

**Analyse der proteolytischen Prozessierung und der
Bindungscharakteristika von Bindepotein-2 und -4
der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren
aus humanem Hämofiltrat**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biochem. Silke Mark

geboren am 07. Juni 1973 in Homberg/Efze

2002

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Otto

Tag der Promotion: 07.02.2002

Meinen Eltern gewidmet

Zusammenfassung: Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und biochemische Charakterisierung natürlich vorkommender Fragmente von IGFBP-2- und -4 aus humanem Hämofiltrat. Die Aufreinigung der Fragmente erfolgte durch aufeinanderfolgende chromatographische Schritte anhand ihrer Immunreaktivität, ihrer Molekularmassen sowie ihrer IGF-I-Bindungsfähigkeit. Es konnte eine Vielzahl verschiedener C-terminaler IGFBP-2-Fragmente isoliert werden. Die ermittelten Spaltstellen ließen auf eine Plasma-Proteolyse von IGFBP-2 durch Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Proteasen schließen. Verglichen mit rhIGFBP-2 besaßen alle Fragmente eine deutlich verringerte Bindungsaffinität zu IGF-I und -II. Das hauptsächlich vorkommende Fragment IGFBP-2 (167-279) zeigte noch eine signifikante IGF-II-Bindung ($K_d=43$ nM), allerdings nur eine niedrigaffine Bindung von IGF-I ($K_d=495$ nM). Im Rahmen der Aufreinigung von IGFBP-4-Fragmenten konnte sowohl ein N-terminales Fragment IGFBP-4 (4-122) als auch ein C-terminales Fragment IGFBP-4 (136-237) isoliert werden. Die Spaltstellen deuteten darauf hin, daß die Proteolyse von IGFBP-4 im Plasma durch eine Chymotrypsin-ähnliche Protease und durch Kallikrein erfolgt. Das N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) besaß eine deutliche IGF-Bindungsaffinität ($K_d=24$ nM für IGF-I, $K_d=26$ nM für IGF-II), wohingegen das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) nur eine niedrigaffine Bindung zeigte ($K_d=164$ nM für IGF-I, $K_d=184$ nM für IGF-II). Weiterhin konnte die Disulfidverbrückung innerhalb der C-terminalen Domänen von IGFBP-2 und -4 aufgeklärt werden. Die sechs konservierten Cystein-Reste zeigten in beiden Peptiden eine Verknüpfung nach dem Muster 1-2, 3-4 und 5-6.

Schlagworte: IGFBP-2 und -4 – Proteolyse – Bindungsanalyse

Abstract: The subject of this work was the isolation and biochemical characterization of naturally occurring fragments of IGFBP-2 and -4 from human hemofiltrate. The purification of IGFBP fragments was performed by consecutive chromatographic steps guided by immunoreactivity, molecular masses, and the ability of the fragments to bind IGF-I. A variety of C-terminal IGFBP-2-fragments was isolated. The determined cleavage sites suggested plasma proteolysis of IGFBP-2 by trypsin- and chymotrypsin-like proteases. Compared to rhIGFBP-2, all isolated fragments showed a significantly reduced binding affinity for IGF-I and -II. The mainly occurring fragment IGFBP-2 (167-279) still revealed significant binding to IGF-II ($K_d=43$ nM), but only low affinity binding to IGF-I ($K_d=495$ nM). The screening for IGFBP-4 peptides resulted in the isolation of a N-terminal fragment IGFBP-4 (4-122) as well as a C-terminal fragment IGFBP-4 (136-237). From the cleavage sites plasma proteolysis of IGFBP-4 by a chymotrypsin-like protease and kallikrein can be concluded. Binding analysis showed significant IGF binding affinities of the N-terminal fragment IGFBP-4 (4-122) ($K_d=24$ nM for IGF-I, $K_d=26$ nM for IGF-II), whereas the C-terminal fragment IGFBP-4 (136-237) bound to both IGFs only with low affinity ($K_d=164$ nM for IGF-I, $K_d=184$ nM for IGF-II). Furthermore, the disulfide bonding pattern within the C-terminal domains of IGFBP-2 and -4 was determined. The six conserved cysteine residues in both peptides were found to be bridged in the pattern 1-2, 3-4, and 5-6.

Keywords: IGFBP-2 and -4 – proteolysis – binding analysis

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	HÄMOFILTRAT ALS QUELLE BIOLOGISCH AKTIVER PEPTIDE.....	1
1.2	DAS SYSTEM DER INSULIN-ÄHNLICHEN WACHSTUMSFAKTOREN	2
1.2.1	<i>Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren.....</i>	3
1.2.2	<i>Die Rezeptoren der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren</i>	4
1.2.3	<i>Die Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren.....</i>	5
1.2.4	<i>Proteolyse der Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren</i>	7
1.3	FUNKTION UND WIRKUNGSWEISE DER BINDEPROTEINE DER INSULIN-ÄHNLICHEN WACHSTUMSFAKTOREN	9
1.3.1	<i>Speicherung der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren</i>	9
1.3.2	<i>Regulation der Bioverfügbarkeit der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren</i>	9
1.3.3	<i>Modulation der Wirkung der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren.....</i>	10
1.3.4	<i>Intrinsische Wirkungen</i>	11
1.4	DIE BINDEPROTEINE DER INSULIN-ÄHNLICHEN WACHSTUMSFAKTOREN IM SERUM.....	12
1.5	AUFGABENSTELLUNG	15
2	MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1	PRÄPARATION DER HÄMOFILTRAT-PEPTIDBANK.....	16
2.2	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	16
2.2.1	<i>RP-HPLC</i>	17
2.2.2	<i>Kationenaustausch-HPLC.....</i>	18
2.2.3	<i>Isolierung von IGFBP-Fragmenten</i>	19
2.2.3.1	<i>Aufreinigung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279)</i>	19
2.2.3.2	<i>Aufreinigung eines C-terminalen IGFBP-2-Fragments mit einer molekularen Masse von 12875 Da... 20</i>	20
2.2.3.3	<i>Aufreinigung des Fragments IGFBP-2 (104-289).....</i>	21
2.2.3.4	<i>Aufreinigung des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237)</i>	22
2.2.3.5	<i>Aufreinigung des N-terminalen Fragments IGFBP-4 (4-122)</i>	23
2.3	ANALYTISCHE METHODEN	24
2.3.1	<i>Massenspektrometrische Methoden</i>	24
2.3.1.1	<i>MALDI-TOF - Massenspektrometrie.....</i>	24
2.3.1.2	<i>ESI - Massenspektrometrie.....</i>	25
2.3.2	<i>Kapillarzonelektrophorese</i>	25
2.3.3	<i>Sequenzanalyse</i>	26
2.3.4	<i>Aminosäurenanalyse</i>	26
2.4	IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	27
2.4.1	<i>Western-Immunoblot.....</i>	28
2.4.1.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	28
2.4.1.2	<i>Transfer auf die Membran</i>	29
2.4.1.3	<i>Färbung des Blots.....</i>	30

2.4.2	Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA).....	31
2.5	BINDUNGSANALYSE.....	32
2.5.1	Liganden-Blot-Analyse.....	32
2.5.2	Bestimmung der IGF-I-Bindungsaffinität durch Sättigungsexperimente	33
2.5.2.1	Radioaktive Markierung von Peptiden mit ¹²⁵ Iod.....	33
2.5.2.2	Sättigungsexperimente mittels Polyethylenglycol (PEG) - Fällung.....	34
2.5.3	Bestimmung der IGF-II-Bindungsaffinität durch BIACore-Analyse.....	35
2.6	PROTEOLYTISCHER VERDAU ZUR AUFKLÄRUNG DER DISULFIDVERBRÜCKUNG.....	35
2.7	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND PEPTIDE.....	36
3	ERGEBNISSE	38
3.1	SCREENING DER HÄMOFILTRAT-PEPTIDBANK NACH IGF-I-BINDENDEN PEPTIDEN.....	38
3.2	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON IGFBP-2-FRAGMENTEN AUS HUMANEM HÄMOFILTRAT....	39
3.2.1	Screening der Hämofiltrat-Peptidbank nach IGFBP-2-Immunreaktivitäten	39
3.2.2	Isolierung verschiedener C-terminaler Fragmente von IGFBP-2	42
3.2.2.1	Isolierung und biochemische Charakterisierung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167–279)	43
3.2.2.2	Isolierung eines IGFBP-2-Fragments mit einer molekularen Masse von 12875 Da.....	48
3.2.2.3	Isolierung und biochemische Charakterisierung des Fragments IGFBP-2 (104-289).....	50
3.2.2.4	Identifizierung weiterer C-terminaler IGFBP-2-Fragmente.....	55
3.2.2.5	Übersicht über die isolierten C-terminalen IGFBP-2-Fragmente	57
3.2.3	Aufklärung der Disulfidverbrückung des isolierten C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279) 60	
3.2.4	Untersuchung der Bindungscharakteristika der isolierten IGFBP-2-Fragmente	62
3.2.4.1	Liganden-Blot-Analyse der isolierten IGFBP-2-Fragmente	63
3.2.4.2	Bestimmung der Bindungsaffinität der isolierten IGFBP-2-Fragmente für IGF-I.....	65
3.2.4.3	Bestimmung der Bindungsaffinität der isolierten IGFBP-2-Fragmente für IGF-II.....	67
3.2.4.4	Übersicht über die bestimmten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d	68
3.3	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON IGFBP-4-FRAGMENTEN AUS HUMANEM HÄMOFILTRAT....	69
3.3.1	Screening der Hämofiltrat-Peptidbank nach IGFBP-4-Immunreaktivitäten	69
3.3.2	Isolierung und Charakterisierung von IGFBP-4-Fragmenten.....	70
3.3.2.1	Isolierung und biochemische Charakterisierung des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237).....	70
3.3.2.2	Isolierung und Charakterisierung des verkürzten N-terminalen Fragments IGFBP-4 (4-122)	74
3.3.3	Aufklärung der Disulfidverbrückung des isolierten C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237) 77	
3.3.4	Untersuchung der Bindungscharakteristika der isolierten IGFBP-4-Fragmente.....	79
3.3.4.1	Bestimmung der Bindungsaffinität der isolierten IGFBP-4-Fragmente für IGF-I.....	79
3.3.4.2	Bestimmung der Bindungsaffinität der isolierten IGFBP-4-Fragmente für IGF-II	80
3.3.4.3	Übersicht über die bestimmten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d	82
4	DISKUSSION	83
4.1	ISOLIERUNG VON IGFBP-FRAGMENTEN AUS HUMANEM HÄMOFILTRAT	83
4.1.1	Proteolyse der IGFBPs	85
4.1.2	Bedeutung der Bindungsaffinität der IGFBP-Fragmente	87
4.2	ISOLIERTE FRAGMENTE VON IGFBP-2	88
4.2.1	Proteolytische Prozessierung von IGFBP-2	89

4.2.2	<i>Bindungseigenschaften der isolierten IGFBP-2-Fragmente</i>	93
4.3	ISOLIERTE FRAGMENTE VON IGFBP-4	96
4.3.1	<i>Proteolytische Prozessierung von IGFBP-4</i>	97
4.3.2	<i>Bindungseigenschaften der isolierten IGFBP-4-Fragmente</i>	100
4.4	AUFKLÄRUNG DER DISULFIDVERBRÜCKUNG IN DEN C-TERMINALEN DOMÄNEN VON IGFBP-2 UND -4	102
4.5	MÖGLICHE BEDEUTUNG DER IGFBPs IM ORGANISMUS	102
4.5.1	<i>Mögliche Funktion und Wirkung von IGFBP-2</i>	103
4.5.2	<i>Mögliche Funktion und Wirkung von IGFBP-4</i>	105
5	ZUSAMMENFASSUNG	107
6	LITERATURVERZEICHNIS	109

ANHANG

1 Einleitung

1.1 Hämofiltrat als Quelle biologisch aktiver Peptide

Peptide sind als Hormone, Wachstumsfaktoren, Neuropeptide oder Immunmodulatoren an vielen regulatorischen Prozessen im Organismus beteiligt. Die Identifizierung und Charakterisierung biologisch aktiver Peptide hat somit sowohl für die medizinisch orientierte Grundlagenforschung als auch für die Therapie und Diagnostik verschiedener Erkrankungen eine große Bedeutung. Als prominente Beispiele sind der therapeutische Einsatz von Insulin zur Behandlung von Diabetes mellitus und von β -Interferon zur Behandlung von Multipler Sklerose zu nennen.

Die IPF PharmaCeuticals GmbH hat sich zur Aufgabe gemacht, biologisch aktive Formen von Peptiden zu isolieren und ihre Wirkungsmechanismen aufzuklären. Die identifizierten Peptide werden anschließend hinsichtlich ihrer möglichen klinischen Relevanz und Anwendungsmöglichkeit untersucht und stehen dann entweder in direkter Form oder als Leitstruktur zur Entwicklung von Arzneimitteln zur Verfügung.

Zur Peptidisolierung steht neben Peptidbibliotheken aus verschiedenen Geweben eine Peptidbank aus humanem Hämofiltrat zur Verfügung (Schulz-Knappe *et al.*, 1997).

Blut stellt als zentrale Körperflüssigkeit eine umfassende Quelle zur Isolierung regulatorischer Peptidwirkstoffe dar (Forssmann *et al.*, 1993), da diese entweder als endokrine Faktoren direkt in den Blutstrom sezerniert werden oder als parakrine, autokrine und neurokrine Substanzen durch Diffusion in den intravasalen Raum gelangen (Forssmann, 1996). Ein großer Vorteil für die Isolierung von Peptiden aus Blutflüssigkeit besteht weiterhin darin, daß die Peptide in ihrer posttranslational modifizierten und somit authentisch prozessierten Form vorliegen.

Vergleiche zwischen Hämofiltrat und Blutplasma zeigen, daß die Zusammensetzung beider Flüssigkeiten in Bezug auf Proteine, Peptide und Aminosäuren bis zu einer Größenordnung von 10 kDa weitgehend übereinstimmt (Schepky *et al.*, 1994). Darüberhinaus besitzt Hämofiltrat gegenüber Blutplasma den Vorteil, daß es als Abfallprodukt in nephrologischen Zentren anfällt und somit in großen Mengen erhältlich ist. Aus diesem Grund können selbst

Peptide, die nur in pico- bis femtomolaren Konzentrationen zirkulieren, noch in Reinform gewonnen und bezüglich ihrer Primärstruktur aufgeklärt werden (Schulz-Knappe *et al.*, 1996).

Zur Gewinnung der Peptide aus Hämofiltrat ist eine Extraktionsmethode im Großmaßstab optimiert und standardisiert worden (Schulz-Knappe *et al.*, 1997). Dabei entsteht aus 10 000 l Hämofiltrat eine Peptidbank mit 300 bis 500 Fraktionen, aus der eine systematische und reproduzierbare Isolierung von Peptidwirkstoffen möglich ist.

1.2 Das System der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Das System der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin-like growth factors, IGFs) besteht aus mehreren Komponenten. Neben den beiden Wachstumsfaktoren IGF-I und -II zählen dazu spezifische Zelloberflächenrezeptoren und Bindeproteine (Insulin-like growth factor binding proteins, IGFBPs) sowie spezifische IGFBP-Proteasen (Hwa *et al.*, 1999).

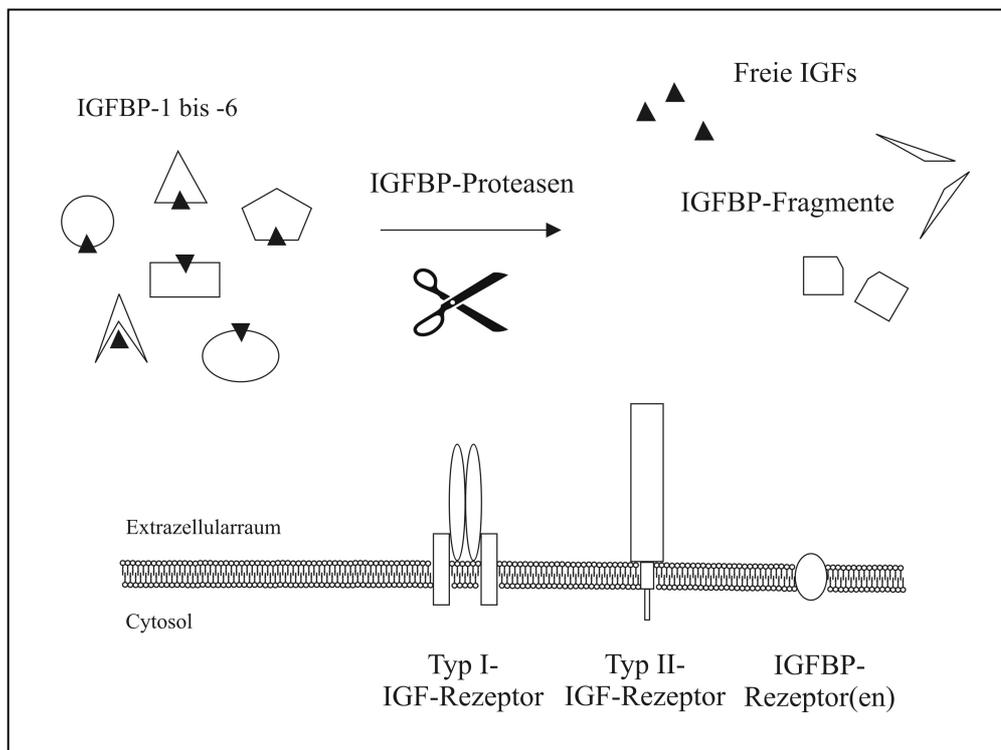


Abbildung 1:

Schematische Darstellung des Systems der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren. Dazu zählen neben den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und -II selbst ihre Bindeproteine IGFBP-1 bis -6, spezifische IGFBP-Proteasen sowie spezifische Zelloberflächenrezeptoren. (nach: Hwa *et al.*, 1999).

Die IGFs besitzen im Organismus vielfältige sowohl auto- und parakrine als auch endokrine Wirkungen. Diese werden durch die Wechselwirkung der freien IGFs mit ihren spezifischen Zelloberflächenrezeptoren vermittelt. Die Kontrolle der Verfügbarkeit an freien IGFs erfolgt durch die Familie der IGF-BPs. Diese besitzen die Fähigkeit, eine hochaffine Bindung mit den IGFs einzugehen. Da die Bindungsaffinität der IGF-BPs für die IGFs höher ist als die Affinität der IGFs für ihre Rezeptoren (McCusker *et al.*, 1991), liegen die IGFs größtenteils in IGF/IGFBP-Komplexen vor (Shimasaki & Ling, 1991). Die Freisetzung der komplexierten IGFs kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen (Zapf, 1995). Dazu zählen die Bindung der IGF-BPs an die Zelloberfläche oder an die extrazelluläre Matrix, Phosphorylierung oder Dephosphorylierung sowie die proteolytische Prozessierung der IGF-BPs durch spezifische IGF-BP-Proteasen. Weiterhin sind neuerdings auch IGF-unabhängige Wirkungen der IGF-BPs und ihrer proteolytischen Fragmente beschrieben worden (Lalou *et al.*, 1996; Mohensi-Zadeh & Binoux, 1997).

1.2.1 Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und -II werden in nahezu allen Geweben gebildet (Murphy *et al.*, 1987) und besitzen ein weites Wirkungsspektrum. *In vitro* fördern sie sowohl Zellwachstum und –überleben als auch Migration und Differenzierung verschiedener Zellsysteme (Jones & Clemmons, 1995). Auch *in vivo* verfügen die IGFs über verschiedene anabole Effekte. Dabei fungieren sie nicht nur als lokale Wachstumsfaktoren, sondern besitzen auch systemische Wirkungen. So üben sie beispielsweise Insulin-ähnliche Effekte aus und sind essentiell für ein normales fetales und postnatales Wachstum (Daughaday & Rotwein, 1989).

Die Sekretion der IGFs wird überwiegend para- und autokrin reguliert, unterliegt aber auch endokriner Kontrolle (Clemmons, 1989). Die endokrine Regulation des IGF-I-Spiegels im Blut erfolgt dabei hauptsächlich durch das Wachstumshormon (growth hormone, GH). Die Kontrolle durch GH unterliegt wiederum einem negativen Rückkopplungsmechanismus, indem IGF-I die GH-Sekretion der Hypophyse hemmt. Die Serumkonzentration der IGFs wird weiterhin durch verschiedene physiologische und pathophysiologische Zustände beeinflusst. Dazu zählen unter anderem Faktoren wie Alter, Geschlecht, eventuelle Schwangerschaft und der Ernährungszustand (Rajaram *et al.*, 1997).

Strukturell bestehen beide IGFs aus einer einzigen Polypeptidkette und zeigen eine signifikante Homologie zu Insulin (Humbel, 1990). IGF-I setzt sich aus 70 Aminosäuren zusammen, während IGF-II aus 67 Aminosäuren besteht. Beide Wachstumsfaktoren besitzen zwei homologe, konservierte Domänen im Bereich des C- und des N-Terminus. Diese werden als A- und B-Domäne bezeichnet und sind durch eine nicht konservierte Peptidregion verbunden. Die verschiedenen Domänen werden dabei durch eine charakteristische Struktur aus drei Disulfidbrücken verknüpft.

1.2.2 Die Rezeptoren der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Die Wirkung der IGFs wird durch spezifische Zelloberflächenrezeptoren vermittelt, wobei die Rezeptoren von IGF-I und -II große strukturelle Unterschiede aufweisen.

Der Typ-I-IGF-Rezeptor (Insulin-like growth factor -type 1-receptor, IGF1R) gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren (Ullrich *et al.*, 1986). Er wird aus einem Heterotetramer gebildet, welches sich aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten zusammensetzt. Während sich die α -Untereinheit im Extrazellularraum befindet und die Peptidbindungsstelle enthält, umfaßt die β -Untereinheit sowohl den transmembranären als auch den cytosolischen Bereich mit der charakteristischen Tyrosinkinase-Aktivität. Trotz deutlicher struktureller Homologie des IGF1R zu dem Insulin-Rezeptor besitzen beide Rezeptoren eine hohe Spezifität. So bindet der IGF1R bevorzugt IGF-I. Während die Bindungsaffinität für IGF-II nur leicht verringert ist, wird Insulin nur noch sehr schwach gebunden (Steele-Perkins *et al.*, 1988).

Der Typ-II-IGF-Rezeptor besteht im Gegensatz zu dem IGF1R nur aus einer einzigen Polypeptidkette. Er stellt ein multifunktionelles Protein dar und ist identisch mit dem Kationen-unabhängigen Mannose-6-phosphat-Rezeptor (Kiess *et al.*, 1987). Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 300 kDa. Die Bindung von IGF-II erfolgt mit hoher Affinität. Die Bindungsaffinität des Rezeptors für IGF-I ist signifikant reduziert, wohingegen Insulin gar nicht gebunden wird (Nissley & Rechler, 1984).

Die exakte Funktion des Typ-II-Rezeptors bezüglich des IGF-Systems konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden, da die anabolen, mitogenen und proliferativen Wirkungen der IGFs meist über den IGF-I-Rezeptor vermittelt sind (Kiess *et al.*, 1987).

1.2.3 Die Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Eine weitere wichtige Rolle im IGF-System übernehmen die Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin-like growth factor binding proteins, IGFBPs). Es handelt sich bei den IGFBPs um eine Proteinfamilie mit bislang sechs bekannten Mitgliedern, die als IGFBP-1 bis -6 bezeichnet werden. Sie werden in einer Vielzahl von Geweben gebildet und können in vielen verschiedenen biologischen Flüssigkeiten detektiert werden. Sie kommen im interstitiellen und intravasalen Raum vor und fungieren dort als Transport- und Speicherproteine der IGFs. Darüberhinaus modulieren sie die Bioaktivität der IGFs (Übersicht in: Rajaram *et al.*, 1997).

Allen IGFBPs ist ein struktureller Aufbau aus drei Domänen ungefähr gleicher Größe gemeinsam. Sie besitzen globuläre, hochkonservierte C- und N-terminale Domänen, welche durch eine variable mittlere Region verbunden sind (Spencer & Chan, 1995). Während die mittlere Verbindungsregion keine Disulfidbrücken enthält, sind die C- und N-terminalen Domänen Cystein-reich und verfügen über eine konservierte Disulfidbrückenstruktur innerhalb der jeweiligen Domänen. Die C-terminale Region besitzt dabei eine charakteristische Struktur aus drei Disulfidbrücken, die N-terminale Region umfaßt sechs Disulfidbrücken. Ausnahmen bilden IGFBP-4 mit zwei zusätzlichen Cysteinen und IGFBP-6 mit zwei Cysteinen weniger in der N-terminalen Domäne (Hwa *et al.*, 1999).

Strukturelle Eigenschaft	Bindeprotein
Glykosylierung	
• N-Glykosylierung	IGFBP-3, -4
• O-Glykosylierung	IGFBP-5, -6
Phosphorylierung	IGFBP-1, -3
RGD-Epitop	IGFBP-1, -2
Heparin-Bindungsdomäne	IGFBP-3, -5, -6
Kern-Lokalisations-Signal	IGFBP-3, -5

Tabelle 1 Übersicht über die strukturellen Eigenschaften der einzelnen IGFBPs. Dargestellt sind bekannte posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung sowie verschiedene Sequenz-Motive (nach: Rechler & Clemmons, 1998).

Trotz der Übereinstimmung im Grundaufbau besitzen die einzelnen IGF-BPs verschiedene strukturelle Besonderheiten in Form von posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung sowie in Form unterschiedlicher Sequenz-Motive. Eine Übersicht über die strukturellen Eigenschaften der einzelnen IGF-BPs gibt Tabelle 1.

Alle IGF-BPs sind durch die Fähigkeit charakterisiert, eine hochaffine Bindung mit den IGFs einzugehen. Dabei zeigen die einzelnen Bindeproteine jedoch Unterschiede bezüglich ihrer Bindungseigenschaften. So besitzt IGF-BP-6 eine deutlich höhere Affinität zu IGF-II als zu IGF-I. Auch bei IGF-BP-2 ist die Bindungsaffinität für IGF-II gegenüber der für IGF-I leicht erhöht (Roghani *et al.*, 1991). Alle anderen IGF-BPs binden IGF-I und -II mit annähernd gleicher Affinität. Da die Bindungsaffinität der IGFs für die IGF-BPs höher ist als die der IGFs für ihre Rezeptoren (McCusker *et al.*, 1991), liegt der Hauptanteil der IGFs im Blut und in den Geweben in Form von IGF/IGF-BP-Komplexen vor (Shimasaki & Ling, 1991). Durch das molare Verhältnis IGF/IGF-BP kann dabei die Konzentration an freien IGFs und damit auch deren Verfügbarkeit für die umliegenden Gewebe und Zielzellen reguliert werden.

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Veränderung der Bindungsaffinität der IGF-BPs durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Proteolyse sowie durch Assoziation mit der Zelloberfläche oder der Extrazellulärmatrix (Zapf, 1995).

Während die Phosphorylierung von IGF-BP-3 keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften zu haben scheint (Coverley *et al.*, 2000), konnte für IGF-BP-1 gezeigt werden, daß die phosphorylierte Form eine 6fach erhöhte Bindungsaffinität für IGF-I besitzt (Jones *et al.*, 1991). Weiterhin wurde beschrieben, daß die Bindung von IGF-BP-5 an die Extrazellulärmatrix oder von IGF-BP-2 und -3 an Moleküle der Zelloberfläche die Bindung zu den IGFs verringert (Devi *et al.*, 2000; Yamanaka *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1997). Ein Mechanismus der allen IGF-BPs gemeinsam ist, ist eine Abnahme der Bindungsaffinität durch limitierte Proteolyse.

Die Regulation der IGF-BP-Expression findet sowohl systemisch als auch lokal statt und unterliegt der Kontrolle einer Vielzahl von Hormonen und Wachstumsfaktoren. Dabei ist die Bildung der IGF-BPs vom Alter sowie der physiologischen und pathophysiologischen Konstitution abhängig (Übersicht in: Rajaram *et al.*, 1997).

Kürzlich konnte eine weitere Proteinfamilie beschrieben werden, die zum IGF-System gezählt wird. Es handelt sich dabei um die sogenannten IGFBP-rPs (Insulin-like growth factor binding proteins – related proteins). Diese besitzen eine signifikante Homologie zu der N-terminalen Domäne der IGFBPs. Während sie die IGFs im Gegensatz zu den IGFBPs nur mit geringer Affinität binden, sind die IGFBP-rPs zu einer hochaffinen Bindung von Insulin befähigt (Übersicht in: Hwa *et al.*, 1999).

1.2.4 Proteolyse der Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Die Konzentration und damit verbunden auch die biologische Aktivität der IGFBPs wird nicht nur auf Expressionsebene sondern auch durch ihren proteolytischen Abbau reguliert (Fowlkes & Freemark, 1992). Dieser erfolgt durch spezifische IGFBP-Proteasen.

Die resultierenden IGFBP-Fragmente besitzen eine verringerte Affinität zu den IGFs (Zapf, 1995), so daß die IGFs aus den IGF/IGFBP-Komplexen freigesetzt werden. Die freien IGFs können anschließend mit ihren Rezeptoren in Wechselwirkung treten und ihre biologische Wirkung entfalten (Claussen *et al.*, 1997). Die kontrollierte proteolytische Prozessierung der Bindeproteine ist somit essentiell für die Regulation der Bioverfügbarkeit der IGFs in der Zirkulation und auf zellulärer Ebene (Claussen *et al.*, 1997).

Die Bedeutung der Proteolyse zur Erhöhung der IGF-Bioverfügbarkeit zeigt sich auch darin, daß bei erhöhten IGF-Bedarf im Organismus – beispielsweise bei akuter und chronischer Krankheit, nach Operationen oder in der Schwangerschaft - eine erhöhte Proteaseaktivität im Serum zu finden ist (Rajaram *et al.*, 1997).

Bei der Regulation der autokrinen und parakrinen Wirkung der IGFs werden die spezifischen Proteasen oft von den Zellen selbst sezerniert (Conover *et al.*, 1995; Imai *et al.*, 1997). Dabei kann die Expression der IGFBP-Proteasen durch verschiedene lokale Wachstumsfaktoren wie TGF β (transforming growth factor beta) (Durham *et al.*, 1994; Menouny *et al.*, 1997), bFGF (basic fibroblast growth factor) (Russo *et al.*, 1999) oder auch den IGFs selbst (Conover *et al.*, 1995) reguliert werden. Weiterhin ist die Expression der spezifischen IGFBP-Proteasen vom Entwicklungs- und Differenzierungszustand abhängig. Beispielsweise zeigt sich während der osteoblastären Entwicklung ein spezifischer Expressionsverlauf von IGFBP-5 und einer dazugehörigen IGFBP-5-Protease (Thraikill *et al.*, 1995).

Darüberhinaus wurde auch eine IGF-abhängige Regulation des proteolytischen Abbaus von IGFBP-4 durch eine Metallionen-abhängige Serinprotease in den konditionierten Medien verschiedener Zelllinien beschrieben (Conover *et al.*, 1995). Die Aktivierung der IGFBP-4-spezifischen Protease erfolgt dabei direkt durch die Bindung von IGF an IGFBP-4. Als Mechanismus wird angenommen, daß die Bindung von IGF eine Änderung der IGFBP-4-Konformation bewirkt, so daß die proteolytische Spaltung erleichtert wird (Conover *et al.*, 1995; Durham *et al.*, 1994).

Spezifische IGFBP-Proteaseaktivität konnte bereits in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten wie Serum (Kübler *et al.*, 1998), Milch (Elmlinger *et al.*, 1999) oder Samenflüssigkeit, aber auch in konditionierten Medien verschiedenster Zelltypen nachgewiesen werden (Conover *et al.*, 1995; Coverley *et al.*, 2000). Allerdings sind die dazugehörigen Proteasen bislang nur unzureichend identifiziert worden. Die Charakterisierung der Proteasen beschränkt sich meist auf *in vitro* durchgeführte Inhibitorstudien. Aufgrund der Ergebnisse solcher Studien können die IGFBP-Proteasen in die Gruppen der Serin-, Metallo- und Aspartylproteasen eingestuft werden.

Zu bekannten Serin-Proteasen, für die eine Proteolyse der IGFBPs nachgewiesen werden konnte, gehören unter anderem das Prostata-spezifische Antigen (prostate-specific antigen, PSA) (Cohen *et al.*, 1994) sowie Plasmin (Menouny *et al.*, 1997).

Weiterhin wurde die Familie der Matrix-Metalloproteasen (matrix metalloproteinase, MMP) mit dem IGF-System in Verbindung gebracht (Fowlkes *et al.*, 1995). Für IGFBP-5 konnte weiterhin eine Zn^{2+} -abhängige Metalloprotease nachgewiesen werden, die nicht zur Familie der MMPs gehört und durch das Follikel-stimulierende Hormon induziert wird (Resnick *et al.*, 1998).

Auch können die IGFBPs *in vitro* durch die lysosomale Aspartylprotease Cathepsin D gespalten werden (Conover *et al.*, 1994; Claussen *et al.*, 1997). Da Cathepsin *in vitro* ebenfalls dazu in der Lage ist, die IGFs zu spalten, wird dieser Protease allerdings eher eine Rolle im intrazellulären Abbau der IGFs und IGFBPs zugeschrieben.

Die proteolytische Spaltung der IGFBPs erfolgt in der variablen mittleren Region der IGFBPs (Chernausk *et al.*, 1995). Dadurch entstehen Fragmente, die entweder die C- oder die N-terminale Domäne und einen Teil der mittleren Domäne umfassen (Chernausk *et al.*, 1995).

Posttranslationale Modifikationen der IGF-BPs wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen kommen hauptsächlich in der mittleren Domäne der IGF-BPs vor. Allerdings konnte bislang mit Ausnahme der Phosphorylierung von IGF-BP-1 kein Einfluß dieser Modifikationen auf das Bindungsverhalten der IGF-BPs zu den IGFs festgestellt werden. Es wird postuliert, daß diese Modifikationen eine Rolle bei der Regulation der proteolytischen Prozessierung der IGF-BPs spielen. So konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von IGF-BP-3 die Resistenz des Moleküls gegenüber Plasmin erhöht (Coverley *et al.*, 2000).

Durch die Spaltung der IGF-BPs in der variablen Verbindungsregion kann weiterhin die Spezifität der Proteasen erklärt werden.

1.3 Funktion und Wirkungsweise der Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

1.3.1 Speicherung der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Eine wichtige Funktion der IGF-BPs besteht in der Speicherung der IGFs. Dabei schützen die IGF-BPs die IGFs durch ihre hochaffine Bindung vor einem Abbau durch extrazelluläre Proteasen und verlängern dadurch die IGF-Halbwertszeit (Guler *et al.*, 1989).

In der Zirkulation kommt die wichtigste Rolle bei der Speicherung der IGFs IGF-BP-3 als einer Komponente des 150 kDa-Komplexes zu (vgl. Abschnitt 1.4), da dieser das größte Reservoir an IGFs im Organismus darstellt (Zapf, 1995). Neuerdings wird einzelnen IGF-BPs auch eine Rolle bei der Speicherung der IGFs auf lokaler Ebene zugeschrieben. So wird postuliert, daß IGF-BP-5 die IGFs in der Extrazellulärmatrix des Knochengewebes fixieren kann (Bautista *et al.*, 1991). Dieser Lagerung der IGFs im Knochen könnte eine wichtige Aufgabe während des permanenten Knochenumbaus zukommen. Durch eine Freisetzung des Komplexes in der osteoklastären Knochenresorptionsphase könnte so unmittelbar der anschließende Knochenaufbau durch die Osteoblasten gefördert werden (Hayden *et al.*, 1995).

1.3.2 Regulation der Bioverfügbarkeit der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Eine weitere wichtige Funktion der IGF-BPs ist die Regulation der IGF-Verfügbarkeit. Der größte Anteil der IGFs im Organismus liegt in gebundener Form vor und kann somit nicht mit

den IGF-Rezeptoren in Wechselwirkung treten und eine biologische Wirkung entfalten. Durch Proteolyse der IGF-BPs und einer damit verbundenen Freisetzung der IGFs kann die Verfügbarkeit an freien IGFs sowohl systemisch als auch lokal reguliert werden.

In der Zirkulation kommt es zunächst zu einer Spaltung des 150 kDa-Komplexes (vgl. Abschnitt 1.4), aus dem anschließend die IGFs freigesetzt werden. Die freien IGFs können daraufhin entweder direkt in die umliegenden Gewebe wandern oder an ein Gewebe-spezifisches IGF-BP gebunden und somit kontrolliert in verschiedene Gewebe transportiert werden (Zapf, 1995). So konnte beispielsweise ein Gewebe-spezifischer Transport von IGF-I durch IGF-BPs am isoliert perfundierten Rattenherzen gezeigt werden (Bar *et al.*, 1990). Auf lokaler Ebene erfolgt weiterhin eine Gewebe-spezifische Freisetzung verschiedener IGF-BP-Proteasen. Durch die Degradation der IGF-BPs werden die gebundenen IGFs aus ihren Komplexen freigesetzt. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der lokalen IGF-Konzentration und einer damit verbundenen Gewebe-spezifischen Wachstumsstimulation.

1.3.3 Modulation der Wirkung der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Weiterhin besitzen die IGF-BPs die Fähigkeit, die Wirkung der IGFs zu modulieren. Dabei ist sowohl eine Inhibition als auch eine Verstärkung der IGF-stimulierten Prozesse möglich.

Die Inhibition der IGF-vermittelten Wirkung wird durch die hochaffine Bindung der IGFs an die IGF-BPs und einer daraus resultierenden Verringerung der IGF-Verfügbarkeit hervorgerufen. Als Beispiele seien hier die Wachstumsinhibition von Colon-Karzinomzellen (Culouscou & Shayab, 1991) sowie von Fibroblasen (Conover *et al.*, 1995) durch IGF-BP-4 genannt.

Hingegen konnte der genaue Mechanismus der Verstärkung der IGF-stimulierten Prozesse bislang nicht aufgeklärt werden. Allerdings scheint die Verstärkung generell mit einer Abnahme der Bindungsaffinität der IGF-BPs zu den IGFs verbunden zu sein (Zapf, 1995).

Eine Verringerung der Bindungsaffinität kann dabei zum einen durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Proteolyse hervorgerufen werden. So konnte für IGF-BP-1 gezeigt werden, daß die phosphorylierte Form eine 6fach höhere Bindungsaffinität als die nicht phosphorylierte Form besitzt (Jones *et al.*, 1991). Während die nicht phosphorylierte Form von IGF-BP-1 die DNA-Synthese in glatten Muskelzellen verstärkt, konnten für die phosphorylierte nur inhibitorische Wirkungen beobachtet werden.

Zum anderen wird die Bindungsaffinität der IGF-BPs zu den IGFs durch Assoziation der IGF-BPs mit Komponenten der Extrazellulärmatrix oder der Zelloberfläche verringert (Russo *et al.*, 1997). Es kommt so zu einer langsamen, kontrollierten Freisetzung der IGFs in den perizellulären Raum, wodurch eine effektivere Wirkung der IGFs erreicht wird. Da die Bindung der IGF/IGF-BP-Komplexe dabei nur an speziellen Zellen erfolgt, können die IGFs weiterhin gezielt ihren Rezeptoren präsentiert werden (Russo *et al.*, 1997).

Weitere Beispiele für eine Verstärkung der IGF-vermittelten Prozesse *in vitro* sind die Stimulation der IGF-induzierten DNA-Synthese in osteoblastären Zellen durch IGF-BP-5 (Andress & Birnbaum, 1992) sowie die Förderung des Wachstums von Fibroblasten durch IGF-BP-3 (Conover, 1991).

Auch *in vivo* kann eine Verstärkung der IGF-induzierten Wirkungen durch IGF-BPs beobachtet werden. So wird durch die Gabe von IGF-BP-1/IGF-II- bzw. IGF-BP-3/IGF-I-Komplexen eine schnellere Wundheilung bewirkt als durch die Gabe einer entsprechenden Menge der unkomplexierten IGFs (Debroy *et al.*, 1999). Auch kann nach systemischer Applikation von IGF-BP-4 oder -5 eine erhöhte Bildung von osteoblastären Markern wie Osteokalzin beobachtet werden (Richman *et al.*, 1999; Miyakoshi *et al.*, 2001).

Mögliche Gründe für die erhöhte Wirksamkeit von IGF/IGF-BP-Komplexen verglichen mit einer gleichen Menge an freien IGFs können neben einer langsamen, kontrollierten Freisetzung der IGFs aus ihrem Komplexen auch in einer verringerten Degradation der freien IGFs gesucht werden. Weiterhin wäre es denkbar, daß der Komplex keine Auswirkung auf die Expression des IGF1R besitzt, während die Applikation einer größeren Menge an freiem IGF eine Herunterregulation des IGF1R bewirkt. In Bezug auf IGF-BP-4 konnte ein Protease-vermittelter Prozess aufgeklärt werden, der zu einer Erhöhung von Markern der Knochenbildung führt (Miyakoshi *et al.*, 2001).

1.3.4 Intrinsische Wirkungen

Neben der Modulation der IGF-induzierten Effekte besitzen die IGF-BPs auch intrinsische Wirkungen, die keine Aktivierung des IGF1R involvieren (Oh *et al.*, 1993). IGF1R-unabhängige Effekte können dabei sowohl von Gesamtbindeproteinen als auch von proteolytischen IGF-BP-Fragmenten ausgehen. Allerdings konnten bislang nur für IGF-BP-1, -3 und -5 intrinsische Wirkungen gezeigt werden.

Dazu zählt beispielsweise die Stimulation der Zellmigration von glatten Muskelzellen und von CHO-Zellen durch IGF-BP-1 (Jones *et al.*, 1993). Für IGF-BP-5 konnte eine direkte

Stimulation der Migration von Mesangial-Zellen gezeigt werden (Abrass *et al.*, 1997), wobei die Wirkung über die Heparin-Bindungsdomäne vermittelt wurde. Neben stimulatorischen Wirkungen konnten auch inhibitorische Wirkungen beobachtet werden. So konnte für IGFBP-3 eine Inhibition des Wachstums von Fibroblasten gezeigt werden, die keinen IGF1R mehr exprimierten (Valentinis *et al.*, 1995). Auch sind IGF-unabhängige, inhibitorische Wirkungen eines IGFBP-3-Fragments beschrieben worden. Zunächst konnte gezeigt werden, daß das IGFBP-3-Fragment die mitogenen Effekte von IGF-I und Insulin inhibieren konnte, obwohl es keine Bindungsaffinität für die IGFs mehr besaß (Lalou *et al.*, 1996). Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß es ebenso in der Lage war, die FGF-stimulierten Effekte in Fibroblasten ohne IGF1R-Expression zu inhibieren (Mohensi-Zadeh & Binoux, 1997).

Die intrinsischen Wirkungen der IGFBPs scheinen rezeptorvermittelt zu sein. Während bekannt ist, daß IGFBP-1 über $\alpha V\beta I$ -Integrin (Fibronectin-Rezeptor) wirkt (Jones *et al.*, 1993), wird für IGFBP-5 ein Zelloberflächenrezeptor mit Serinkinase-Aktivität diskutiert (Andress, 1998). Dieser konnte aber bislang nicht ausreichend charakterisiert werden. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß der Typ V Rezeptor von TGF β bei der Vermittlung der inhibitorischen Wirkung des IGFBP-3-Fragmentes beteiligt ist (Leal *et al.*, 1997).

Interessant scheint bezüglich der intrinsischen Wirkungen der IGFBPs auch, daß für IGFBP-3 und IGFBP-5 eine nukleäre Translokation beobachtet werden konnte (Schedlich *et al.*, 1998). Dabei konnte kürzlich gezeigt werden, daß der Transport in den Zellkern für beide Bindeproteine unter Hydrolyse von GTP und ATP durch Importin β erfolgt (Schedlich *et al.*, 2000).

1.4 Die Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren im Serum

In der Zirkulation liegen die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und -II nahezu vollständig in gebundener Form vor (Abbildung 2).

Dabei ist der größte Anteil von 75-80 % in einem heterotrimeren Komplex von ca. 150 kDa gebunden. Weitere 20-25 % der IGFs werden durch ihre Bindeproteine komplexiert, wodurch binäre IGF/IGFBP-Komplexe mit einer Größe von 40-50 kDa entstehen. Nur <1% der IGFs im Serum kommen in ihrer freien, aktiven Form vor (Guler *et al.*, 1989).

	150 kDa-Komplex	50 kDa-Komplexe	Freie IGFs
	 IGFBP-3/ IGF/ ALS	 IGFBP-1/ IGF IGFBP-2/ IGF IGFBP-4/ IGF IGFBP-5/ IGF/ (ALS) IGFBP-6/ IGF	
Prozentualer Anteil	75-80%	20-25%	<1%
Halbwertszeit	12-16 h	20-30 min	8 min

Abbildung 2:

Relative Verteilung der IGFs zwischen den verschiedenen IGF-Pools und ihre dazugehörigen Halbwertszeiten in humanem Serum (Guler et al., 1989). Der 150 kDa-Komplex ist mit einem prozentualen Anteil von 75-80 % am häufigsten vertreten und besitzt auch die längste Halbwertszeit. Weitere 20-25 % der IGFs liegen in 50 kDa-Komplexen mit den Bindeproteinen-1, -2, -4, -5 und -6 vor. Diese Komplexe besitzen eine deutlich geringere Halbwertszeit und unterliegen einem hohen Umsatz. Es ist schematisch angedeutet, daß der Komplex aus IGFBP-5 und IGF ebenfalls zur Assoziation mit der ALS befähigt ist. Der geringste Anteil der IGFs von <1% liegt in freier Form vor.

Der heterotrimere 150 kDa-Komplex wird aus IGF-I oder -II, IGFBP-3 und der säurelabilen Untereinheit (acid-lable subunit, ALS) gebildet (Rechler & Clemmons, 1998). Bei der ALS handelt es sich um ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von ca. 85 kDa, welches nicht in der Lage ist, die IGFs zu binden. Ihre Aufgabe besteht darin, das Molekulargewicht des Komplexes zu erhöhen. Aufgrund seiner Größe kann der 150 kDa-Komplex das vaskuläre Kompartiment nicht verlassen, so daß er die inaktive Depotform der IGFs im Blut darstellt. Dabei wird sowohl die IGF-Verfügbarkeit für verschiedene Gewebe limitiert als auch eine Ausscheidung der IGFs über den Urin verhindert. Weiterhin bewirkt der 150 kDa-Komplex, daß es trotz hoher Konzentrationen der IGFs in der Zirkulation nicht zu einer Hypoglykämie kommt (Baxter, 1995). Dieses wäre möglich, da die IGFs zur niedrigaffinen Bindung des Insulin-Rezeptors fähig sind.

Diese wichtige Rolle des 150 kDa-Komplexes im Organismus zeigt sich auch darin, daß eine verringerte Konzentration des Komplexes zur Pathogenese der Tumor-Hypoglykämie beiträgt (Syndrome of non-islet cell tumor hypoglycemia, NICTH). Dabei kommt es zu einer Hypoglykämie in Abwesenheit von Insulin (Rechler & Clemmons, 1998).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß auch IGFBP-5 dazu in der Lage ist, einen hochmolekularen IGF/ALS/IGFBP-5-Komplex zu bilden (Twigg & Baxter, 1998). Inwiefern dieser eine Rolle im Organismus spielt, konnte allerdings bislang nicht geklärt werden.

Eine Funktion der IGFBPs im Serum ist in der Verlängerung der Halbwertszeit der IGFs zu sehen (Abbildung 2). Dabei kommt dem 150 kDa-Komplex die entscheidende Rolle zu, da dieser die Halbwertszeit der IGFs im Serum ungefähr 100fach erhöht. Zwar ist die IGF-Halbwertszeit auch in den binären IGF/IGFBP-Komplexen signifikant erhöht, doch unterliegen diese ebenso wie die freien IGFs einem hohen Umsatz (Guler *et al.*, 1989).

Eine weitere Aufgabe der IGFBPs besteht darin, die IGF-vermittelten Wirkungen zu modulieren. Im Gegensatz zu dem 150 kDa-Komplex sind die binären IGF/IGFBP-Komplexe in der Lage, den Blutstrom zu verlassen und in die umliegenden Gewebe zu wandern. Dadurch können die IGFs zu ihren Zielgeweben transportiert werden, wobei den einzelnen IGFBPs eine Rolle bei der Gewebe-spezifischen Wirkung der IGFs zugeschrieben wird (Zapf, 1995).

Für die Vermittlung der endokrinen Wirkungen der IGFs werden zwei verschiedene Mechanismen angenommen. Beiden Mechanismen ist gemeinsam, daß durch proteolytische Enzyme die Affinität zwischen IGFBP-3 und den IGFs verringert wird, so daß die IGFs anschließend aus dem 150 kDa-Komplex freigesetzt werden.

Zum einen wird dabei die Dissoziation des ternären Komplexes durch limitierte Proteolyse von IGFBP-3 bewirkt (Rechler & Clemmons, 1998). Zum anderen kann IGF-I durch eine spezifische Serum-Protease zu des(1-3)IGF-I gespalten werden (Yamamoto & Murphy, 1995). Da IGFBP-3 eine verringerte Affinität zu dieser verkürzten Form besitzt, kommt es anschließend zur Dissoziation des Komplexes.

IGFBP-3 ist als Komponente des 150 kDa-Komplexes das vorherrschende Bindeprotein in der Zirkulation und kommt in mindestens 10fach höheren Konzentrationen als die anderen IGFBPs vor. Diese liegen in folgender, nach abfallender Konzentration geordneter Reihe vor: IGFBP-4 > IGFBP-5 > IGFBP-2 > IGFBP-6 > IGFBP-1 (Rajaram *et al.*, 1997).

1.5 Aufgabenstellung

Die Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren nehmen eine zentrale Stellung bei der Regulation der autokrinen, parakrinen und endokrinen Wirkungen der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren ein. Neben einer Modulation der IGF-vermittelten Effekte werden für die IGF-BPs und ihre proteolytischen Fragmente auch IGF-unabhängige Wirkungen beschrieben. Obwohl bereits alle sechs IGF-BPs im Plasma detektiert werden konnten, ist nur wenig über den proteolytischen Abbau sowie über die funktionellen und strukturellen Eigenschaften der ebenfalls im Plasma zirkulierenden IGF-BP-Fragmente bekannt.

Ziel dieser Arbeit war daher die Isolierung und Charakterisierung natürlich vorkommender Fragmente der Bindeproteine IGF-BP-2 und -4 aus humanem Hämofiltrat.

Zunächst sollte ein Screening der Hämofiltrat-Peptidbibliothek nach IGF-I-bindenden Peptiden durchgeführt werden. Parallel dazu sollten verschiedene Fragmente von IGF-BP-2 und -4 in den einzelnen Peptidbank-Fractionen mit Hilfe eines immunologischen Screenings identifiziert werden. Ausgewählte Fragmente sollten anschließend anhand ihrer Molekularmassen und ihrer Immunreaktivität durch verschiedene chromatographische Techniken bis zur Reinsubstanz aufgereinigt werden. Im Anschluß an die Isolierung sollten die Fragmente umfassend biochemisch charakterisiert werden. Dazu zählte neben der Bestimmung des exakten Molekulargewichts und der Aminosäuresequenz auch die Durchführung von Bindungsstudien mit IGF-I und -II. Gegebenenfalls sollten weiterhin strukturelle Untersuchungen zur Bestimmung der Glykosylierung oder der Verbrückung der Cysteinreste durchgeführt werden.

Bei der Identifizierung natürlich vorkommender IGF-BP-Fragmente aus humanem Hämofiltrat steht die Aufklärung der Prozessierung der IGF-BPs *in vivo* im Vordergrund. Dabei können aus der Kenntnis der Aminosäuresequenz der zirkulierenden Fragmente Rückschlüsse auf die bei der Prozessierung beteiligten Proteasen gezogen werden. Durch Bestimmung der IGF-Bindungsfähigkeit der einzelnen Fragmente können weiterhin Aussagen über ihre Bedeutung bei der Regulation der IGF-Bioverfügbarkeit im Plasma und in den umliegenden Geweben getroffen werden. Weiterführende Studien lassen interessante biologische, zum Teil auch IGF-unabhängige Wirkungen der Fragmente erwarten.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation der Hämofiltrat-Peptidbank

Zur Isolierung von IGFBP-Fragmenten wurde die humane Hämofiltrat-Peptidbibliothek verwendet, die am Niedersächsischen Institut für Peptidforschung (IPF; heute: IPF PharmaCeuticals GmbH) entwickelt und etabliert wurde. Die Herstellung der Peptidbank erfolgte wie beschrieben (Schulz-Knappe *et al.*, 1997).

2.2 Chromatographische Methoden

Die Auftrennung von Peptidgemischen erfolgte mit Hilfe von Umkehrphasen (Reversed-Phase, RP)- oder Kationenaustausch-High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Präparative RP-HPLC-Läufe wurden an den HPLC-Anlagen BioCad 250 (PerSeptive Biosystems, Freiburg, D) oder BioCad 60 (PerSeptive Biosystems, Freiburg, D) durchgeführt. Bei Verwendung des BioCad 60 erfolgte eine automatisierte Fraktionierung mit dem Fraktionssammler Advantec SF-2120 (Advantec Toyo Kaisha, Tokyo, Japan).

Alle weiteren chromatographischen Auftrennungen wurden an einer HPLC-Anlage der Firma Kontron (Neufahrn, D) durchgeführt. Diese enthielt zwei Doppelkolbenpumpen Typ 420 sowie ein Durchflußphotometer Typ 430 und wurde über einen Computer mit dem HPLC Datasystem 450 gesteuert. Zur automatischen Fraktionierung wurde ein Fraktionssammler (Modell 2110 Fraction Collector, BioRad, München, D) verwendet.

Die Elution der Peptide erfolgte generell mit einem steigendem Anteil an Laufmittel B. Dabei wurde die Trennung der Peptide durch die Messung ihrer Absorption bei 214 nm und 280 nm am Durchflußphotometer detektiert. Der Absorptionsverlauf wurde dabei direkt mit Hilfe eines Schreibers (Typ BD 112, Kipp&Zonen, Düsseldorf, D) als Chromatogramm aufgezeichnet.

2.2.1 RP-HPLC

Bei der RP-Chromatographie wurden lyophilisierte Proben direkt in Laufmittel A aufgenommen. In organischen Lösungsmitteln gelöste Proben aus vorangegangenen RP-chromatographischen Schritten wurden vor dem Auftrag im Verhältnis 1:4 mit Laufmittel A verdünnt. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile der Probe durch Filtration (Minisart (17597) 0,2 μm , Satorius, Göttingen, D) abgetrennt. Der Probenauftrag erfolgte über die Lösungsmittelzufuhr von Pumpe A oder bei geringen Volumina über ein Injektionsventil.

Die verwendeten Säulenmaterialien für die RP-HPLC sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Säulenmaterial	Hersteller
Präparative Säulenmaterialien	
Pharmacia Source Fineline 15RPC, PS/DVB, 10 x 15,1 cm, 1000 Å, 15 μm	Pharmacia, Freiburg, D
Bakerbond Kartusche C18, 4,7 x 30 cm, 15-20 μm	Waters, Milford, MA, USA
Analytische Säulenmaterialien	
Vydac C4, 20 x 250 mm, 300 Å, 10 μm	Vydac, Hesperina, CA, USA
Vydac C18, 20 x 250 mm, 300 Å, 10 μm	Vydac, Hesperina, CA, USA
Vydac C18, 4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 μm	Vydac, Hesperina, CA, USA
Jupiter C5, 10 x 250 mm, 300 Å, 5 μm	Phenomenex, Aschaffenburg, D
Aqua C5, 10 x 250 mm, 125 Å, 5 μm	Phenomenex, Aschaffenburg, D
Jupiter C4, 4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 μm	Phenomenex, Aschaffenburg, D

Tabelle 2 *Verwendete Säulenmaterialien bei der RP-Chromatographie mit den dazugehörigen Herstellern.*

Tabelle 3 enthält die verwendeten Puffersysteme. Zur Herstellung der Puffer wurde zweifach entionisiertes Wasser (Reinstwasseranlage NANOpure, Barnstead, Bergisch Gladbach, D) verwendet. Als organische Lösungsmittel wurden Acetonitril und Methanol der Firma Merck (Darmstadt, D) eingesetzt. Die organischen Lösungsmittel entsprachen dabei den Reinheitsstufen „gradient grade“ oder „prepsolv“. Vor ihrer Verwendung wurden die Laufmittel für 10 min im Heliumstrom entgast.

	Laufmittel A	Laufmittel B
1	10 mM HCl	80% (v/v) Acetonitril 10 mM HCl
2	0,1% (v/v) TFA	80% (v/v) Acetonitril 0,1% (v/v) TFA
3	30 % (v/v) Methanol	10 mM HCl in Methanol

Tabelle 3 *Verwendete Puffersysteme bei der RP-Chromatographie.*

2.2.2 Kationenaustausch-HPLC

Für die Kationenaustausch-Chromatographie wurde das folgende Säulenmaterial sowie das folgende Puffersystem verwendet:

Säulenmaterial: Biotek Pepkat, 20 x 150 mm, 1000 Å, 7 µm (Biotek, Östringen, D)

Laufmittel A: 50 mM NaH₂PO₄, pH 3,0

Laufmittel B: 50 mM NaH₂PO₄
1,5 M NaCl, pH 3,0

Die Herstellung der Puffer erfolgte mit zweifach entionisiertem Wasser aus der Reinstwasseranlage NANOpure der Firma Barnstead (Bergisch Gladbach, D). Vor ihrer Verwendung wurden die Puffer filtriert (Minisart (17597) 0,2 µm, Satorius, Göttingen, D) und anschließend im Heliumstrom entgast.

Für weiterführende Untersuchungen wurden salzfreie Proben benötigt. Deshalb wurden Aliquots der Fraktionen in 96-Well-Extraktionsplatten (3M Empore™ 96 Well Extraction Disks, 3M Filtration Products, St. Paul, MN, USA) entsalzt. Die Aliquots wurden zunächst auf das C18 Material der Extraktionsplatten pipettiert. Anschließend wurde einmal mit 600 µl 0,1% TFA gespült, um das Salz zu entfernen. Daraufhin wurde das gebundenen Peptid mit 600 µl 0,1% TFA / 80% Acetonitril eluiert.

Nach Regeneration in 100% Acetonitril und Einlagerung in 30% Methanol können diese Extraktionsplatten mehrfach wiederverwendet werden.

2.2.3 Isolierung von IGFBP-Fragmenten

2.2.3.1 Aufreinigung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279)

Zur Isolierung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279) waren fünf chromatographische Aufreinigungsschritte notwendig. Die verwendeten Säulenmaterialien, Puffersysteme, Gradienten und Flußraten sowie die jeweils zugehörige Fraktionierung sind in Tabelle 4 dargestellt.

	Säulenmaterial	Laufmittel	Gradient	Flußrate	Fraktionierung
1	Pharmacia Source Fineline 15RPC 10 x 15,1 cm 1000 Å, 15 µm	A: 10 mM HCl B: 80 % (v/v) Acetonitril 10 mM HCl	0 % B für 300 ml 0-5 % B in 150 ml 5-50 % B in 8000 ml 50-95 % B in 400 ml	150 ml/min	200 ml
2	Bakerbond Kartusche C18 4,7 x 30 cm 15-20 µm	A: 30% (v/v) Methanol 10 mM HCl B: 10 mM HCl in Methanol	0-10 % B in 100 ml 10-70 % B in 1850 ml 70-100 % B in 100 ml	30 ml/min	50 ml
3	Biotek Pepkat 20 x 150 mm 1000 Å, 7 µm	A: 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 3,0 B: 50 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl pH 3,0	0-20 % B in 2 min 20-90 % B in 70 min 90-100 % B in 3 min	4,2 ml/min	1 min
4	Vydac C18 20 x 250 mm 300 Å, 10 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-25 % B in 2 min 25-55 % B in 60 min 55-100 % B in 3 min	7 ml/min	1 min
5	Aqua C5 10 x 250 mm 125 Å, 5 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-35 % B in 3 min 35-50 % B in 45 min 50-100 % B in 3 min	1,8 ml/min	1 min und Peaks

Tabelle 4 Übersicht über die Chromatographiebedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte, die zur Isolierung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279) führten.

2.2.3.2 Aufreinigung eines C-terminalen IGFBP-2-Fragments mit einer molekularen Masse von 12875 Da

Zur Aufreinigung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (12875 Da) mit einer molekularen Masse von 12875 Da wurden fünf chromatographische Schritte durchgeführt. Die eingesetzten Säulenmaterialien und Laufmittel sowie die zugehörigen Gradienten, Flußraten und die Art der Fraktionierung sind in Tabelle 5 gezeigt.

	Säulenmaterial	Laufmittel	Gradient	Flußrate	Fraktionierung
1	Pharmacia Source Fineline 15RPC 10 x 15,1 cm 1000 Å, 15 µm	A: 10 mM HCl B: 80 % (v/v) Acetonitril 10 mM HCl	0 % B für 300 ml 0-5 % B in 150 ml 5-50 % B in 8000 ml 50-95 % B in 400 ml	150 ml/min	200 ml
2	Bakerbond Kartusche C18 4,7 x 30 cm 15-20 µm	A: 30% (v/v) Methanol 10 mM HCl B: 10 mM HCl in Methanol	0-10 % B in 100 ml 10-70 % B in 1850 ml 70-100 % B in 100 ml	30 ml/min	50 ml
3	Biotek Pepkat 20 x 150 mm 1000 Å, 7 µm	A: 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 3,0 B: 50 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl pH 3,0	0-20 % B in 2 min 20-90 % B in 70 min 90-100 % B in 3 min	4,2 ml/min	1 min
4	Vydac C18 20 x 250 mm 300 Å, 10 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-25 % B in 2 min 25-55 % B in 60 min 55-100 % B in 3 min	7 ml/min	1 min
5	Jupiter C5 10 x 250 mm 300 Å, 5 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-33 % B in 3 min 33-46 % B in 39 min 46-100 % B in 3 min	1,8 ml/min	1 min und Peaks

Tabelle 5 Detaillierte Darstellung der einzelnen Chromatographieschritte, die zur Isolierung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (12875 Da) durchgeführt wurden.

2.2.3.3 Aufreinigung des Fragments IGFBP-2 (104-289)

Im Rahmen des Screening nach IGFBP-2-Immunreaktivitäten konnte das Fragment IGFBP-2 (104-289) durch sechs aufeinanderfolgende Chromatographieschritte aufgereinigt werden. Tabelle 6 enthält die detaillierten Chromatographiebedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte.

	Säulenmaterial	Laufmittel	Gradient	Flußrate	Fraktionierung
1	Pharmacia Source Fineline 15RPC 10 x 15,1 cm 1000 Å, 15 µm	A: 10 mM HCl B: 80 % (v/v) Acetonitril 10 mM HCl	0 % B für 300 ml 0-5 % B in 150 ml 5-50 % B in 8000 ml 50-95 % B in 400 ml	150 ml/min	200 ml
2	Bakerbond Kartusche C18 4,7 x 30 cm 15-20 µm	A: 30% (v/v) Methanol 10 mM HCl B: 10 mM HCl in Methanol	0-10 % B in 100 ml 10-70 % B in 1850 ml 70-100 % B in 100 ml	30 ml/min	50 ml
3	Biotek Pepkat 20 x 150 mm 1000 Å, 7 µm	A: 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 3,0 B: 50 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl pH 3,0	0-20 % B in 2 min 20-90 % B in 70 min 90-100 % B in 3 min	4,2 ml/min	1 min
4	Vydac C18 20 x 250 mm 300 Å, 10 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-25 % B in 2 min 25-55 % B in 60 min 55-100 % B in 3 min	7 ml/min	1 min
5	Jupiter C5 10 x 250 mm 300 Å, 5 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-33 % B in 3 min 33-48 % B in 45 min 48-100 % B in 3 min	1,8 ml/min	1 min
6	Jupiter C4 4,6 x 250 mm 300 Å, 5 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-33 % B in 3 min 33-48 % B in 45 min 48-100 % B in 3 min	0,7 ml/min	1 min

Tabelle 6 Darstellung der detaillierten Chromatographiebedingungen der einzelnen Aufreiniugnsschritte bei der Isolierung des Fragments IGFBP-2 (104-289).

2.2.3.4 Aufreinigung des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237)

Zur Aufreinigung des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237) waren vier aufeinanderfolgende chromatographische Schritte notwendig. Eine detaillierte Darstellung der Chromatographiebedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte ist in Tabelle 7 zu finden.

	Säulenmaterial	Laufmittel	Gradient	Flußrate	Fraktionierung
1	Pharmacia Source Fineline 15RPC 10 x 15,1 cm 1000 Å, 15 µm	A: 10 mM HCl B: 80 % (v/v) Acetonitril 10 mM HCl	0-5 % B in 2 min 5-45 % B in 60 min 45-100 % B in 3 min	150 ml/min	200 ml
2	Bakerbond Kartusche C18 4,7 x 30 cm 300 Å, 15-30 µm	A: 30% (v/v) Methanol 10 mM HCl B: 10 mM HCl in Methanol	0-55 % B in 1800 ml 55-100 % in 150 ml	30 ml/min	50 ml
3	Biotek Silica C4 20 x 250 mm 100 Å, 5 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-30 % B in 3 min 30-50 % B in 60 min 50-100% B in 3 min	7 ml/min	1 min und Peaks
4	Vydac C18 20 x 250 mm 100 Å, 10 µm	A: 30% (v/v) Methanol 10 mM HCl B: 10 mM HCl in Methanol	0-15 % B in 2 min 15-40 % B in 50 min 40-100 % B in 3 min	7 ml/min	1 min

Tabelle 7 Übersichtliche Darstellung der einzelnen Chromatographieschritte, die zur Isolierung des Fragments IGFBP-4 (136-237) notwendig waren. Neben den eingesetzten Säulenmaterialien sind die verwendeten Laufmittel, Gradienten und Flußraten sowie die durchgeführte Fraktionierung angegeben.

2.2.3.5 Aufreinigung des N-terminalen Fragments IGFBP-4 (4-122)

Die fünf chromatographischen Aufreinigungsschritte, die zur Isolierung des verkürzten N-terminalen Fragments IGFBP-4 (4-122) führten, sind in Tabelle 6 mit den verwendeten Säulenmaterialien, Laufmitteln, Gradienten, Flußraten sowie der entsprechenden Fraktionierung dargestellt.

	Säulenmaterial	Laufmittel	Gradient	Flußrate	Fraktionierung
1	Pharmacia Source Finesline 15RPC 10 x 15,1 cm 1000 Å, 15 µm	A: 10 mM HCl B: 80 % (v/v) Acetonitril 10 mM HCl	0 % B für 300 ml 0-5 % B in 150 ml 5-50 % B in 8000 ml 50-95 % B in 400 ml	150 ml/min	200 ml
2	Bakerbond Kartusche C18 4,7 x 30 cm 15-20 µm	A: 30% (v/v) Methanol 10 mM HCl B: 10 mM HCl in Methanol	0-10 % B in 100 ml 10-70 % B in 1850 ml 70-100 % B in 100 ml	30 ml/min	50 ml
3	Biotek Pepkat 20 x 150 mm 1000 Å, 7 µm	A: 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 3,0 B: 50 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl pH 3,0	0-20 % B in 2 min 20-90 % B in 70 min 90-100 % B in 3 min	4,2 ml/min	1 min
4	Vydac C18 20 x 250 mm 300 Å, 10 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-25 % B in 2 min 25-55 % B in 60 min 55-100 % B in 3 min	7 ml/min	1 min
5	Aqua C5 10 x 250 mm 125 Å, 5 µm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 80 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) TFA	0-35 % B in 3 min 35-50 % B in 45 min 50-100 % B in 3 min	1,8 ml/min	1 min

Tabelle 8 Detaillierte Darstellung der einzelnen Chromatographieschritte bei der Aufreinigung des N-terminalen Fragments IGFBP-4 (4-122).

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Massenspektrometrische Methoden

Die Bestimmung der Molekularmasse erfolgte entweder über Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF)- oder über Electrospray-Ionization (ESI)-Massenspektrometrie (MS).

Dabei wurden Fraktionen chromatographischer Aufreinigungsschritte zunächst mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Bei dieser Methode ist zum einen ein hoher Probendurchsatz möglich. Zum anderen können auch komplexe Proteingemische hinsichtlich ihrer molekularen Massen untersucht werden, da überwiegend einfach geladene Ionen auftreten.

Die Massenbestimmung mittels ESI-MS wurde mit aufgereinigten Reinsubstanzen durchgeführt, da sich diese Methode im allgemeinen durch eine höhere Genauigkeit auszeichnet.

2.3.1.1 MALDI-TOF - Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Molekularmasse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie erfolgte entweder mit dem LaserTec RBT II-Massenspektrometer (PerSeptive/Vestec, Houston, USA) oder mit dem Voyager DE-Pro-Massenspektrometer (Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Zur Erzeugung des gepulsten Ionenstrahls wurde bei beiden Geräten ein 337 nm-Stickstoff-Laser eingesetzt. Die Messungen selbst wurden im linearen Modus durchgeführt.

Zur Steuerung und Kalibrierung des LaserTec RBT II wurde die Software VoyagerTM RP BioSpectrometryTM Workstation Version 3.07.01 (PerSeptive Biosystems, Cambridge, USA) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Grams/386 Level II, Version 3.0 (Galactic Industries Corporation, Salem, USA).

Die Messung mit dem Voyager DE-Pro erfolgte mit Hilfe der Software VoyagerTM RP BioSpectrometryTM Workstation Version 5.1 (PerSeptive Biosystems, Cambridge, USA).

Zur Auswertung der Daten wurde die Software Data Explorer 4.0 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) eingesetzt.

Die Probenvorbereitung erfolgte nach der „dried drop“-Methode. Dabei wurden jeweils 1 µl der zu analysierenden Probe mit 1 µl der gewünschten Matrix direkt auf der Probenplatte

vermischt und anschließend mit Hilfe eines Ventilators bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxycimtsäure in einer Konzentration von 5 mg/l in 50 % (v/v) Acetonitril, 0,05 % (v/v) TFA verwendet. Als Co-Matrix wurde L-Fucose in einer Konzentration von 5 mg/ml beigemischt.

2.3.1.2 ESI - Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Molekularmasse mittels ESI-MS erfolgte zum einen mit dem Sciex API III-Quadrupol-Massenspektrometer (Perkin-Elmer, Langen, D). Zur Auswertung und Datenaufnahme wurde dabei die Software MacSpec Version 3.3 des gleichen Herstellers verwendet.

Zum anderen wurden Messungen am Sciex API 100 (Perkin-Elmer, Langen, D) durchgeführt. Hierbei wurde die Software BioMultiView 1.2 (Perkin-Elmer, Langen, D) eingesetzt.

Bei beiden Geräten wurden die Analysen im „positive mode“ durchgeführt. Dabei wurden nur Kationen im Spannungsfeld des Massenspektrometers beschleunigt und somit detektiert. Die verwendete Ionisierungsspannung betrug 5000 V, der abgedeckte Massenbereich erstreckte sich von 400 m/z bis 2390 m/z in Schritten von 0,5 m/z.

Zur Massenanalyse wurden salzfreie Proben benötigt, da Kationen wie Na⁺- Tris- oder NH₄⁺- Ionen einen sehr hohen Hintergrund erzeugen. Die salzfreien Proben wurden dabei mit einer Flußrate von 5 μ l/min über eine Hamilton-Spritze und eine Infusionspumpe (Havard Apparatus 22, FMI, Egelsbach, D) injiziert.

2.3.2 Kapillarzonenlektrophorese

Die Kapillarzonenlektrophorese wurde als hochauflösende Analysenmethode zur Reinheitsüberprüfung von Peptiden eingesetzt. Dabei wurde ein Elektrophoresegerät der Firma Beckman (P/ACETM MDQ, Beckman, München, D) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software P/ACE System MDQ (Beckman, München, D).

Zur Messung wurden nur wenige nl der Probe benötigt, wobei die optimale Probenkonzentration bei 0,2 μ g/ μ l lag. Die Injektion der Probe erfolgte durch Anlegen eines geringen Überdrucks in eine unbeschichtete „fused silica“-Kapillare (eCAPTM Capillary Tubing, Beckman, München, D). Diese besaß eine effektive Länge von 50 cm sowie einen Innendurchmesser von 75 μ m. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von

25°C und einer konstanten Stromstärke von 120 µA durch Anlegen einer Hochspannung von 22–27 kV. Als Elektrophorese-Puffer wurde 100 mM NaH₂PO₄, 0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose, pH 2,5 eingesetzt. Die Wellenlänge zur Detektion der Peptide betrug 214 nm.

2.3.3 Sequenzanalyse

Die N-terminale Sequenzierung von Peptiden erfolgte mit Hilfe des Edman-Abbaus. Die Sequenzierung wurde automatisiert am Sequenzer ProciseTM 494 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) durchgeführt. Zur Datenaufnahme und Auswertung wurde die Software Modell 610 Data Analysis Version 2.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) eingesetzt.

Zur Sequenzierung wurden zwischen 10 pmol und 100 pmol des zu sequenzierenden Peptids benötigt. Die Applikation des Peptids sowie der für den Abbau benötigten Reagenzien erfolgte auf ein Filterplättchen aus BioBreneTM Plus (Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Die anschließende Detektion und Analyse der freigesetzten Phenylthiohydantion-Aminosäuren erfolgte über RP-Chromatographie bei einer Wellenlänge von 269 nm.

Mit Hilfe dieser Methode ist ein Nachweis von bis zu 50 Aminosäuren möglich. Um die isolierten Peptide initial zu identifizieren, wurden aber meist nur 10 bis 15 Abbauschritte durchgeführt. Durch einen anschließenden Datenbankvergleich mit der Datenbank Swiss-Prot konnten die Peptide danach in der Regel eindeutig zugeordnet werden.

2.3.4 Aminosäurenanalyse

Die Bestimmung der genauen Peptidmenge erfolgte mit Hilfe der Aminosäurenanalyse (ASA). Die Messung erfolgte automatisiert an dem Aminosäuren-Analysesystem Series II 1090 Aminoquant (Hewlett Packard, Fort Collins, CO, USA). Die Aminosäuren Norvalin und Sarcosin wurden als interne Standards verwendet. Bei der ASA wurden die Peptide zuerst in 6 M HCl für 1,5 h bei 150°C vollständig hydrolysiert. Anschließend wurden die entstehenden Aminosäuren an ihren primären und sekundären Aminogruppen derivatisiert, wobei ein Fluoreszenzmarker in das Molekül eingeführt wurde. Die Auftrennung der derivatisierten Aminosäuren erfolgte über RP-Chromatographie. Die Detektion und Quantifizierung der einzelnen Aminosäuren wurde mittels Fluoreszenzmessung durchgeführt.

2.4 Immunologische Methoden

Die Detektion von IGFBP-2- und IGFBP-4-Immunreaktivitäten erfolgte sowohl mittels Western-Immunoblot als auch mittels Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen im Western-Immunoblot und im ELISA sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Primärantikörper				
	Beschreibung/Epitop	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
anti-IGFBP-4	Immunogen: humanes IGFBP-4 Serum	Kaninchen	Western-Blot: 1 : 1000	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY,USA
anti-human IGFBP-2	Immunogen: synthetisches Peptid von IGFBP-2 Serum	Kaninchen	ELISA: 1 : 2000 Western-Blot 1 : 1000	IBT, Reutlingen, D
anti-human IGFBP-2	Immunogen: synthetisches, C- terminales Peptid von IGFBP-2 Serum	Kaninchen	Western-Blot: 1 : 1000	GroPep, Adelaide, Australien
anti-IGFBP-2	Immunogen: bovines IGFBP-2; Serum	Kaninchen	ELISA: 1 : 5000 Western-Blot: 1 : 2000	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY,USA
Sekundärantikörper				
	Beschreibung/Epitop	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen IgG	gekoppelt an Alkalische Phosphatase	Ziege	Western-Blot: 1 : 30000 ELISA: 1 : 40000	Sigma, Deisenhofen, D

Tabelle 9 Übersicht über die Primär- und Sekundärantikörper, die für die Detektion von IGFBP-Fragmenten verwendet wurden.

2.4.1 Western-Immunoblot

2.4.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Peptidgemische erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Pro Elektrophorese-Lauf wurden in Mini-Protean II-Kammern der Firma BIO-Rad (München, D) parallel zwei Gele verwendet. Die Gele mit der Größe von 7 x 8 cm sowie einer Dicke von 0,75 mm gliederten sich in ein Trenn- und ein Sammelgel. Für zwei Gele wurden jeweils die in Tabelle 10 angegebenen Volumina der entsprechenden Lösungen verwendet.

	rotiphorese® Gel 40	Gelpuffer	Glycerin	Wasser	TEMED	10% APS
Trenngel	3420 µl	2760 µl	2 g	450 µl	3,6 µl	30 µl
Sammelgel	300 µl	600µl	-	1500 µl	2,5 µl	12 µl

Tabelle 10 Pipettierschema für die Herstellung von zwei Gelen.

Zur Probenvorbereitung wurden Lyophilisate direkt in 1fach Probenauftragspuffer (PAP) gelöst. Gelöste Proben wurden im Verhältnis 4:1 in 4fach PAP aufgenommen. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf 95°C erhitzt. Daraufhin wurden unlösliche Bestandteile in einer Tischzentrifuge (Modell 112, Sigma, Deisenhofen, D) bei maximaler Drehzahl für 5 min abzentrifugiert.

Die Elektrophorese selbst gliederte sich in einen Vorlauf und in die eigentliche Trennung. Der Vorlauf erfolgte für 20 min bei einer konstanten Spannung von 60 V und diente zum Einsinken und Sammeln der Proben im Gel. Die darauffolgende Trennung wurde für 90 min bei einer Spannung von 150 V durchgeführt. Als Größenstandard wurde der Marker SeeBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die für die Trennung erforderliche Spannung wurde mit dem Power Supply, Modell 1000/500 (BioRad, München, D) erzeugt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

rotiphorese® Gel 40 38% Acrylamid
2% Bisacrylamid

Gelpuffer	3 M Tris-HCl 0,3 % (w/v) SDS, pH 8,45
4fach PAP	6,665 % (v/v) Gelpuffer 20 % (w/v) EDTA 2 % (w/v) DTT 4 % (w/v) SDS 50 % (w/v) Glycerin Bromphenolblau
Kathoden-Puffer	10 mM Tris 10 mM Tricin 0,1 % (w/v) SDS
Anoden-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,9

2.4.1.2 Transfer auf die Membran

Als Membran wurde eine PVDF-Membran (Fluorotrans Transfer Membran, 0,2 µm, PALL, Portsmouth, UK) verwendet. Diese wurde zunächst auf eine Größe von 7 x 9 cm zugeschnitten und anschließend für 30 s mit Methanol benetzt. Daraufhin wurde die Membran im Blotpuffer äquilibriert. Gleichzeitig wurden zwei Filterpapiere (Gel Blotting Paper GB 004, Schleicher&Schuell, Dassel, D) der gleichen Größe in Blotpuffer eingeweicht.

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte mit Hilfe der Semi-Dry-Blottkammer Transblot SD (BIO Rad, München, D). Dazu wurde zunächst pro Gel ein eingeweichtes Filterpapier auf die Anodenplatte der Blotkammer gelegt. Auf das Filterpapier wurde anschließend die vorbereitete PVDF-Membran, das Gel und zum Abschluß erneut ein eingeweichtes Filterpapier luftblasenfrei geschichtet. Nach Auflegen der Kathodenplatte erfolgte der Transfer für 2 h bei einer konstanten Spannung von 7 V.

Blotpuffer: 50 mM Borsäure
20 % (w/v) Methanol, pH 9,0

2.4.1.3 Färbung des Blots

Nach dem Transfer der Peptide auf die Membran wurde diese direkt in TBST-Puffer mit 5 % Milchpulver überführt und für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Nach einem Waschschrift mit TBST-Puffer, wurde der Primärantikörper in TBST-Puffer zugegeben. Alle verwendeten Antikörper und ihre eingesetzten Verdünnungen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C unter Schütteln. Daraufhin wurde der Blot dreimal für 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 9) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde der Blot jeweils für 5 min in TBST-Puffer, daraufhin in TBS-Puffer und schließlich in Reaktionspuffer gewaschen. Die Färbung erfolgte anschließend für ungefähr 1 h im Dunkeln in 20 ml Färbelösung unter leichtem Schütteln. Dabei wurde der Blot alle 20 min gewendet. Nach der Färbung wurde der Blot für 10-20 min in entionisiertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

Verwendete Puffer und Lösungen:

TBS-Puffer	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
TBST-Puffer	TBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Triton X100
Reaktionspuffer	100 mM Tris 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Färbelösung	0,033 % (w/v) NBT 0,015 % (w/v) BCIP in Reaktionspuffer
	entsprechend:
	660 µl NBT-Lösung (10 mg/ml) 60 µl BCIP-Lösung (50 mg/ml in DMF) 20 ml Reaktionspuffer

2.4.2 *Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)*

Die Durchführung des Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA) erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden, D) in Doppel- oder Dreifachwerten.

Zunächst wurden 100 µl/well der zu untersuchenden Probe in Coating-Puffer über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Platten auf Zellstoff ausgeschlagen und mit 200 µl/well Roti-Block®-Lösung (Roth, Karlsruhe, D) für 30 min bei Raumtemperatur geblockt, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 200 µl/well Waschpuffer wurden 100 µl/well des Primärantikörper in der gewünschten Verdünnung (s. Tabelle 9) in Waschpuffer zugegeben. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach drei weiteren Waschschritten mit jeweils 200 µl/well Waschpuffer wurden 100 µl/well der Sekundärantikörper-Verdünnung (s. Tabelle 9) in Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut dreimal mit je 200 µl/well Waschpuffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl/well frisch angesetzter TMB-Substrat-Lösung (ImmunoPure® TMB Substrate Kit, Pierce, Rockford, IL, USA). Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die enzymatische Reaktion mit 100 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader (MRX II Microplate Reader, Dynex, Frankfurt, D) gemessen.

Verwendete Puffer:

Coating-Puffer: 34 mM M Na₂CO₃
 16 mM NaHCO₃

Waschpuffer: 13 mM Na₂HPO₄
 2,5 mM NaH₂PO₄
 140 M NaCl
 0,05% Tween-20

2.5 Bindungsanalyse

2.5.1 Liganden-Blot-Analyse

Die Bestimmung der IGF-Bindungsfähigkeit der isolierten Fragmente mit Hilfe der Liganden-Blot-Analyse erfolgten in Kooperation mit Dr. Bernd Kübler (Universitäts-Kinderklinik, Abteilung Biochemie, Universität Hamburg, D). Dabei wurden die Proteine zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert (s. Abschnitt 2.4.1.1 und 2.4.1.2).

Zur Abättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in Inkubationspuffer inkubiert. Anschließend wurde biotinyliertes IGF-I oder-II in einer Verdünnung von 1:5000 zugegeben. Die Inkubation erfolgte entweder bei 4°C über Nacht oder für 1,5 h bei Raumtemperatur. Zur Entfernung des überschüssigen biotinylierten IGF wurde die Membran daraufhin gewaschen. Dazu wurde sie zunächst zweimal kurz in Waschpuffer gespült, gefolgt von einem Waschschrift für 10 min und vier Waschschriften für jeweils 5 min mit Waschpuffer. Anschließend wurde die Streptavidin-Biotin-Kopplung durchgeführt. Dazu wurde die Membran in Inkubationspuffer für 2 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur mit Streptavidin-HRP (Jackson Immunosearch, West Grove, PA, USA) in einer Verdünnung von 1 : 5000 inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut zweimal kurz mit Waschpuffer gespült und danach einmal für 10 min sowie viermal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion der gebundenen IGFs erfolgte mit Hilfe des ECL-Reagenz (Pierce, Rockford, IL, USA).

Verwendete Puffer:

Inkubationspuffer	10 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 0,1 % Tween-20 1 % BSA pH 7,4
Waschpuffer	10 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 0,1 % Tween-20 pH 7,4

2.5.2 Bestimmung der IGF-I-Bindungsaffinität durch Sättigungsexperimente

Die Bestimmung der IGF-I-Bindung wurde unter Verwendung von radioaktiv markiertem [^{125}I]-IGF-I durchgeführt. Dabei wurde zunächst mit Hilfe der Chloramin T-Methode ^{125}I in das IGF-I-Molekül eingeführt. Anschließend wurde das radioiodierte IGF-I in den Bindungsstudien eingesetzt.

2.5.2.1 Radioaktive Markierung von Peptiden mit ^{125}I

Zuerst wurden sowohl die Chloramin-T- als auch die Natriumdisulfit-Lösung frisch angesetzt. Anschließend wurden 1 μg des zu iodierenden Peptids in 75 μl Phosphatpuffer vorgelegt. Durch die Zugabe von 10 μl Chloramin T-Lösung sowie 2 μl Na^{125}I mit einer Radioaktivitätsmenge von 0,2 mCi wurde die Reaktion gestartet. Nach gründlicher Durchmischung wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 10 μl Natriumdisulfit-Lösung gestoppt wurde. Zur Abtrennung des freien ^{125}I wurde die Reaktionslösung daraufhin auf eine RP-Fertigsäule (SepPak, C18 Cartridge, 1ml, Millipore, Eschborn, D) aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit 5 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % TFA zur Entfernung des freien ^{125}I wurde das Peptid mit 2 ml 60 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % TFA eluiert. Das Eluat wurde daraufhin in ein Glasgefäß mit 2fach-Tracer-Puffer überführt. Anschließend wurde die spezifische Aktivität in einem γ -Counter (1470 Wallac Wizard, Pharmacia, Turku, Finnland) ermittelt und die Qualität der radioaktiv markierten Verbindung mittels analytischer RP-HPLC überprüft. Die spezifische Aktivität betrug ca. 500.000 cpm/ng.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Phosphat-Puffer	0,25 M Na_2HPO_4 pH 7,4
Chloramin-T-Lösung	1 mg/ml Chloramin-T in Phosphatpuffer
Natriumdisulfit-Lösung	2,5 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in Phosphatpuffer

2fach-Tracer-Puffer	2fach PBS 10 mM EDTA 4 % (w/v) BSA 0,1 % (w/v) Natriumazid 0,1 % (v/v) Tween-20
PBS	50 mM Na ₂ HPO ₄ 150 mM NaCl pH 7,4

2.5.2.2 Sättigungsexperimente mittels Polyethylenglycol (PEG) - Fällung

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d wurden über Sättigungsexperimente mit Hilfe einer Polyethylenglycol (PEG)-Fällung bestimmt. Dazu wurden zunehmende Mengen des zu untersuchenden Bindeproteins mit 20.000 cpm [¹²⁵I]-IGF-I in 150 µl Assaypuffer für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallel Ansätze betrachtet, die einen 500fachen Überschuß an nicht radioaktiv markiertem IGF-I enthielten. Gebundenes und freies [¹²⁵I]-IGF-I wurde anschließend durch die Zugabe von 250 µl 40% (w/v) PEG-4000 in Assaypuffer getrennt. Nach der Zugabe der PEG-Lösung wurden die Proben zunächst kräftig durchmischt und die Ausgangsaktivität der einzelnen Proben im γ -Counter (1470 Wallac Wizard, Pharmacia, Turku, Finnland) gemessen. Anschließend erfolgte die Trennung von gebundenem und freiem [¹²⁵I]-IGF-I durch Zentrifugation (Sorvall RT 6000 B, DuPont, Bad Homburg, D) für 25 min bei 2000 x g. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, woraufhin die Proben erneut für 20 min bei 2000 x g zentrifugiert wurden. Nach Abnahme des Überstandes wurde schließlich die gebundene Radioaktivität des Pellets im γ -Counter gemessen.

Zur Bestimmung der spezifischen Bindung wurde die unspezifische Bindung von der totalen Bindung subtrahiert. Die Berechnung der Bindungskonstanten erfolgte durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Prism Graph Pad Version 3.0 (Graph Pad Inc, San Diego, CA, USA).

Assaypuffer: 0,1 M Hepes
0,44 mM NaHCO₃
0,1 % (w/v) BSA
0,02 % (w/v) Triton-X100
pH 6,0

2.5.3 Bestimmung der IGF-II-Bindungsaffinität durch BIAcore-Analyse

Die BIAcore-Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Stefan Höning (Institut für Biochemie II, Universität Göttingen, D) durchgeführt. Dabei wurden die Interaktionen zwischen IGF-II und den isolierten IGFBP-Fragmenten sowie den Gesamt-IGFBP-Molekülen durch die Messung von Oberflächen-Plasmonresonanz analysiert. Die Messungen erfolgten in Echtzeit mit dem BIAcore-2000-Biosensor (Pharmacia, Freiburg, D). Dazu wurde IGF-II in einer Dichte von 2 ng/mm² über Aminokopplung an einen CM5-Sensorchip gebunden. Die zu untersuchenden Bindeproteine wurde anschließend in Puffer A mit einer Flußrate von 20 µl/min injiziert. Unter Durchfluß von Puffer A wurde zunächst die Assoziation für 2 min detektiert, gefolgt von der Messung der Dissoziation für weitere 2 min. Nach jedem Reaktionszyklus wurde die Oberfläche des Sensor-Chips durch eine kurze Injektion von 20 mM NaOH, 0,5 % SDS für 15 s regeneriert. Ein so behandelter Sensor-Chip konnte für mehr als 100 Reaktionszyklen ohne Veränderung der spezifischen Bindungskapazität verwendet werden. Die Assoziations- und Dissoziationszeitkonstanten, k_a und k_d , wurden anschließend mit der BIAevaluation Software, Version 1.2 (Pharmacia, Freiburg, D) berechnet.

Puffer A: 20 mM HEPES, pH 7,0 mit NaOH
 150 mM NaCl
 10 mM KCl
 2 mM MgCl₂

2.6 Proteolytischer Verdau zur Aufklärung der Disulfidverbrückung

Die Aufklärung der Disulfidverbrückung der C-terminalen Fragmente von IGFBP-2 und -4 erfolgte durch proteolytischen Verdau der Peptide mit nachfolgender Analyse der entstehenden Spaltprodukte mittels MALDI-MS, ESI-MS und Sequenzanalyse.

Beide Fragmente wurden mit den Endoproteasen Chymotrypsin (Roche, Mannheim, D) und Arg-C (Roche, Mannheim, D) der Reinheitsstufe „sequencing grade“ verdaut. Alle Versuche wurden mit einem Peptid/Enzym-Verhältnis von 100/1 (w/w) durchgeführt.

Zur Ermittlung der Spaltkinetik wurden zunächst Vorversuche mit geringen Peptidmengen durchgeführt. Den Ansätzen wurden dabei nach 0,5 h, 1,5 h, 2,5 h, 3,5 h und 18 h Aliquots entnommen. Diese wurden sofort mit 1 M HCl auf pH 3,0 eingestellt und entsalzt. Das Entsalzen erfolgte nach dem Prinzip der RP-Chromatographie mit Hilfe von Zip-Tips (Pharmacia, Freiburg, D). Bei Zip-Tips handelt es sich um Pipettenspitzen mit einem

integrierten Source RPC 15 Material. Durch Aufsagen der Probe werden enthaltene Proteine und Peptide an das Material gebunden. Anschließend wird das Salz durch Spülen mit 0,1 % TFA entfernt, bevor die Probe durch 80 % Acetonitril, 0,1 % TFA eluiert wird. Die entsalzten Aliquots wurden zunächst über MALDI-TOF-MS auf proteolytisch entstandene Proteinfragmente hin untersucht. Die ausgewählten Versuchsbedingungen für beide Fragmente sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

IGFBP-2 (167-279)			
Enzym	Puffer	Zeit	Temperatur
Chymotrypsin	100 mM Tris - HCl 10 mM CaCl ₂ pH 7,8	18 h	25 °C
Endoprotease Arg-C	100 mM Tris - HCl 10 mM CaCl ₂ pH 7,6	18 h	37 °C
IGFBP-4 (136-237)			
Enzym	Puffer	Zeit	Temperatur
Chymotrypsin	100 mM Tris - HCl pH 7,8	8 h	25 °C
Endoprotease Arg-C	90 mM Tris – HCl pH 7,6	2 h	37 °C

Tabelle 11 Zusammenstellung der Versuchsbedingungen für den proteolytischen Verdau der aufgereinigten C-terminalen Fragmente IGFBP-2 (167-279) sowie IGFBP-4 (136-237) zur Bestimmung der Disulfidverbrückung.

Die resultierenden Fragmente wurden anschließend über RP-HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Fraktionen, die theoretisch erwartete Massen von Fragmenten mit Cystein-Resten enthielten, wurden weiterführend durch ESI-MS und N-terminale Sequenzierung analysiert.

2.7 Verwendete Chemikalien und Peptide

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen, D) und Merck (Darmstadt, D) bezogen.

Weiterhin wurden folgende Peptide verwendet:

IGF-I	PeproTech, London, UK
IGF-I, biotinyliert	GroPep, Adelaide, Australien
IGF-II	PeproTech, London, UK
IGF-II, biotinyliert	GroPep, Adelaide, Australien
IGF-II, receptor grade	GroPep, Adelaide, Australien
rhIGFBP-2	GroPep, Adelaide, Australien
rhIGFBP-4	GroPep, Adelaide, Australien

3 Ergebnisse

Zur Isolierung von bislang unbekanntem IGF-BP-Fragmenten aus Hämofiltrat wurde im Rahmen dieser Promotion die folgende Strategie entwickelt (Mark *et al.*, 1999), bei der schon vor dem Beginn der Isolierung verschiedene biochemische und immunologische Parameter von Peptidbankfraktionen untersucht wurden.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der IGF-I-Bindungsfähigkeit sowie die Identifizierung von IGF-BP-Immunitäten durch Western-Immunoblotting oder ELISA in den einzelnen Fraktionen der Hämofiltrat Peptidbibliothek. Fraktionen, die sowohl eine signifikante IGF-I-Bindung als auch eine deutliche IGF-BP-Immunität zeigten, wurden anschließend hinsichtlich ihrer Molekularmasse analysiert. Dabei wurde die Größe des immunitiven Peptids im Western-Immunoblot abgeschätzt und ein MALDI-TOF-Massenspektrum von der entsprechenden Fraktion aufgenommen. Durch den Vergleich der abgeschätzten Masse mit den durch MALDI-TOF-MS erhaltenen Daten konnte dabei der detektierten Immunität oftmals eine Molekularmasse zugeordnet werden.

Daraufhin erfolgte die Isolierung der ausgewählten Peptide durch aufeinanderfolgende chromatographische Schritte, bei denen die Peptide sowohl mittels Western-Immunoblotting als auch mittels MALDI-TOF-MS detektiert wurden.

3.1 Screening der Hämofiltrat-Peptidbank nach IGF-I-bindenden Peptiden

Um einen Überblick über die vorhandene IGF-I-Bindungsfähigkeit in der Hämofiltrat-Peptidbank zu erhalten, wurde zunächst ein Screening nach IGF-I-bindenden Peptiden durchgeführt. Dazu wurden Äquivalentmengen der einzelnen Peptidbank-Fraktionen, die jeweils 200 ml HF entsprachen, mit radioaktiv markiertem ^{125}I -IGF-I inkubiert. Die Trennung von gebundenem und freiem ^{125}I -IGF-I erfolgte mittels PEG-Fällung. Um die unspezifische Bindung zu detektieren, wurden parallel Ansätze mit einem Überschuß an nicht radioaktiv markiertem IGF-I untersucht. Als Positivkontrolle wurde rhIGFBP-2 in einer Menge von 70 ng pro Ansatz eingesetzt. Eine Übersicht der spezifischen Bindung von ^{125}I -IGF-I in den einzelnen Fraktionen der Hämofiltrat-Peptidbank ist in Abbildung 3 zu sehen.

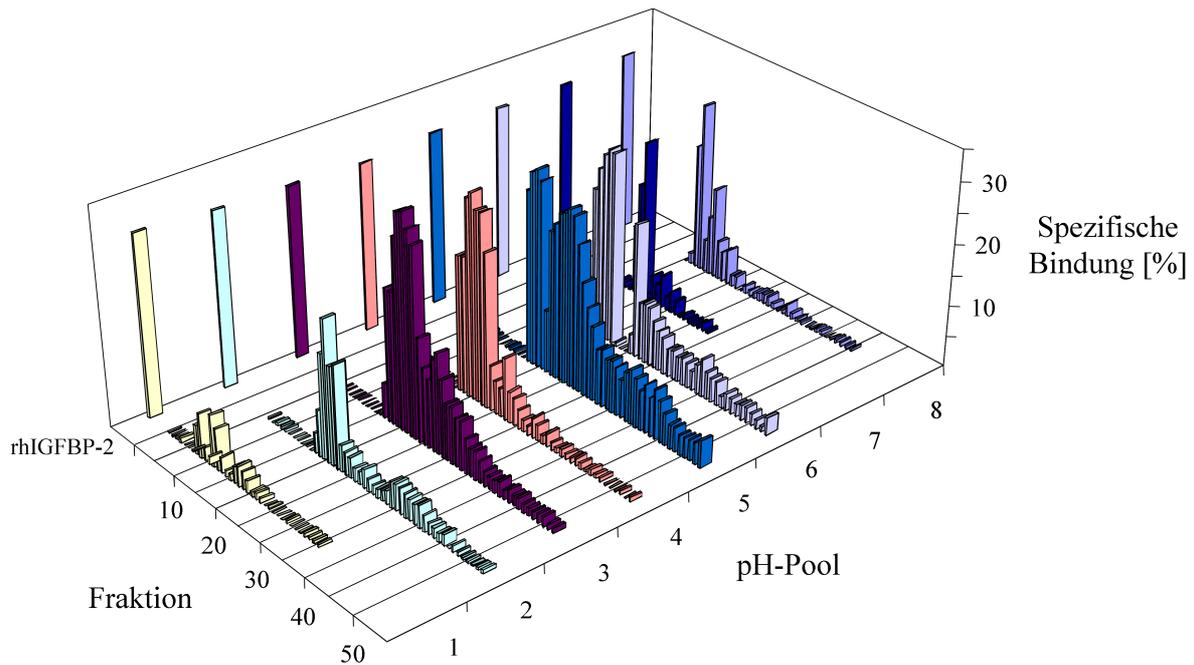


Abbildung 3:

Übersicht über die IGF-I-Bindungsfähigkeit in den einzelnen Fraktionen der Hämofiltrat-Peptidbank.

Es konnte gezeigt werden, daß sich in jedem pH-Pool der Peptidbank Peptide befanden, die eine deutliche IGF-I-Bindungsfähigkeit besaßen. Die höchste Bindungskapazität konnte dabei im Bereich der Fraktionen 19 bis 24 in den pH-Pools 3 bis 6 gemessen werden. Hingegen wurde in pH-Pool 1 nur eine sehr schwache IGF-I-Bindung detektiert.

3.2 Isolierung und Charakterisierung von IGFBP-2-Fragmenten aus humanem Hämofiltrat

3.2.1 Screening der Hämofiltrat-Peptidbank nach IGFBP-2-Immunreaktivitäten

Um einen Überblick über vorhandene IGFBP-2-Immunreaktivitäten in der Hämofiltrat-Peptidbank zu erhalten, wurden die einzelnen Fraktionen der Peptidbibliothek einem immunologischen Screening unterzogen. Dazu wurde ein spezifischer polyklonaler Antikörper verwendet, der durch Immunsierung gegen das IGFBP-2-Gesamtmolekül

hergestellt worden war. Dadurch sollte sichergestellt werden, möglichst alle vorkommenden IGFBP-2-Fragmente detektieren zu können.

Zunächst wurden Äquivalentmengen der einzelnen Fraktionen von jeweils 500 µl HF im ELISA auf vorhandene IGFBP-2-Immunreaktivitäten getestet. Als Positivkontrolle wurden 5 ng rhIGFBP-2 eingesetzt. Eine Übersicht über das immunologische Screening mittels ELISA ist in Abbildung 4 zu sehen. In der Übersichtsdarstellung wurden die Immunreaktivitäten auf die Immunreaktivität von 5 ng rhIGFBP-2 normiert.

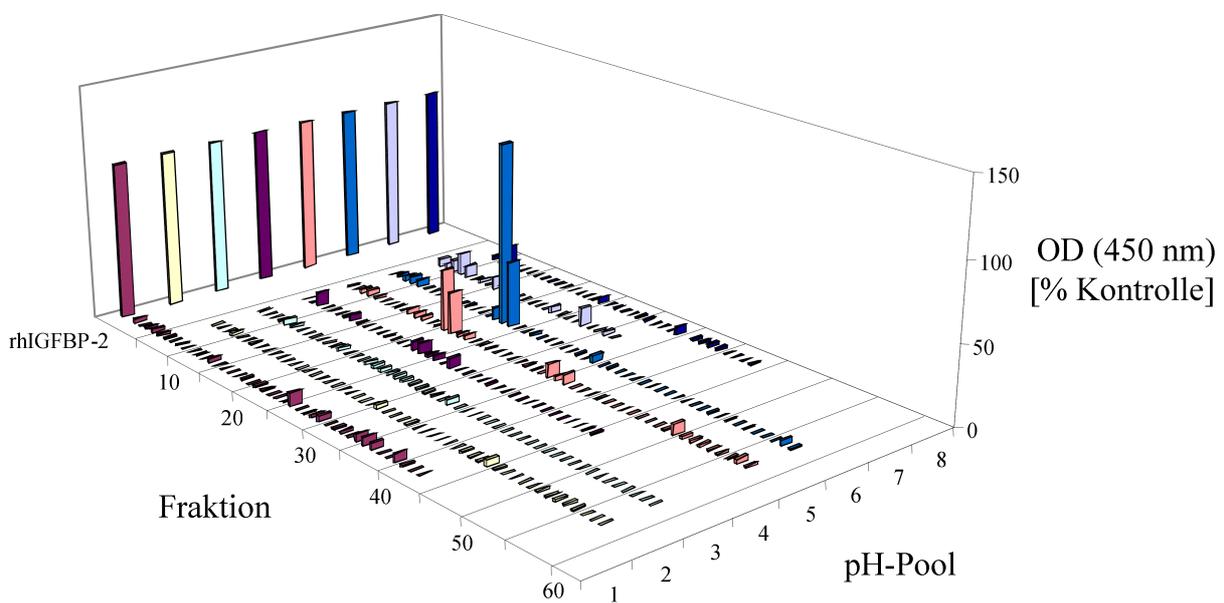


Abbildung 4:

Initiales Screening nach IGFBP-2-Immunreaktivitäten in der Hämofiltrat-Peptidbank mittels ELISA. Die Fraktionen 21 und 22 von pH-Pool 5 sowie die Fraktionen 22 und 23 von pH-Pool 6 zeigten deutliche IGFBP-2-Immunreaktivitäten. Als Positivkontrolle wurden 5 ng rhIGFBP-2 verwendet.

Deutliche IGFBP-2-Immunreaktivitäten konnten nur in den Fraktionen 21 und 22 von pH-Pool 5 sowie in den Fraktionen 22 und 23 von pH-Pool 6 detektiert werden. Beide Bereiche zeichneten sich ebenfalls durch eine signifikante IGF-I-Bindungskapazität aus (vgl. Abbildung 3, Abschnitt 3.1).

Um Informationen über die Größe der immunreaktiven Peptide zu erhalten, wurde anschließend ein Screening mittels Western-Immunoblotting durchgeführt. Dabei wurden Äquivalentmengen der einzelnen Peptidbankfraktionen eingesetzt, die jeweils 200 µl HF entsprachen. Als Kontrolle dienten 200 ng rhIGFBP-2. Abbildung 5 zeigt die chromatographische Fraktionierung von pH-Pool 5 und 6 sowie die zugehörigen Western-Immunoblots.

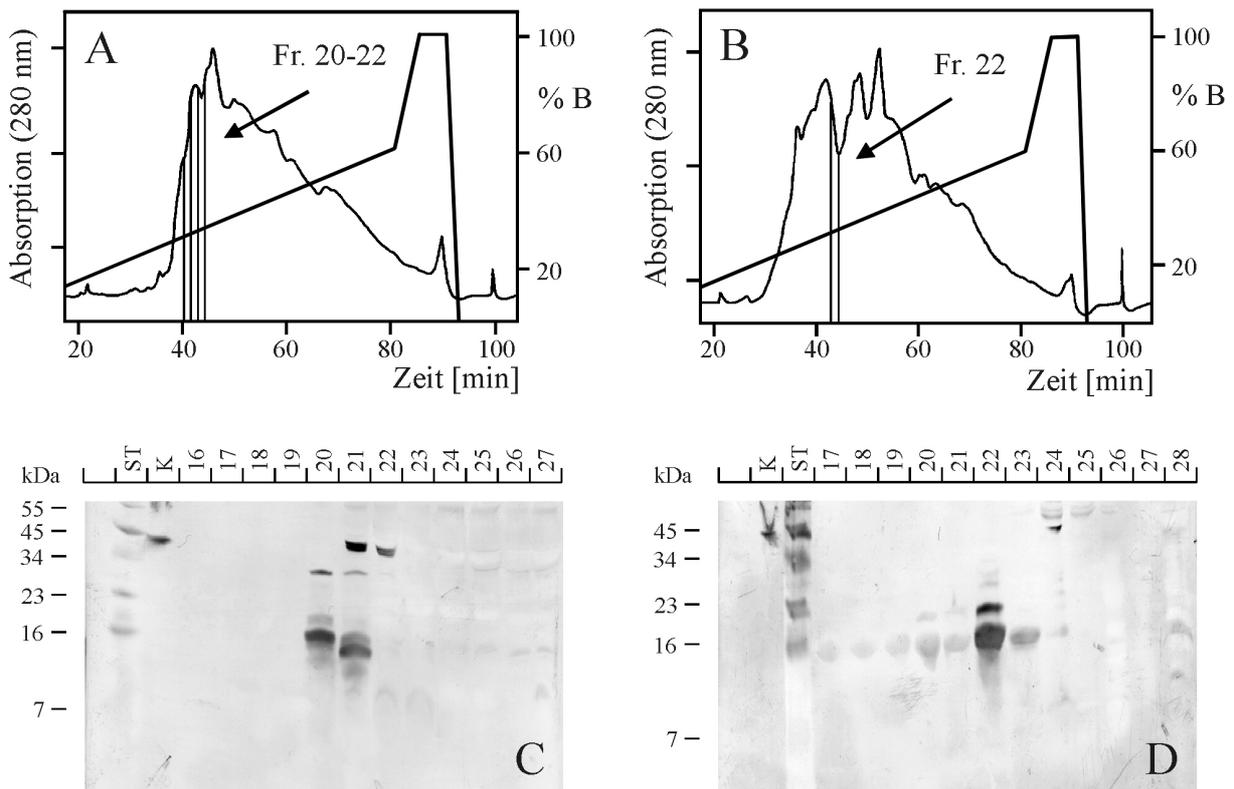


Abbildung 5:

Screening nach IGF2-Immunitäten mittels Western-Immunoblot-Analyse. Gezeigt sind die RP-Chromatogramme zur Herstellung der Peptidbankfraktionen von pH-Pool 5 (A) und pH-Pool 6 (B) sowie die zugehörigen Western-Immunoblots (C, D). In pH-Pool 5 (C) konnten IGF2-Immunitäten in den Fraktionen 20-22 detektiert werden. Der Western-Immunoblot von pH-Pool 6 (D) zeigt eine dominante IGF2-Immunität in Fraktion 22. Die Bereiche, die den immunreaktiven Fraktionen entsprechen, sind in den Chromatogrammen markiert.

K = Kontrolle, 200 ng rhIGFBP-2; ST = Molekulargewichtsstandard

In pH-Pool 5 konnten in den Fraktionen 20 bis 22 immunreaktive Banden verschiedener Größe detektiert werden. Während Fraktion 22 nur eine immunreaktive Bande im Molekulargewichtsbereich des Gesamt-IGFBP-2-Moleküls (~ 40 kDa) zeigte, waren in den Fraktionen 20 und 21 auch verschiedene kleinere IGFBP-2-Fragmente zu erkennen. Fraktion 20 zeigte dabei eine deutliche IGFBP-2-Immunreaktivität im Bereich von ca. 15 kDa, während Fraktion 21 eine immunreaktive Bande mit einer molekularen Größe von ungefähr 13 kDa enthielt. Weiterhin war in beiden Fraktionen eine höhermolekulare Form mit einer apparenten Größe von 27-28 kDa zu finden.

In pH-Pool 6 war eine deutliche IGFBP-2-Immunreaktivität in Fraktion 22 zu beobachten. Diese enthielt zwei deutliche Banden mit apparenten Molekularmassen von 15 und 17 kDa. Neben weiteren schwach immunreaktiven Banden in den Fraktionen 17 – 23 konnte in Fraktion 24 ebenfalls das Gesamt-IGFBP-2-Molekül detektiert werden. Dabei war auffallend, daß das Gesamtmolekül rhIGFBP-2 mit einer molekularen Masse von 31 kDa in einem Molekulargewichtsbereich von 40 kDa detektiert wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sowohl im ELISA als auch im Western-Immunoblot die Fraktionen 21 und 22 aus pH-Pool 5 sowie die Fraktion 22 aus pH-Pool 6 deutliche IGFBP-2-Immunreaktivitäten zeigten. Die Ergebnisse beider Methoden stimmten somit sehr gut überein.

3.2.2 Isolierung verschiedener C-terminaler Fragmente von IGFBP-2

Zur Isolierung von IGFBP-2-Fragmenten wurden die Fraktionen 20 und 21 aus pH-Pool 5 ausgewählt, die im Screening sowohl deutliche IGF-I-Bindungskapazität als auch IGFBP-2-Immunreaktivität zeigten.

Die Aufreinigung der verschiedenen IGFBP-2-Fragmente erfolgte daraufhin durch die Kombination von (a) Western-Immunoblot-Analyse zur Detektion der Peptide und (b) verschiedenen chromatographischen Techniken zur Auftrennung der Peptidgemische. Weiterhin wurden die Fraktionen der einzelnen Chromatographieschritte mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Durch die Kenntnis der Molekularmassen in den immunreaktiven Fraktionen konnte dabei zum einen schon frühzeitig auf die mögliche molekulare Masse der immunreaktiven Peptide geschlossen werden. Zum anderen konnte eine Aussage über die Reinheit der Fraktion getroffen werden, wodurch Informationen für den nächsten Chromatographieschritt erhalten wurden. Ferner wurde durch die Detektion bekannter

Molekularmassen eine erneute Aufreinigung bereits identifizierter IGFBP-2-Fragmente verhindert.

3.2.2.1 Isolierung und biochemische Charakterisierung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167–279)

Die Isolierung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279) erfolgte über fünf aufeinanderfolgende chromatographische Aufreinigungsschritte (Abbildung 6-8). Dabei wurden die Fraktionen der einzelnen Chromatographieschritte mittels Western-Immunoblot sowie mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Die detaillierten Chromatographiebedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte sind in Tabelle 4, Abschnitt 2.2.3.1 aufgeführt.

Zunächst wurden die ausgewählten Peptidbankfraktionen 20 und 21 von pH-Pool 5 durch eine präparative RP-HPLC unter Verwendung einer Pharmacia Source Finline 15RPC-Säule weiter aufgetrennt. Im darauffolgenden Western-Immunoblot konnte eine deutliche IGFBP-2-Immunreaktivität in den Fraktionen 21 bis 23 detektiert werden.

Da es sich bei den immunreaktiven Fraktionen 21–23 um eine zu große Substanzmenge für einen gemeinsamen nachfolgenden Chromatographieschritt handelte, wurden Fraktion 22 sowie die Fraktionen 21 und 23 getrennt chromatographiert. Dabei wurde erneut eine präparative RP-HPLC auf einem Bakerbond C18-Material durchgeführt. Im anschließenden Western-Immunoblot zeigte sich, daß sich die IGFBP-2-Immunreaktivität bei der Rechromatographie der Fraktionen 21 und 23 in mehrere immunreaktive Banden unterschiedlicher Größe aufgetrennt hatte. Insgesamt konnten immunreaktive Peptide mit apparenten Molekulargewichten von 5, 9, 12, 15, 17 und 27 kDa in den Fraktionen 6 bis 12 detektiert werden.

Zur Isolierung der dominierenden IGFBP-2-Immunreaktivität mit einem apparenten Molekulargewicht von 15 kDa erfolgte eine Rechromatographie der Fraktionen 8 und 9. Dabei wurde eine analytische Kationenaustausch-Chromatographie unter Verwendung eines Biotek Pepkat-Materials durchgeführt. Die Western-Immunoblot-Analyse der entstehenden Fraktionen zeigte immunreaktive Peptide in den Fraktionen 57 bis 76. Für den nachfolgenden Chromatographieschritt wurden die Fraktionen 68-72 ausgewählt. Diese enthielten neben der dominierenden Immunreaktivität mit einer Größe von 15 kDa noch eine weitere immunreaktive Bande im Bereich von 9 kDa.

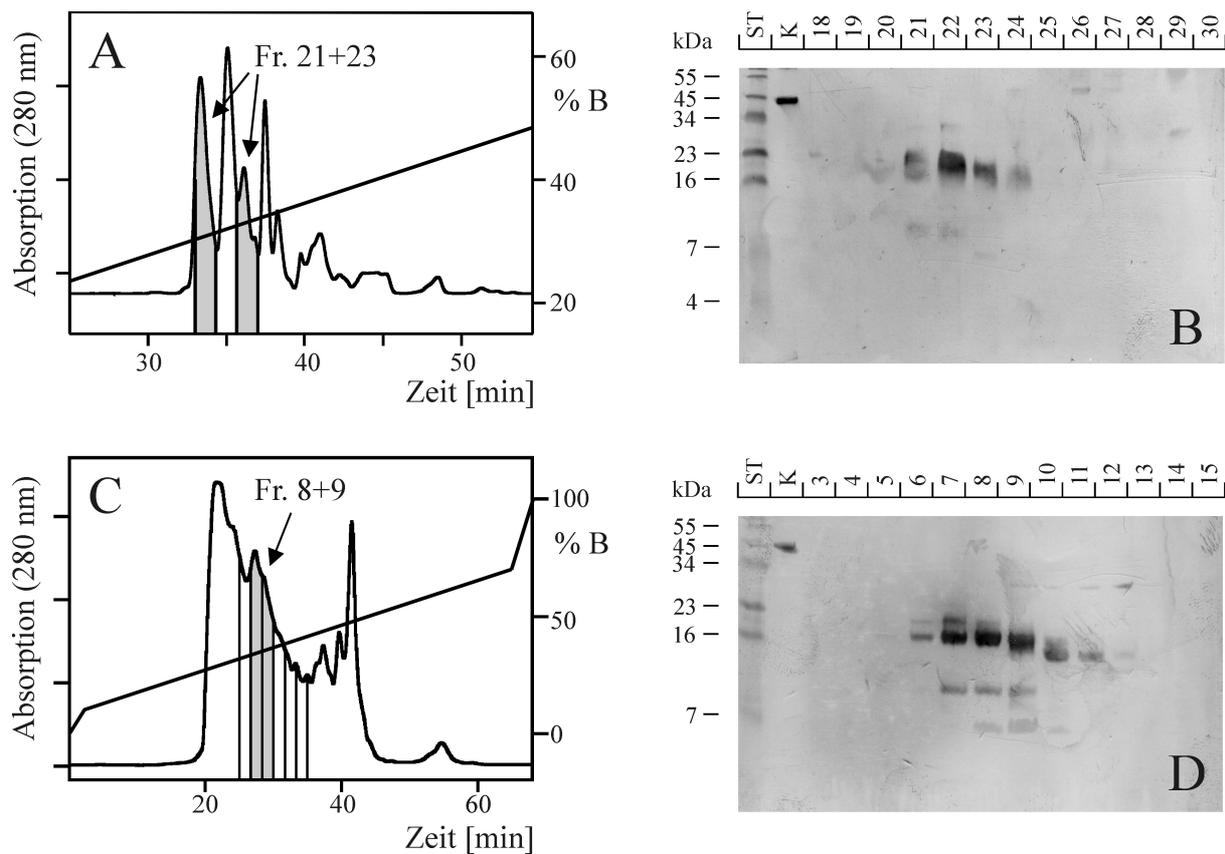


Abbildung 6:

Präparative RP-HPLC-Schritte zur Isolierung des Fragments IGFBP-2 (167-279). Nach der chromatographischen Auftrennung der Peptidbankfraktionen 20 und 21 aus pH-Pool 5 (A) konnten im anschließenden Western-Immunoblot deutliche Immunreaktivitäten in den Fraktionen 21 bis 24 detektiert werden (B). Die Fraktionen 21 und 23 wurden daraufhin rechromatographiert (C). Der zugehörige Western-Immunoblot zeigt eine Auftrennung der Immunreaktivität in immunreaktive Banden verschiedener molekularer Größen (D). Die zur weiteren Chromatographie eingesetzten Fraktionen sind in den Chromatogrammen jeweils durch grau unterlegte Bereiche gekennzeichnet.

K = Kontrolle, 100 ng rhIGFBP-2; ST = Molekulargewichtsstandard

Die vierte chromatographische Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines analytischen Vyday C18 Säulenmaterials. Im nachfolgenden Western-Immunoblot konnten immunreaktive Banden in den Fraktionen 38 bis 45 detektiert werden. Die IGFBP-2-Immunreaktivität mit einer apparenten Größe von 9 kDa wurde dabei in den Fraktionen 38 und 39, die Immunreaktivität mit einer apparenten Molekularmasse von 15kDa in den Fraktionen 40 bis 45 detektiert. Beide immunreaktiven Peptide konnten in diesem chromatographischen Schritt somit voneinander getrennt werden. Obwohl die Fraktionen 41 bis 43 die größte Immunreaktivität

besaßen, wurde Fraktion 44 für den nachfolgenden Chromatographieschritt ausgewählt. Den Grund hierfür lieferte die parallel durchgeführte MALDI-TOF-Massenspektrometrie der immunreaktiven Fraktionen. Diese zeigte für Fraktion 44 nur noch eine molekulare Masse von 12860 Da im gewünschten Molekulargewichtsbereich.

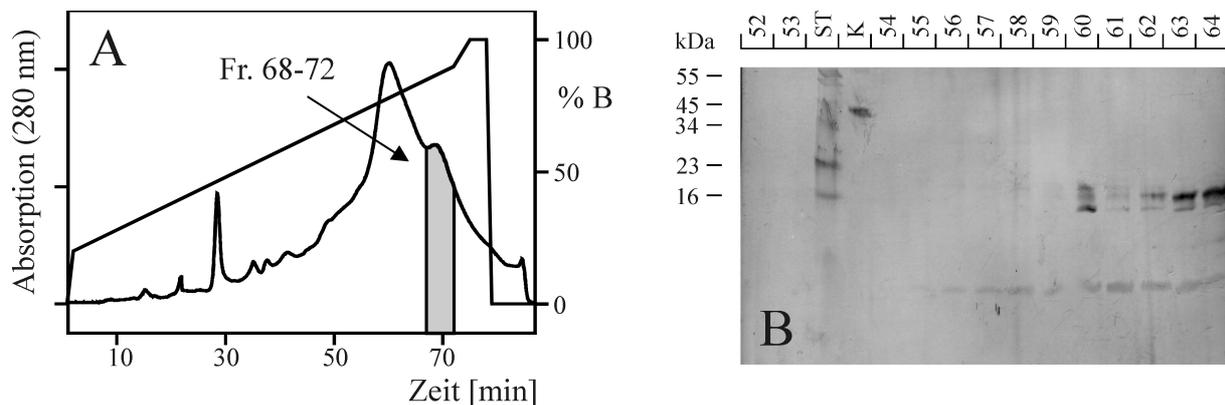


Abbildung 7:

Im dritten Aufreinigungsschritt der Isolierung des Fragments IGFBP-2 (167-279) wurde eine Kationenaustausch-Chromatographie durchgeführt (A). Der zugehörige Western-Immunoblot ist in (B) und (C) zu sehen. Die zur weiteren Aufreinigung eingesetzten Fraktionen 68 bis 72 sind im Chromatogramm grau unterlegt.

K = Kontrolle, 100 ng rhIGFBP-2;

ST = Molekulargewichtsstandard

Im fünften Aufreinigungsschritt konnte das immunreaktive Peptid mit einer apparenten molekularen Masse von 15 kDa unter Verwendung einer analytischen Phenomenex Aqua RP-C5-Säule schließlich als Reinsubstanz erhalten werden. Deutliche IGFBP-2-Immunreaktivität konnte in den Fraktionen 23 bis 25 detektiert werden. Fraktion 25 mit der höchsten Immunreaktivität wurde nachfolgend weiter biochemisch charakterisiert.

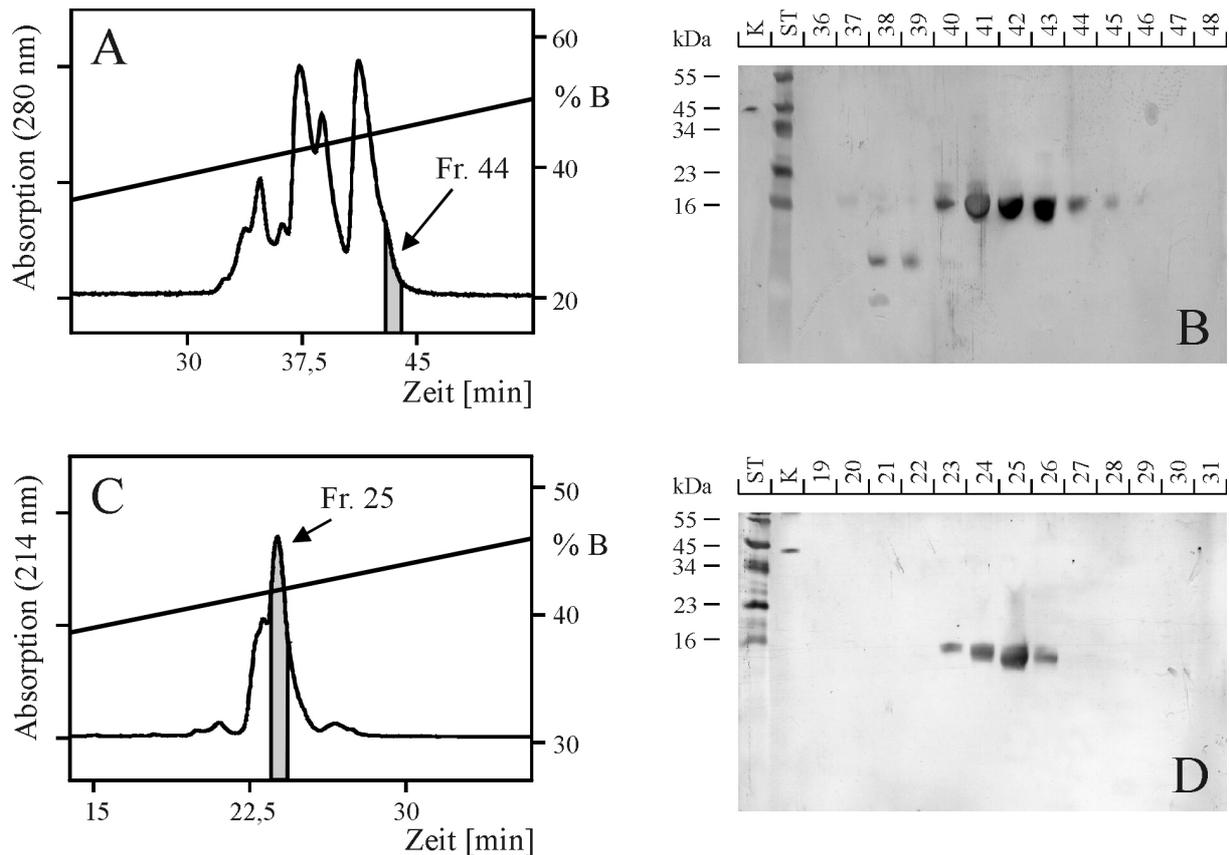


Abbildung 8:

Analytische RP-HPLC-Schritte zur Aufreinigung des Fragments IGFBP-2 (167-279) mit zugehöriger Western-Immunoblot-Analyse. Nach der chromatographischen Auftrennung der immunreaktiven Fraktionen 68 bis 72 aus Abbildung 7 (A) konnten bei der darauffolgenden Western-Immunoblot-Analyse (B) immunreaktive Peptide in den Fraktionen 38 bis 45 detektiert werden. Trotz einer relativ schwachen Immunreaktivität wurde Fraktion 44 zur weiteren Chromatographie (C) ausgewählt, da mittels parallel durchgeführter MALDI-TOF-Massenspektrometrie in dieser Fraktion nur eine Substanz im erwarteten Molekulargewichtsbereich detektiert wurde. Im anschließenden Western-Immunoblot (D) konnte ein deutlich immunreaktives Peptid in Fraktion 25 erhalten werden, welches nachfolgend als IGFBP-2 (167-279) identifiziert wurde.

K = Kontrolle, 100 ng rhIGFBP-2; ST = Molekulargewichtsstandard

Zur Reinheitsüberprüfung des isolierten immunreaktiven Peptids wurde zunächst eine Kapillarzonen-Elektrophorese durchgeführt (Abbildung 9 A). Dabei konnte nur eine einzelne Komponente ohne Verunreinigungen detektiert werden. Die anschließende genaue Massenbestimmung mittels ESI-MS ergab eine molekulare Masse des Peptids von 12858,6 Da (Abbildung 9 B).

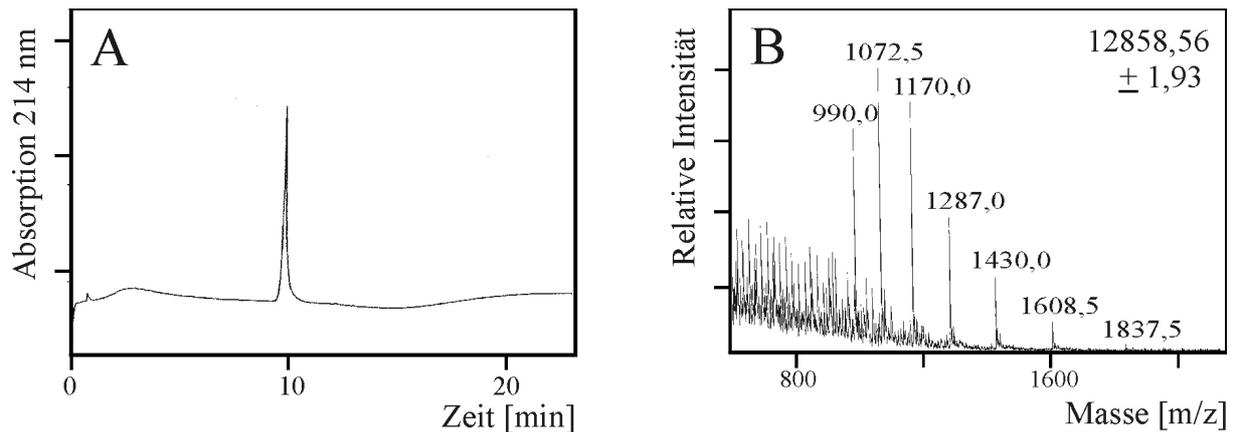


Abbildung 9:

Biochemische Charakterisierung des isolierten immunreaktiven Peptids. (A) Die Kapillaronenelektrophorese zur Reinheitsüberprüfung des isolierten Fragments zeigte keine Verunreinigungen. (B) Mit Hilfe von ESI-MS konnte die molekulare Masse des immunreaktiven Peptids von 12858,6 Da bestimmt werden.

Mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung konnte das immunreaktive Peptid eindeutig als C-terminales IGFBP-2-Fragment identifiziert werden. Durch Edman-Abbau wurde dabei die Einzelsequenz GKGGKHHLGLEEPKK erhalten (Abbildung 10). Diese stimmte exakt mit dem Sequenzabschnitt Gly167 bis Lys181 des humanen IGFBP-2 überein. Unter Berücksichtigung der bestimmten Molekularmasse von 12858,6 Da konnte das isolierte Fragment eindeutig dem Bereich Gly167-Glu279 des humanen IGFBP-2-Moleküls mit einer theoretischen Molekularmasse von 12857,74 Da zugeordnet werden.

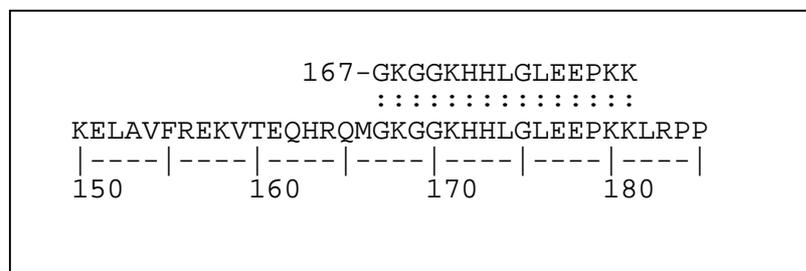


Abbildung 10:

Vergleich von einem Sequenzabschnitt des humanen IGFBP-2 mit der N-terminalen Sequenz des immunreaktiven Peptids. Die ermittelte Sequenz zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Bereich Gly167 bis Lys181 von humanem IGFBP-2.

Um genügend Material für weiterführende Untersuchungen zu erhalten, wurden anschließend größere Mengen des Fragments anhand seiner Molekularmasse isoliert. Zur Detektion wurde dabei die MALDI-TOF-Massenspektrometrie verwendet.

3.2.2.2 Isolierung eines IGFBP-2-Fragments mit einer molekularen Masse von 12875 Da

Während der Isolierung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279) mit einer molekularen Masse von 12858 Da konnte weiterhin mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie in einigen Fraktionen eine IGFBP-2-Immunreaktivität mit einer geringfügig differierenden Masse detektiert werden. Da die Abweichung dieser Masse nicht im Rahmen der Meßgenauigkeit der Methode lag, wurde das zugehörige Peptid weiter gereinigt und identifiziert. Dazu wurde eine Fraktion mittels MALDI-TOF-MS ausgewählt, die ein deutliches Signal der gewünschten Masse enthielt. Diese Fraktion wurde anschließend mit Hilfe einer analytischen RP-Chromatographie aufgetrennt (Abbildung 11).

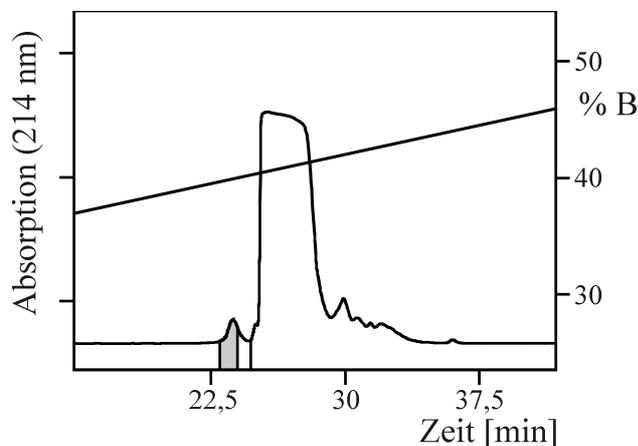


Abbildung 11:

Analytischer RP-HPLC-Schritt, bei dem ein IGFBP-2-Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da als Reinsubstanz erhalten wurde. Die Fraktionen mit der gesuchten Masse sind durch Balken markiert. Die grau unterlegte Fraktion wurde zur weiterführenden Analytik verwendet.

Daraufhin wurden die generierten Fraktionen erneut mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Die gesuchte Masse konnte im vorderen Bereich des Chromatogramms in nahezu sauberer Form detektiert werden, so daß anschließend eine biochemische Charakterisierung des zugehörigen Peptids mittels Kapillarzonelektrophorese, ESI-MS und N-terminaler Sequenzierung durchgeführt wurde. Insgesamt waren zur Aufreinigung dieses Fragments fünf

chromatographische Trennschritte notwendig, die übersichtlich in Tabelle 5, Abschnitt 2.2.3.2 dargestellt sind.

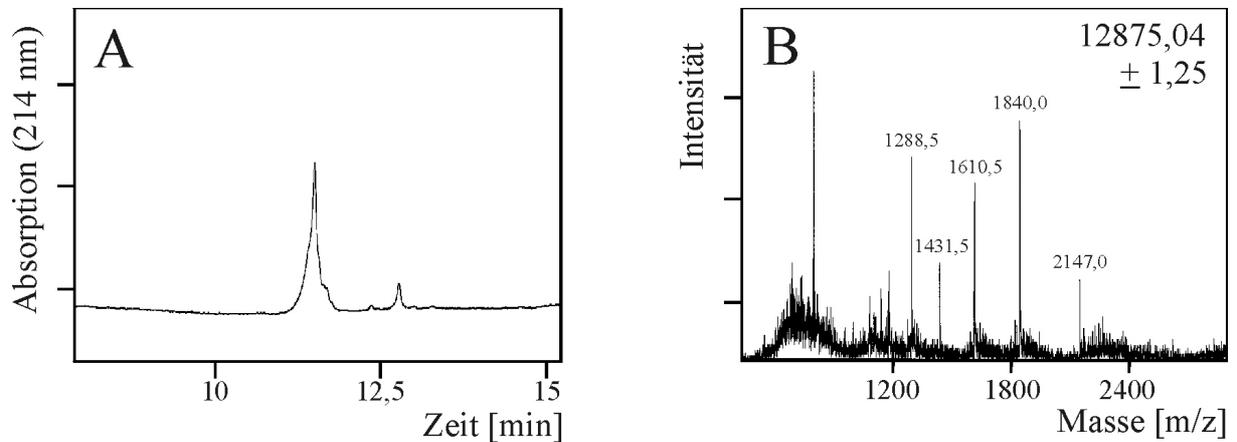


Abbildung 12:

Biochemische Charakterisierung des isolierten IGFBP-2-Fragments. (A) Die Kapillarzonenelktrophorese zeigte leichte Verunreinigungen, wobei die Hauptkomponente eine Reinheit von 90 % besaß. (B) Bei der genauen Massenbestimmung mittels ESI-MS wurde eine Molekularmasse von 12875 Da erhalten.

Bei der Kapillarzonenelktrophorese wurden nur leichte Verunreinigungen detektiert (Abbildung 12 A), wobei eine Reinheit des Peptids von 90 % bestimmt wurde. Die Massenbestimmung mittels ESI-MS resultierte in einer molekularen Masse von 12875 Da (Abbildung 12 B).

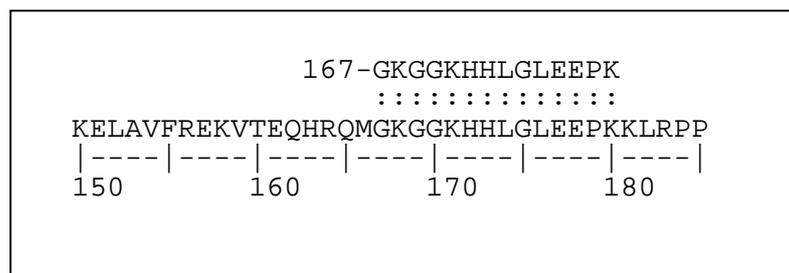


Abbildung 13:

Sequenzvergleich der durch Edman-Abbau erhaltenen Aminosäure-Sequenz mit der Sequenz von humanem IGFBP-2. Der sequenzierte Bereich zeigt eine exakte Übereinstimmung mit dem Sequenzabschnitt IGFBP-2 (167-180).

Bei der anschließenden N-terminalen Sequenzierung wurde die Sequenz GKGGKHHLGLEEPK in Form einer Einzelsequenz erhalten (Abbildung 13). Diese Sequenz stimmte exakt mit dem Sequenzabschnitt IGFBP-2 (167-180) überein.

Es konnte somit ein weiteres C-terminales IGFBP-2-Fragment aufgereingt werden, welches N-terminal mit der Aminosäure Gly167 begann. Allerdings konnte das isolierte IGFBP-2-Fragment aufgrund seiner molekularen Masse von 12875 Da keinem Bereich der humanen IGFBP-2-Sequenz eindeutig zugeordnet werden.

Da nicht genügend Material für eine C-terminale Sequenzierung mittels Carboxypeptidase Y oder für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stand, konnte die exakte molekulare Form des Fragments – insbesondere sein C-terminales Ende sowie mögliche Modifikationen – nicht aufgeklärt werden.

3.2.2.3 Isolierung und biochemische Charakterisierung des Fragments IGFBP-2 (104-289)

Schon während des initialen Screening konnte eine IGFBP-2-Immunreaktivität mit einer apparenten molekularen Masse von 27 kDa in pH-Pool 5 detektiert werden (vgl. Abschnitt 3.2.1). Dieses immunreaktive Peptid wurde aufgrund seines deutlich höheren Molekulargewichts im Vergleich zu den anderen detektierbaren Fragmenten ebenfalls für eine weiterführende Analytik aufgereinigt. Zur Reindarstellung des Peptidfragments waren sechs aufeinanderfolgende chromatographische Schritte der Peptidbank-Fractionen notwendig (Abbildung 14 und 15). Eine Übersicht über die detaillierten chromatographischen Bedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte liegt mit Tabelle 6, Abschnitt 2.2.3.3 vor. Die Detektion des Peptids erfolgte dabei mittels Western-Immunoblot-Analyse. Parallel wurden die Molekularmassen in den immunreaktiven Fraktionen mittels MALDI-TOF-MS bestimmt.

Zur Isolierung des Peptids mit einer apparenten Molekularmasse von 27 kDa wurden zunächst die beiden Fraktionen 20 und 21 aus pH-Pool 5 auf einer präparativen Pharmacia Source Finline 15RPC-Säule RP-chromatographisch aufgetrennt. Anschließend wurden die entstehenden Fraktionen bezüglich ihrer IGFBP-2-Immunreaktivität im Western-Immunoblot untersucht. In den Fraktionen 21 bis 24 waren deutliche immunreaktive Banden zu erkennen.

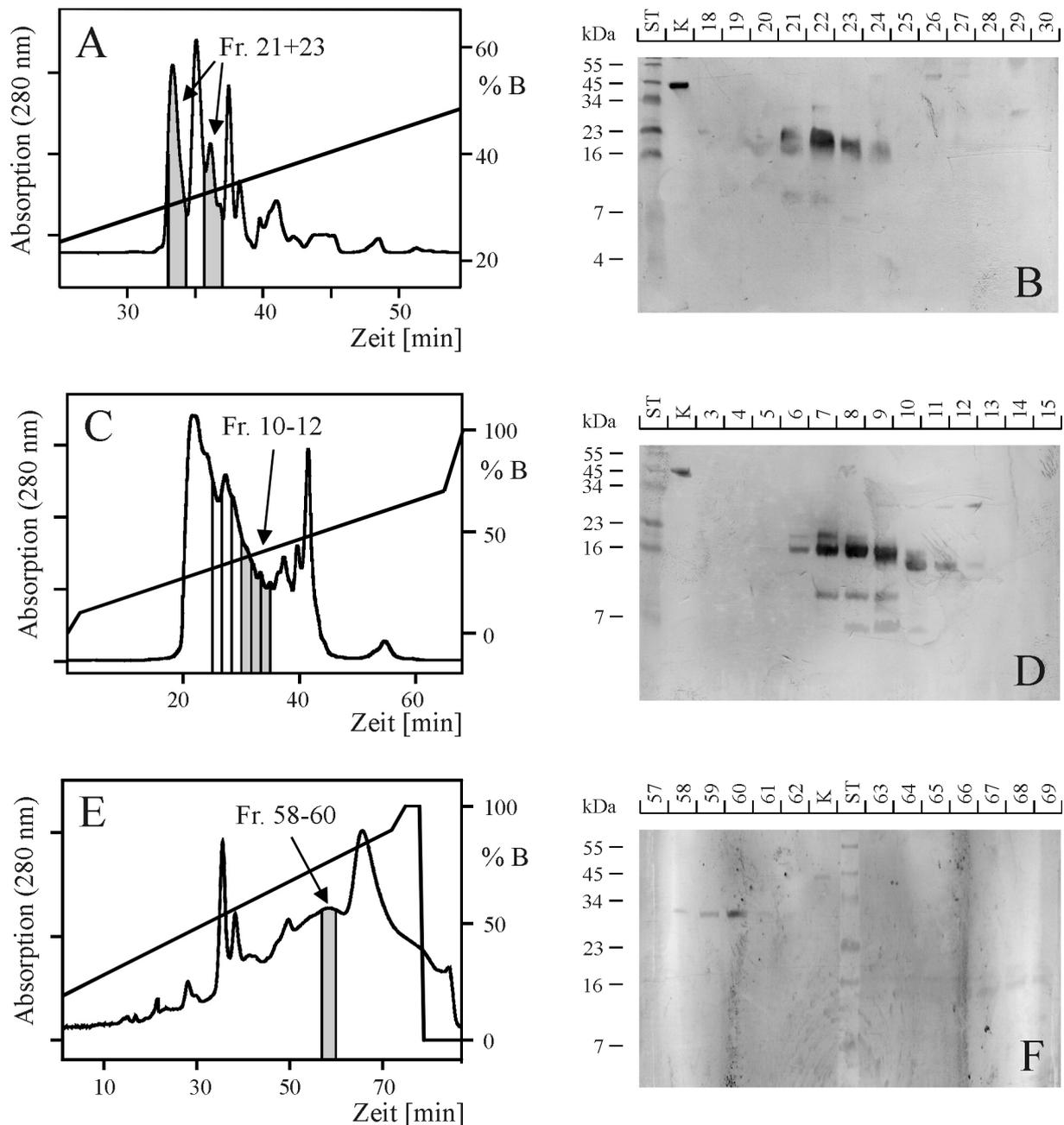


Abbildung 14:

Darstellung der ersten drei Aufreinigungsschritte bei der Isolierung des Fragments IGFBP-2 (104-289). Bei der präparativen RP-Chromatographie der Peptidbankfraktionen 20 und 21 von pH-Pool 5 (A) wurden Fraktionen generiert, die anschließend im Western-Immunoblot (B) getestet wurden. Die immunreaktiven Fraktionen 21 und 23 wurden daraufhin erneut chromatographiert (C). Der zugehörige Western-Immunoblot (D) zeigte mehrere immunreaktive Banden mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten. Die Fraktionen 10 bis 12, die ein immunreaktives Peptid mit einer apparenten molekularen Masse von 27 kDa enthielten, wurden einem weiteren Aufreinigungsschritt mittels Kationenaustausch-Chromatographie unterzogen (E). Im anschließenden Western-Immunoblot konnte das immunreaktive Peptid in den Fraktionen 58 bis 60 erneut detektiert werden. Die jeweils im nächsten Chromatographieschritt zur Rechromatographie eingesetzten Fraktionen sind in den Chromatogrammen grau unterlegt.

K = Kontrolle, 100 ng rhIGFBP-2; ST = Molekulargewichtsstandard

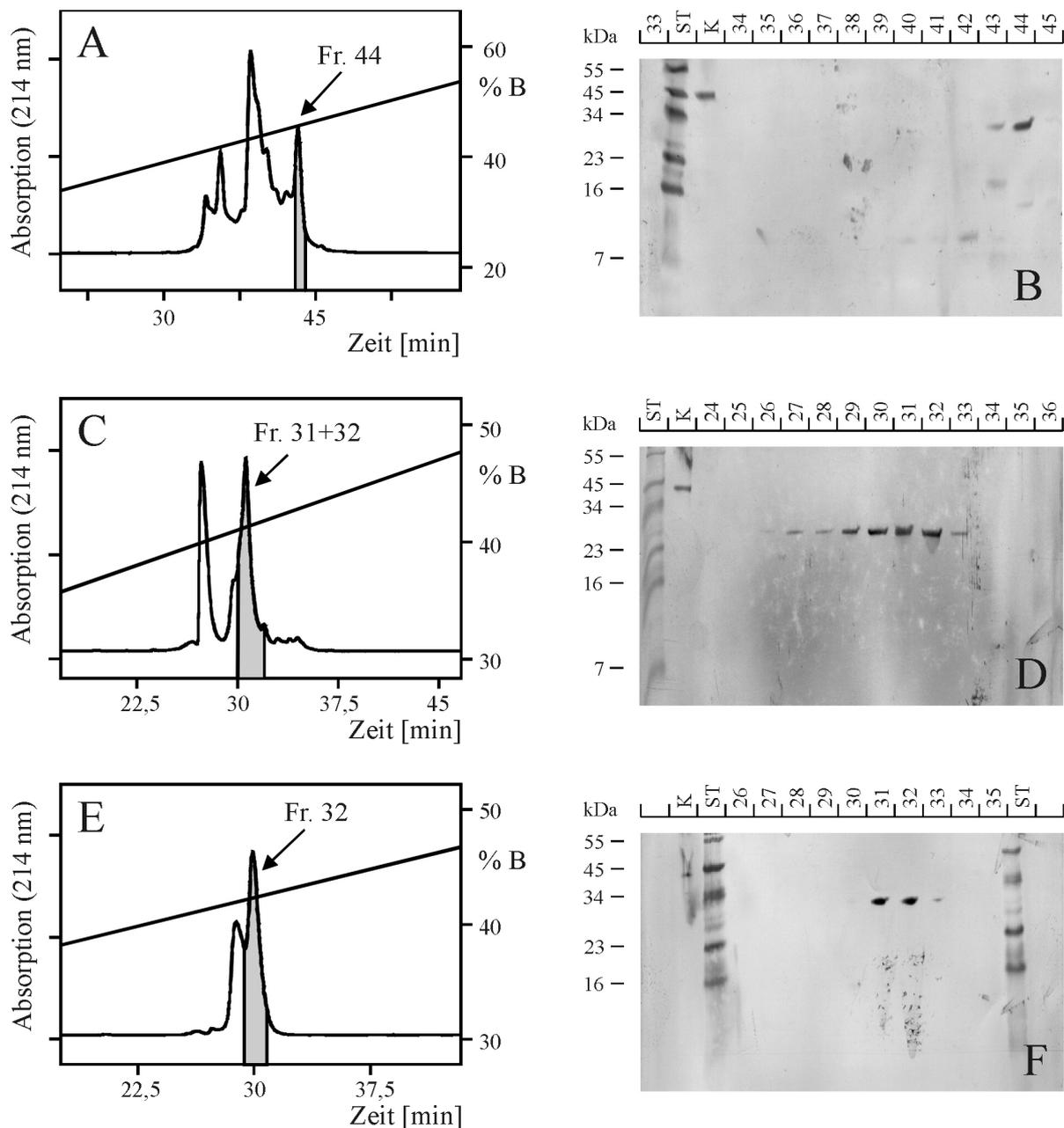


Abbildung 15:

Darstellung der letzten drei Chromatographieschritte, die zur Isolierung des Fragments IGFBP-2 (104-289) führten. Die immunreaktiven Fraktionen 58-60 aus Abbildung 14 E und F wurden zunächst rechromatographiert (A), woraufhin die generierten Fraktionen mittels Western-Immunoblot untersucht wurden (B). Dabei konnte in Fraktion 44 eine deutliche Immunreaktivität detektiert werden. Diese wurde erneut chromatographiert (C). Der zugehörige Western-Immunoblot (D) zeigte deutliche Immunreaktivitäten in den Fraktionen 29 bis 32. Die erneute chromatographische Auftrennung der Fraktionen 31 und 32 (E) führte schließlich zur Reindarstellung des Fragments IGFBP-2 (104-289). Der zugehörige Western-Immunoblot ist unter (F) gezeigt. Die zur nachfolgenden Chromatographie oder zur Analytik eingesetzten Fraktionen sind in den entsprechenden Chromatogrammen jeweils grau gekennzeichnet.

K = Kontrolle, 100 ng rhIGFBP-2; ST = Molekulargewichtsstandard

Die Fraktionen 21 und 23 wurden anschließend für eine zweite präparative RP-Chromatographie auf eine Bakerbond Kartusche mit C18-Säulenmaterial aufgetragen. Bei der darauffolgenden Western-Immunoblot-Analyse der generierten Fraktionen konnten mehrere immunreaktive Peptide unterschiedlicher apparenter Molekulargewichte detektiert werden. Fraktionen 10 bis 12 enthielten dabei das gesuchte Peptid mit einer Größe von ungefähr 27 kDa und wurden deshalb für einen weiteren Chromatographieschritt ausgewählt.

Dieser erfolgte auf einer Kationenaustauscher-Säule mit einem Biotek-Pepkat-Säulenmaterial. Das immunreaktive Peptid konnte anschließend in den Fraktionen 58 bis 60 mittels Western-Immunoblot-Analyse erneut detektiert werden.

In der vierten Aufreinigungsstufe wurden die immunreaktiven Fraktionen des vorherigen Aufreinigungsschrittes über RP-Chromatographie mit einem analytischen Vyday C18-Säulenmaterial erneut aufgetrennt. Im anschließenden Western-Immunoblot konnte in Fraktion 44 eine deutliche immunreaktive Bande der gesuchten Größe detektiert werden.

Diese wurde daraufhin auf einer analytischen Phenomenex Jupiter RP-C5-Säule erneut RP-chromatographisch aufgetrennt, wobei die erhaltenen Fraktionen ebenfalls bezüglich ihrer IGFBP-2-Immunreaktivität untersucht wurden. Deutlich immunreaktive Banden konnte dabei in den Fraktionen 29 bis 32 erhalten werden.

Im letzten Chromatographieschritt wurde mit einer Phenomenex Jupiter RP-C4-Säule erneut ein analytischer RP-HPLC-Lauf durchgeführt. Dabei wurden die Fraktionen 31 und 32 der vorangegangenen Chromatographie auf die Säule aufgetragen. Der Western-Immunoblot der generierten Fraktionen zeigte eine deutliche Immunreaktivität in den Fraktionen 31 und 32. Fraktion 32 wurde dabei für eine weiterführende Analytik mittels ESI-MS, Kapillarzonelektrophorese und N-terminaler Sequenzierung zur Identifizierung des immunreaktiven Peptids eingesetzt.

Zunächst wurde die genaue Masse des immunreaktiven Peptids mit Hilfe von ESI-MS bestimmt (Abbildung 16). Dabei konnten zwei unterschiedliche Massen von $20688,3 \pm 2,4$ Da und von $20428,0 \pm 5,6$ Da detektiert werden (Abbildung 16 A und B).

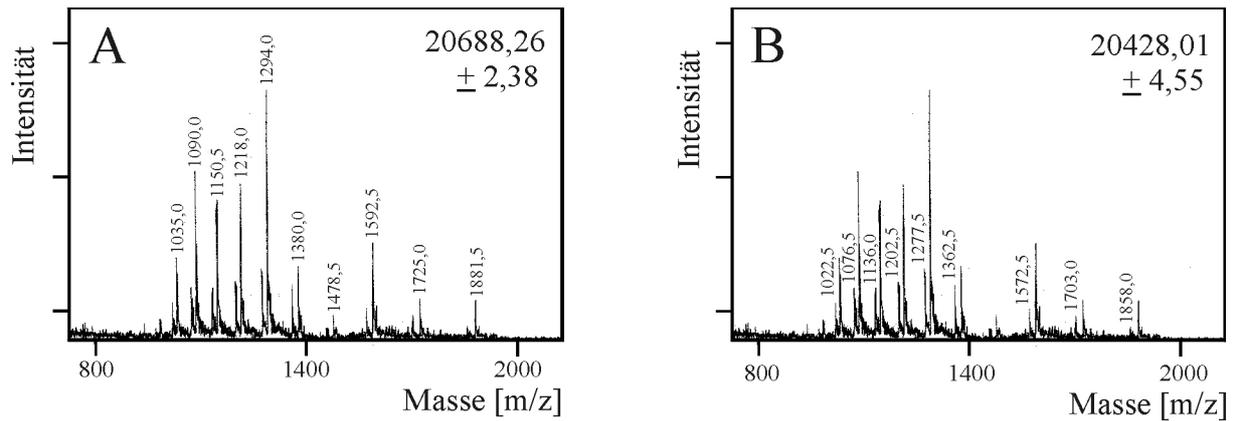


Abbildung 16:

ESI-Massenspektrum der immunreaktiven Fraktion. In (A) und (B) sind jeweils die Signale markiert, die sich einer der beiden unterschiedlichen Molekularmassen zuordnen lassen. Die markierten Signale in (A) gehören zu einem Peptid mit einer molekularen Masse von 20688,3 Da, während die markierten Signale in (B) einem Peptid mit einer Molekularmasse von 20428,0 Da entsprechen.

Die Reinheitsüberprüfung mittels Kapillarzonelektrophorese zeigte ebenfalls zwei verschiedene Hauptkomponenten, die allerdings ein sehr ähnliches Migrationsverhalten aufwiesen (Abbildung 17). Diese Beobachtung ließ darauf schließen, daß es sich bei den zwei unterschiedlichen Massen um zwei sehr ähnliche Formen oder Fragmente des gleichen Peptids handelte. Zusammen betrachtet, zeigten beide Hauptpeaks eine Reinheit von >80%.

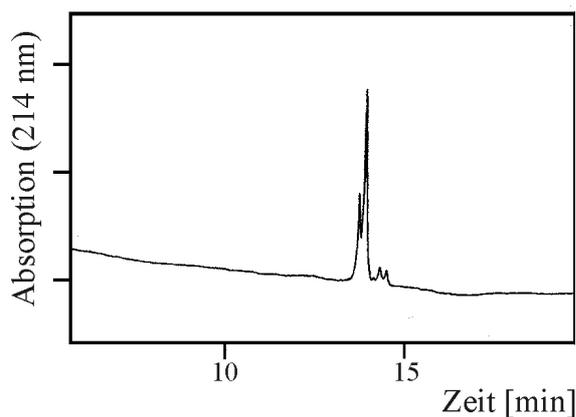


Abbildung 17:

Die Kapillarzonelektrophorese der immunreaktiven Fraktion zeigte einen zweigeteilten Hauptpeak. Weiterhin sind kleinere Verunreinigungen detektierbar.

Bei der anschließenden N-terminalen Sequenzierung wurde die Einzelsequenz GASPEQVADNGDDHSEGGLV erhalten. Diese stimmt exakt mit dem Sequenzabschnitt

Abbildung 19 zeigt das MALDI-TOF-Massenspektrum einer Fraktion mit drei unterschiedlichen IGFBP-2-Immunreaktivitäten im Western-Immunoblot, die sich chromatographisch nicht voneinander trennen ließen. Der zugehörige Western-Immunoblot ist in Abbildung 20, Spur F (Abschnitt 3.2.2.5) dargestellt. Im Massenspektrum waren ebenfalls nur noch drei verschiedene Molekulargewichts-Bereiche detektierbar, da die beiden Signale mit einer Molekularmasse um 7 kDa den zweifach geladenen Signalen der Peptide mit einer Molekularmasse um 14 kDa entsprachen. Die Massen von 4242 Da, 9533 Da und 9798 Da sowie 13774 Da und 14036 Da konnten somit den immunreaktiven Banden zugeordnet werden.

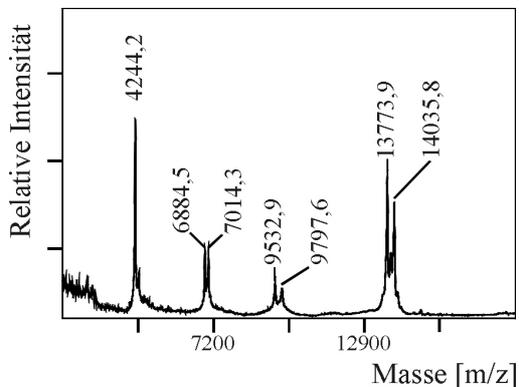


Abbildung 19:

MALDI-TOF-Massenspektrum einer Fraktion mit drei verschiedenen IGFBP-2-Immunreaktivitäten, die sich chromatographisch nicht voneinander trennen ließen. Der zugehörige Western-Immunoblot ist in Abbildung 20, Spur F (Abschnitt 3.2.2.5) zu sehen.

Zur Identifizierung der immunreaktiven Peptide wurde daraufhin eine direkte N-terminale Sequenzierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente durchgeführt. Dazu wurden diese zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran geblottet. Nach einer darauffolgenden Coomassie-Färbung zur Detektion der Peptide wurden die entsprechenden Bereiche des Blots ausgeschnitten und direkt zur Sequenzierung eingesetzt.

Mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung konnten alle im MALDI-TOF-Massenspektrum detektierten Peptide IGFBP-2-Fragmenten zugeordnet werden. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht über die erhaltenen Sequenzen sowie ihre Zuordnung zu den Molekularmassen und den zugehörigen Sequenzbereichen des IGFBP-2-Moleküls.

Molekularmasse nach MALDI-MS [Da]	theoretische Molekularmasse [Da]	N-terminale Sequenzierung	zugehöriger Sequenzbereich
4244,2	4244,9	GKGGKHHHLGLEEPKKLXPPPA	IGFBP-2 (167-204)
9532,9	9538,9	MRLPDERGPLEHLYSL	IGFBP-2 (205-287)
9797,6	9798,2	MRLPDERGPLEHLYSL	IGFBP-2 (205-289)
13773,9	13763,8	GKGGKHHHLGLEEPKKLXPPPA	IGFBP-2 (167-287)
14035,8	14023,1	GKGGKHHHLGLEEPKKLXPPPA	IGFBP-2 (167-289)

Tabelle 12 Übersicht über die IGFBP-2-Fragmente, die durch direkte Sequenzierung aus dem Blot nach gelelektrophoretischer Auftrennung identifiziert werden konnten.

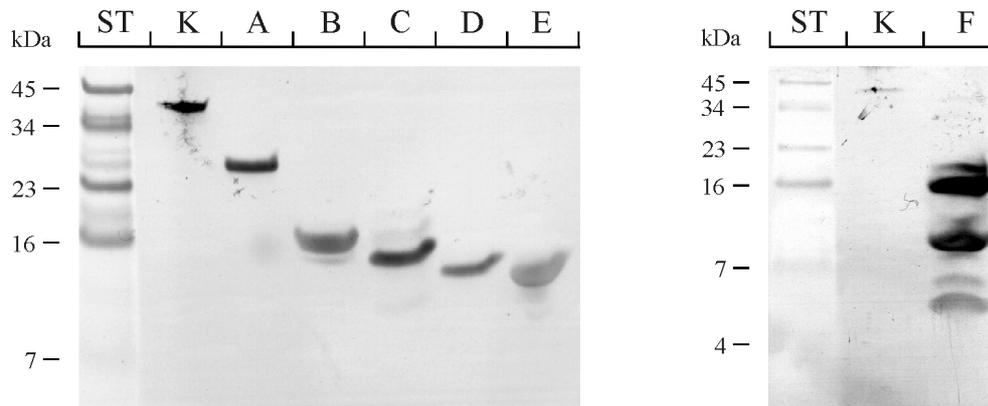
3.2.2.5 Übersicht über die isolierten C-terminalen IGFBP-2-Fragmente

Neben den bereits genau beschriebenen Fragmenten IGFBP-2 (167-279), IGFBP-2 (12875 Da) sowie IGFBP-2 (104-279) und den kleineren IGFBP-2-Spaltstücken (Abschnitt 3.2.2.4) konnten noch weitere immunreaktive IGFBP-2-Fragmente aus humanem Hämofiltrat identifiziert werden. Tabelle 13 zeigt eine Übersicht über alle IGFBP-2-Fragmente, die aus der Hämofiltrat-Peptidbank isoliert werden konnten.

Für die in den vorangegangenen Abschnitten 3.2.2.1, 3.2.2.2, 3.2.2.3 und 3.2.2.4 näher beschriebenen IGFBP-2-Fragmente sowie für IGFBP-2-Fragmente, die in weiterführenden Analysen zur Bestimmung der IGF-Bindungsaffinitäten eingesetzt wurden, ist darüberhinaus in Abbildung 20 eine Übersicht in Form eines Western-Immunoblots dargestellt. Die zugehörige Beschreibung der eingesetzten Proben ist in Form von Tabelle 14 beigefügt. Die Fragmente wurden dabei anhand der hauptsächlich im Hämofiltrat vorkommenden Spaltstellen innerhalb der IGFBP-2-Moleküls ausgewählt.

Fragment	N-terminale Sequenzierung	Bestimmte Molekularmasse [Da]	Theoretische Molekularmasse [Da]
Fragmente, die die mittlere und die C-terminale Domäne umfassen			
IGFBP-2 (104-289)	GASPEQVADNGDDH SEGGLV	20688	20684,5
IGFBP-2 (104-287)	GASPEQVADNGDDH SEGGLV	20428	20425,2
Fragmente, die die C-terminale Domäne umfassen			
IGFBP-2 (153-289)	AVFREXVTEQHRQM GKGGKH	15792	15764,1
IGFBP-2 (157-289)	EKVTEQHRQMGKGG	15296	15290,5
IGFBP-2 (157-287)	EKVTEQHRQMGKGG	15035	15031,2
IGFBP-2 (159-289)	VTEQHRQMGKGGK H	15035	15033,2
IGFBP-2 (159-287)	VTEQHRQMGKGGK H	14777	14773,9
IGFBP-2 (166-289)	MGKGXKHHLGLEEP KKL	14158	14154,3
IGFBP-2 (166-287)	MGKGXKHHLGLEEP KKL	13899	13895,0
IGFBP-2 (167-289)	GKXGKHHLGLEEPK KLR	14028	14023,1
IGFBP-2 (167-288)	GKXGKHHLGLEEPK KLR	13899	13885,0
IGFBP-2 (167-287)	GKXGKHHLGLEEPK KLR	13770	13763,8
IGFBP-2 (167-279)	GKGGKHHLGLEEPK K	12859	12857,7
IGFBP-2 (12875 Da)	GKGGKHHLGLEEPK	12875	?
IGFBP-2 (169-287)	GGKHHLGLEEPKKL RPP	13582	13584,5
Fragmente, die durch Spaltung innerhalb der C-terminalen Domäne entstehen			
IGFBP-2 (167-204)	GKGGKHHLGLEEPK KLXPPPA	4244	4244,9
IGFBP-2 (205-289)	MRLPDERGPLEHLYS L	9798	9798,2
IGFBP-2 (205-287)	MRLPDERGPLEHLYS L	9533	9538,9

Tabelle 13 Übersicht über alle in der Hämofiltrat-Peptidbank identifizierten IGFBP-2-Fragmente. Gezeigt sind sowohl die bei der N-terminalen Sequenzierung erhaltenen Aminosäuresequenzen als auch die gemessenen und theoretischen Molekularmassen der einzelnen Fragmente. Die Massenbestimmung erfolgte entweder mittels MALDI- oder mittels ESI-MS. Bei der Sequenzierung nicht detektierbare Aminosäuren sind durch X gekennzeichnet. Das im Hämofiltrat in der höchsten Konzentration vorliegende Fragment IGFBP-2 (167-279) ist fett gedruckt.

**Abbildung 20:**

Übersicht über die identifizierten IGFBP-2-Immunitäten in der Hämofiltrat-Peptidbank, die die hauptsächlichsten Spaltstellen des IGFBP-2-Moleküls in Hämofiltrat repräsentierten. Eine Beschreibung der eingesetzten Proben ist in Tabelle 14 zu finden.

K = Kontrolle, 100 ng rhIGFBP-2; ST = Molekulargewichtsstandard; A : Mischfraktion IGFBP-2 (104-289); B: Mischfraktion IGFBP-2 (157-289); C: Mischfraktion IGFBP-2 (167-289); D: IGFBP-2 (12875 Da); E: IGFBP-2 (167-279); F: Mischfraktion der kleinen IGFBP-2-Fragmente aus Abschnitt 3.2.2.4.

	Zugehöriger Sequenzabschnitt	Theoretische Molekularmasse [Da]
A	IGFBP-2 (104-289)	20684,5
	IGFBP-2 (104-287)	20425,2
B	IGFBP-2 (157-289)	15290,5
	IGFBP-2 (159-289)	15033,2
	IGFBP-2 (159-287)	14773,9
C	IGFBP-2 (167-289)	14023,1
	IGFBP-2 (167-287)	13763,8
	IGFBP-2 (167-288)	13895,0
D	IGFBP-2 (12875 Da)	12875 (ESI)
E	IGFBP-2 (167-279)	12857,7
F	IGFBP-2 (167-204)	4244,9
	IGFBP-2 (205-287)	9538,9
	IGFBP-2 (205-289)	9798,2
	IGFBP-2 (167-287)	13763,8
	IGFBP-2 (167-289)	14023,1

Tabelle 14 Beschreibung der im Western-Immunoblot (Abbildung 20) eingesetzten Proben A bis F. Die Fragmente entsprechen dabei den hauptsächlich im Hämofiltrat vorliegenden Fragmenten von IGFBP-2.

3.2.3 Aufklärung der Disulfidverbrückung des isolierten C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279)

Um die Disulfidverbrückung des isolierten C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279) aufzuklären, wurde das Fragment zunächst enzymatisch verdaut. Anschließend wurden die proteolytischen Spaltprodukte durch massenspektrometrischen Methoden und N-terminale Sequenzierung analysiert (vgl. Abschnitt 2.6). In Vorversuchen wurden zunächst geringe Mengen des Fragments mit Chymotrypsin und der Endopeptidase Arg-C proteolytisch gespalten. Da der Verdau mit der Endopeptidase Arg-C hierbei keine vielversprechenden Ergebnisse zeigte, erfolgte die Spaltung einer größeren Peptidmenge für eine weiterführende Analytik nur mit Chymotrypsin.

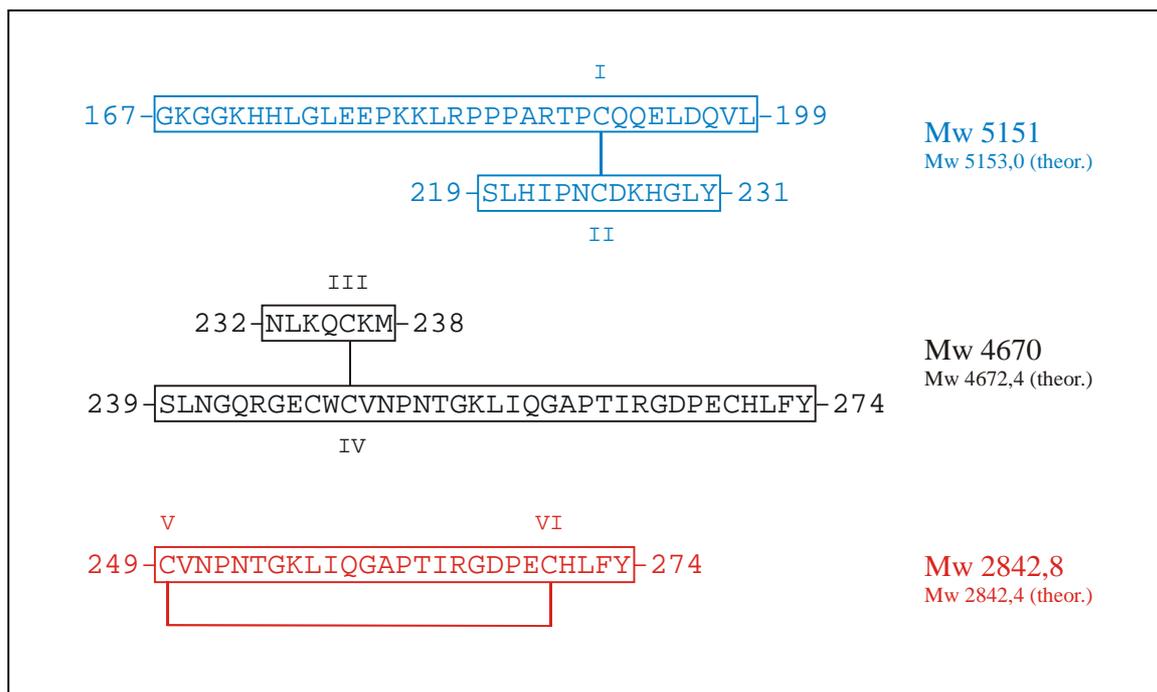


Abbildung 21:

Identifizierte Cystein-haltige Fragmente nach dem chymotryptischen Verdau des Fragments IGFBP-2 (167-279), die zur Aufklärung der Disulfidverbrückung führten. Die dargestellten Fragmente konnten über ihre Molekularmassen mittels MALDI-TOF- und ESI-MS nachgewiesen und anschließend durch Sequenzierung verifiziert werden.

Zur chymotryptischen Spaltung wurden 300 µg des Fragments eingesetzt. Die resultierenden Spaltprodukte wurden anschließend über RP-HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Fragmente, die aufgrund ihrer Massen theoretisch berechneten Fragmenten mit Cysteinresten zuzuordnen waren, wurden daraufhin weitergehend analysiert. Dazu zählten gegebenenfalls eine weitere chromatographische Aufreinigung mittels RP-HPLC und die Bestimmung der Molekularmasse mittels ESI-MS sowie eine Verifizierung der postulierten Fragmente durch N-terminale Sequenzierung. Abbildung 21 zeigt die identifizierten Spaltprodukte, die zur Aufklärung des Verbrückungsmusters führten.

Die Molekularmasse von 5151 Da konnte den Spaltprodukten Gly167-Leu199 und Ser219-Try231 zugeordnet werden, die durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys191 und Cys225 verbunden sind. Die gemessene Molekularmasse von 5151 Da stimmte dabei mit der theoretischen Masse der verbrückten Fragmente von 5153,0 Da überein.

Eine Übereinstimmung zeigte sich auch beim Vergleich der detektierten Molekularmasse von 4670 Da mit der theoretischen Masse von 4672,4 Da, die den beiden ebenfalls verbrückten Fragmenten Asn232-Met238 sowie Ser239-Try274 zugeordnet werden konnte. Diese Fragmente sind somit über eine Disulfidbrücke zwischen Cys236 und Cys247 verknüpft.

Durch Chymotrypsin erfolgte keine Spaltung in dem Sequenzabschnitt zwischen den Cysteinresten Cys249 und Cys270. Um eine Aussage über das Auftreten einer Disulfidbrücke innerhalb des identifizierten Fragments Cys236-Trp274 treffen zu können, wurde deshalb eine genauere Massenbestimmung mittels ESI-MS durchgeführt. Diese resultierte in einer molekularen Masse von 2842,8 Da. Die erhaltene Masse stimmt nahezu exakt mit der theoretischen Masse des Fragments von 2842,4 Da unter Berücksichtigung einer intrafragmentarischen Disulfidbrücke überein. Die reduzierte Form des Fragments ohne Disulfidbrücke müßte hingegen einen Massenunterschied von 2 Da aufweisen. Daraus kann geschlossen werden, daß eine Disulfidbrücke zwischen Cys249 und Cys270 besteht.

Das Disulfidbrückenmuster innerhalb der C-terminalen Domäne von IGFBP-2 konnte somit vollständig aufgeklärt werden. Dabei wurden Verbrückungen zwischen Cys191 und Cys225, Cys236 und Cys247 sowie zwischen Cys249 und Cys270 nachgewiesen, woraus sich ein Verbrückungsmuster von 1-2, 3-4 und 5-6 ergibt. Eine Übersicht über die identifizierten Spaltprodukte sowie die daraus resultierende Disulfidverbrückung des C-terminalen Fragments IGFBP-2 (167-279) ist in Abbildung 22 gezeigt.

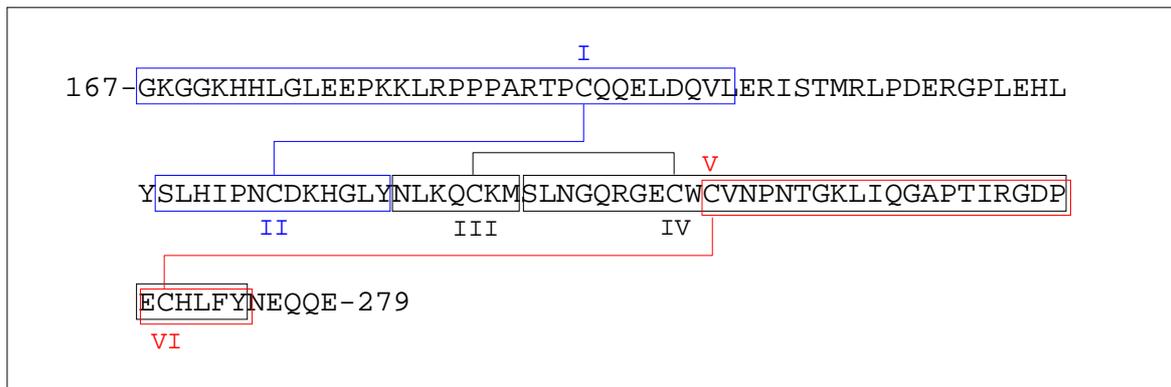


Abbildung 22:

Disulfidbrückenmuster des Fragments IGFBP-2 (167-279). Die nach dem chymotryptischen Verdau des Peptids identifizierten Fragmente sind als blaue, schwarze bzw. rote Kästchen dargestellt. Anhand dieser Fragmente ließ sich eine Verbrückung nach dem Muster 1-2, 3-4 und 5-6 ermitteln.

3.2.4 Untersuchung der Bindungscharakteristika der isolierten IGFBP-2-Fragmente

Einige der identifizierten IGFBP-2-Fragmente wurden anschließend hinsichtlich ihrer IGF-Bindungsfähigkeit untersucht. Diese IGFBP-2-Fragmente sind in Tabelle 15 mit ihren theoretischen Massen und den zugehörigen Sequenzabschnitten zusammengestellt.

Zum einen wurden die bis zur Reinsubstanz aufgereinigten Fragmente IGFBP-2 (12875 Da) und IGFBP-2 (167-279) sowie die näher beschriebene Mischfraktion IGFBP-2 (104-289) eingesetzt. Von diesen wurde vor der Durchführung der Bindungsstudien eine genaue Mengenbestimmung der Peptide mittels ASA durchgeführt. Darüberhinaus wurden auch weitere Fragmentgemische untersucht. In diesen Mischfraktionen ließen sich die einzelnen Komponenten ebenfalls aufgrund nur geringfügiger Unterschiede von 1-2 Aminosäuren mit den hier verwendeten chromatographischen Techniken nicht voneinander trennen. Allerdings konnte der prozentuale Anteil der einzelnen Komponenten mit Hilfe analytischer Methoden wie N-terminaler Sequenzierung und Kapillarzonenelektrophore bestimmt werden. Der prozentuale Anteil jedes Fragments ist in Tabelle 15 angegeben. Ausgewählt wurden die Fragmentgemische aufgrund der hauptsächlich im Hämofiltrat detektierten Spaltstellen im IGFBP-2-Molekül zwischen Met166 und Gly167 bzw. Lys168 und Gly169 sowie zwischen

Arg156 und Glu157 bzw. Lys158 und Val159. Die eingesetzten Fragmentgemische umfassten die Bereiche von diesen Spaltstellen bis zum C-terminalen Ende des IGFBP-2-Moleküls.

Probe	Theoretische Molekularmasse [Da]	Prozentualer Anteil	Zugehöriger Sequenzabschnitt
A	20685,5	68 %	IGFBP-2 (104-289)
	20425,2	32 %	IGFBP-2 (104-287)
B	15290,5	34 %	IGFBP-2 (157-289)
	15033,2	48 %	IGFBP-2 (159-289)
	14773,9	16 %	IGFBP-2 (159-287)
C	14023,1	18 %	IGFBP-2 (167-289)
	13763,8	55 %	IGFBP-2 (167-287)
	13 895,0	18 %	IGFBP-2 (167-288)
D	12875,0 ± 1,3 (ESI-MS)	100 %	IGFBP-2 (167-???)
E	12857,7	100 %	IGFBP-2 (167-279)

Tabelle 15 Zusammenstellung der IGFBP-2-Fragmente, die hinsichtlich ihrer IGF-I- und IGF-II-Bindung untersucht wurden. Es sind jeweils die unterschiedlichen Komponenten der einzelnen Proben A bis E mit ihren theoretischen Molekularmassen und zugehörigen Sequenzabschnitten angegeben.

3.2.4.1 Liganden-Blot-Analyse der isolierten IGFBP-2-Fragmente

Mit Hilfe von Liganden-Blots wurde die IGF-Bindungsfähigkeit der verschiedenen isolierten IGFBP-2-Fragmente untersucht. Dabei wurden die IGFBP-2-Fragmente zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Durch Inkubation der Membran mit IGF-I oder -II und anschließender Detektion der gebundenen IGFs konnte so eine Aussage über die IGF-Bindungsfähigkeit der einzelnen Fragmente getroffen werden.

Im Liganden-Blot wurden sowohl die Reinpeptide IGFBP-2 (167-279) und IGFBP-2 (12875 Da) als auch die Mischfraktionen IGFBP-2 (104-289), IGFBP-2 (157-289) und IGFBP-2 (167-289) bezüglich ihrer Bindung von IGF-I und -II untersucht (Tabelle 15).

Dabei wurden von jedem Peptid jeweils ca. 5×10^{-11} mol pro Spur im Gel aufgetragen. Bei den Mischfraktionen IGFBP-2 (157-289) und IGFBP-2 (167-289) wurde die entsprechende Menge bezüglich der Hauptkomponente berechnet. Bei der Mischfraktion IGFBP-2 (104-289)

wurden beide Fragmente gemeinsam betrachtet. Als Kontrolle dienten 50 ng rhIGFBP-2. Die resultierende IGF-I- und -II-Bindung ist in Abbildung 23 dargestellt.

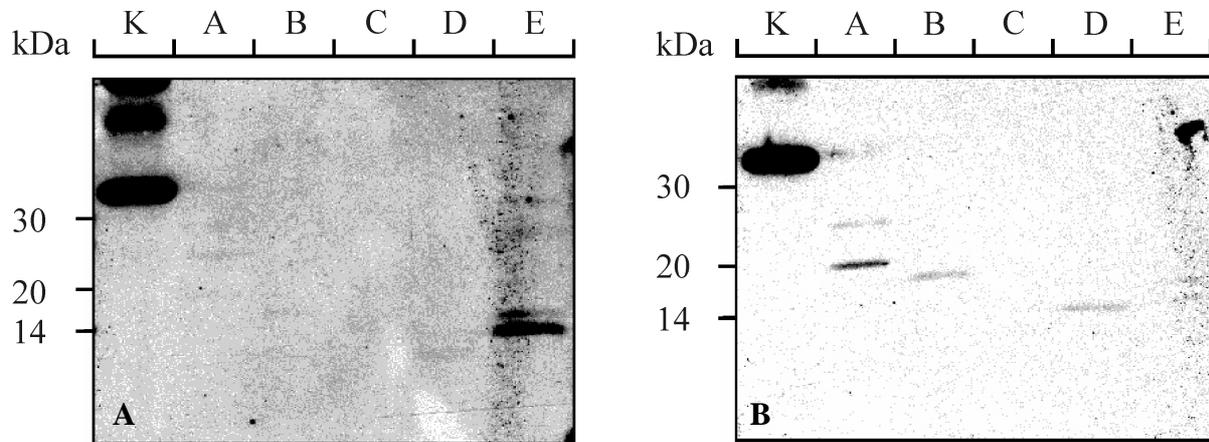


Abbildung 23:

Liganden-Blot zur Bestimmung der IGF-Bindungsfähigkeit der isolierten IGFBP-2-Fragmente. (A) IGF-I-Bindung der einzelnen Fragmente. Nur das Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da zeigte eine signifikante IGF-I-Bindung (Spur E). (B) Bindung von IGF-II. Das Fragment IGFBP-2 (167-279) sowie die Mischfraktionen IGFBP-2 (104-289) und IGFBP-2 (157-289) zeigten eine schwache IGF-II-Bindung (Spur A, B und D). Bei dem Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da war ebenfalls eine sehr schwache IGF-II-Bindung detektierbar (Spur E), wohingegen die Mischfraktion IGFBP-2 (167-289) keine Bindung von IGF-II zeigte (Spur C).

K = Kontrolle, rhIGFBP-2; A = Mischfraktion IGFBP-2 (104-289), B = Mischfraktion IGFBP-2 (157-289), C = Mischfraktion IGFBP-2 (167-289), D = IGFBP-2 (167-279), E = IGFBP-2 (12875 Da).

In den Liganden-Blots zeigte das Kontrollpeptid rhIGFBP-2 sowohl in Bezug auf IGF-I als auch in Bezug auf IGF-II eine deutliche Bindung.

Auch konnte bei fast allen eingesetzten Fragmenten eine schwache IGF-II-Bindung detektiert werden. Es zeigten sowohl die Reinsubstanzen IGFBP-2 (167-279) und IGFBP-2 (12875 Da) als auch die Mischfraktionen IGFBP-2 (104-289) und IGFBP-2 (157-289) eine detektierbare IGF-II-Bindung. Dabei besaß das Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da die geringste IGF-II-Bindungsfähigkeit. Erstaunlicherweise traten bei der Mischfraktion IGFBP-2 (104-289) (Abbildung 23 B, Spur A) Banden unterschiedlicher Größe auf. Ebenso unerwartet zeigte die Mischfraktion IGFBP-2 (167-289) in der eingesetzten Menge keine detektierbare IGF-II-Bindung.

Bezüglich der IGF-I-Bindung zeigte sich ein interessantes Bild. Während das IGFBP-2-Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da eine deutliche Bindung von IGF-I aufwies (Abbildung 23, Spur E), konnte bei keinem der anderen Fragmente in der eingesetzten Menge eine signifikante IGF-I-Bindung beobachtet werden.

3.2.4.2 Bestimmung der Bindungsaffinität der isolierten IGFBP-2-Fragmente für IGF-I

Da das IGFBP-2-Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da eine deutliche IGF-I-Bindung im Liganden-Blot zeigte, sollte die IGF-I-Bindungsaffinität des Fragments anschließend mit Hilfe von Sättigungsexperimenten bestimmt werden. Dazu wurden ansteigende Mengen des Peptids mit radioaktiv markiertem ^{125}I -IGF-I inkubiert. Zur Detektion der unspezifischen Bindung wurden parallel Ansätze mit einem Überschuß an nicht-radioiodiertem IGF-I betrachtet. Anschließend erfolgte mit Hilfe der PEG-Fällung die Trennung von gebundenem und nicht gebundenem IGF-I.

Vor jedem Versuch wurde die Qualität des radioaktiv markierten ^{125}I -IGF-I mittels RP-HPLC überprüft. Dabei konnte sowohl freies Jod als auch eine Zersetzung der iodierten Substanz detektiert werden. Als Kontrolle diente das Gesamtmolekül rhIGFBP-2. Weiterhin wurde zum Vergleich das hauptsächlich vorkommende Fragment IGFBP-2 (167-279) im Versuch mitgeführt, welches im Liganden-Blot keine deutliche IGF-I-Bindung zeigte.

In Abbildung 24 sind die erhaltenen Sättigungskurven gezeigt, wobei die prozentuale spezifische Bindung in Abhängigkeit von der eingesetzten Peptidkonzentration dargestellt wurde. Die prozentuale spezifische Bindung wurde berechnet, indem die spezifische Bindung B der einzelnen Proben auf die maximale spezifische Bindung B_0 bezogen wurde. Die entsprechenden Bindungskonstanten für IGF-I wurden anschließend mit Hilfe von nicht-linearer Regression berechnet. Die ermittelten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 16 aufgeführt.

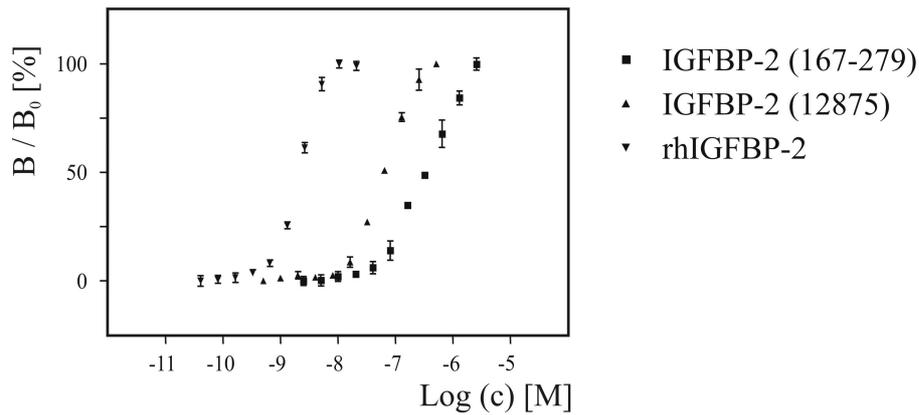


Abbildung 24:

Sättigungskurven zur Bestimmung der IGF-I-Bindungsaffinitäten der isolierten Fragmente IGFBP-2 (167-279) und IGFBP-2 (12875 Da). Als Kontrolle wurde rhIGFBP-2 verwendet. Beide Fragmente zeigten verglichen mit rhIGFBP-2 eine deutlich verringerte IGF-I-Bindungsaffinität. In der Abbildung sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen in Zweifachwerten gezeigt, wobei die Standardabweichung der jeweiligen Meßpunkte durch Fehlerbalken dargestellt ist. Die zugehörigen Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d wurden durch nicht-lineare Regression berechnet (Tabelle 16).

	K_d [nM]
rhIGFBP-2	$3,4 \pm 0,5$
IGFBP-2 (167-279)	495 ± 39
IGFBP-2 (12875 Da)	120 ± 18

Tabelle 16 Durch nicht-lineare Regression bestimmte Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d sowie die zugehörigen Standardabweichungen, für die IGF-I-Bindung von IGFBP-2 (167-279), IGFBP-2 (12875 Da) und rhIGFBP-2. Die zugehörigen Sättigungskurven sind in Abbildung 24 dargestellt.

Es zeigte sich, daß beide Fragmente im Vergleich zu dem Gesamtmolekül rhIGFBP-2 eine deutlich verringerte Bindungsaffinität zu IGF-I besaßen. Während das Fragment IGFBP-2 (12875 Da) mit einer Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 120$ nM eine 35fach verringerte IGF-I-Bindungsaffinität zeigte, war die Affinität des Fragments IGFBP-2 (167-279) zu IGF-I mit einer Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 495$ nM sogar 150fach verringert.

Das erhaltene Ergebnis stimmt dabei sehr gut mit dem Ergebnis des Ligandenblots überein, in dem nur das Fragment IGFBP-2 (12875 Da) eine deutlich detektierbare IGF-I-Bindung zeigte (Abschnitt 3.2.4.1).

3.2.4.3 Bestimmung der Bindungsaffinität der isolierten IGFBP-2-Fragmente für IGF-II

Da im Liganden-Blot nahezu alle eingesetzten IGFBP-2-Fragmente eine detektierbare IGF-II-Bindung zeigten, wurden anschließend ihre Bindungsaffinitäten für IGF-II mit Hilfe von BIAcore-Messungen bestimmt.

Neben den isolierten Reinpeptiden IGFBP-2 (167-279) und IGFBP-2 (12875 Da) wurden auch die Mischfraktionen IGFBP-2 (104-289), IGFBP-2 (157-289) und IGFBP-2 (167-289) untersucht (Tabelle 15). Allerdings konnten die Bindungskonstanten der Mischfraktionen IGFBP-2 (157-289) und IGFBP-2 (167-289) nur abgeschätzt werden, da keine genaue Mengenbestimmung mittels ASA durchgeführt wurde. Als Kontrolle diente das Gesamtmolekül rhIGFBP-2.

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden mindestens sechs Zyklen bestehend aus Assoziation und anschließender Dissoziation durchgeführt. Die daraus berechneten Bindungskonstanten sind in Tabelle 17 aufgeführt.

	K_d [nM]
rhIGFBP-2	4,1
IGFBP-2 (167-279)	43
IGFBP-2 (12875 Da)	141
Mischfraktion IGFBP-2 (104-289)	133
Mischfraktion IGFBP-2 (157-289)	150
Mischfraktion IGFBP-2 (167-289)	197

Tabelle 17 Mit Hilfe von BIAcore-Messungen bestimmte Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d der isolierten IGFBP-2-Fragmente für IGF-II.

Es konnte gezeigt werden, daß wiederum alle Fragmente eine deutlich verringerte Bindungsaffinität für IGF-II aufwiesen als das Gesamtmolekül rhIGFBP-2.

Dabei zeigte das Fragment IGFBP-2 (167-279) mit einer Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 43$ nM noch eine signifikante IGF-II-Bindung, die verglichen mit rhIGFBP-2 ca. 10fach verringert war. Im Gegensatz dazu besaß die Mischfraktion IGFBP-2 (167-289) nur eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von $K_d = 197$ nM. Die in dieser Fraktion enthaltenen Fragmente zeigten somit wie auch schon im Liganden-Blot die schwächste IGF-II-Bindung (vgl. Abbildung 23, Abschnitt 3.2.4.1).

Alle weiteren untersuchten IGFBP-2-Fragmente waren ebenfalls nur zu einer niedrigaffinen IGF-II-Bindung mit Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten im Bereich von $K_d = 130 - 150$ nM fähig.

3.2.4.4 Übersicht über die bestimmten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d

Die in Abschnitt 3.2.4.2 und 3.2.4.3 ermittelten Bindungskonstanten der einzelnen IGFBP-2-Fragmente für IGF-I und -II sind in Tabelle 18 zusammengestellt. Insgesamt zeigten alle untersuchten Fragmente verglichen mit dem Gesamtmolekül rhIGFBP-2 sowohl zu IGF-I als auch zu IGF-II eine deutlich verringerte Bindungsaffinität.

Für das Fragment IGFBP-2 (167-279) konnte noch eine signifikante IGF-II-Bindung gezeigt werden, wohingegen es nur eine niedrigaffine Bindung zu IGF-I aufwies. In Bezug auf IGF-I besaß das Fragment IGFBP-2 (12875 Da) die höchste Bindungsaffinität.

	K_d [nM] für IGF-I	K_d [nM] für IGF-II
rhIGFBP-2	3,4	4,1
IGFBP-2 (167-279)	495	43
IGFBP-2 (12875 Da)	120	141
Mischfraktion IGFBP-2 (104-289)	n.b.	133
Mischfraktion IGFBP-2 (157-289)	n.b.	150
Mischfraktion IGFBP-2 (167-289)	n.b.	197

Tabelle 18 Übersicht über die Bindungsaffinitäten der isolierten IGFBP-2-Fragmente zu IGF-I und IGF-II. Die aufgeführten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d wurden für IGF-I mittels Sättigungsstudien im chemischen Gleichgewicht und für IGF-II mit Hilfe von Echtzeit-Messungen im BIACore ermittelt.

n.b. = nicht bestimmt

3.3 Isolierung und Charakterisierung von IGFBP-4-Fragmenten aus humanem Hämofiltrat

3.3.1 Screening der Hämofiltrat-Peptidbank nach IGFBP-4-Immunreaktivitäten

Zunächst wurde ein primäres Screening nach IGFBP-4-Immunreaktivitäten in den einzelnen Fraktionen der Hämofiltrat-Peptidbank durchgeführt (Mark *et al.*, 1999). Dazu wurden im Western-Immunoblot von jeder Fraktionen Äquivalentmengen untersucht, die jeweils 100 ml HF entsprachen. Um möglichst alle vorhandenen IGFBP-4-Fragmente detektieren zu können, wurde ein ein spezifischer, polyklonaler Antikörper gegen das IGFBP-4-Gesamtmolekül verwendet. Neben der bereits identifizierten Immunreaktivität mit einer molekularen Masse von 13,2 kDa aus pH-Pool 3 (Ständker *et al.*, 2000) konnte in den Fraktionen 21-23 aus pH-Pool 4 eine bislang nicht identifizierte IGFBP-4-Immunreaktivität mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 12 kDa detektiert werden (Abbildung 25).

Diese Fraktionen zeichneten sich darüberhinaus auch durch eine signifikante IGF-I-Bindungsfähigkeit aus (vgl. Abschnitt 3.1).

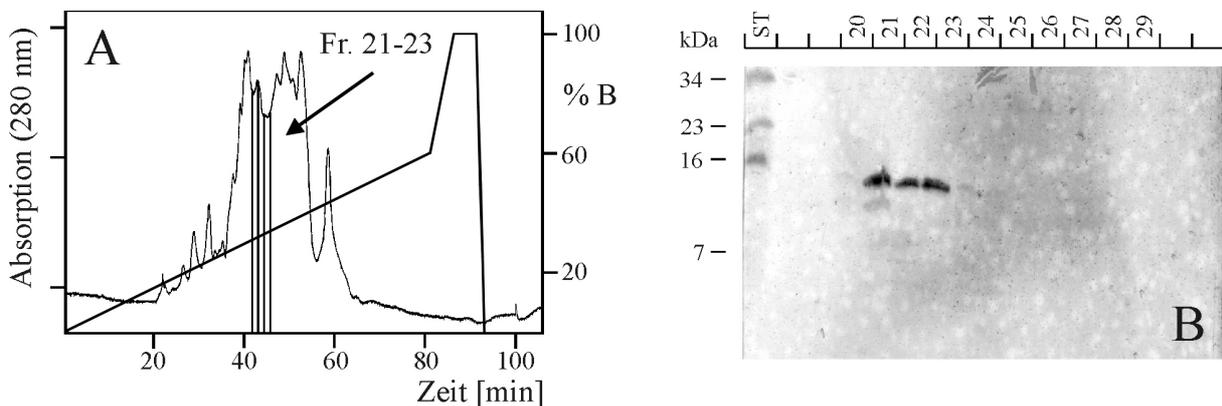


Abbildung 25:

Primäres Screening nach IGFBP-4-Immunreaktivitäten in der Hämofiltrat-Peptidbank. In den Fraktionen 21-23 von pH-Pool 4 konnte eine deutliche IGFBP-4-Immunreaktivität mit einer apparenten molekularen Masse von ungefähr 12 kDa detektiert werden. (A) RP-Fraktionierung von pH-Pool 4. Die immunreaktiven Fraktionen sind durch Balken markiert. (B) Western-Immunoblot einzelner Fraktionen von pH-Pool 4. Die Fraktionen 21-23 zeigten deutliche IGFBP-4-Immunreaktivität.

3.3.2 Isolierung und Charakterisierung von IGFBP-4-Fragmenten

3.3.2.1 Isolierung und biochemische Charakterisierung des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237)

Die im Rahmen des primären Screenings detektierte IGFBP-4-Immunreaktivität in den Fraktionen 21-23 von pH-Pool 4 (Abschnitt 3.2.1) wurde anschließend mit Hilfe RP-chromatographischer Techniken aufgereinigt. Die Isolierung erfolgte hierbei überwiegend anhand der molekularen Masse, da dem immunreaktiven Peptid durch den Vergleich von Western-Blot und MALDI-TOF-Massenspektrum eine molekulare Masse von 11,4 kDa zugeordnet werden konnte.

Im Western-Blot zeigte die immunreaktive Bande eine molekulare Masse von ungefähr 12 kDa. Die nachfolgende Untersuchung der immunreaktiven Fraktionen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ergab, daß in diesem Bereich nur eine molekulare Masse von ca. 11,4 kDa zu finden war. Das MALDI-TOF-Massenspektrum von Fraktion 21 aus pH-Pool 4 ist stellvertretend für alle immunreaktiven Fraktionen in Abbildung 26 dargestellt. Um die Isolierung eines IGFBP-4-Fragments sicherzustellen, wurde allerdings parallel eine Western-Immunoblot-Analyse der Fraktionen durchgeführt, die die zugeordnete Molekularmasse von 11,4 kDa enthielten.

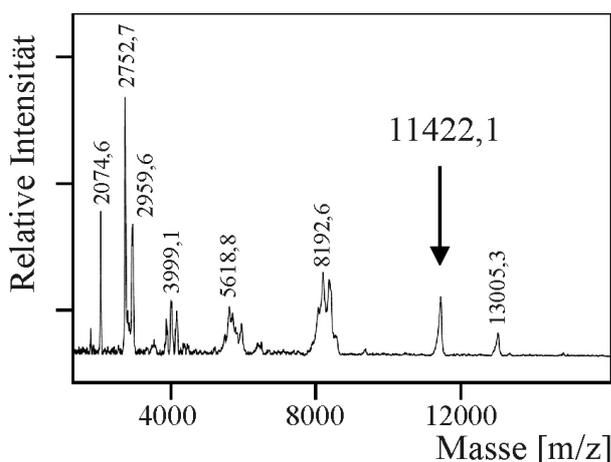


Abbildung 26:

MALDI-TOF-Massenspektrum der immunreaktiven Fraktion 21 aus pH-Pool 4. Der im Western-Immunoblot detektierten Immunreaktivität mit einer apparenten molekularen Masse von 12 kDa konnte nur die molekulare Masse von 11,4 kD zugeordnet werden.

Bis zur Reindarstellung des immunreaktiven IGFBP-4-Fragments waren vier weitere chromatographische Schritte der Peptidbankfraktionen notwendig (Abbildung 27).

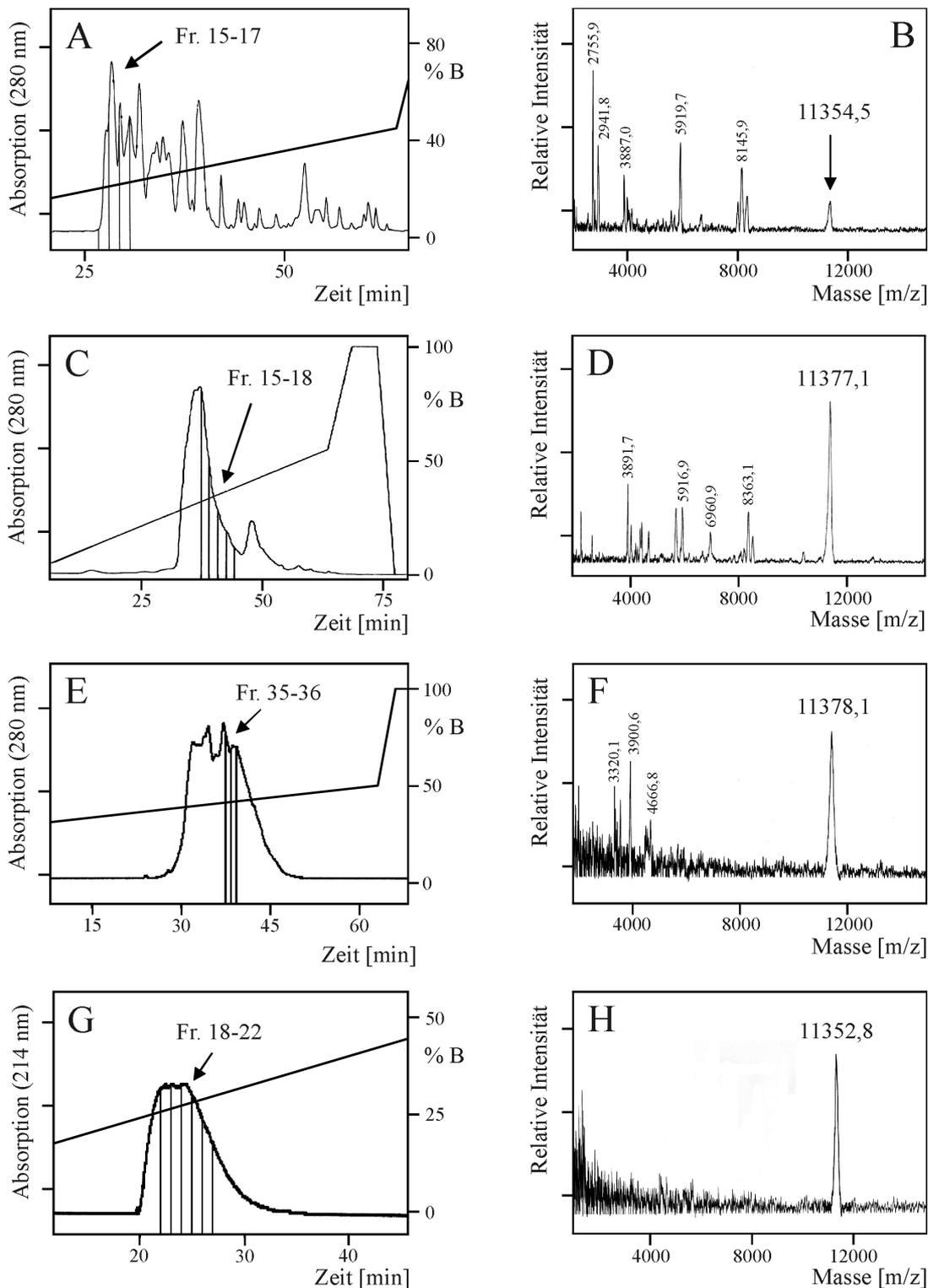


Abbildung 27:

Isolierung des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237) in vier chromatographischen Aufreinigungsschritten anhand seiner molekularen Masse. In A, C, E und G sind die einzelnen Chromatographieschritte dargestellt. Fraktionen, die die gesuchte molekulare Masse von 11,4 kDa enthielten, sind in den Chromatogrammen durch Balken markiert. In B, D, F und G ist jeweils das zugehörige MALDI-TOF-Massenspektrum einer repräsentativen Fraktion abgebildet.

Die genauen Chromatographiebedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte sind in Tabelle 7, Abschnitt 2.2.3.4 aufgeführt.

Zunächst wurden die Fraktionen 21-23 aus pH-Pool 4 mittels präparativer RP-HPLC chromatographisch aufgetrennt (Abbildung 27 A). Dabei wurde eine Pharmacia Source Finesline 15RPC-Säule verwendet. Bei der nachfolgenden Untersuchung der einzelnen Fraktionen mittels MALDI-TOF-MS konnte die gesuchte molekulare Masse von 11,4 kDa in den Fraktionen 15-17 detektiert werden (Abbildung 27 B). Diese Fraktionen zeigten ebenfalls eine IGFBP-4-Immunreaktivität im gewünschten Molekulargewichtsbereich. Der zweite Aufreinigungsschritt erfolgte ebenfalls durch präparative RP-HPLC auf einer Bakerbond-Kartusche mit einem C18-Säulenmaterial (Abbildung 27 C). Durch Bestimmung der molekularen Massen in den einzelnen Fraktionen mittels MALDI-TOF-MS konnte gezeigt werden, daß die Fraktionen 15-18 die gesuchte Molekularmasse enthielten (Abbildung 27 D). Da die Fraktionen 16 und 17 die geringsten Verunreinigungen durch Peptide mit anderen molekularen Massen zeigten, wurde diese einem weiteren Chromatographieschritt unterzogen (Abbildung 27 E). Dabei wurde eine Biotek Silica C4-Säule verwendet. Die anschließende Analyse der generierten Fraktionen hinsichtlich der enthaltenen Massen ergab, daß die gesuchte molekulare Masse von 11,4 kDa in den Fraktionen 35 und 36 in relativ sauberer Form vorlag (Abbildung 27 F). Diese Fraktionen wurden daraufhin auf eine Vydac C18-Säule aufgetragen und erneut chromatographisch aufgetrennt (Abbildung 27 G). Bei der anschließenden Untersuchung der Fraktionen mittels MALDI-MS konnte in den Fraktionen 18-22 nur noch eine molekulare Masse von 11353 Da detektiert werden (Abbildung 27 H). Diese Fraktionen wurden daraufhin vereinigt und biochemisch charakterisiert.

Zunächst wurde eine Reinheitsüberprüfung des isolierten Peptids mittels Kapillarzonen-elektrophorese durchgeführt (Abbildung 28 A). Dabei wurden nur geringe Verunreinigungen detektiert, so daß eine Reinheit des Peptids von >90% bestimmt werden konnte. Die darauffolgende Messung der genauen molekularen Masse des Fragments mittels ESI-MS resultierte in einer Molekularmasse von $11344,9 \pm 1,2$ Da (Abbildung 28 B).

3.3.2.2 *Isolierung und Charakterisierung des verkürzten N-terminalen Fragments IGFBP-4 (4-122)*

Neben der Aufreinigung peptidischer Faktoren anhand verschiedener Assaysysteme wird bei der IPF PharmaCeuticals GmbH auch eine systematische Proteomanalyse von humanem Blutfiltrat durchgeführt (Schulz-Knappe *et al.*, 1996). Dabei wird angestrebt, alle in der Hämofiltrat-Peptidbank vorkommenden Peptide in Form einer Peptidatenbank mit ihrer Molekularmasse sowie ihrem chromatographischen Elutionsverhalten und ihrer Sequenz zusammenzustellen.

Während dieser Promotion wurde die bislang unbekannte Molekularmasse von 12914 Da in nahezu sauberer Form mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie detektiert und im Rahmen der systematischen Proteomanalyse identifiziert. Es handelte sich dabei um ein bislang unbekanntes N-terminales Fragment von IGFBP-4 aus pH-Pool 5.

Bis zur Detektion und der damit verbundenen Identifizierung des Peptids wurden fünf aufeinanderfolgende chromatographische Schritte von Fraktionen der Hämofiltrat-Peptidbank durchgeführt. Die detaillierten Bedingungen der einzelnen Chromatographieschritte sind in Tabelle 8, Abschnitt 2.2.3.5 aufgeführt. In Abbildung 30 A ist der letzte chromatographische Aufreinigungsschritt gezeigt, der zur Isolierung des Fragmentes führte. Fraktionen, welche das Peptid mit einer molekularen Masse von 12914 Da enthielten, sind im Chromatogramm durch Balken markiert. Das MALDI-TOF-Massenspektrum der grau unterlegten Fraktion 19 ist in Abbildung 30 B zu sehen. Diese Fraktion wurde auch zur weiteren biochemischen Charakterisierung und der damit verbundenen Identifizierung des IGFBP-4-Fragments eingesetzt.

Die anschließende Bestimmung der exakten Molekularmasse mittels ESI-MS ergab eine molekulare Masse von $12924,4 \pm 3,2$ Da (Abbildung 32 A). Unter Berücksichtigung der genauen Molekularmasse und dem N-terminalen Beginn des Moleküls, konnte das isolierte Peptid eindeutig der dem Sequenzabschnitt Ile4 – Phe122 des humanen IGFBP-4-Moleküls zugeordnet werden. Das entsprechende Fragment IGFBP-4 (4-122) besitzt dabei eine theoretische Masse von 12922,0 Da, welche sehr gut mit der bestimmten Molekularmasse übereinstimmt.

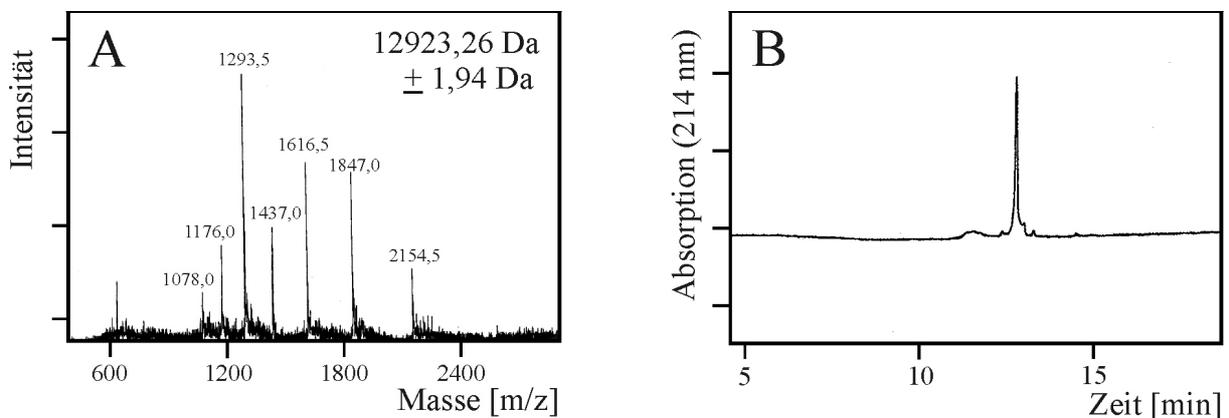


Abbildung 32:

Biochemische Charakterisierung des IGFBP-4-Fragments mittels ESI-Massenspektrometrie (A) und Kapillarzonenelktrophorese (B). Die Bestimmung der Molekularmasse des isolierten Peptids resultierte in einer molekularen Masse von 12923 Da. Bei der Kapillarzonenelktrophorese wurden nur geringfügige Verunreinigungen detektiert, wobei eine Reinheit des Fragments von >80% bestimmt werden konnte.

Abschließend wurde die Reinheit des identifizierten Peptids mittels Kapillarzonenelktrophorese bestimmt (Abbildung 32 B). Dabei konnte gezeigt werden, daß das verkürzte N-terminale Fragment eine Reinheit von >80% besaß.

Um ausreichende Mengen des Fragments IGFBP-4 (4-122) für weiterführende Untersuchungen zu erhalten, wurde eine größere Menge des Fragments anhand seiner molekularen Masse im MALDI-TOF-Massenspektrum aufgereinigt.

3.3.3 Aufklärung der Disulfidverbrückung des isolierten C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237)

Die Aufklärung der Cysteinbrückenstruktur des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237) erfolgte durch proteolytischen Verdau des Peptids und nachfolgender Analyse der entstandenen Spaltprodukte mittels Massenspektrometrie und N-terminaler Sequenzierung (vgl. Abschnitt 2.6). Als geeignete Proteasen für den Verdau wurden Chymotrypsin sowie die Endoproteinase Arg-C ausgewählt. Eine Übersicht über die proteolytischen Fragmente, mit deren Hilfe das Verbrückungsmuster bestimmt werden konnte, ist in Abbildung 33 gezeigt.



Abbildung 33:

Schematische Darstellung der identifizierten, proteolytischen Spaltprodukte, von denen die Disulfidverbrückung der C-terminalen Domäne von IGFBP-4 abgeleitet werden konnte. Nach Detektion der proteolytischen Fragmente mittels MALDI-TOF-MS wurde der zugehörige Sequenzabschnitt durch N-terminale Sequenzierung ermittelt.

Beim Verdau des nativen Peptids mit der Endoproteinase Arg-C konnte ein Fragment mit einer molekularen Masse von 3236 Da identifiziert werden. Die anschließende Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz ergab eine Doppelsequenz mit je zwei Aminosäuren pro Abbauschritt. Diese umfaßten die Sequenzbereiche Pro147-Arg159 sowie Thr171-Arg185. Die Spaltprodukte waren somit über Cys153 und Cys183 miteinander verknüpft.

Nach Verdau des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237) mit Chymotrypsin wurden zwei verschiedene proteolytische Fragmente mit Molekularmassen von 1960 Da und 3112 Da weitergehend analysiert. Das Spaltprodukt mit einer molekularen Masse von 1960 Da konnte dabei der Aminosäuresequenz His190-Trp206 zugeordnet werden, wodurch sich eine Verbrückung zwischen Cys194 und Cys205 ergab. Bei der Sequenzanalyse des Spaltprodukts mit einer Molekularmasse von 3112 Da wurde wiederum eine Einzelsequenz erhalten, die die Aminosäuren Cys207-Phe235 als zugehörigen Sequenzabschnitt identifizierte. Dieses deutete auf eine Verbrückung zwischen Cys207 und Cys228 hin.

Es konnten somit Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten Cys153 und Cys183, Cys194 und Cys205 sowie Cys207 und Cys228 nachgewiesen werden. Dies entsprach dem Verbrückungsmuster 1-2, 3-4 und 5-6. Ein Schema der ermittelten Disulfidverbrückung sowie der proteolytischen Spaltprodukte ist in Abbildung 34 gezeigt.

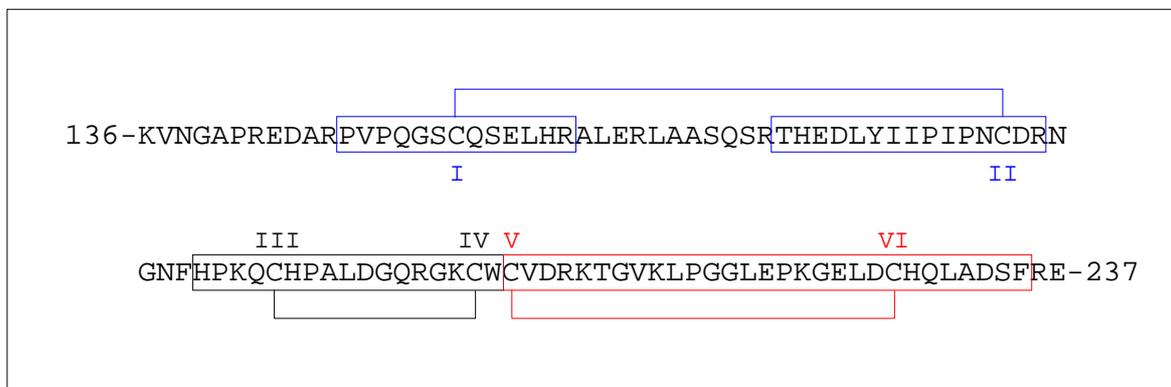


Abbildung 34:

Darstellung der Disulfidverbrückung des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (163-236). Die unterschiedlichen Spaltprodukte des proteolytischen Verdaus, die zur Bestimmung der Disulfidbrücken in der C-terminalen Domäne führten, sind blau, schwarz oder rot gekennzeichnet. Als Verbrückungsmuster wurde 1-2, 3-4 und 5-6 erhalten.

3.3.4 Untersuchung der Bindungscharakteristika der isolierten IGFBP-4-Fragmente

Um eine Aussage über die IGF-Bindungsfähigkeit der isolierten Fragmente IGFBP-4 (4-122) und IGFBP-4 (136-237) machen zu können, wurden Bindungsstudien mit IGF-I und IGF-II durchgeführt. Die Bindungsaffinität der Fragmente zu IGF-I wurde dabei mittels Sättigungsstudien im chemischen Gleichgewicht bestimmt. Die Messung der IGF-II-Bindungsaffinität erfolgte durch Echtzeit-Messungen im BIACore.

3.3.4.1 Bestimmung der Bindungsaffinität der isolierten IGFBP-4-Fragmente für IGF-I

Die Bestimmung der Bindungsaffinitäten der isolierten Fragmente IGFBP-4 (4-122) und IGFBP-4 (136-237) zu IGF-I erfolgte mit Hilfe von Sättigungsstudien. Dabei wurden ansteigende Konzentrationen der zu untersuchenden IGFBP-4-Fragmente mit radioaktiv markiertem ^{125}I -IGF-I inkubiert. Nach Einstellung des chemischen Gleichgewichts wurden gebundenes und freies IGF durch PEG-Fällung voneinander getrennt und die spezifische IGF-I-Bindung ermittelt. Als Positivkontrolle diente das Gesamtmolekül rhIGFBP-4. Die erhaltenen Sättigungskurven sind in Abbildung 35 dargestellt.

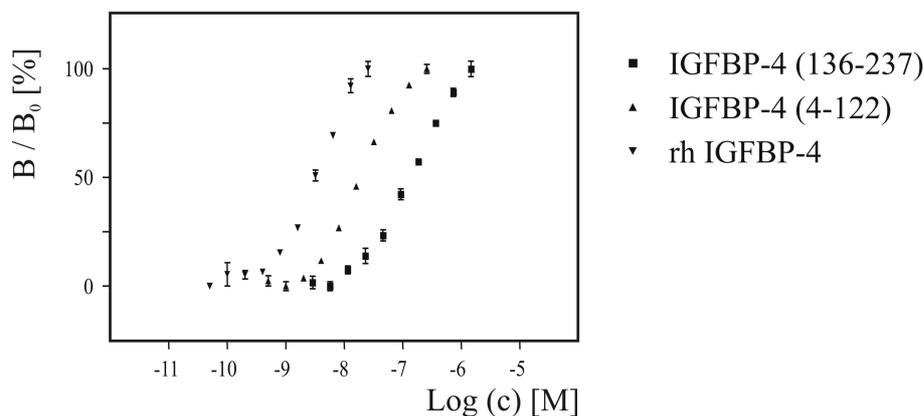


Abbildung 35:

Sättigungskurven zur Bestimmung der IGF-I-Bindungsaffinitäten der isolierten Fragmente IGFBP-4 (4-122) und IGFBP-4 (136-237) sowie von rhIGFBP-4. Beide Fragmente zeigen verglichen mit dem Gesamtmolekül rhIGFBP-4 eine deutlich verringerte Bindungsaffinität zu IGF-I. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen in Zweifachwerten mit der zugehörigen Standardabweichung. Die aus den Kurven berechneten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Die Affinität der beiden isolierten Fragmente zu IGF-I war verglichen mit der hochaffinen IGF-I-Bindung von rhIGFBP-4 deutlich verringert. Allerdings besaß das N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) noch eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu IGF-I als das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237). Die genauen Bindungskonstanten wurden durch nicht-lineare Regression bestimmt und sind in Tabelle 19 dargestellt.

	K_d [nM]
rhIGFBP-4	$5,0 \pm 0,5$
IGFBP-4 (4-122)	$24,3 \pm 1,4$
IGFBP-4 (136-237)	164 ± 12

Tabelle 19 Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d der isolierten IGFBP-4-Fragmente sowie von rhIGFBP-4 für IGF-I mit den zugehörigen Standardabweichungen. Beide Fragmente zeigten bezogen auf das IGFBP-4-Gesamtmolekül eine verringerte IGF-I-Bindung. Die Bindungsaffinität des verkürzten N-terminalen Fragments IGFBP-4 (4-122) war dabei ca. 5fach, die des C-terminalen Fragments IGFBP-4 (136-237) ca. 35fach verringert.

Die Betrachtung der berechneten Bindungskonstanten zeigte deutlich, daß das N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) mit einer Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 24$ nM noch eine deutliche Bindungsaffinität zu IGF-I besaß. Diese war jedoch ungefähr 5fach geringer als die IGF-I-Bindungsaffinität von intaktem rhIGFBP-4. Für das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) wurde hingegen nur eine niedrigaffine IGF-I-Bindung von $K_d = 164$ nM erhalten, was einer 35fachen Abnahme der Bindungsaffinität verglichen mit dem IGFBP-4-Gesamtmolekül entsprach.

3.3.4.2 Bestimmung der Bindungsaffinität der isolierten IGFBP-4-Fragmente für IGF-II

Die Affinitäten zu IGF-II wurden mit Hilfe von Echtzeit-Messungen im BIACore bestimmt. Dazu wurden zunächst die Assoziations- und Dissoziationszeitkonstanten k_a und k_d gemessen, woraus anschließend die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d berechnet werden konnte.

Zur Berechnung der Bindungskonstanten wurden dabei für jedes Fragment mindestens sechs Zyklen bestehend aus Assoziation und Dissoziation durchgeführt.

Bei den Untersuchungen wurden nicht nur die beiden hier beschriebenen Fragmente IGFBP-4 (4-122) und IGFBP-4 (136-237), sondern auch das bereits bekannte, nicht verkürzte N-terminale Fragment IGFBP-4 (1-122) (Ständker *et al.*, 2000) eingesetzt. Weiterhin wurde zum Vergleich die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d des Gesamt-Moleküls rhIGFBP-4 bestimmt. Die berechneten Bindungsaffinitäten sind in Tabelle 20 aufgeführt.

	K_d [nM]
rhIGFBP-4	2,1
IGFBP-4 (1-122)	15
IGFBP-4 (4-122)	26
IGFBP-4 (136-237)	184

Tabelle 20 Übersicht über die IGF-II-Bindungsaffinitäten der isolierten Fragmente IGFBP-4 (4-122) und IGFBP-4 (136-237) sowie von rhIGFBP-4 und dem bereits beschriebenen Fragment IGFBP-4 (1-122). Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten wurden durch Messungen im BIACore erhalten.

Das intakte Molekül rhIGFBP-4 zeigte erwartungsgemäß eine hochaffine Bindung von IGF-II. Die IGFBP-4-Fragmente besaßen hingegen verglichen mit dem Gesamtmolekül rhIGFBP-4 alle eine verringerte IGF-II-Bindungsaffinität. Während das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) mit einer Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 184$ nM keine hochaffine IGF-II-Bindung mehr aufweisen konnte, zeigten beide N-terminalen Fragmente noch eine deutliche Bindungsaffinität zu IGF-II. Dabei wurden Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 15$ nM für das Fragment IGFBP-4 (1-122) bzw. von $K_d = 26$ nM für das Fragment IGFBP-4 (4-122) erhalten.

3.3.4.3 Übersicht über die bestimmten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d

In Tabelle 21 sind alle Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten zusammengestellt, die für rhIGFBP-4 sowie für die verschiedenen IGFBP-4-Fragmente mit Hilfe von Sättigungsstudien (Abschnitt 3.3.4.1) und BIACore-Messungen (Abschnitt 3.3.4.2) bestimmt wurden.

	K_d [nM] für IGF-I	K_d [nM] für IGF-II
rhIGFBP-4	5,0	2,1
IGFBP-4 (1-122)	n.b.	15
IGFBP-4 (4-122)	24	26
IGFBP-4 (136-237)	164	184

Tabelle 21 Zusammenstellung der ermittelten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für die Bindung zwischen IGF-I bzw.IGF-II und IGFBP-4 sowie den Fragmenten IGFBP-4 (4-122), IGFBP-4 (136-237) und IGFBP-4 (1-122).

n.b. = nicht bestimmt

Die Zusammenstellung der Bindungskonstanten zeigt, daß alle untersuchten IGFBP-4-Fragmente verglichen mit rhIGFBP-4 sowohl zu IGF-I als auch zu IGF-II eine verringerte Bindungsaffinität besaßen. Dabei konnten für das verkürzte N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) mit Dissoziationskonstanten von $K_d = 24$ nM für IGF-I und $K_d = 26$ nM für IGF-II sowie für das nicht verkürzte N-terminale Fragment IGFBP-4 (1-122) noch hochaffine Bindungen zu beiden IGFs gezeigt werden. Das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) war hingegen nur noch zu einer niedrigaffinen Bindung beider IGFs fähig.

4 Diskussion

4.1 Isolierung von IGFBP-Fragmenten aus humanem Hämofiltrat

Ziel dieser Promotion war die Isolierung und Charakterisierung natürlich vorkommender Fragmente der Bindeproteine der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGFBP-2 und -4. Im Rahmen der Arbeit konnten mehrere Fragmente von IGFBP-2 und -4 aus humanem Hämofiltrat isoliert und identifiziert werden. Dabei wurden sowohl ein N- als auch ein C-terminales Fragment von IGFBP-4 sowie mehrerer C-terminale Fragmente von IGFBP-2 bis zur Reinsubstanz aufgereinigt.

Als Quelle für die Peptidisolierung diente die bei der IPF PharmaCeuticals GmbH etablierte Peptidbibliothek aus humanem Hämofiltrat (Schulz-Knappe *et al.*, 1997). Die Isolierung der Fragmente erfolgte durch aufeinanderfolgende, chromatographische Schritte in Kombination mit verschiedenen biochemischen und immunologischen Methoden. Dazu wurde zunächst die IGF-I-Bindungsfähigkeit der einzelnen Peptidbankfraktionen untersucht. Parallel wurde ein immunologisches Screening mittels Western-Immunoblotting oder ELISA durchgeführt. Fraktionen mit deutlicher IGF-I-Bindung und IGFBP-Immunität wurden anschließend hinsichtlich der enthaltenen Molekularmassen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Daraufhin erfolgte die Isolierung ausgewählter Peptide anhand ihrer Molekularmasse und ihrer Immunreaktivität.

Als besonders günstig erwies sich dabei, während der einzelnen Chromatographieschritte die in den Fraktionen enthaltenen Molekularmassen mittels MALDI-TOF-MS zu analysieren.

Durch die Verwendung dieser Methode konnte beispielsweise das IGFBP-2-Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da von dem Fragment IGFBP-2 (167-279) mit einer molekularen Masse von 12858 Da unterschieden und daraufhin isoliert werden. Dieses Fragment zeigte trotz einem identischen N-terminalen Beginn und einem Massenunterschied von nur 17 Da ein deutlich verändertes IGF-Bindungsverhalten.

Weiterhin konnte durch Kenntnis der Molekularmassen in den einzelnen Fraktionen eine erneute Aufreinigung bereits bekannter Fragmente verhindert werden. Darüberhinaus bestand ebenso die Möglichkeit, größere Mengen bereits bekannter Peptide anhand ihrer Molekularmassen effizient zu isolieren.

Im Western-Immunoblot konnten mehrere Fragmente von IGFBP-2 und -4 detektiert werden. Die verwendeten Antikörper besaßen dabei eine hohe Spezifität und vernachlässigbare Kreuzreaktivitäten, so daß nur Fragmente von IGFBP-2 und -4 isoliert wurden. Interessanterweise konnten neben den IGFBP-Fragmenten auch die entsprechenden Gesamt-IGFBPs detektiert werden, obwohl das Auftreten größerer Mengen der intakten IGFBP-Moleküle unter Verwendung von Hämofiltrat als Ausgangsquelle für die Isolierung nicht zu erwarten war. Die intakten IGFBP-Moleküle besitzen im unkomplexierten und nicht modifiziertem Zustand Molekularmassen zwischen 22,8 kDa und 31,4 kDa (Hwa *et al.*, 1999). Allerdings liegen sie gewöhnlich sowohl durch Komplexierung mit den IGFs als auch durch umfangreiche Modifikationen wie Glykosylierung in bedeutend höher molekularer Form vor. Da bei der Hämofiltration Filter mit einer Ausschlußgröße von 20 bis 30 kDa verwendet werden, werden Proteine dieser Größenordnung zum größten Teil nicht filtriert (Schepky *et al.*, 1994).

Weiterhin zeigte sich, daß in allen pH-Pools der Hämofiltrat-Peptidbank Peptide mit IGF-I-Bindungsfähigkeit vorkamen. Diese Beobachtung läßt sich zum einen dadurch erklären, daß jedes der sechs Bindeproteine IGFBP-1 bis -6 bereits im Serum detektiert werden konnte (Rajaram *et al.*, 1997; Zapf, 1995). Unter der Annahme, daß alle IGFBPs weiterhin in ihrer proteolytisch prozessierten Form vorliegen, sind im Blutstrom eine Vielzahl von IGFBP-Fragmenten zu erwarten. Obwohl diese Fragmente verglichen mit den Gesamt-IGFBP-Molekülen eine verringerte Bindungsaffinität für die IGFs besitzen (Zapf, 1995), sind sie gewöhnlich noch zu einer IGF-Bindung befähigt und können somit detektiert werden.

Darüberhinaus ist zu erwarten, daß die Gesamt-IGFBPs sowie Fragmente mit hoher IGF-Bindungsaffinität in der Hämofiltrat-Peptidbank sowohl in Form von IGF/IGFBP-Komplexen als auch in freier Form vorliegen. Diese verschiedenen Formen können durchaus ein unterschiedliches Elutionsprofil aufweisen. In bezug auf IGF-I und -II konnte bereits ein ungewöhnliches Elutionsverhalten gezeigt werden (Mark, 1998). In der Regel eluieren Peptide in zwei bis drei benachbarten Fraktionen der Hämofiltrat-Peptidbank. IGF-I hingegen konnte bereits aus verschiedenen Fraktionen eines pH-Pools sowie aus verschiedenen pH-Pools aufgereinigt werden.

Das Auftreten von IGF-bindenden Proteinen in allen pH-Pools der Hämofiltrat-Peptidbibliothek läßt weiterhin den Schluß zu, daß neben den im Rahmen dieser Promotion isolierten Fragmenten von IGFBP-2 und -4 und den bereits bekannten Fragmenten von

IGFBP-3, -4 und -5 (Ständker *et al.*, 1998; Ständker *et al.*, 2000; sowie unveröffentlichte Ergebnisse) noch weitere IGFBP-Fragmente in der Hämofiltrat-Peptidbank vorliegen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die Isolierung mehrerer IGFBP-Fragmente im Rahmen dieser Promotion gezeigt werden konnte, das die verfolgte Strategie zur Identifizierung natürlich vorkommender Fragmente der IGFBPs geeignet ist.

Allerdings muß kritisch betrachtet werden, daß die verwendete Peptidbibliothek aus dem Hämofiltrat chronisch nierenkranker Personen hergestellt wurde. Da sowohl die Expression als auch die Proteolyse der IGFBPs von verschiedenen Krankheitsbildern oder (patho-)physiologischen Zuständen abhängen (Rajaram *et al.*, 1997), bleibt zu klären, ob die hier isolierten Fragmente auch im gesunden Organismus auftreten. So sind bereits erhöhte Serumspiegel sowohl der Gesamt-IGFBPs als auch der IGFBP-Fragmente bei Nierensuffizienz beschrieben worden (Powell *et al.*, 1997; Durham *et al.*, 1997). Dabei könnten sich die Fragmente beispielsweise durch die verringerte Nierenfunktion und einer damit erniedrigten renalen Elimination im Serum anreichern.

Während bereits mehrere IGFBP-Fragmente aus Hämofiltrat nierenkranker Patienten beschrieben wurden (Ständker *et al.*, 1998; Ständker *et al.*, 2000; Durham *et al.*, 1997), ist bislang nur wenig über IGFBP-Fragmente bei gesunden und nicht schwangeren Frauen bekannt. Dies dürfte mit der schlechteren Verfügbarkeit von großen Ausgangsmengen für die Peptidisolierung zusammenhängen.

4.1.1 Proteolyse der IGFBPs

Es wird angenommen, daß es sich bei der Proteolyse der IGFBPs durch spezifische IGFBP-Proteasen um einen wichtigen Regulationsmechanismus der IGF-Bioverfügbarkeit handelt. Da die entstehenden IGFBP-Fragmente eine verringerte Affinität zu den IGFs besitzen, werden diese anschließend aus den IGF/IGFBP-Komplexen freigesetzt und können somit mit ihren Rezeptoren in Wechselwirkung treten (Clemmons, 1998).

Diese Theorie wird dadurch bestätigt, daß eine Korrelation zwischen der Inhibition der IGF-vermittelten Wirkung und der IGF-Bindungsaffinität der entsprechenden IGFBPs besteht. Zum einen konnte gezeigt werden, daß IGFBP-4-Fragmente mit verringerter IGF-Bindungsaffinität im Gegensatz zu den hochaffinen IGFBP-4-Gesamtmolekülen keine Inhibition des IGF-I-stimulierten ³H-Thymidin-Einbaus mehr besitzen (Chernausk *et al.*,

1995). Zum anderen wurden Untersuchungen mit Proteolyse-resistenten IGFBP-Mutanten durchgeführt. Dabei wurde die IGF-vermittelte Wirkung sowohl durch Proteolyse-resistente Mutanten von IGFBP-4 (Conover *et al.*, 1995) als auch von IGFBP-5 (Imai *et al.*, 1997) inhibiert. Aufgrund dieser Beobachtungen wird auf wichtige funktionelle Konsequenzen der proteolytischen Prozessierung *in vivo* geschlossen (Chernausk *et al.*, 1995).

Weiterhin ist die Verstärkung der IGF-vermittelten Effekte durch die IGF-BPs generell mit einer Verringerung der Bindungsaffinität der entsprechenden IGF-BPs verbunden (Zapf, 1995; Baxter 2000). Neben der Assoziation mit der Zelloberfläche oder der Extrazellulärmatrix spielen dabei posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder proteolytische Prozessierung eine entscheidende Rolle.

Es wird angenommen, daß sich die Spaltstellen der IGF-BPs in der mittleren, nicht homologen Verbindungsregion befinden (Chernausk *et al.*, 1995; Baxter, 2000). Die im Rahmen dieser Promotion erhaltenen Ergebnisse bestätigen dieses Konzept, da die isolierten Fragmente von IGFBP-2 und -4 durch proteolytische Prozessierung im zentralen, nicht konservierten Bereich gebildet wurden.

Dieser Spaltung der IGF-BPs in der variablen Verbindungsregion wird eine entscheidende Rolle in der Spezifität der IGFBP-Proteasen zugeschrieben. Beispielsweise wird von der neuronalen Zelllinie B104 eine spezifische IGFBP-4-Protease sezerniert, die IGFBP-4 in einem Bereich der mittleren Domäne spaltet, der keinerlei Homologie zu den anderen IGF-BPs besitzt (Chernausk *et al.*, 1995). Während die Glykosylierung der IGF-BPs keinen Einfluß auf ihre Bindungseigenschaften zu haben scheint, wird vermutet, daß der unterschiedliche Grad der Glykosylierung in der mittleren Domäne von IGFBP-3 das Ausmaß der IGFBP-3-Proteolyse beeinflussen kann (Firth & Baxter, 1995).

Bei beiden Bindeproteinen konnten die isolierten proteolytischen Fragmente den drei verschiedenen Domänen der IGF-BPs zugeordnet werden. Bei der Isolierung von IGFBP-4-Fragmenten wurde mit IGFBP-4 (4-122) zum einen ein Fragment aufgereinigt, welches die konservierte N-terminale Domäne repräsentiert. Zum anderen konnte das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) identifiziert werden. Im Rahmen der Aufreinigung von IGFBP-2-Immunreaktivitäten konnten mehrere Fragmente isoliert werden, die die C-terminale Domäne enthielten. Weiterhin konnte mit dem Fragment IGFBP-2 (104-289) ein Fragment isoliert werden, welches sowohl die mittlere als auch die C-terminale Domäne umfaßt. Diese

Beobachtung läßt den Schluß zu, daß zumindest die konservierten C- und N-terminalen Domänen eine hohe strukturelle Stabilität in der Zirkulation besitzen.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß IGFBP-2 und -4 unterschiedlich prozessiert werden. Zwar erfolgt bei beiden Bindeproteinen die proteolytische Spaltung in der variablen mittleren Domäne, jedoch werden bei IGFBP-4 nur diskrete Fragmente gebildet. Diese lassen sich den drei Domänen von IGFBP-4 zuordnen. Die C-terminalen Fragmente von IGFBP-2 weisen hingegen eine hohe Diversität auf. Neben dem hauptsächlich vorkommenden Fragment IGFBP-2 (167-279) konnten zahlreiche weitere IGFBP-2-Fragmente aus dem C-terminalen Bereich detektiert werden. Diese Beobachtung läßt auf eine unterschiedliche Funktion von IGFBP-2 und -4 im Organismus schließen.

4.1.2 Bedeutung der Bindungsaffinität der IGFBP-Fragmente

Grundsätzlich scheinen durch limitierte Proteolyse der IGFBP-Fragmente zu entstehen, die verglichen mit den Gesamt-IGFBP-Molekülen eine verringerte Affinität zu den IGFs besitzen. Als Grund dafür wird vermutet, daß nicht nur die konservierten N- sondern auch die konservierten C-terminalen Domänen der IGFBP-Fragmente sowie letztendlich auch ihre komplette Gesamtstruktur zur hochaffinen Bindung der IGFs beitragen. Es konnte bereits gezeigt werden, daß sowohl die N-terminalen Fragmente von IGFBP-4 und -5 (Qin *et al.*, 1998; Kalus *et al.*, 1998) als auch das C-terminale Fragment von IGFBP-2 (Ho & Baxter, 1997) eine deutliche IGF-Bindung besitzen. Weiterhin konnte für IGFBP-3 eine IGF-Bindung der C- und N-terminalen Fragmente beschrieben werden (Spencer & Chan, 1995). Allerdings zeigten alle Fragmente eine geringere IGF-Bindungsaffinität als die entsprechenden Gesamt-IGFBPs.

Die hier beschriebenen Fragmente von IGFBP-2 und -4 zeigten ebenfalls alle eine verringerte Bindungsaffinität für die IGFs. Dabei besaß das N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von $K_d = 24$ nM für IGF-I sowie $K_d = 26$ nM für IGF-II noch eine hochaffine Bindung der IGFs. Auch das C-terminale Fragment IGFBP-2 (167-279) zeigte mit $K_d = 43$ nM noch eine deutliche IGF-II-Bindung. Allerdings war dieses Fragment nur zu einer niedrigaffinen Bindung von IGF-I in der Lage. Ebenso konnten für alle weiteren isolierten IGFBP-Fragmente nur deutlich verringerte Bindungsaffinitäten verglichen mit den IGFBP-Gesamtmolekülen beobachtet werden.

Generell wird eine unterschiedliche Struktur, Lokalisation und Anzahl der IGF-Bindungsstellen bei den einzelnen IGFBPs angenommen (Qin *et al.*, 1998).

Interessant erscheint dabei die Beobachtung, daß die isolierten IGFBP-4-Fragmente keine unterschiedliche Bindungsaffinität für IGF-I und IGF-II aufwiesen. Sowohl das N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) als auch das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) besaßen jedes für sich genommen annähernd die gleiche Bindungsaffinität für IGF-I und -II. Da eine ähnliche Beobachtung sowohl für das IGFBP-4-Gesamtmolekül als auch für verschiedene IGFBP-4-Mutanten gemacht werden konnte, wurde eine gemeinsame Bindungsstelle beider IGFs im IGFBP-4-Molekül postuliert (Qin *et al.*, 1998).

IGFBP-2 hingegen zeigt ein unterschiedliches Bindungsverhalten bezüglich der beiden IGFs, wobei das IGFBP-2-Gesamtmolekül eine höhere Bindungsaffinität zu IGF-II als zu IGF-I besitzt (Roghani *et al.*, 1991). Deshalb wurden bereits verschiedene Bindungsstellen für die beiden IGFs im IGFBP-2-Molekül postuliert. Die hier erhaltenen Bindungsdaten stimmen mit diesem Konzept überein. So zeigt das C-terminale Fragment IGFBP-2 (167-279) mit $K_d = 43$ nM noch eine signifikante Bindungsaffinität für IGF-II, während die IGF-I-Bindung mit $K_d = 495$ nM bedeutend niedriger affin ist. Ein umgekehrtes Bild erhält man für das IGFBP-2-Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da, welches N-terminal ebenfalls mit Gly167 beginnt. Während im Liganden-Blot kaum eine Bindung von IGF-II detektiert werden konnte, war dieses Fragment als einziges IGFBP-2-Fragment zu einer deutlich detektierbaren IGF-I-Bindung in der Lage (vgl. Abbildung 23, Abschnitt 3.2.4.1).

Diese Ergebnisse lassen eine unterschiedliche Lokalisation der Bindungsstellen von IGF-I und -II im IGFBP-2-Molekül vermuten. In bezug auf IGFBP-4 könnte es sich hingegen um eine gemeinsame Bindungsstelle für beide IGFs handeln.

4.2 Isolierte Fragmente von IGFBP-2

Die Isolierung des Bindeproteins-2 der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren erfolgte zuerst aus BRL-3A-Zellen, einer Zelllinie aus Rattenleber (Mottola *et al.*, 1986).

Es handelt sich bei IGFBP-2 um ein nicht glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 31,8 kDa. Zu den strukturellen Besonderheiten von IGFBP-2 zählt ein RGD-Epitop in der C-terminalen Domäne, welches in der Regel ein Bindungsmotiv für Integrinrezeptoren darstellt.

IGFBP-2 konnte bereits in vielen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden und kommt sowohl im Serum als auch in Zerebrospinal-Flüssigkeit in signifikanten Mengen vor (Ocrant *et al.*, 1990; Roghani *et al.*, 1991). Weiterhin konnte IGFBP-2 in Milch, Urin, synovialer Flüssigkeit, interstitieller Flüssigkeit, follikulärer Lymphflüssigkeit, Seminalflüssigkeit und Fruchtwasser detektiert werden (Rajaram *et al.*, 1997).

4.2.1 Proteolytische Prozessierung von IGFBP-2

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene Fragmente von IGFBP-2 identifiziert werden. Die unterschiedlichen Fragmente sind in Tabelle 22 mit ihren jeweiligen N- und C-terminalen Spaltstellen zusammengefaßt.

Fragment	N-terminale Spaltstelle	C-terminale Spaltstelle
Fragmente, die die mittlere und die C-terminale Domäne umfassen		
IGFBP-2 (104-289)	Tyr103 - Gly104	C-Terminus
IGFBP-2 (104-287)	Tyr103 - Gly104	Arg287 - Met288
Fragmente, die die C-terminale Domäne umfassen		
IGFBP-2 (153-289)	Leu152 – Ala153	C-Terminus
IGFBP-2 (157-289)	Arg156 - Glu157	C-Terminus
IGFBP-2 (157-287)	Arg156 - Glu157	Arg287 - Met288
IGFBP-2 (159-289)	Lys158 - Val159	C-Terminus
IGFBP-2 (159-287)	Lys158 - Val159	Arg287 - Met288
IGFBP-2 (166-289)	Gln165 - Met166	C-Terminus
IGFBP-2 (166-287)	Gln165 - Met166	Arg287 - Met288
IGFBP-2 (167-289)	Met166 - Gly167	C-Terminus
IGFBP-2 (167-288)	Met166 - Gly167	Met288 - Gln289
IGFBP-2 (167-287)	Met166 - Gly167	Arg287 - Met288
IGFBP-2 (167-279)	Met166 - Gly167	Glu279 - Ala280
IGFBP-2 (169-287)	Lys168 - Gly169	Arg287 - Met288
Fragmente, die durch Spaltung innerhalb der C-terminalen Domäne entstehen		
IGFBP-2 (167-204)	Met166 - Gly167	Tyr204 – Met205
IGFBP-2 (205-289)	Thr204 – Met205	C-Terminus
IGFBP-2 (205-287)	Thr204 – Met205	Arg287 - Met288

Tabelle 22 Übersicht über die im Hämofiltrat identifizierten IGFBP-2-Fragmente mit ihren zugehörigen C- sowie N-terminalen Spaltstellen. Das am häufigsten vorkommende Fragment IGFBP-2 (167-279) ist fett gedruckt.

Zum einen wurden die Fragmente IGFBP-2 (104-289) und IGFBP-2 (104-287) isoliert, welche sowohl die variable mittlere Region als auch die C-terminale Domäne von IGFBP-2 umfaßten. Zum anderen konnten zahlreiche Fragmente aufgereinigt werden, die einen Teil der mittleren Region sowie die konservierte C-terminale Domäne enthielten. Die unterschiedlichen Fragmente zeigten dabei sowohl C- als auch N-terminal meist nur einen Unterschied von wenigen Aminosäuren. Das dominierende C-terminale Fragment war IGFBP-2 (167-279). Darüberhinaus konnten drei kleinere Fragmente identifiziert werden, die durch Spaltung der C-terminalen Fragmente IGFBP-2 (167-289) bzw. IGFBP-2 (167-287) innerhalb der konservierten C-terminalen Domäne gebildet wurden. Eine schematische Darstellung der verschiedenen Spaltstellen ist in Abbildung 34 zu sehen.

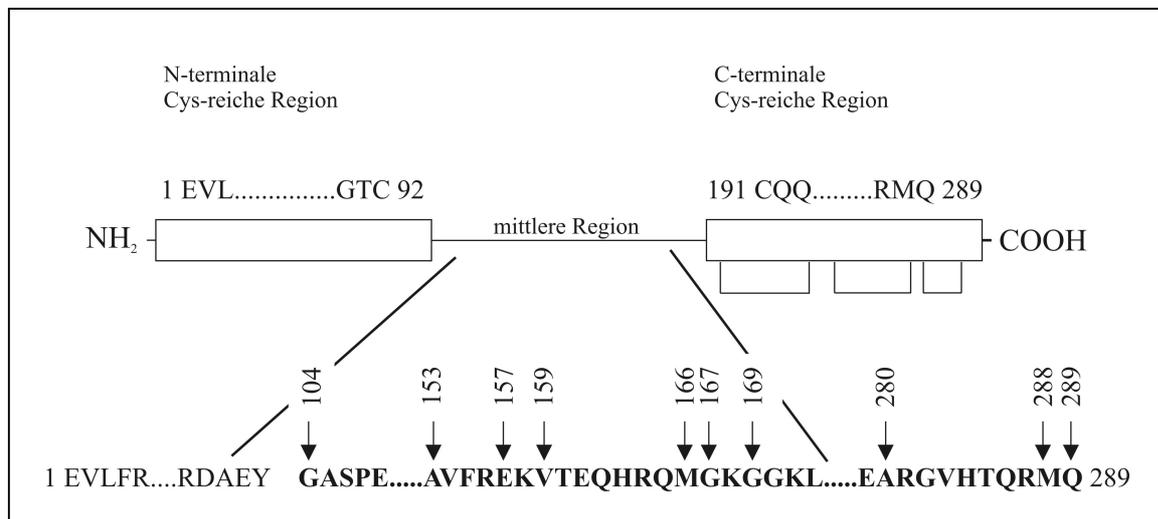


Abbildung 36:

Schematische Darstellung der Struktur und der Proteolyse von IGFBP-2 in humanem Hämofiltrat. In der mittleren, nicht konservierten Region des IGFBP-2-Moleküls befinden sich zahlreiche Spaltstellen. Ebenso tritt eine proteolytische Prozessierung am C-terminalen Ende des Moleküls auf. Die Spaltung erfolgt dabei jeweils N-terminal der mit einem Pfeil markierten Aminosäure. Die Spaltstelle innerhalb der C-terminalen Domäne zwischen Thr204 und Met205 ist nicht markiert. Bereiche im IGFBP-2-Molekül, die den hier isolierten IGFBP-2-Fragmenten entsprechen, sind fett gedruckt. Weiterhin sind die konservierten C- und N-terminalen Domänen als Kästchen sowie die Cysteinverbrückung innerhalb der C-terminalen Domäne (vgl. Abschnitt 3.2.3) dargestellt.

Während alle anderen identifizierten Fragmente durch proteolytische Spaltung in der variablen Verbindungsregion entstanden, konnten mit den Fragmenten IGFBP-2 (167-204) und IGFBP-2 (205-289) bzw. IGFBP-2 (205-287) drei Fragmente identifiziert werden, die durch Proteolyse innerhalb der konservierten C-terminalen Region zwischen Thr204 und Met205 gebildet wurden. Im allgemeinen wird angenommen, daß die Spaltung der IGFBPs in der mittleren variablen Domäne erfolgt (Chernausek *et al.*, 1995; Baxter, 2000). Bisher konnten noch keine Fragmente beschrieben werden, die durch Spaltung innerhalb der konservierten C- oder N-terminalen Domänen gebildet wurden. Ob es sich bei den hier isolierten Fragmenten um Fragmente mit physiologischer Relevanz handelt, ist allerdings fraglich. Eher kann vermutet werden, daß es sich um reine Abbauprodukte handelt. Allerdings können aus der Identifizierung dieser Fragmente Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur der C-terminalen Domäne von IGFBP-2 gezogen werden. Die Spaltstelle sollte sich dabei in einem äußeren Bereich befinden, der für Proteolyse leicht zugänglich ist.

Da bei der proteolytischen Prozessierung von IGFBP-2 eine große Anzahl unterschiedlicher Fragmente zu detektieren war, gestaltet sich die Zuordnung einzelner Proteasen als schwierig. Aufgrund der großen Anzahl an Spaltstellen ist zu vermuten, daß bei der proteolytischen Prozessierung von IGFBP-2 mehrere Proteasen beteiligt sind.

Generell fällt auf, daß die Spaltung oft C-terminal der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin erfolgt. Dieses ist sowohl in der mittleren Verbindungsregion bei den Aminosäureresten Arg156, Lys158 und Lys168 als auch zwischen Arg287 und Met288 am C-terminalen Ende des Moleküls zu beobachten. Da Trypsin C-terminal von Lysin und Arginin spaltet, könnte es sich bei der involvierten Protease um eine Trypsin-ähnliche Proteaseaktivität handeln. Ebenso wäre eine Hydrolyse der Peptidbindung durch Plasmin denkbar, welches ebenfalls zur Spaltung C-terminal von Arginin- und Lysin-Resten befähigt ist. Eine limitierte Proteolyse von IGFBP-2 durch Plasmin konnte dabei bereits im Zellkulturüberstand der Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-SH gezeigt werden (Menouny *et al.*, 1997). Bei der Spaltung zwischen Arg156 und Glu157 sowie zwischen Arg287 und Met288 besteht weiterhin die Möglichkeit, daß die proteolytische Prozessierung durch Kallikrein erfolgt. Auch für Kallikrein ist bekannt, daß eine Proteolyse C-terminal von Arginin stattfinden kann.

Bei der Bildung der Fragmente IGFBP-2 (104-289) bzw. IGFBP-2 (104-287) tritt ferner eine Spaltung zwischen Tyr103 und Gly104 auf. In der mittleren Verbindungsregion scheint weiterhin eine wichtige proteolytische Spaltung zwischen Met 166 und Gly167 zu erfolgen. Sowohl bei der Spaltung C-terminal von Tyrosin als auch bei der Spaltung C-terminal von

Methionin könnte dabei eine Chymotrypsin-ähnliche Proteaseaktivität involviert sein. Für Chymotrypsin ist bekannt, daß die hauptsächlichsten Spaltstellen C-terminal der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zu finden sind. Weiterhin tritt eine Hydrolyse der Peptidbindung C-terminal der Aminosäuren Leucin, Methionin und Alanin auf. Somit könnte eine Chymotrypsin-ähnliche Protease weiterhin für die Spaltung zwischen Leu152 und Ala153 verantwortlich sein.

Eine weitere Hauptspaltstelle ist am C-terminalen Ende der konservierten C-terminalen Domäne zwischen Glu279 und Ala280 zu beobachten. Die Zuordnung einer bekannten Protease ist dabei nach heutigem Kenntnisstand nicht möglich. Ebenso ist bislang keine Protease bekannt, die spezifisch zwischen den Aminosäure-Resten Threonin und Methionin spaltet. Durch die Spaltung zwischen Thr204 und Met205 innerhalb der C-terminalen Domäne werden dabei die Fragmente IGFBP-2 (167-204) sowie IGFBP-2 (205-289) und IGFBP-2 (205-287) gebildet.

Da sehr oft Fragmente auftreten, die sich entweder C- oder N-terminal nur um wenige Aminosäuren unterscheiden, wäre bei der proteolytischen Prozessierung von IGFBP-2 auch ein sequentieller Verdau unter Beteiligung verschiedener Endo- und Exoproteasen denkbar.

Interessant erscheint, daß bereits ähnliche C-terminale Fragmente sowohl von humanem als auch von IGFBP-2 aus Ratte beschrieben wurden.

So wurde schon 1988 von Wang *et al.* ein IGFBP-2-Fragment publiziert, welches aus dem Zellkulturüberstand der Zelllinie BRL-3A aus Ratte isoliert wurde. Dieses wurde durch Proteolyse zwischen Glu147 und Met148 gebildet, wobei diese Spaltstelle derjenigen zwischen Gln165 und Met166 der humanen Form von IGFBP-2 entspricht. Mit dem Fragment IGFBP-2 (166-289) konnte während dieser Promotion ein Fragment identifiziert werden, welches durch proteolytische Spaltung an exakt dieser Stelle gebildet wurde. Im Rahmen der Proteomanalyse humanen Blutfiltrats konnte weiterhin das Fragment IGFBP-2 (153-165) aus der variablen Verbindungsregion identifiziert werden (L.Ständker, unveröffentlichte Ergebnisse). Es scheint sich somit hierbei um die spezifische Spaltstelle einer Endoprotease zu handeln. Die Zuordnung einer Protease mit einer spezifischen Spaltstelle zwischen Glutaminsäure und Methionin bzw. Glutamin and Methionin ist nach heutigem Kenntnisstand allerdings nicht möglich.

Weiterhin wurden C-terminale IGFBP-2-Fragmente aus humaner Milch beschrieben, die N-terminal mit den Aminosäuren Gly169 bzw. Lys181 begannen (Ho & Baxter, 1997). Dabei konnte vor kurzem eine IGFBP-2-spezifische Proteaseaktivität in humaner Milch detektiert

werden (Elmlinger *et al.*, 1999), die Fragmente ähnlicher Größe generierte. Durch Inhibitorstudien *in vitro* wurde diese als Metallionen-abhängige Serinprotease charakterisiert. Mit IGFBP-2 (169-279) konnte dabei im Rahmen dieser Promotion ein entsprechendes Fragment identifiziert werden.

Allerdings konnte mit den angewandten Methoden kein N-terminales Fragment von IGFBP-2 identifiziert werden. Ein möglicher Grund könnte zum einen darin zu finden sein, daß der N-Terminus trotz Verwendung eines polyklonalen Antiserums nicht detektiert werden konnte. Aus Erfahrung mit anderen IGFBP-Antisera erscheint dies jedoch eher unwahrscheinlich. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß das N-terminale Fragment im Hämofiltrat nur in sehr geringen Mengen vorliegt. Dabei könnte es einerseits sehr schnell von Zellen internalisiert, abgebaut und damit aus der Zirkulation entfernt werden. Andererseits könnte es auch während der Hämofiltration verloren gehen. So wäre es beispielsweise denkbar, daß Absorptionseffekte am Hämofilter auftreten oder daß es sich um ein großes oder komplexiertes Fragment handelt, welches aufgrund seiner Größe nicht filtriert wird.

4.2.2 Bindungseigenschaften der isolierten IGFBP-2-Fragmente

Die isolierten IGFBP-2-Fragmente wurden weiterhin bezüglich ihrer Bindungseigenschaften für IGF-I und -II untersucht. Zunächst wurde die Bindungsfähigkeit der einzelnen Fragmente im Western-Ligandblot getestet. Für einzelne Fragmente wurden anschließend die Bindungsaffinitäten für IGF-I mit Hilfe von Sättigungsstudien im chemischen Gleichgewicht sowie für IGF-II mittels Echtzeitmessungen im BIACore bestimmt. Dabei zeigten alle Fragmente verglichen mit dem Gesamtmolekül rhIGFBP-2 eine verringerte Bindungsaffinität.

Besonders interessant war der Vergleich des Fragments IGFBP-2 (167-289) mit einer molekularen Masse von 12858 Da mit dem IGFBP-2-Fragment mit einer molekularen Masse von 12875 Da. Obwohl beide Fragmente N-terminal mit der Aminosäure Gly167 begannen und nur einen Massenunterschied von 17 Da besaßen, zeigten sie deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Bindungseigenschaften für IGF-I und -II. Schon im Liganden-Blot konnte gezeigt werden, daß das Fragment IGFBP-2 (167-279) noch eine deutliche Bindung von IGF-II besaß, während keine Bindung von IGF-I detektiert werden konnte. Hingegen zeigte das Fragment IGFBP-2 (12875 Da) kaum eine Bindung von IGF-II, war aber zu einer deutlich detektierbaren Bindung von IGF-I in der Lage. Genauere Untersuchungen zur Bestimmung

der Bindungsaffinitäten der Fragmente zu IGF-I und -II bestätigten diese Beobachtung. Für das Fragment IGFBP-2 (167-279) konnte für IGF-II eine Dissoziationskonstante $K_d = 43$ nM bestimmt werden, was einer 10fach verringerten Bindungsaffinität verglichen mit rhIGFBP-2 entsprach. Hingegen war die Bindungsaffinität für IGF-I mit $K_d = 495$ nM in Bezug auf rhIGFBP-2 150fach verringert. Im Gegensatz dazu zeigte das Fragment IGFBP-2 (12875 Da) sowohl für IGF-I als auch für IGF-II verglichen mit rhIGFBP-2 eine ungefähr 35fache Verringerung der Bindungsaffinität. Diese entsprach Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 120$ nM für IGF-I bzw. $K_d = 141$ nM für IGF-II.

Leider konnte bislang nicht genügend Material des Fragments IGFBP-2 (12875 Da) für umfangreiche weiterführende Analysen zur Aufklärung möglicher Modifikationen oder Mutationen gewonnen werden. Die vollständige Aufklärung der Struktur des Fragments wird allerdings Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Interessanterweise können Parallelen zwischen dem Fragment IGFBP-2 (12875 Da) und bereits beschriebenen C-terminalen IGFBP-2-Fragmenten aus humaner Milch (Ho & Baxter, 1997) aufgezeigt werden. Dabei wurde in humaner Milch ein Fragment identifiziert, welches N-terminal mit der Aminosäure Gly169 begann. Diesem Fragment konnte ebenfalls keine Sequenz von IGFBP-2 eindeutig zugeordnet werden, da die bestimmte Molekularmasse mit der theoretisch berechneten Masse eines IGFBP-2-Fragments nicht übereinstimmte. Trotz der unzureichenden Aufklärung der Struktur des Peptids konnte eine deutliche IGF-Bindungsfähigkeit sowohl für IGF-I als auch für IGF-II gezeigt werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit mit IGFBP-2 (104-289) ein Fragment isoliert, welches sowohl die mittlere Verbindungsregion als auch den C-Terminus von IGFBP-2 umfaßte. Während für IGFBP-3 beschrieben wurde, daß das Vorhandensein der mittleren Verbindungsregion eine Erhöhung der IGF-II-Bindungsaffinität der N-terminalen Domäne bewirkte (Hashimoto *et al.*, 1997), konnte bei dem Fragment IGFBP-2 (104-289) keine verbesserte Bindung von IGF-I oder -II verglichen mit dem Fragment IGFBP-2 (167-279) detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte das Fragment IGFBP-2 (104-289) mit $K_d = 133$ nM eine deutlich geringere IGF-II-Bindungsaffinität als das Fragment IGFBP-2 (167-279) mit $K_d = 43$ nM.

Insgesamt zeigten alle Fragmente bis auf IGFBP-2 (167-279) und der Mischfraktion IGFBP-2 (167-289) eine ungefähr 35fache Abnahme der Bindungsaffinität für IGF-II. Die Mischfraktion IGFBP-2 (167-289) enthielt dabei drei verschiedene Fragmente, die die

Sequenzbereiche Gly167-Gln289, Gly167-Met288 und Gly167-Arg287 umfaßten (vgl. Abschnitt 3.2.4). Die N-terminalen Enden des Fragments IGFBP-2 (167-279) sowie der Fragmente in der Mischfraktion IGFBP-2 (167-289) stimmten somit überein. Allerdings war das Fragment IGFBP-2 (167-279) C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzt, während die Fragmente der Mischfraktion nahezu den gesamten C-terminalen Bereich umfaßten. Interessanterweise zeigte das C-terminal verkürzte Fragment IGFBP-2 (167-279) nur eine 10fach verringerte IGF-II-Bindungsaffinität verglichen mit rhIGFBP-2. Die Bindungsaffinität der Mischfraktion IGFBP-2 (167-289) für IGF-II war hingegen ca. 50fach verringert. Der Verlust der 10 C-terminalen Aminosäuren bewirkte somit eine deutliche Steigerung der IGF-II-Bindungsaffinität.

Im Gegensatz dazu konnten Forbes *et al.* (1998) für bovines IGFBP-2 zeigen, daß der Verlust der letzten 14, 36 oder 48 Aminosäuren keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des IGFBP-2-Gesamtmoleküls hatte. Der Verlust der letzten 63 C-terminalen Aminosäure-Reste resultierte hingegen in einer deutlichen Abnahme der IGF-Bindungsaffinität.

Insgesamt konnte durch unterschiedliche Studien gezeigt werden, daß sowohl die C- als auch die N-terminalen Domänen von IGFBP-2 zur hochaffinen Bindung von IGF-I und -II beitragen.

Die Involvierung der C-terminalen Domäne in die IGF-Bindung von IGFBP-2 konnte bereits 1988 von Wang *et al.* durch die Isolierung eines IGFBP-2-Fragments aus dem Zellkulturüberstand der Zelllinie BRL-3A aus Ratte gezeigt werden. Dieses umfaßte sowohl einen Teil der mittleren Region als auch den C-Terminus von IGFBP-2 und war zu einer hochspezifischen Bindung von IGF-I und -II fähig. Jedoch war die IGF-Bindungsaffinität im Vergleich zum IGFBP-2-Gesamtmolekül 5-15fach verringert. Auch für C-terminale IGFBP-2-Fragmente aus humaner Milch konnte eine spezifische Bindung von IGF-I und -II beschrieben werden (Ho & Baxter, 1997). Allerdings zeigten diese nur 10% der IGF-I- bzw. 25% der IGF-II-Bindungskapazität des IGFBP-2-Gesamtmoleküls. Einige Bereiche der C-terminalen Domäne von IGFBP-2, die bei der Bindung der IGFs beteiligt sind, konnten dabei bereits aufgeklärt werden. So konnte durch Photoaffinitäts-Markierung gezeigt werden, daß die C-terminalen Aminosäuren 212-217 sowie 266-287 von IGFBP-2 in die Interaktion von IGFBP-2 und IGF-I involviert sind (Horney *et al.*, 2001). Für bovines IGFBP-2 konnte weiterhin beschrieben werden, daß die Aminosäure-Reste Lys222-Asn136 eine entscheidende Rolle bei der Bindung der IGFs spielen (Forbes *et al.*, 1998). Dieser Bereich wurde durch die Deletion verschiedener C-terminaler Bereiche identifiziert. Während der Verlust der letzten

14, 36 oder 48 Aminosäuren keine veränderte IGF-Bindung der entsprechenden IGFBP-2-Mutante hervorrief, hatte die Deletion der letzten 63 Aminosäuren eine deutlich verringerte Bindungsaffinität zur Folge.

Weitere Untersuchungen mit bovinem IGFBP-2 konnten ebenfalls eine wichtige Rolle der N-terminalen Domäne von IGFBP-2 bei der Bindung der IGFs aufzeigen. Eine besondere Stellung scheint dabei der Aminosäure Tyr60 zuzukommen. So bewirkte die chemische Modifikation von Tyr60 durch Iodierung eine Verringerung der Bindungsaffinität des IGFBP-2-Moleküls für die IGFs (Hobba *et al.*, 1996). Auch konnte gezeigt werden, daß bei gleichzeitiger Bindung von IGF-I und -II keine Iodierung der Aminosäure Tyr60 möglich war. Die Bedeutung der Aminosäure Tyr60 wurde in weiterführenden Untersuchungen von IGFBP-2-Mutanten sowohl durch Bindungsstudien im chemischen Gleichgewicht als auch durch Echtzeit-Messungen im BIACore unterstrichen. So resultierte die Substitution von Tyr60 durch Alanin oder Phenylalanin in einer deutlich verringerten Affinität der IGFBP-2-Mutanten für die IGFs (Hobba *et al.*, 1998). Hingegen hatten Mutationen von benachbarten und ebenfalls konservierten Aminosäuren keine Auswirkungen auf das Bindungsverhalten.

Neuere Untersuchungen an bovinem IGFBP-2 mittels BIACore-Analyse konnten die genauere Bedeutung der N- und der C-terminalen Domänen weiter aufklären (Carrick *et al.*, 2001). Es wurde beschrieben, daß die N-terminale Domäne zur schnellen Assoziation mit IGF-I und -II befähigt ist. Hingegen bildet die C-terminale Domäne einen Komplex mit den IGFs aus, der eine höhere Stabilität als der Komplex mit der N-terminalen Domäne aufweist. Durch die Beobachtung eines relativ stabilen Komplexes der C-terminalen Domäne mit den IGFs kann erklärt werden, warum für die Rahmen dieser Promotion isolierten C-terminalen Fragmente eine spezifische Bindung der IGFs gezeigt werden konnte.

4.3 Isolierte Fragmente von IGFBP-4

Die erste Isolierung von IGFBP-4 erfolgte zeitgleich aus dem konditionierten Zellkulturüberstand der humanen Osteosarkoma-Zelllinie TE-89 (Mohan *et al.*, 1989) und aus dem Serum von adulten Ratten (Shimonaka *et al.*, 1989).

IGFBP-4 ist neben IGFBP-3 das einzige Bindeprotein der IGFs, welches mit Asn104 eine N-Glykosylierungsstelle besitzt. Diese ist variabel glykosyliert (Ceda *et al.*, 1991; Cheung *et al.*, 1991), so daß das IGFBP-4-Molekül in Molekulargewichtsvarianten zwischen 24 und 28 kDa vorkommt. Die Glykosylierung scheint aber keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften

von IGFBP-4 zu besitzen (Carr *et al.*, 1994). Zu den weiteren strukturellen Besonderheiten von IGFBP-4 zählen zwei zusätzlich Cystein-Reste im N-terminalen Bereich.

IGFBP-4 konnte bislang nicht nur im Serum und in verschiedenen Zellkulturüberständen, sondern auch in Seminalflüssigkeit sowie interstitieller und synovialer Flüssigkeit nachgewiesen werden (Rajaram *et al.*, 1997).

4.3.1 Proteolytische Prozessierung von IGFBP-4

Während dieser Promotion konnte zum einen im Rahmen der systematischen Proteomanalyse humanen Blutfiltrats das N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) identifiziert werden. Zum anderen konnte das Fragment IGFBP-4 (136-237) anhand seiner Immunreaktivität im Western-Immunoblot isoliert werden. Dieses Fragment entspricht der C-terminalen Domäne des IGFBP-4-Moleküls. Eine schematische Übersicht der Proteolyse von IGFBP-4 in humanem Hämofiltrat ist in Abbildung 37 dargestellt.

Das Auftreten eines N- wie auch eines C-terminalen Fragments unterstützt dabei die Hypothese, daß die proteolytische Prozessierung der IGFBPs im allgemeinen zu zwei Hauptfragmenten führt, die den C- und N-terminalen konservierten Domänen entsprechen.

Neben dem bereits bekannten N-terminalen Fragment IGFBP-4 (1-122) (Ständker *et al.*, 2000) konnte somit ein weiteres N-terminales Fragment aufgereinigt werden. Das bislang unbekannte Fragment IGFBP-4 (4-122) ist dabei N-terminal um drei Aminosäuren verkürzt. Ob der Verlust der N-terminalen Aminosäuren Asp-Glu-Ala eine biologische Signifikanz besitzt, ist allerdings noch unklar. Interessanterweise beinhaltet dieser kurze Sequenzabschnitt jedoch zwei saure Aminosäuren, so daß durch den Verlust die Gesamtladung des Moleküls verändert wird. Dabei hat das Fragment IGFBP-4 (1-122) einen Isoelektrischen Punkt von 5,9, wohingegen das Fragment IGFBP-4 (4-122) einen Isoelektrischen Punkt von 6,5 besitzt. Auch stellt sich die Frage, ob der N-terminalen Verkürzung von Peptiden ein generelles Konzept zu Grunde liegt. Zum einen treten auch verkürzte Formen der IGFs auf. Die entsprechenden Peptide des(1-3) IGF-I bzw. des(1-6) IGF-II besitzen dabei veränderte biologische Eigenschaften. So sind sie zwar noch zur Bindung des IGF1R in der Lage, jedoch ist die Bindung zu den IGFBPs deutlich verringert. Zum anderen wurde ebenfalls die N-

terminal um drei Aminosäuren verkürzte Form des(1-3) IGFBP-2 beschrieben (Mottola *et al.*, 1989; Cohick *et al.*, 1995).

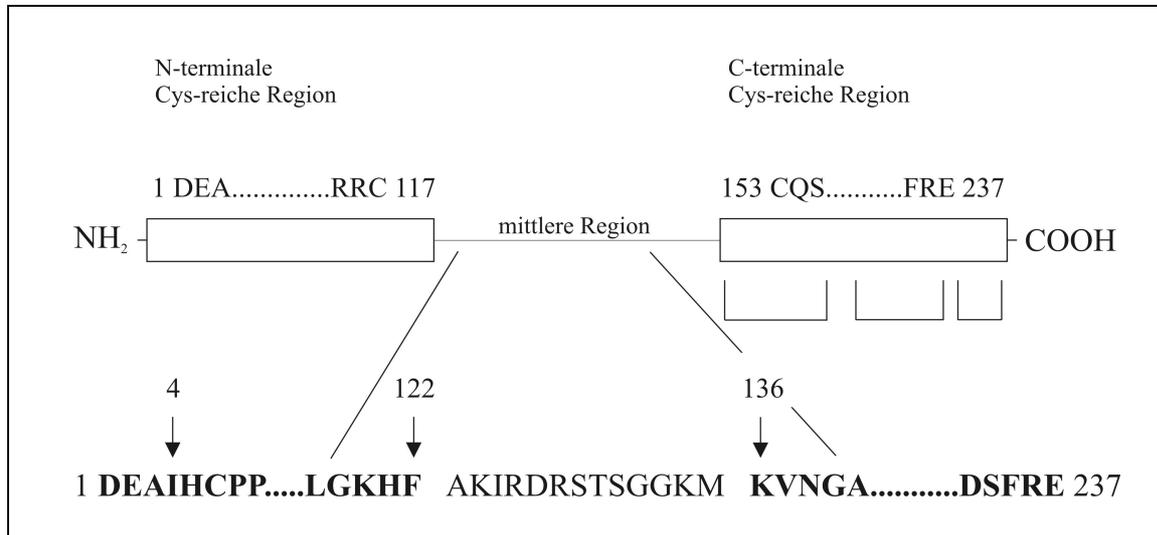


Abbildung 37:

Schematische Darstellung der Struktur und der Proteolyse von IGFBP-4 in humanem Hämofiltrat (Ständker *et al.*, 2000). Die identifizierten Spaltstellen im Molekül sind durch Pfeile markiert. Die Spaltung erfolgt zum einen in der mittleren Region C-terminal der Aminosäure Phe122 sowie N-terminal der Aminosäure Lys136, wobei die zirkulierenden N-terminalen Fragmente IGFBP-4 (1-122) und IGFBP-4 (4-122) sowie das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) entstehen. Zum anderen wird zur Bildung des verkürzten N-terminalen Fragments die Peptidbindung N-terminal der Aminosäure Ile4 hydrolysiert. Isolierte Fragmente sind durch fett gedruckte Buchstaben gekennzeichnet, die konservierten C- und N-terminalen Domänen sind als Kästchen dargestellt. Weiterhin ist die Disulfidverbrückung in der C-terminalen Region gezeigt (vgl Abschnitt 3.3.3).

Da beide N-terminalen Fragmente C-terminal von Phe122 proteolytisch gespalten werden, kann dort eine spezifische Spaltstelle für IGFBP-4 im Serum vermutet werden. Für eine spezifische Spaltstelle zwischen Phe122 und Ala123 spricht auch die Identifizierung des Peptids IGFBP-4 (123-135) aus dem mittleren Bereich des IGFBP-4-Moleküls, welches kürzlich im Hämofiltrat durch systematische Proteomanalyse detektiert werden konnte (L.Ständker, unveröffentlichte Ergebnisse). Dieses Peptid entspricht exakt dem fehlenden Bereich des IGFBP-4-Moleküls zwischen den isolierten N- und C-terminalen Fragmenten. Die Beobachtung läßt den Schluß zu, daß die identifizierten IGFBP-4-Fragmente durch

direkte Proteolyse zwischen Phe122 – Ala123 und Met135 – Lys136 entstehen. Die proteolytische Prozessierung von IGFBP-4 erfolgt somit durch spezifische Endoproteasen ohne sequentiellen Verdau durch verschiedenen Proteasen oder Involvierung von Amino- oder Carboxypeptidasen.

Aufgrund der unterschiedlichen Spaltstellen im IGFBP-4-Molekül sind bei der Entstehung der Fragmente vermutlich zwei Proteasen beteiligt. Zum einen findet eine Spaltung zwischen Met135 und Lys136 statt, wodurch das C-terminale Fragment gebildet wird. Dabei könnten Kallikreine eine Rolle spielen, da diese zur Spaltung von Peptidbindungen zwischen Methionin- und Lysin-Resten zirkulierender Kininogene fähig sind (Clements *et al.*, 1989). Eine weitere Spaltung zwischen Phe122 und Ala123 führt zur Entstehung der N-terminalen Fragmente. Da Chymotrypsin Peptidbindungen C-terminal von aromatischen Aminosäuren hydrolysiert, könnte es sich hierbei um eine Chymotrypsin-ähnliche Proteaseaktivität handeln. Zur Entstehung des hier isolierten verkürzten N-terminalen Fragments ist weiterhin eine Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Ala3 und Ile4 notwendig. Bislang ist allerdings keine Protease mit einer spezifischen Spaltstelle zwischen den Aminosäure-Resten Alanin und Isoleucin bekannt. Denkbar wäre hierbei aber, daß die proteolytische Abspaltung der drei N-terminalen Aminosäuren durch Aminopeptidasen erfolgt.

Interessanterweise konnten bereits C-terminale IGFBP-4-Fragmente beschrieben werden, die ebenfalls mit Lys136 oder mit dem entsprechenden Lys132 des IGFBP-4-Moleküls der Ratte beginnen. Das humane Fragment wird dabei zum einen durch eine IGF-II-abhängige Protease im Zellkulturüberstand von Osteoblasten und Fibroblasten gebildet (Conover *et al.*, 1995). Aufgrund von Inhibitorstudien *in vitro* wurde vermutet, daß es sich dabei um eine Kalzium-abhängige Metalloprotease handelt. Lawrence *et al.* (1999) identifizierten die IGF-abhängige IGFBP-4-Protease aus dem konditionierten Medium von Fibroblasten schließlich als Zn^{2+} -abhängiges PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A). Zum anderen konnte kürzlich eine IGF-II-abhängige Protease im Serum schwangerer Frauen detektiert werden, die ebenfalls eine spezifische Spaltstelle zwischen Met135 und Lys136 besaß (Byun *et al.*, 2000). Ob es sich hierbei um die gleiche Protease handelt, konnte allerdings bislang nicht aufgeklärt werden. Das entsprechende C-terminale Fragment aus Ratte konnte im Medium der neuronalen Zelllinie B104 identifiziert werden (Chernausek *et al.*, 1995). Die proteolytische Aktivität für IGFBP-4 aus dem Zellkulturüberstand von B104 Zellen wurde bereits zuvor als

Glucokortikoid-induzierbare, Ca^{2+} -abhängige Metallo-Serinprotease beschrieben (Cheung *et al.*, 1994).

Eine weitere Möglichkeit ist in der Spaltung durch die saure Protease Cathepsin D zu sehen, für die ebenfalls eine Spaltung von IGFBP-4 an Met135 gezeigt werden konnte (Claussen *et al.*, 1997).

Wiederum muß berücksichtigt werden, daß als Ausgangsmaterial Hämofiltrat von Patienten mit Niereninsuffizienz verwendet wurde. Dies erscheint wichtig, da die Proteolyse von IGFBP-4 ebenfalls von verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen des Organismus abhängig ist. Beispielsweise wurde beschrieben, daß nach Bypass-Operationen transient eine verstärkte IGFBP-4-Proteolyse auftritt (Cwyfan-Hughes *et al.*, 1992). Auch wird bei Schwangerschaft IGFBP-4 vermehrt durch eine Disintegrin-Metalloprotease gespalten (Kübler *et al.*, 1998).

Allerdings konnte gezeigt werden, daß die IGFBP-4-Proteaseaktivität im Serum von Patienten mit Niereninsuffizienz *in vitro* eher derjenigen von nicht schwangeren als von schwangeren Frauen entspricht (T.Braulke, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß bei chronisch nierenkranken Personen keine erhöhte oder veränderte IGFBP-4-Proteaseaktivität auftritt.

4.3.2 Bindungseigenschaften der isolierten IGFBP-4-Fragmente

Weiterhin wurden die Bindungsaffinitäten der im Rahmen dieser Promotion isolierten IGFBP-4-Fragmente für IGF-I und -II bestimmt. Aufgrund der Isolierung sowohl eines N-terminalen als auch eines C-terminalen IGFBP-4-Fragments konnte dabei eine Aussage über die Bedeutung der beiden konservierten Domänen des IGFBP-4-Moleküls für die Bindung von IGF-I und -II getroffen werden.

Das verkürzte N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) zeigte mit den Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten $K_d = 24 \text{ nM}$ für IGF-I bzw. $K_d = 26 \text{ nM}$ für IGF-II noch eine deutliche Bindung beider IGFs. Die bestimmten Bindungskonstanten entsprachen dabei einer 5fachen bzw. einer 12fachen Abnahme der IGF-Bindungsaffinität bezogen auf das IGFBP-4-Gesamtmolekül.

Das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) war hingegen nur noch zu einer niedrigaffinen Bindung der beiden IGFs fähig. So wurde für die Bindung von IGF-I eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von $K_d = 164$ nM sowie für IGF-II von $K_d = 184$ nM erhalten.

Neben dem hier isolierten verkürzten Fragment aus der N-terminalen Domäne IGFBP-4 (4-122) konnte bereits das nicht verkürzte N-terminale Fragment IGFBP-4 (1-122) beschrieben werden (Ständker *et al.*, 2000). Dabei scheint die C-terminale Verkürzung um drei Aminosäuren keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des Fragments für IGF-I und -II zu haben, da die bestimmten Bindungsaffinitäten derjenigen des nicht verkürzten Fragments entsprachen (Ständker *et al.*, 2000).

Es konnte somit gezeigt werden, daß das N-terminale IGFBP-4-Fragment noch eine deutliche Bindung der IGFs besaß, wohingegen das C-terminale Fragment nur noch zu einer niedrigaffinen Bindung der IGFs fähig war. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die Hauptbindungsstelle für die IGFs im IGFBP-4-Molekül in der N-terminalen Domäne zu finden ist. Allerdings sind beide Domänen für die hochaffine Bindung der IGFs notwendig, da das N-terminale Fragment im Vergleich mit dem IGFBP-4-Gesamtmolekül eine verringerte Bindungsaffinität zu den IGFs zeigte.

Diese Ergebnisse stimmen gut mit dem bereits beschriebenen Bindungsverhalten verschiedener IGFBP-4-Fragmente überein. So konnte ein IGFBP-4-Fragment mit einer molaren Masse von 16 kDa isoliert werden, welches den N-Terminus sowie einen geringen Anteil der mittleren Region umfaßte (Cheung *et al.*, 1994). Auch dieses war zu einer spezifischen IGF-Bindung in der Lage, wobei das Fragment jedoch eine 20fach verringerte Affinität als das Gesamt-IGFBP-4-Molekül zeigte. Auch Qin *et al.* (1998) konnten zeigen, daß das N-terminale Fragment von IGFBP-4 noch eine deutliche IGF-Bindungsfähigkeit besaß, wohingegen für C-terminale Fragmente keine Bindung der IGFs detektiert werden konnte.

Durch die Einführung verschiedener Mutationen in das IGFBP-4-Molekül konnten weiterhin gezeigt werden, daß sowohl der Bereich Leu72-Ser91 in der N-terminalen Domäne als auch der Bereich Cys205-Val214 in der C-terminalen Domäne für die hochaffine Bindung der IGFs notwendig ist (Qin *et al.*, 1998). Während der Bereich in der N-terminalen Domäne dabei essentiell für die Bindung der IGFs ist, scheint die Aufgabe des C-terminalen Bereichs darin zu bestehen, die Bindung der IGFs zu fördern bzw. zu erleichtern. Ferner konnte

beschrieben werden, daß die mittlere Region nur einen geringen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des IGFBP-4-Moleküls besitzt (Qin *et al.*, 1998). So hatte eine Deletion der Bereiche Pro94-Glu119 sowie His121-Pro141 keine Auswirkung auf die IGF-Bindung von IGFBP-4.

4.4 Aufklärung der Disulfidverbrückung in den C-terminalen Domänen von IGFBP-2 und -4

Im Rahmen dieser Promotion konnten weiterhin die Disulfidbrückenmuster der isolierten C-terminalen Fragmente IGFBP-2 (167-279) und IGFBP-4 (136-237) aufgeklärt werden.

Für IGFBP-2 (167-279) konnte eine Verbrückung der Cysteinreste Cys191 und Cys225, Cys236 und Cys247 sowie Cys249 und Cys270 nachgewiesen werden. Im Fragment IGFBP-4 (136-237) waren die Cysteinreste Cys153 und Cys183, Cys194 und Cys205 sowie Cys207 und Cys228 über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Beide Fragmente besaßen somit eine Disulfidbrückenmuster nach dem Schema 1-2, 3-4 und 5-6.

Das hier beobachtete Verbrückungsmuster wurde ebenfalls für den C-Terminus von bovinem IGFBP-2 beschrieben (Forbes *et al.*, 1998). Die Ergebnisse lassen somit den Schluß zu, daß es sich bei der aufgeklärten Verbrückung der sechs konservierten Cysteine der C-terminalen Domäne um ein konserviertes Muster innerhalb der IGFBP's handelt.

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß alle sechs konservierten Cysteinreste innerhalb der C-terminalen Domäne verbrückt waren. Diese Beobachtung unterstützt die allgemeine Annahme, daß in den IGFBP-Molekülen keine Verbrückung der Cysteinreste zwischen den konservierten C- und N-terminalen Domänen sondern nur Disulfidbrücken innerhalb der jeweiligen konservierten Bereiche bestehen.

4.5 Mögliche Bedeutung der IGFBP's im Organismus

Eine bekannte Funktion der IGFBP's besteht in der Regulation der Bioverfügbarkeit der IGF's. Durch die hochaffine Bindung der IGF's an die IGFBP's wird die Verfügbarkeit an freien IGF's limitiert, die mit ihren Rezeptoren in Wechselwirkung treten und somit ihre biologische Wirkung entfalten können. Die Komplexbildung der IGF's durch die IGFBP's führt weiterhin zu einer deutlichen Erhöhung der Halbwertszeit der IGF's im Organismus. Auch sind die IGFBP's

dazu in der Lage, IGF-stimulierte Prozesse sowohl zu inhibieren als auch zu verstärken. Es wird ebenfalls angenommen, daß die IGF-BPs für eine spezifische Verteilung der IGFs in verschiedenen Körperflüssigkeiten /-kompartimenten sorgen. Weiterhin werden IGF-unabhängige Funktionen der einzelnen IGF-BPs im Organismus vermutet (Übersicht in: Rajaram *et al.*, 1997).

Insgesamt gibt es zahlreiche Hinweise, die auf eine wichtige Rolle der einzelnen IGF-BPs im Organismus hindeuten.

Zum einen kommt es zu einer zell- und gewebespezifischen Expression der IGF-BPs, die sich im Laufe unterschiedlicher Entwicklungs- und Differenzierungszustände verändert. Dazu zählt zum Beispiel das spezifische IGF-BP-Expressionsmuster bei der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten in Zellkultur (Birnbäum & Wiren, 1994).

Zum anderen tritt eine Veränderung der IGF-BP-Expression sowohl in Geweben als auch in der Zirkulation bei einigen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen auf (Rajaram *et al.*, 1997). So wird durch Fasten eine Erhöhung des Serumspiegels von IGF-BP-1 und -2 sowie eine Abnahme des IGF-BP-3-Serumspiegels hervorgerufen. Dieser Effekt läßt sich durch Nahrungsaufnahme wieder umkehren. Auch zeigt sich eine Korrelationen der Serumspiegel von IGF-BP-4 und -5 mit der Knochendichte in Personen mit einer Wachstumshormon-Defizienz (Thoren *et al.*, 1998).

Im dieser Arbeit wurden die Isolierung und Identifizierung natürlich vorkommender Fragmente von IGF-BP-2 und IGF-BP-4 beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, daß beide Bindeproteine durch Proteolyse unterschiedlich prozessiert werden. Die unterschiedliche proteolytische Prozessierung läßt dabei ebenfalls auf verschiedene biologische Funktionen der beiden IGF-BPs im Organismus schließen. Dabei wird IGF-BP-2 eine entscheidende Rolle im Gehirn zugewiesen, wohingegen IGF-BP-4 eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel zu spielen scheint.

4.5.1 Mögliche Funktion und Wirkung von IGF-BP-2

IGF-BP-2 wird eine besondere Rolle im Gehirn zugeschrieben. Dabei wird postuliert, daß es eine regulatorische Funktion sowohl im Wachstum als auch bei der Differenzierung des Zentralnervensystems (ZNS) besitzt. Eine mögliche physiologische Bedeutung von IGF-BP-2 im Gehirn wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß IGF-BP-2 nur in bestimmten

Regionen des ZNS gebildet wird (Tseng *et al.*, 1989). Weiterhin ist es zusammen mit IGFBP-6 das dominierende IGFBP in der Zerebrospinalflüssigkeit (cerebrospinal fluid, CSF) (Ocrant *et al.*, 1990). Die CSF enthält ebenfalls hohe Konzentrationen an IGF-II. In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, daß IGFBP-2 eine höhere Affinität für IGF-II als für IGF-I aufweist (Roghani *et al.*, 1991). Ein weiterer Hinweis auf eine Funktion von IGFBP-2 im ZNS ist darin zu sehen, daß verschiedene Krankheitszustände mit einer Veränderung der IGFBP-2-Konzentration in der CSF korrelieren. So weisen beispielsweise Patienten mit Gehirntumoren erhöhte IGFBP-2-Spiegel in der CSF auf (Müller *et al.*, 1994).

Es wird angenommen, daß IGFBP-2 lokal von Gliazellen und Neuronen exprimiert wird und in speziellen Regionen des Gehirns die biologische Aktivität der IGFs moduliert. Als Wirkungsmechanismus wird dabei postuliert, daß IGFBP-2 die IGFs zunächst zu ihren Rezeptoren transportiert und anschließend in direkter Nachbarschaft des IGF1R als Speicher für die IGFs fungiert (Russo *et al.*, 1997). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß IGFBP-2 dazu in der Lage ist, im Gehirn mit Proteoglykanen der Zelloberfläche zu assoziieren (Russo *et al.*, 1997). Die Bindung an die Zelloberfläche erfolgt dabei in Kolokalisation mit Bereichen, die sowohl eine hohe IGF-I- als auch eine hohe IGF1R-Expression aufweisen. Da die Assoziation mit der Zelloberfläche eine ca. 3fache Abnahme der IGF-Bindungsaffinität zur Folge hat, wird vermutet, daß so niedrig affine Bindungsstellen der IGFs in der Nähe ihrer Rezeptoren entstehen. Neuere Untersuchungen mit Hilfe der Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-MC haben gezeigt, daß in dieser Zelllinie eine IGFBP-2-Protease induziert wird, die sowohl Zell-assoziierte als auch in Lösung vorliegende IGFBP-2/IGF-Komplexe spalten kann (Russo *et al.*, 1999). Ein Komplex aus einem IGFBP-2-Fragment mit einer Größe von 14 kDa und IGF ist anschließend immer noch zur Bindung an die Zelloberfläche befähigt. Allerdings ist die IGF-Bindungsaffinität des Fragments deutlich verringert. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, daß die Membran-assoziierten IGFBP-2/IGF-Komplexe zur Aufgabe haben, die IGFs in direkter Nachbarschaft zu dem IGF1R zu speichern und bei Bedarf freizusetzen. Die Freisetzung könnte dabei zum einen langsam durch die verringerte Affinität vom Membran-gebundenem IGFBP-2 zu den IGFs erfolgen. Zum anderen könnte die Freisetzung der IGFs durch spezifische Proteolyse an der Zellmembran erfolgen. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Proteolyse von IGFBP-2 in Neuroblastoma-Zellen durch verschiedene lokale Wachstumsfaktoren reguliert wird. Dazu zählen TGF β 1 und Retinsäure (Menouny *et al.*, 1997) sowie bFGF (Russo *et al.*, 1999).

In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, daß im Rahmen dieser Promotion C-terminale Fragmente von IGFBP-2 aufgereinigt wurden, die ebenfalls noch zu einer Bindung der IGFs befähigt waren. Diese enthielten sowohl die potentielle Heparin-Bindungsstelle PKKLRP als auch ein RDG-Epitop. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß die isolierten IGFBP-2-Fragmente weiterhin zu einer Bindung von Zelloberflächenmolekülen befähigt sein könnten, was wiederum auf interessante biologische Eigenschaften der Fragmente hinweisen würde. Weiterführende Untersuchungen sollten sich somit mit der Fähigkeit zur Zellbindung sowie möglichen intrinsischen Funktionen der Fragmente befassen.

4.5.2 Mögliche Funktion und Wirkung von IGFBP-4

Für IGFBP-4 konnten bislang hauptsächlich inhibitorische Wirkungen gezeigt werden. So wurde *in vitro* eine Inhibition der IGF-vermittelten mitogenen Effekte bei Fibroblasten (Conover *et al.*, 1995), neuronalen Zellen (Cheung *et al.*, 1994), Kolon-Karzinomazellen (Culouscou & Shayab, 1991) und Osteoblasten (Mohan *et al.*, 1989; Mohan *et al.*, 1995) beobachtet.

Dabei wird ein IGF-abhängiger Mechanismus postuliert, bei dem das intakte IGFBP-4-Molekül die IGFs mit hoher Affinität bindet und dadurch die Wechselwirkung der IGFs mit dem IGF1R verhindert. Diese Theorie wird durch die Beobachtung unterstützt, daß eine Korrelation zwischen IGF-Bindungsaffinität und inhibitorischer Potenz von IGFBP-4 besteht (Qin *et al.*, 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß bei der Verwendung von IGF-Analoga mit verringerter IGFBP-4-Bindungsaffinität die IGF-induzierte Zellproliferation nicht inhibiert werden konnte (Mohan *et al.*, 1995).

Die inhibitorischen Effekte von IGFBP-4 werden dabei sowohl durch Veränderungen der IGFBP-4-Expression als auch durch die Bildung von spezifischen IGFBP-4-Proteasen reguliert. So führt die Applikation von TGF β in Kulturen von Knochenzellen nicht nur zu einer Verstärkung der IGF-II-induzierten IGFBP-4-Proteolyse, sondern auch zu einer verringerten Bildung von IGFBP-4 auf Transkriptionsebene (Durham *et al.*, 1994). In Zellkulturen kann die IGFBP-4-Proteolyse weiterhin durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. So stimulieren die IGFs selbst die proteolytische Spaltung von IGFBP-4 in Kulturen von Fibroblasten (Conover *et al.*, 1995) und von Knochenzellen (Durham *et al.*, 1994). Auch konnte gezeigt werden, daß Glukokortikoide eine verstärkte IGFBP-4-Proteolyse in der neuronalen Zelllinie B104 bewirken (Cheung *et al.*, 1994).

Eine besondere Rolle scheint IGFBP-4 im Knochenstoffwechsel zu spielen. Zum einen ist IGFBP-4 in der Lage, die osteoblastäre Zellproliferation *in vitro* zu inhibieren. Weiterhin ist die Bildung von IGFBP-4 durch Stimulatoren und Inhibitoren der Osteoblasten-Proliferation reguliert. Dabei bewirken Inhibitoren der Osteoblasten-Proliferation wie cAMP und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ eine Erhöhung der IGFBP-4-Spiegel (LaTour *et al.*, 1990; Scharla *et al.*, 1993). Hingegen konnte gezeigt werden, daß Stimulatoren wie BMP-7 und TGF β die Konzentration an IGFBP-4 im konditionierten Medium senken (Durham *et al.*, 1994; Knutsen *et al.*, 1995). Auch *in vivo* konnte eine Korrelation zwischen dem IGFBP-4-Serumspiegel und dem Typ II der Osteoporose (Rosen *et al.*, 1994; Rajaram *et al.*, 1997) beobachtet werden.

Kürzlich konnte *in vivo* auch eine Verstärkung der IGF-vermittelten Wirkung von IGFBP-4 gezeigt werden (Miyakoshi *et al.*, 2001). Dabei konnte gezeigt werden, daß die systemische Applikation von IGFBP-4 eine Erhöhung von Markern der Knochenbildung bewirkte. Diese resultierte aus einer Erhöhung der IGF-Bioverfügbarkeit in der Zirkulation durch einen Protease-abhängigen Mechanismus.

Inwiefern die in dieser Arbeit beschriebenen Fragmente eine Rolle in der Regulation der IGF-vermittelten Wirkung spielen, ist jedoch fraglich. Allerdings kann die Isolierung natürlich vorkommender Fragmente zur Identifizierung der involvierten Proteasen beitragen. Da sowohl die inhibitorische als auch die stimulatorische Modulation der IGF-vermittelten Wirkung durch IGFBP-4 generell über Proteolyse reguliert zu sein scheint, kommt der Aufklärung der verantwortlichen Proteasen eine große Bedeutung zu.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden natürlich vorkommende Fragmente der Bindeproteine IGFBP-2 und – 4 aus humanem Hämofiltrat isoliert und anschließend biochemisch sowie funktionell charakterisiert. Die Isolierung der Fragmente erfolgte durch aufeinanderfolgende chromatographische Schritte anhand ihrer Immunreaktivität, ihrer Molekularmassen sowie ihrer IGF-I-Bindungsfähigkeit.

Im Rahmen des Screenings nach IGFBP-2-Fragmenten konnten mehrere Fragmente aus der C-terminalen Region von IGFBP-2 aufgereinigt werden. Weiterhin konnte ein Fragment identifiziert werden, welches sowohl die nicht konservierte mittlere als auch die konservierte C-terminale Domäne umfaßte. Die ermittelten Spaltstellen im IGFBP-2-Molekül ließen darauf schließen, daß die proteolytische Prozessierung im Plasma durch Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Proteasen erfolgt. Die Untersuchung der Bindungsaffinitäten der IGFBP-2-Fragmente zeigte ferner, daß die IGF-Bindung aller Fragmente verglichen mit dem Gesamtmolekül rhIGFBP-2 deutlich verringert war. Während alle weiteren isolierten Fragmente nur eine geringe Bindungsaffinität für IGF-II im Bereich von $K_d = 130-200$ nM besaßen, zeigte das Fragment IGFBP-2 (167-279) eine signifikante IGF-II-Bindung mit einer Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 43$ nM. Im Gegensatz dazu besaß es nur eine niedrigaffine Bindung von IGF-I ($K_d = 495$ nM). Interessanterweise konnte ein Fragment mit einer um nur 17 Da differierenden Masse aufgereinigt werden, welches N-terminal ebenfalls mit der Aminosäure Gly167 begann. Dieses Fragment zeigte im Vergleich zu dem Fragment IGFBP-2 (167-279) eine erhöhte IGF-I-Bindungsfähigkeit ($K_d = 120$ nM), wohingegen die Bindungsaffinität zu IGF-II deutlich verringert war ($K_d = 141$ nM). Insgesamt lassen die Untersuchungen den Schluß zu, daß kleine Veränderungen in der Fragmentlänge oder geringfügige Mutationen bzw. Modifikationen einen großen Einfluß auf die IGF-Bindungsaffinität der IGFBP-2-Fragmente besitzen.

In Bezug auf IGFBP-4 konnte sowohl ein N-terminales Fragment IGFBP-4 (4-122) als auch ein C-terminales Fragment IGFBP-4 (136-237) isoliert und charakterisiert werden. Die Spaltstellen im humanen IGFBP-4-Molekül deuteten daraufhin, daß die proteolytische Prozessierung durch eine Chymotrypsin-ähnliche Protease und durch Kallikrein erfolgen könnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich die Hauptbindungsstelle für die IGFs in

der N-terminalen Domäne befindet. Während das verkürzte N-terminale Fragment IGFBP-4 (4-122) mit Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von $K_d = 24$ nM für IGF-I sowie $K_d = 26$ nM für IGF-II noch eine deutliche IGF-Bindungsaffinität besaß, war das C-terminale Fragment IGFBP-4 (136-237) nur noch zu einer niedrigaffinen Bindung der IGFs fähig ($K_d = 164$ nM für IGF-I; $K_d = 184$ nM für IGF-II).

Darüberhinaus konnte die Disulfidverbrückung innerhalb der C-terminalen Domänen von IGFBP-2 und IGFBP-4 aufgeklärt werden. Die sechs konservierten Cysteinreste zeigten in beiden Peptiden eine Verbrückung nach dem Muster 1-2, 3-4 und 5-6.

6 Literaturverzeichnis

- Abrass, C.K., Berfield, A.K., Address, D.L. (1997) Heparin binding domain of insulin-like growth factor binding protein-5 stimulates mesangial cell migration. *Am. J. Physiol.* 273, F899-F906.
- Address, D.L. & Birnbaum, R.S. (1992) Human Osteoblast-derived Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF actions. *J. Biol. Chem.* 267, 22467-22472.
- Address, 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.
- Bar, R.S., Clemmons, D.R., Boes, M., Busby, W.H., Booth, B.A., Dake, B.L., Sandra, A. (1990) Transcapillary permeability and subendothelial distribution of endothelial and amniotic fluid insulin-like growth factor binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 127, 1078-1086.
- Bautista, C.M., Baylink, D.J., Mohan, S. (1991) Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: A potential candidate for fixing IGF-II in human bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 213-218.
- Baxter, R.C. (1995) Insulin-like growth factor binding proteins as glucoregulators. *Metabolism* 44, 12-17.
- Baxter, R.C. (2000) Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278, E967-976.
- Birnbaum, R.S. & Wiren, K.M. (1994) Changes in insulin-like growth factor-binding protein expression and secretion during the proliferation, differentiation, and mineralization of primary cultures of rat osteoblasts. *Endocrinology* 135, 223-230.
- Byun, D., Mohan, S., Kim, C., Suh, K., Yoo, M., Lee, H., Baylink, D.J., Qin, X. (2000) Studies on human pregnancy-induced insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteases in serum: Determination of IGF-II dependency and localization of cleavage site. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 373-381.
- Carr, J.M., Grant, P.A., Francis, G.L., Owens, J.A., Wallace, J.C., Walton, P.E. (1994) Isolation and characterization of ovine IGFBP-4: protein purification and cDNA sequence. *J. Mol. Endocrinol.* 13, 219-236.
- Carrick, F.E., Forbes, B.E., Wallace, J.C. (2001) BIAcore analysis of bovine Insulin-like growth factor binding protein-2 (bIGFBP-2) identifies major IGF binding site determinants in both the amino- and carboxy-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 276, 27120-27128.
- Ceda, G.P., Fiedler, P.J., Henzel, W.J., Louie, A., Donovan, S.M., Hoffmann, A.R., Rosenfeld, R.G. (1991) Differential effects of Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II on the expression of IGF binding proteins (IGFBPs) in a rat neuroblastoma cell line: isolation and characterization of two forms of IGFBP-4. *Endocrinology*, 128, 2815-2824.

- Chernausek, S.D., Smith, C.E., Duffin, K.L., Busby, W.H., Wright, G., Clemmons, D.R. (1995) Proteolytic cleavage of insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP-4). Localization of cleavage site to non-homologous region of native IGFBP-4. *J. Biol. Chem.* 270, 11377-11382.
- Cheung, P.T., Smith, E.P., Shimasaki, S., Ling, N., Chernausek, S.D. (1991) Characterization of an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-4) produced by the B104 rat neuronal cell line: chemical and biological properties and differential synthesis by sublines. *Endocrinology* 129, 1006-1015.
- Cheung, P.T., Wu, J., Banach, W., Chernausek, S.D. (1994) Glucocorticoid regulation of an insulin-like growth factor-binding protein-4 protease produced by a rat neuronal cell line. *Endocrinology* 135, 1328-1335.
- Claussen, M., Kübler, B., Wendland, M., Neifer, K., Schmidt, B., Zapf, J., Bräulke, T. (1997) Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by Cathepsin D. *Endocrinology* 138, 3797-3803.
- Clements, J.A. (1989) The glandular kallikrein family of enzymes: Tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endocr. Rev.* 10, 393-419.
- Clemmons, D.R. (1989) Structural and functional analysis of insulin-like growth factors. *British Medical Bulletin* 45, 465-480.
- Clemmons, D.R. (1998) Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140, 19-24.
- Cohen, P., Peehl, D.M., Graves, H.C.B., Rosenfeld, R.G. (1994) Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. *J. Endocrinol.* 142, 407-415.
- 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. (1991) Glycosylation of Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) is not required for potentiation of IGF-I action: Evidence for processing of cell-bound IGFBP-3. *Endocrinology* 129, 3259-3268.
- Conover, C.A. & De Leon, D.D. (1994) Acid-activated insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis in normal and transformed cells. *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.

- 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.
- Culouscou, J.M. & Shayab, M. (1991) Purification of a colon cancer cell growth inhibitor and its identification as an insulin-like growth factor binding protein. *Cancer Res.* 51, 2813-2819.
- Cwyfan-Hughes, S.C., Cotterill, A.M., Molloy, A.R., Cassell, T.B., Braude, N., Hinds, C.J., Wass, J.A.H., Holly, J.M.P. (1992) The induction of specific proteases for insulin-like growth factor-binding proteins following major heart surgery. *J. Endocrinol.* 135, 135-145.
- 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.
- Debroy, M.A., Wolf, S.E., Zhang, X.J., Chinkes, D.L., Ferrando, A.A., Wolfe, R.R., Herndon, D.N. (1999) Anabolic effects of insulin-like growth factor in combination with insulin-like growth factor binding protein-3 in severely burned adults. *J. Trauma* 47, 904-910.
- Devi, G.R., Yang, D.-H., Rosenfeld, R.G., Oh, Y. (2000) Differential effects of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 and its proteolytic fragments on ligand binding, cell surface association, and IGF-I receptor signaling. *Endocrinology* 141, 4171-4179.
- Durham, S.K., Riggs, B.L., Conover, C.A. (1994b) The insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4)-IGFBP-4 protease system in normal human osteoblast-like cells: Regulation by transforming growth factor- β . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1752-1758.
- Durham, S.K., Mohan, S., Liu, F., Baker, B.K., Lee, P.D.K., Hintz, R.L., Conover, C.A., Powell, D.R. (1997) Bioactivity of a 29-kilodalton insulin-like growth factor binding protein-3 fragment present in excess in chronic renal failure serum. *Pediatr. Res.* 42, 335-341.
- Elmlinger, M.W., Grund, R., Buck, M., Wollmann, H.A., Feist, N., Weber, M.M., Speer, C.P., Ranke, M.B. (1999) Limited proteolysis of the IGF binding protein-2 (IGFBP-2) by a specific serine protease activity in early breast milk. *Pediatr. Res.* 46, 76-81.
- Firth, S.M. & Baxter, R.C. (1995) The role of glycosylation in the action of IGFBP-3. *Prog. Growth Factor Res.* 6, 223-229.
- 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.
- Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., Meyer, M., Adermann, K., Forssmann, K., Hock, D., Aoki, A. (1993) Characterization of natural posttranslationally processed peptides from human blood: A new tool in the systematic investigation of native peptides. *In: Peptide Chemistry* (Yanaihara, N.ed.) 553-556, ESCOM, Leiden.
- Forssman, W.G. (1996) Prinzipien der Informationsausbreitung und Signalübertragung im endokrinen System durch peptiderge Regulatorsubstanzen. *Nova Acta Leopoldina NF* 294, 103-122.

- Folkes, 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.
- Folkes, J.L., Thraillkill, K.M., Serra, D.M., Suzuki, K., Nagase, H. (1995) Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases. *Prog. Growth Factor Res.* 6, 255-263.
- Fowlkes, J.L., Serra, D.M., Rosenberg, C.K., Thraillkill, K.M. (1995) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) functions as an IGF-reversible inhibitor of IGFBP-4 proteolysis. *J. Biol. Chem.* 270, 27481-27488.
- Fowlkes, J.L., Thraillkill, K.M., George-Nascimento, C., Rosenberg, C.K., Serra, D.M. (1997) Heparin-binding, highly basic regions within the thyroglobulin type-1 repeat of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBPs) -3, -5, and -6 inhibit IGFBP-4 degradation. *Endocrinology* 138, 2280-2285.
- Guler, H.P., Zapf, J., Schmid, C., Froesch, E.R. (1989) Insulin-like growth factors I and II in healthy man. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 121, 753-758.
- Hashimoto, R., Ono, O., Fujiwara, H., Higashihashi, N., Yoshida, M., Enjoh-Kimura, T., Sakano, K. (1997) Binding sites and binding properties of binary and ternary complexes of insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3, and acid-labile subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 27936-27942.
- Hayden, J.M., Mohan, S., Baylink, D.J. (1995) The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 17, 93S-98S.
- Ho, P.J. & Baxter, R.C. (1997) Characterization of truncated insulin-like growth factor-binding protein-2 in human milk. *Endocrinology* 138, 3811-818.
- 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.
- Hobba, G.D., Löthgren, A., Holmberg, E., Forbes, B.E., Francis, G.L., Wallace, J.C. (1998) Alanine screening mutagenesis establishes tyrosine 60 of bovine Insulin-like growth factor binding protein-2 as a determinant of Insulin-like growth factor binding. *J. Biol. Chem.* 273, 19691-19698.
- Horney, M.J., Evangelista, C.A., Rosenzweig, S.A. (2001) Synthesis and characterization of insulin-like growth factor (IGF)-1 photoprobes selective for the IGF-binding proteins (IGFBPs). *J. Biol. Chem.* 276, 2880-2889.
- Humbel, R.E. (1990) Insulin-like growth factor I and II. *Eur. J. Biochem.* 190, 445-462.
- Hwa, V., Oh, Y., Rosenfeld, R.G. (1999) The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 20, 761-787.

- Imai, Y., Busby, W.H., Smith, C.E., Clarke, J.B., Garmong, A.J., Horwitz, G.D., Rees, C., Clemmons, D.R. (1997) Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells. *J. clin. Invest.* 100, 2596-2605.
- Jones, J.I., D'Ercole, A.J., Camacho-Hübner, C., Clemmons, D.R. (1991) Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and *in vivo*: Effects on affinity for IGF-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7481-7485.
- Jones, J.I., Gockerman, A., Busby, W.H., Wright, G., Clemmons, D.R. (1993) Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the $\alpha 5 \beta 1$ integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10553-10557.
- Jones, J.I. & Clemmons, D.R. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16, 3-34.
- Kalus, W., Zweckstetter, M., Renner, C., Sanchez, Y., Georgescu, J., Grol, M., Demuth, D., Schumacher, R., Dony, C., Lang, K., Holak, T.A. (1998) Structure of the IGF-binding domain of the insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): Implications for IGF and IGF-I receptor interactions. *EMBO J.* 17, 6558-6572.
- Kiess, W., Blickenstaff, G.D., Sklar, M.M., Thomas, C.L., Nissley, S.P., Sahagian, G.G. (1988) Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 9339-9344.
- Knutsen, R., Honda, Y., Strong, D.D., Sampath, T.K., Baylink, D.J., Mohan, S. (1995) Regulation of insulin-like growth factor system components by osteogenic protein-1 in human bone cells. *Endocrinology* 136, 857-865.
- Kübler, B., Cowell, S., Zapf, J., Bräulke, T. (1998) Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins by a novel 50-kilodalton metalloproteinase in human pregnancy serum. *Endocrinology* 139, 1556-1563.
- Lalou, C., Lassarre, C., Binoux, M. (1996) A proteolytic fragment of Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 that fails to bind IGFs inhibits the mitogenic effects of IGF-I and Insulin. *Endocrinology* 137, 3206-3212.
- LaTour, D., Mohan, S., Linkhart, T.A., Baylink, D.J., Strong, D.D. (1990) Inhibitory insulin-like growth factor-binding protein: cloning, complete sequence, and physiological regulation. *Mol. Endocrinol.* 4, 1806-1814.
- Lawrence, J.B., Oxvig, C., Overgaard, M.T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G.J., Hays, L.G., Yates, J.R., Conover, C.A. (1999) The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasmin protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3149-3153.
- Leal, S.M., Liu, Q., Huang, S.S., Huang, J.S. (1997) The type V transforming growth factor β receptor is the putative Insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 20572-20576.

- Mark, S. (1998) Isolierung und Charakterisierung von Bindeproteinen der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Hannover.
- Mark, S., Forssmann, W.-G., Ständker, L. (1999) Strategy for identifying circulating fragments of insulin-like growth factor binding proteins in a hemofiltrate peptide bank. *J. Chrom. A* 852, 197-205.
- McCusker, R.H., Busby, W.H., Dehoff, M.H., Camacho-Hübner, C., Clemmons, D.R. (1991) Insulin-like growth factor (IGF) binding to cell monolayers is directly modulated by the addition of IGF-binding proteins. *Endocrinology* 129, 939-949.
- 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- β and retinoic acid. *Endocrinology* 138, 683-690.
- Miyakoshi, N., Qin, X., Kasukawa, Y., Richman, C., Srivastava, A.K., Baylink, D.J., Mohan, S. (2001) Systemic administration of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) increase bone formation parameters in mice by increasing IGF bioavailability via an IGFBP-4 protease-dependent mechanism. *Endocrinology* 142, 2641-2648.
- Mohan, S., Bautista, C.M., Wergedal, J., Baylink, D.J. (1989) Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: a potential local regulator of IGF action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8338-8342.
- 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.
- Mohensi-Zadeh, S. & Binoux M. (1997) The 16-kDa proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the mitogenic action of fibroblast growth factor on mouse fibroblasts with a targeted disruption of the type 1 IGF receptor gene. *Endocrinology* 138, 3069-3072.
- Mottola, C., MacDonald, R.G., Brackett, J.L., Mole, J.E., Anderson, J.K., Czech, M.B. (1986) Purification and amino-terminal sequence of an insulin-like growth factor binding protein secreted by rat liver BRL-3A cells. *J. Biol. Chem.* 261, 11180-11188.
- Müller, H.L., Oh, Y., Lehrnbecher, T., Blum, W.F., Rosenfeld, R.G. (1994) 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.
- Murphy, L.J., Bell, G.I., Friesen, H.G. (1987) Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120, 1279-1282.
- Nissley, S.P. & Rechler, M.M. (1984) Somatomedin/insulin-like growth factor tissue receptors. *Clin. Endocrinol. Metab.* 13, 43-67.
- Ocran, I., Fay, C.T., Parmelee, J.T. (1990) Characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced in the rat central nervous system. *Endocrinology* 127, 1260-1267.

- Oh, Y., Müller, H.L., Ng, L., Rosenfeld, R.G. (1995) Transforming growth factor- β -induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J. Biol. Chem.* 270, 13589-13592.
- Powell, D.R., Liu, F., Baker, B.K., Hintz, R.L., Durham, S.K., Brewer, E.D., Frane, J.W., Tönshoff, B., Mehls, O., Wingen, A.M., Watkins, S.L., Hogg, R.J., Lee, P.D.K. (1997) Insulin-like growth factor-binding protein-6 levels are elevated in serum of children with chronic renal failure: A report of the Southwest pediatric nephrology study group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1978-1984.
- Qin, X., Strong, D.D., Baylink, D.J., Mohan, S. (1998) Structure-function analysis of the human insulin-like growth factor binding protein-4. *J. Biol. Chem.* 273, 23509-23516.
- Rajaram, S., Baylink, D.J., Mohan, S. (1997) Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr. Rev.* 18, 801-831.
- Rechler, M.M. & Clemmons, D.R. (1998) Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins. *TEM* 9, 176-183.
- Resnick, C.E., Fiedler, P.J., Rosenfeld, R.G., Adashi, E.Y. (1998) Characterization and hormonal regulation of a rat ovarian insulin-like growth factor binding protein-5 endopeptidase: An FSH-inducible granulosa cell-derived metalloprotease. *Endocrinology* 139, 1249-1257.
- Richman, C., Baylink, D.J., Lang, K., Dony, C., Mohan, S. (1999) Recombinant human Insulin-like growth factor-binding protein-5 stimulates bone formation parameters *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, 140, 4699-4705.
- Roghani, M., Lassarre, C., Zapf, J., Povoas, G., Binoux, M. (1991) Two insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins are responsible for the selective affinity for IGF-II of cerebrospinal fluid binding proteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 658-666.
- Rosen, C.J., Donahue, L.R., Hunter, S.J. (1994) Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206, 83-102.
- 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.
- Scharla, S.H., Strong, D.D., Rosen, C., Mohan, S., Holick, M., Baylink, D.J., Linkhart, T.A. (1993) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases secretion of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) by human osteoblast-like cells *in vitro* and elevates IGFBP-4 serum levels *in vivo*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1190-1197.
- 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.

- Schedlich, L.J., Le Page, S.L., Firth, S.M., Briggs, L.J., Jans, D.A., Baxter, R.C. (2000) Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin β subunit. *J. Biol. Chem.* 275, 23462-23470.
- Schepky, A.G., Bensch, K.W., Schulz-Knappe, P., Forssmann, W.-G. (1994) Human hemofiltrate as a source of circulating bioactive peptides: Determination of amino acids, peptides and proteins. *Biomed. Chromatogr.* 8, 90-94.
- Schulz-Knappe, P., Raida, M., Meyer, M., Quellhorst, E.A., Forssmann, W.G. (1996) Systematic isolation of circulating human peptides: The concept of peptide trapping. *Eur. J. Med. Res.* 1, 223-226.
- Schulz-Knappe, P., Schrader, M., Ständker, L., Richter, R., Hess, R., Jürgens, M., Forssmann, W.-G. (1997) Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J. Chrom. A* 776, 125-132.
- Shimasaki, S., Ling, N. (1991) Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1,-2,-3,-4,-5, and -6). *Prog. Growth Factor Res.* 3, 243-266.
- Shimonaka, M., Schroder, R., Shimasakai, S., Ling, N. (1989) Identification of a novel binding protein for insulin-like growth factors in adult serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 1890-1895.
- Spencer, E.M. & Chan, K. (1995) A 3-dimensional model for the insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs); Supporting evidence using the structural determinants of the IGF binding site on IGFBP-3. *Prog. Growth Factor Res.* 6, 209-214.
- Ständker, L., Wobst, P., Mark, S., Forssmann, W.G. (1998) Isolation and characterization of circulating 13-kDa C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-5. *FEBS Lett.* 441, 281-286.
- Ständker, L., Bräulke, T., Mark, S., Mostafavi, H., Meyer, M., Höning, S., Giménez-Gallego, G., Forssman, W.G. (2000) Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and the disulfide bonding pattern of the C-terminal IGFBP-4 domain. *Biochemistry* 39, 5082-5088.
- Steele-Perkins, G., Turner, J., Edman, J.C., Hari, J., Pierce, S.B., Stover, C., Rutter, W.J., Roth, R.A. (1988) Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 11486-11492.
- Thoren, M., Hilding, A., Brismar, T., Magnusson, P., Degerblad, M., Larsson, L., Säaf, M., Baylink, D.J., Mohan, S. (1998) Serum levels of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP)-4 and -5 correlate with bone mineral density in growth hormone (GH)-deficient adults and increase with GH replacement therapy. *J. Bone Miner. Res.* 13, 891-899.
- Thraillkill, K.M., Quarles, L.D., Nagase, H., Suzuki, K., Serra, D.M., Fowlkes, J.L. (1995) Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology* 136, 3527-3533.

- Tseng, L.Y., Brown, A.L., Yang, Y.W., Romanus, J.A., Orłowski, C.C., Taylor, T., Rechler, M.M. (1989) The fetal rat binding protein for insulin-like growth factor is expressed in the choroid plexus and cerebrospinal fluid of adult rats. *Mol. Endocrinol.* 3, 1559-1568.
- Twigg, S.M. & Baxter, R.C. (1998) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 6074-6079.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., Jacobs, S., Francke, U., Ramachandran, J., Fujita-Yamaguchi, Y. (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 5, 2503-2512.
- Valentinis, B., Bhala, A., DeAngelis, T., Baserga, R., Cohen, P. (1995) The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 9, 361-367.
- Wang, J.F., Hampton, B., Mehlman, T., Burgess, W.H., Rechler, M.M. (1988) Isolation of a biologically active fragment from the carboxy terminus of the fetal rat binding protein for insulin-like growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 718-726.
- Yamamoto, H. & Murphy, L.J. (1995) Enzymatic conversion of IGF-I to des(1-3)IGF-I in rat serum and tissues: A further potential site of growth hormone regulation of IGF-I action. *J. Endocrinol.* 146, 141-148.
- Yamanaka, Y., Fowlkes, J.L., Wilson, E.M., Rosenfeld, R.G., Oh, Y. (1999) Characterization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) binding to human breast cancer cells: Kinetics of IGFBP-3 binding and identification of receptor binding domain on the IGFBP-3 molecule. *Endocrinology* 140, 1319-1328.
- Zapf, J. (1995) Physiological role of the insulin-like growth factor binding proteins. *Eur. J. Endocrinol.* 132, 645-654.

Abkürzungsverzeichnis

ALS	“acid-labile subunit” (säurelabile Untereinheit)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASA	Aminosäureanalyse
B	spezifische Bindung
B ₀	maximale spezifische Bindung
BCIP	Bromochloroindolylphosphat
bFGF	“basic fibroblast growth factor”
BMP	“bone morphogenic protein”
BSA	“bovine serum albumin” (Rinderserumalbumin)
C-	Carboxy-
CHO	“chinese hamster ovary”
CSF	“cerebrospinal liquid” (Zerebrospinalflüssigkeit)
D	Deutschland
Da	Dalton
DNA	“deoxyribonucleic acid” (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme-linked immunosorbant assay” (Enzymgebundener Immunoassay)
ESI	„electrospray ionization“ (Elektorspray Ionisation)
Fr	Fraktion
g	Erdbeschleunigung
GH	„growth hormone“ (Wachstumshormon)
HPLC	„high performance liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssig-Chromatographie)
HRP	„horse-radish peroxidase“ (Meerrettich-Peroxidase)
IGF	„insulin-like growth factor“ (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IGF1R	„insulin-like growth factor-type 1-receptor“ (IGF-Typ-I-Rezeptor)
IGFBP	„insulin-like growth factor binding proteins“ (IGF-Bindeprotein)
IGFBP-rP	„insulin-like growth factor binding proteins-related protein“ (IGFBP-verwandtes Protein)
IPF	Institut für Peptid-Forschung
K	Kontrolle
k _a	Assoziations-Zeitkonstante

k_d	Dissoziations-Zeitkonstante
K_d	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
MALDI-TOF-MS	„Matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight - MS“ (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-MS)
MMP	Matrix-Metalloprotease
MS	„mass spectrometry“ (Massenspektrometrie)
Mw	„molecular weight“ (Molekulargewicht)
m/z	Masse pro Ladung
N-	Amino-
NBT	Nitrobluetetrazolium-Salz
NICTH	„non-islet cell tumor hypocychemia“
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Probenauftragspuffer
PAPP-A	“pregnancy-associated plasma protein-A” (Schwangerschafts-assoziiertes Plasmaprotein A)
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglycol
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rh	“recombinant human” (rekombinant human)
RP	“reversed-phase” (Umkehrphase)
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST	Molekulargewichtsstandard
TBS	“Tris-buffered saline” (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS mit TritonX100
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF β	“transforming growth factor beta”
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
ZNS	Zentralnervensystem

Zur Abkürzung von Aminosäuren wurde sowohl die Einbuchstaben- als auch die Dreibuchstaben-Nomenklatur verwendet

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Silke Mark

Hannover, 14.01.02

Danksagung

Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann möchte ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen sowie für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in den Forschungslaboren der IPF PharmaCeuticals GmbH anfertigen zu können.

Für die Übernahme des Referates möchte ich Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover recht herzlich danken.

Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. Bernd Otto vom Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover, für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Weiterhin möchte ich Dr. Ludger Ständker für die Betreuung sowie für die Unterstützung während dieser Arbeit danken.

Allen Mitarbeitern der Abteilungen Funktionsanalyse und Präparative Peptidchemie möchte ich für die stets freundliche und kollegiale Zusammenarbeit danken. Mein besondere Dank gilt dabei Frau Ute Block für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihre freundliche Unterstützung im Laboralltag.

Der Abteilung von Dr. Harald John, insbesondere Frau Stefanie Schulz sowie Frau Jutta Barras-Akhnoukh, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft sowie für die Erstellung zahlreicher Analysen.

Weiterhin möchte ich meinen Eltern dafür danken, mich während der gesamten Studien- und Promotionszeit unterstützt und mir das Studium ermöglicht zu haben.

Publikationsliste

Zeitschriftenartikel:

Ständker, L., Wobst, P., Mark, S., Forssmann, W.G. (1998) Isolation and characterization of circulating 13-kDa C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-5. *FEBS Lett.* 441, 281-286.

Seiler, P., Ständker, L., Mark, S., Hahn, W., Forssmann, W.G., Meyer, M. (1999) Application of a peptide bank from porcine brain in isolation of regulatory peptides. *J Chromatogr A.* 852, 273-283.

Mark, S., Forssmann, W.G., Ständker, L. (1999) Strategy for identifying circulating fragments of insulin-like growth factor binding proteins in a hemofiltrate peptide bank. *J Chromatogr A.* 852, 197-205.

Ständker, L., Braulke, T., Mark, S., Mostafavi, H., Meyer, M., Höning, S., Gimenez-Gallego, G., Forssmann, W.G., (2000) Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and disulfide bonding pattern of the C-terminal IGFBP-4 domain. *Biochemistry* 39, 5082-5088.

Mark, S., Obendorf, M., Reiter, R., Braulke, T., Kübler, B., Forssmann, W.G., Ständker, L. (2002) Characterization of a stable plasma-complex comprising IGF-II and the C-terminal domain of insulin-like growth factor binding protein-2. *In Vorbereitung.*

Abstracta und Posterbeiträge:

Ludger Ständker, Philip Wobst, Silke Mark, Wolf-Georg Forssmann. Strategy to identify new fragments of Insulin-like growth factor binding proteins from the peptide bank of circulating human peptides, 18th International Symposium on Separation of Proteins, Peptides & Polynucleotides, Vienna, Austria, November 1998.

Petra Seiler, Ludger Ständker, Silke Mark, Wilfried Hahn, Wolf-Georg Forssmann, Markus Meyer. Preparation and application of a peptide bank from porcine brain, 18th International Symposium on Separation of Proteins, Peptides & Polynucleotides, Vienna, Austria, November 1998.

Ludger Ständker, Silke Mark, Hossein Mostavafi, Stefan Höning, Thomas Braulke, Wolf-Georg Forssmann. Characterization of circulating fragments of human IGFBP-4, 5th International Symposium on Insulin-Like Growth Factors, Brighton, UK, November 1999.

Petra Seiler, Ludger Ständker, Silke Mark, Wilfried Hahn, Wolf-Georg Forssmann, Markus Meyer. Preparation and application of a peptide bank from porcine brain, GBM Workshop: Bioanalytik für junge Wissenschaftler, Schloß Rauischholzhausen, November 1999.

Franz-Josef Kramer, Silke Mark, Henning Schliephake, In vivo application of purified supernatant of fetal and postnatal osteoblast-like cultures for bone regeneration, 8th Workshop of Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease, Davos, Schweiz, April 2000.

Franz-Josef Kramer, Silke Mark, Henning Schliephake, Osseous Regeneration in Critical Size Defects: Age-related Potential of Osteoblast Culture Supernatant, XV Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Edinburgh, UK, September 2000.

Patente:

Franz-Josef Kramer, Silke Mark, Ludger Ständker, Wolf-Georg Forssmann. Anwendung von Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP-2) als osteoanabol wirksame Substanz zur Behandlung von Knochendefekten und -erkrankungen, Deutsche Patentanmeldung DE 1001679.1 vom 05.04.2000; Internationale Patentanmeldung PCT/EP01/04891 vom 11.10.2001.

Preise:

„Leibinger Prize Award 2000“

für den Beitrag „Osseous Regeneration in Critical Size Defects: Age-related Potential of Osteoblast Culture Supernatant“, XV Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Edinburgh, UK, September 2000,

für Franz-Josef Kramer, Silke Mark, Henning Schliephake.

Lebenslauf

Name: Silke Erika Mark

Anschrift: Hegefeldstr. 7
30559 Hannover

Geburtsdatum: 07.06.1973

Geburtsort: Homberg/Efze

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

- 1979 – 1983 Grundschule „Mittelpunktschule Heiligenberg“ in Felsberg-Gensungen
- 1983 – 1989 Gesamtschule Felsberg, gymnasialer Zweig
- 1989 – 1992 Oberstufengymnasium „Geschwister-Scholl-Schule“ in Melsungen
- 1992 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

- 1992 Beginn des Studiums Diplom-Biochemie an der Universität Hannover
- 1996 Praktikum an der University of California, San Diego, USA, im Rahmen des Biochemiestudiums
- 1998 Abschluß des Studiums mit dem Hochschulgrad Diplom-Biochemikerin an der Universität Hannover (Note: sehr gut)
- 1998 Beginn der experimentellen Arbeiten zur Doktorarbeit am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung (heute: IPF PharmaCeuticals GmbH, Leiter: Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann)