

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 TGF- $\beta$ 1 UND SEIN BINDUNGSPROTEIN LTBP-4

#### 2.1.1 Kurzer Überblick

Latente TGF- $\beta$ -bindende Proteine (LTBP's) sind Glykoproteine, die in Thrombozyten entdeckt wurden. Es sind vier Isoformen bekannt (LTBP-1 bis -4), wobei LTBP-4 erstmals 1997 sequenziert werden konnte (Giltay, Kostka et al. 1997). LTBP-1, -3 und -4 binden das latente TGF- $\beta$ . Transforming Growth Factor beta ist ein ubiquitärer und essentieller Regulator zellulärer, physiologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Angiogenese u. a. (Elliott and Blobe 2005). Veränderungen der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktionskaskade (siehe Abbildung 4), wie z. B. Mutation oder Deletion einzelner Komponenten der Kaskade und Resistenz gegenüber der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Proliferationshemmung werden bei Krebserkrankungen häufig beobachtet (Elliott and Blobe 2005) und vermitteln daher das Bild eines Tumorsuppressors. Zellen synthetisieren das Cytokin als biologisch inaktives Aggregat, dem sog. »small latent complex« (SLC) (Saharinen, Hyytiainen et al. 1999). Dieser SLC besteht aus TGF- $\beta$ 1 in nicht-kovalenter Bindung zu seinem Propeptid, dem »latency-associated peptide« (LAP) (Todorovic, Jurukovski et al. 2005). Neben diesem kleinen inaktiven Komplex existiert ein großer Komplex, der »large latent complex« (LLC), der effektiver aus der Zelle sezerniert wird als der SLC (Sinha, Nevett et al. 1998). Der LLC besteht aus dem SLC sowie dem latenten TGF- $\beta$ -bindenden Protein (LTBP), das über zwei Disulfid-Brücken mit dem LAP verbunden ist (siehe Abbildung 1). Latente TGF- $\beta$ -bindende Proteine haben mindestens zwei Funktionen: Sie sind einerseits Strukturkomponenten der Extrazellulärmatrix, andererseits haben sie eine Regulationsfunktion als Modulator der TGF- $\beta$ 1-Bioverfügbarkeit (Todorovic, Jurukovski et al. 2005).

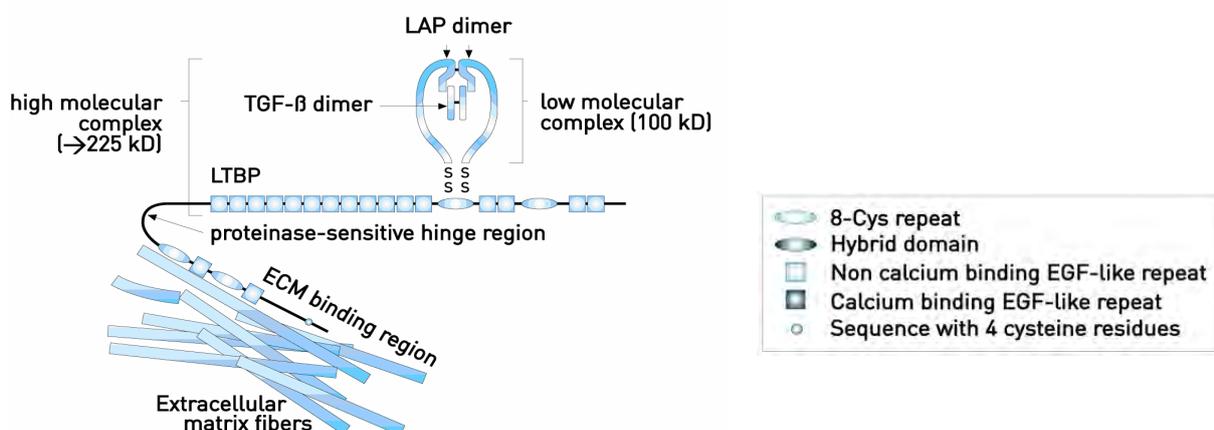


Abbildung 1 Aufbau des TGF- $\beta$ 1-LTBP-Komplexes. Die Abbildung zeigt den SLC (low molecular complex) und den LLC (high molecular complex) sowie die LTBP-Bindung an die Extrazellulärmatrix.

## 2.1.2 Proteinstrukturen

Die bisher identifizierten Säuger-TGF- $\beta$ -Isoformen (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3) bilden eine kleine Familie multifunktionaler Wachstumsfaktoren (Kingsley 1994). Jede dieser Isoformen hat in vivo ein anderes Zielgewebe; nur selten kommt es zur Überlappung (McLennan and Koishi 2002).

Das Protein TGF- $\beta$ 1 haftet an einem Vorläufer-Protein (LAP, Latency Associated Protein) und stellt in dieser Bindung eine latente inaktive Form dar. Sekretion, korrekte Faltung, Prozessierung und Bindung an die Extrazellulärmatrix benötigen die Cosekretion von latenten TGF- $\beta$ -bindenden Proteinen (LTBP`s) (Zhu and Burgess 2001).

Zellen synthetisieren das TGF- $\beta$ 1-Molekül als Propeptid bestehend aus 390-412 Aminosäuren. Die C-terminalen 112 Aminosäuren werden proteolytisch durch eine furinähnliche Protease abgespalten (Hyytiäinen, Penttinen et al. 2004) und formen ein Dimer, das reife TGF- $\beta$ 1, bestehend aus zwei 12,5 kDa schweren Polypeptiden (Massague, Cheifetz et al. 1992). Die restlichen N-terminalen Aminosäuren des Propeptids bilden das LAP (»Latency Associated Protein«) (Olofsson, Miyazono et al. 1992). Das LAP ist ebenfalls ein Dimer und besteht aus zwei 40 kDa schweren Proteinkomponenten (Hyytiäinen, Penttinen et al. 2004). Da das an LAP gebundene TGF- $\beta$ 1 an Oberflächenrezeptoren nicht binden kann und somit latent ist (daher der Name »Latency Associated Protein«), verleiht erst die LAP-Dissoziation TGF- $\beta$ 1 die aktive Form (Rifkin 2005). Die TGF- $\beta$ 1-Aktivierung wird daher nur erreicht durch Abspaltung des reifen, 25 kDa schweren TGF- $\beta$ 1-Moleküls (Olofsson, Miyazono et al. 1992). Diese verzögerte Aktivierung scheint für TGF- $\beta$ 1 kennzeichnender zu sein als für TGF- $\beta$ 2 oder TGF- $\beta$ 3, obwohl alle drei Isoformen auch an akuten biologischen Prozessen beteiligt sind, wobei sie sofort nach ihrer Freisetzung aktiviert werden (McLennan and Koishi 2002). LAP erleichtert die korrekte Faltung von TGF- $\beta$ 1, denn die Expression des TGF- $\beta$ 1-Peptids allein führt zu einer intrazellulären Anhäufung von Disulfidbrücken-gebundenen Aggregaten (Gray and Mason 1990). Die TGF- $\beta$ 1-Propeptide binden fest an TGF- $\beta$ 1, die Proteine werden als Komplex sezerniert (Annes, Munger et al. 2003). Latente (inaktive) TGF- $\beta$ 1-Moleküle werden sezerniert als kleiner Komplex (SLC, siehe 2.1.1), bestehend aus dem reifen TGF- $\beta$ 1 in nicht-kovalenter Bindung zu seinem LAP, und als großer Komplex (Olofsson, Miyazono et al. 1992) (LLC, siehe 2.1.1). Der große latente Komplex enthält zusätzlich das Protein LTBP in kovalenter Bindung durch zwei Disulfidbrücken an LAP (Mangasser-Stephan and Gressner 1999). Der große latente TGF- $\beta$ 1-Komplex (TGF- $\beta$ 1-LAP-LTBP) wird effektiver aus der Zelle sezerniert als der kleine (Sinha, Nevett et al. 1998; Mangasser-Stephan and Gressner 1999). LTBP`s spielen daher eine wichtige Rolle als Modulatoren der TGF- $\beta$ 1-Bioverfügbarkeit. Eine schematische Darstellung der TGF- $\beta$ 1-Proteinstruktur ist der Abbildung 1 zu entnehmen.

LTBP-1, -3 und -4 sind mit dem kleinen latenten TGF- $\beta$ 1-Komplex assoziiert und spielen eine zentrale Rolle bei der TGF- $\beta$ 1-Regulation (Koli, Saharinen et al. 2001).

Latente TGF- $\beta$ 1-bindende Proteine sind große Extrazellulärmatrix-(ECM-)Proteine, die strukturell mit den Fibrillinen verwandt sind. LTBP`s und die Fibrilline (1, 2 und 3) bilden die »Fibrillin-LTBP-Superfamilie«. Fibrilline sind wichtige Komponenten der Mikrofibrillen – ein Mantel fibrillinhaltiger Mikrofibrillen bedeckt das Elastinzentrum elastischer Fasern. Die Kolo-kalisierung des LTBP-1, -2 und -4 mit Fibrillin unterstreicht die Vermutung, dass LTBP`s auch eine Struktur-funktion in elastischen Fasern besitzen (Todorovic, Jurukovski et al. 2005). Die relative Molekülmasse von LTBP-4 beträgt etwa 170 bis 187 kDa (Stern-er-Kock, Thorey et al. 2002). Die Größe der LTBP-4 mRNA beträgt ca. 5,1 kb und kodiert für 1587 Aminosäuren (Saharinen, Taipale et al. 1998).

LTBP`s bestehen primär aus sich wiederholenden EGF-like Domänen, Cystein-reichen (CR-) Domänen (aufgebaut aus 8 sich aneinanderreihenden Cystein-Molekülen) und flankierenden Prolin- oder Glycinreichen Regionen (siehe Abbildung 2).

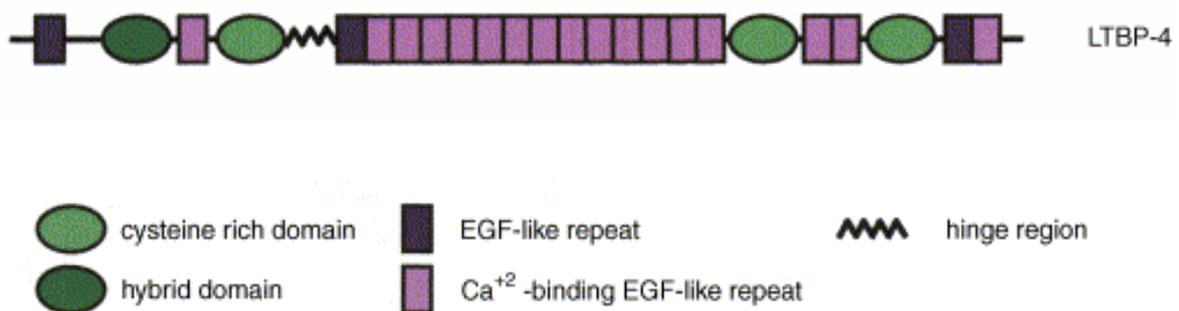


Abbildung 2 Struktur des LTBP-4 (modifiziert nach Todorovic, Jurukovski et al. 2005)

Die meisten der EGF-like Domänen (»EGF-like repeats«) binden Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Alle vier Isoformen beinhalten vier CR-Domänen. Die erste CR-Domäne wird aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit mit sowohl CR- als auch EGF-like Domänen »Hybrid-Domäne« genannt. Die dritte CR-Domäne von LTBP-1, -3 und -4 stellt die kovalente Bindungsstelle für den SLC (siehe 2.1.1) dar. Die Funktionen der anderen CR-Domänen sind unklar (Todorovic, Jurukovski et al. 2005). Ob die Calciumbindungen von LTBP und Fibrillin dem Protein Resistenz gegen Proteolyse verleihen (Reinhardt, Ono et al. 2000) und die EGF-like-Domänen an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind, wird diskutiert (Rebay, Fleming et al. 1991). Die EGF-like- und die 8-Cys-Domänen machen über 60 % der Proteinstruktur aus (Stern-er-Kock, Thorey et al. 2002). LTBP`s besitzen ferner N-Glykolysierungsstellen, und zwar sieben bei LTBP-1, neun bei LTBP-2 und fünf bei LTBP-3 und -4 (Sinha, Nevett et al. 1998). Im Gegensatz zu EGF-like-Domänen, die in vielen Extrazellulärmatrixproteinen vorkommen, sind die 8-Cys-Domänen nur LTBP`s und Fibrillinen eigen und charakterisieren

diese Familie (Annes, Munger et al. 2003).

Darüber hinaus existiert bei LTBP`s eine basische Aminosäurekette mit prolinreicher Sequenz, die sog. »Hinge-Region« (Scharnier-Region) (Rifkin 2005). Die Hinge-Region liegt zwischen der Hybrid-Domäne und den EGF-like-Domänen, nahe am C-terminalen Ende des Proteins nach der letzten 8-Cys-Domäne (Saharinen, Taipale et al. 1998). Sie besitzt den höchsten Grad an Sequenzvielfalt und enthält sieben bzw. neun Cysteine. Sie verbindet den N-terminalen Teil des Proteins mit der LAP-bindenden Domäne (Mangasser-Stephan and Gressner 1999). Die Hinge-Sequenzen von LTBP-1 und -2 sind sensitiv gegenüber proteolytischer Spaltung (Taipale, Lohi et al. 1995; Hyytiainen, Taipale et al. 1998), nicht jedoch die Hinge-Sequenzen von LTBP-3 und -4 (Penttinen, Saharinen et al. 2002).

Die N-terminale Region der LTBP`s vermittelt deren Assoziation mit der Extrazellulärmatrix, während LAP und dessen N-Terminus mit der C-terminalen Region der LTBP`s in Form von Disulfidbrückenbindungen interagieren (Saharinen, Taipale et al. 1998). Einen Überblick über die Struktur des LTBP-4 gibt die Abbildung 2.

Die Komplexbildung zwischen LAP und LTBP wird durch einen intramolekularen Disulfid-Austausch zwischen der 8-Cys3-Domäne von LTBP mit einem Cysteinestpaar von LAP vermittelt (Gleizes, Beavis et al. 1996; Saharinen, Taipale et al. 1996).

Von den 34 bisher bekannten 8-Cys-Domänen, die in LTBP`s und Fibrillinen gefunden wurden, ist für drei erwiesen, dass sie den kleinen latenten TGF- $\beta$ -Komplex (SLC) binden können (Saharinen and Keski-Oja 2000).

Die Bindung von LTBP an LAP scheint für die effektive Sekretion des latenten TGF- $\beta$  und dessen Aktivierung benötigt zu werden (Miyazono, Olofsson et al. 1991; Annes, Chen et al. 2004). Die 8-Cys-Domänen der LTBP`s schaffen eine hydrophobe Oberfläche, was die Interaktion mit dem kleinen latenten Komplex (SLC) erleichtert. Die Hydrophobizität geht mit einer besseren Verfügbarkeit von Sulfhydryl-Gruppen einher. Dies ist Voraussetzung für die kovalente Bindung in Form von Disulfidbrücken zwischen TGF- $\beta$ -LAP und LTBP`s. Die 8-Cys3-Domänen von LTBP-1 und -3 binden alle drei TGF- $\beta$ -Isoformen gut, LTBP-4 assoziiert nur mit TGF- $\beta$ 1 (Saharinen and Keski-Oja 2000; Rifkin 2005). Die schwache 8-Cys3 Bindung von LTBP-4 an TGF- $\beta$ 1 liegt wohl an der Substitution von drei Aminosäuren in der LTBP-1 Sequenz durch Alanin, Serin und Arginin in der LTBP-4 Sequenz. Beim Austausch dieser drei Aminosäuren wird die Bindung von LTBP-4 an LAP stärker (Chen, Ali et al. 2005). Die CR-Domäne von LTBP-4 wird im Gegensatz zu den anderen Isoformen durch zusätzliche prolinreiche Regionen unterbrochen (Hyytiainen, Penttinen et al. 2004).

Für humanes LTBP-4 sind bisher fünf Splicevarianten bekannt (Sterner-Kock, Thorey et al. 2002). Wie bei den übrigen LTBP`s entstehen durch diese Variabilität Isoformen einer mRNA, die sich in den Exons unterscheiden, die für 8-Cys- und EGF-like-Domänen codieren (Koli, Saharinen et al. 2001).

Die Splicevarianten sLTBP-4 (s für short) und LTBP-4L (L für long) haben eine ungleiche N-terminale Sequenz. LTBP-4L, dessen »full-length cDNA« (komplette cDNA) bisher noch nicht kloniert werden konnte, repräsentiert eine N-terminal verlängerte Form des sLTBP-4 (Saharinen, Taipale et al. 1998; Mangasser-Stephan and Gressner 1999). Das »RGD-Motiv« von sLTBP-4 am N-terminalen Bereich in Position 30 fehlt bei LTBP-4L.

RGD, ein Arginin-Glycin-Aspartat-Tripeptid-Motiv, ist eine Integrin-Erkennungssequenz (Derynck, Jarrett et al. 1985) und kommt in vielen Extrazellulärmatrixproteinen vor.

Die Cysteine des 5'-Endes von LTBP-4L bilden einen Kreis. Anderen Splicevarianten fehlen ein oder zwei Motive der lang gestreckten EGF-like-Domänen (Saharinen, Taipale et al. 1998). LTBP-4 $\Delta$ EGF fehlt die vierzehnte EGF-like-Domäne, die dritte des C-terminalen Endes. LTBP-4 $\Delta$ 2EGF fehlt die 14. und 15. EGF-like-Domäne.

Abwesenheit von Calcium-bindenden EGF-like-Domänen führt zu einer reduzierten Resistenz gegenüber Proteolyse (Oklu and Hesketh 2000). LTBP-4 $\Delta$ EGF hat eine Größe von 313 bp (Koli, Saharinen et al. 2001). LTBP-4 $\Delta$ Cys-8 3rd fehlt die dritte 8-Cys-Domäne, die die TGF- $\beta$ 1-Bindungsstelle enthält (Saharinen and Keski-Oja 2000; Koli, Saharinen et al. 2001).

Diese Splicevariante kann TGF- $\beta$ 1 folglich nicht binden und wurde in annähernd denselben Geweben gefunden, in denen die Variante LTBP-4L vorkommt (Koli, Saharinen et al. 2001). LTBP-4L ist 439 bp groß, LTBP-4 $\Delta$ Cys-8 3rd hingegen nur 274 bp. LTBP-4 $\Delta$ Cys-8 3rd wird durch alternatives Splicing über zwei Exons produziert.

Die codierende Sequenz zwischen 8-Cys3 und der vorausgehenden EGF-like-Domäne in LTBP-4 ist länger als in anderen LTBP`s und enthält prolinreiche Sequenzen. Diese Regionen ermöglichen den LTBP`s scheinbar Flexibilität und Proteasesensitivität. Eine prolinreiche Region ist auch in LTBP-4 $\Delta$ Cys-8 3rd gespliced, was zu einer steiferen Struktur und neuen funktionalen Eigenschaften führen könnte.

Die Expression nicht TGF- $\beta$ 1-bindender Varianten von LTBP-4 ist scheinbar für die Regulation der TGF- $\beta$ 1-Absetzung im Gewebe wichtig und könnte, da LTBP-4 ein Teil von Matrix-Mikrofibrillen darstellt, in Strukturfunktionen, die nicht auf das TGF- $\beta$ 1-Signal bezogen sind, involviert sein. Durch diese LTBP-4-Expression wird in manchen Zellen die Anzahl der Matrix-assoziierten kleinen latenten Komplexe (SLC) gesenkt (Koli, Saharinen et al. 2001). Ob die verschiedenen LTBP-4 Varianten allein durch alternatives Splicing, durch unterschiedliche Promotorregionen oder durch die proteolytische Prozessierung zustande kommen, bleibt unklar (Saharinen, Taipale et al. 1998).

### **2.1.3 Gewebelokalisation**

TGF- $\beta$ -Proteine sind ubiquitäre Wachstumsfaktoren (Todorovic, Jurukovski et al. 2005). Obwohl alle drei Isoformen dieselben Rezeptoren teilen und *in vitro* ähnliche zelluläre Effekte aufweisen, werden sie während der Embryogenese unterschiedlich exprimiert (Roberts and Sporn 1992). Fast alle Zellen des Körpers einschließlich Epithelien, Endothelien, Zellen des hämatopoetischen Systems sowie Nerven- und Bindegewebszellen produzieren TGF- $\beta$  und haben Rezeptoren für diesen Wachstumsfaktor (Blobe, Schiemann et al. 2000). TGF- $\beta$ 1 ist die am häufigsten und universellsten exprimierte Isoform (Elliott and Blobel 2005).

Alle LTBP-Isoformen werden in unterschiedlicher Menge in Zellen der Organe Herz, Lunge, Hoden und Niere sowie in der Skelettmuskulatur exprimiert (Todorovic, Jurukovski et al. 2005). Sie werden jeweils durch unterschiedliche Gene codiert und in gewebespezifischer Art und Menge exprimiert (Sinha, Nevett et al. 1998).

Das LTBP-4-Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom Nr. 19q13.1-19q13.2 lokalisiert (Saharinen, Hyytiainen et al. 1999). Die LTBP-4-Splicevariante LTBP-4 $\Delta$ Cys-8 3rd wird am häufigsten in Herz, Skelettmuskulatur und Pankreas exprimiert, kommt aber auch in Lunge, Aorta, Plazenta, Ovarien, Uterus, Darm, Leber und Niere vor (Giltay, Kostka et al. 1997; Saharinen, Taipale et al. 1998). In Zellen der Herzmuskulatur wird LTBP-4 $\Delta$ Cys-8 3rd am stärksten exprimiert (Saharinen, Taipale et al. 1998).

Kultivierte Zellen exprimieren oftmals viele LTBP-Isoformen (Penttinen, Saharinen et al. 2002; Weiskirchen, Moser et al. 2003; Rifkin 2005).

### **2.1.4 Biologische Funktionen**

Die unter anderem durch TGF- $\beta$ 1 kontrollierten positiven und negativen Effekte auf die Genexpression von down-stream Targetgenen (Zielgenen) sind verantwortlich für die Vielfalt an biologischen Funktionen (Zhu and Burgess 2001). Alle Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie sind wirksame Regulatoren diverser Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion, Extrazellulärmatrix-Bildung, Organisation und Zelltod (Massague 1998). Weiterhin werden die Embryonalentwicklung, Immunantworten, Wundheilung und Angiogenese gesteuert (Blobe, Schiemann et al. 2000).

Die multifunktionelle Natur des pleiotropen Cytokins TGF- $\beta$ 1 ist umgebungsabhängig. Seine Effekte hängen ab von Zelltyp, Differenzierungsgrad, Wachstumsbedingungen, Ligandenkonzentration und Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren (Roberts and Sporn 1992; Yue and Mulder 2001).

Ferner konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 die Mitose mesenchymaler Zellen induziert, was auch im Zusammenhang mit der Freisetzung anderer Wachstumsfaktoren als Antwort auf eine TGF- $\beta$ 1-Aktivität stehen könnte (Hartsough and Mulder 1997; Roberts 1998; Yue and Mulder 2001).

TGF- $\beta$ 1 reguliert die Produktion der Extrazellulärmatrix (ECM), indem es die Neusynthese und Umstrukturierung von ECM-Komponenten ausbalanciert (Hartsough and Mulder 1997). TGF- $\beta$ 1 kann weiterhin die Synthese der ECM-Komponenten wie unter anderem Kollagen, Fibronectin, Laminin und Proteoglykane verstärken sowie die Expression von Proteaseinhibitoren induzieren. Im Gegensatz dazu inhibiert TGF- $\beta$  die Expression proteolytischer Enzyme, wie z. B. Kollagenase. Insgesamt begünstigt TGF- $\beta$  die Produktion und Deposition der Extrazellulärmatrix.

Als Reaktion auf eine Gewebeschädigung kann die TGF- $\beta$ 1-Produktion Zellproliferation und die Bildung weiterer ECM-Komponenten stimulieren, um die Heilung zu fördern. Daher spielt TGF- $\beta$ 1 auch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (Border and Noble 1994; Yue and Mulder 2001).

TGF- $\beta$ 1 kann die Zelldifferenzierung in Abhängigkeit von Zelltyp und Wachstumsbedingungen verändern. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 die Differenzierung von Epithelzellen wie Keratinozyten, Bronchialepithelzellen und Kolonkarzinomzellen stimulieren kann (Yue and Mulder 2001).

TGF- $\beta$ 's spielen auch als potente immunregulierende Faktoren eine wichtige Rolle (Letterio and Roberts 1998). Sie können abhängig von Zelltyp, Differenzierungsgrad und in An- bzw. Abwesenheit von anderen Wachstumsfaktoren oder Cytokinen sowohl positive als auch negative Effekte auf das Wachstum und die Aktivität von Leukozyten, T-Zellen und Makrophagen ausüben (Yue and Mulder 2001).

Ferner beeinflussen TGF- $\beta$ -Isoformen die Entwicklung und Homöostase des zentralen Nervensystems (ZNS). TGF- $\beta$  nimmt hier Einfluss auf die Proliferation, Aktion und das Überleben der Neuronen, Gliazellen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten (Martinou, Le Van Thai et al. 1990; Gouin, Bloch-Gallego et al. 1996).

LTBP's haben eine duale Funktion: Sie sind Strukturkomponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) und Modulatoren der TGF- $\beta$ 1-Gewebespeicherung und -Signaltransduktionskaskade. Ihre Funktionen unter in-vivo Bedingungen sind mehr oder weniger unbekannt (Sternier-Kock, Thorey et al. 2002). Mindestens drei Mitglieder der LTBP-Familie (LTBP-1, -2 und -4) sind Bestandteile der ECM und an Elastin-haltigen Mikrofibrillen lokalisiert. Die in-vitro Supprimierung der LTBP-4-Expression im Mausmodell verursacht Kolorektaltumoren, Kardiomyopathie und abnormale Lungenentwicklung. Diese Dysregulationen sind mit tiefen Defekten in der Struktur elastischer Fasern sowie einer reduzierten Ablagerung von TGF- $\beta$ 1 in der ECM assoziiert (Todorovic, Jurukovski et al. 2005).

Der LTBP-4 - knock out - Phänotyp unterstreicht die duale Rolle von LTBP-4 als Strukturkomponente der Extrazellulärmatrix und als lokaler Regulator von TGF- $\beta$ 1-Sekretion und TGF- $\beta$ 1-Signal. Die besondere Wichtigkeit von LTBP-4 für die Integrität der ECM liegt vermutlich in der Prävention von Krebszellinvasion und Metastasierung (Sternier-Kock, Thorey et al. 2002).

### **2.1.5 Funktionen von TGF- $\beta$ 1 im Rahmen der Karzinogenese epithelialer Neoplasien**

Lange Zeit war der Fokus der Untersuchungen zu TGF- $\beta$ 1 auf Funktionen und seine wachstumshemmenden (tumorsuppressiven) Effekte auf viele Zellarten (u. a. Epithelzellen und Lymphozyten, die die Basis für die Mehrzahl der humanen Krebserkrankungen darstellen) gerichtet. Mittlerweile wurde bewiesen, dass TGF- $\beta$ 1 von seiner Tumorsuppressor-Aktivität in prämaligen Stadien der Karzinogenese zu protoonkogenen Eigenschaften in späteren Stadien von Tumorerkrankungen wechselt (Roberts and Wakefield 2003). Die physiologischen Funktionen von TGF- $\beta$ 1, die u. a. Wachstumsregulation, Apoptose, Gewebeintegrität und chromosomale Stabilität vermitteln, können Aspekte seiner tumorsuppressiven Rolle erklären (Glick, Weinberg et al. 1996). In späteren Stadien der Karzinogenese fördert TGF- $\beta$ 1 die Tumorprogression durch Induktion des Übergangs von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (EMT, epithelial to mesenchymal transition) (Siegel and Massague 2003). TGF- $\beta$ 1 nimmt seinen Einfluss auf die Karzinogenese durch auto- und parakrine Effekte, aber auch Mutationen seiner Rezeptoren und Second Messenger führen zur Entwicklung epithelialer Tumoren.

#### **2.1.5.1 Autokrine und parakrine Effekte des TGF- $\beta$ 1 in Neoplasien**

TGF- $\beta$ 1 kann das Wachstum neoplastischer Zellen sowohl autokrin als auch parakrin regulieren. Bei sensitiven Tumorzellen kann das Cytokin autokrin Wachstum hemmen und das neoplastische Potential vermindern (Roberts 1990; Hartsough and Mulder 1997).

TGF- $\beta$ 1-autokrin-negative Effekte konnten durch die Fähigkeit von TGF- $\beta$ 1-neutralisierenden Antikörpern, Wachstum mehrerer Zelllinien zu stimulieren, demonstriert werden (Arteaga, Coffey et al. 1990; Hafez, Infante et al. 1990). Eines der überzeugendsten Beweismittel für die TGF- $\beta$ 1-Funktion als Tumorsuppressor lieferten heterozygote TGF- $\beta$ 1  $-/+$  Mäuse. Diese Mäuse exprimierten lediglich 10-30% der Menge an TGF- $\beta$ 1 wie TGF- $\beta$ 1 Wildtyp-Mäuse. Wurden sie mit chemischen Karzinogenen behandelt, entwickelten sie im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verstärkt Neoplasien, was die Unfähigkeit von TGF- $\beta$ 1 unterstreicht, haploid Tumorstadium zu hemmen (Tang, Bottinger et al. 1998).

Diese Daten zeigen die Wichtigkeit von TGF- $\beta$ 1-autokrin-negativen Effekten für die Aufrechterhaltung eines Wachstumsgleichgewichts in neoplastisch veränderten Zellen (Yue and Mulder 2001).

Umgekehrt wirkt TGF- $\beta$ 1 in TGF- $\beta$ 1-resistenten Tumorzellen, die noch große Mengen an TGF- $\beta$ 1 sezernieren, parakrin und verstärkt dadurch das neoplastische Potential dieser Zellen, indem es ein für Tumorzellwachstum und –überleben positives Milieu schafft (Cui, Fowles et al. 1996). Zum Beispiel kann TGF- $\beta$ 1 neoplastisches Potential fördern, indem es die Proliferation mesenchymaler Zellen stimuliert, die ECM-Produktion erhöht, die Migration von Tumorzellen verstärkt, Immunsuppression induziert und Angiogenese steigert (Roberts 1990; Hartsough and Mulder 1997).

### 2.1.5.2 Mutationen der TGF- $\beta$ 1-Rezeptoren in Neoplasien

Bei bestimmten humanen Darmkrebserkrankungen konnten Mutationen des TGF- $\beta$ 1-Rezeptors T $\beta$ R2 festgestellt werden. Ein oder zwei Adenosine waren hierbei innerhalb eines 10-bp Polyadenin-Repeats (bp 709-718 in der kodierenden Region der Extrazellulärdomäne) mehr oder weniger vorhanden. Diese »Frame-shift Mutation« bewirkt die Einführung früher Stop-Codons und verursacht gestutzte und inaktive T $\beta$ R2. Diesen T $\beta$ R2-Formen fehlen sowohl transmembranöse als auch zytoplasmatische Domänen (Markowitz, Wang et al. 1995).

Auch T $\beta$ R1-Mutationen konnten bei humanen Krebserkrankungen identifiziert werden. Zum Beispiel wurden bei kutanen T-Zell-Lymphomen Deletionen im T $\beta$ R1-Gen gefunden, die sowohl die Expression der T $\beta$ R1 als auch die wachstumshemmenden TGF- $\beta$ -Effekte beseitigte (Schiemann, Pfeifer et al. 1999). Eine schematische Darstellung der TGF- $\beta$ 1-Rezeptoren T $\beta$ R1 und T $\beta$ R2 zeigt die Abbildung 3.

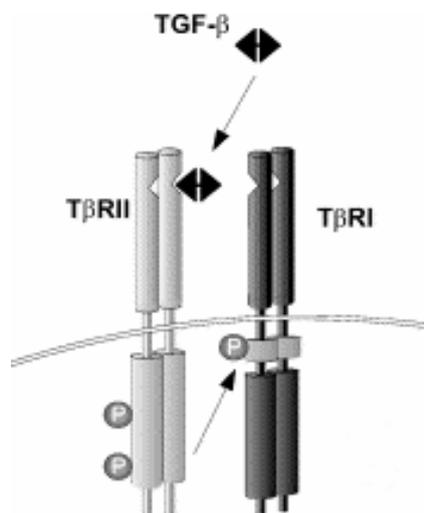


Abbildung 3 TGF- $\beta$ -Rezeptoren T $\beta$ R1 und T $\beta$ R2, Ausschnitt Fig. 1 (Lutz and Knaus 2002)

### **2.1.5.3 Mutationen der Smads in Neoplasien**

Auch Mutationen der Smads haben einen Einfluss auf die Karzinogenese epithelialer Tumoren. Smads sind Second messenger Proteine in der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktionskaskade; ihr Name leitet sich ab von MAD, einem Drosophila-Protein-Analogon zu TGF- $\beta$  (»Mothers Against Decapentaplegic«) und S für »similar to«. Smad-Mutationen können zu TGF- $\beta$ 1-Resistenz einiger Tumorzellen führen. Veränderungen in der Smad2- oder Smad4-Konstitution werden durch komplette Deletion ihres Chromosom-Lokus verursacht, aber auch kleine Deletionen, frame-shift-Mutationen und sog. missense- oder nonsense-Mutationen wurden beobachtet (Massague 1998). In jüngerer Zeit konnte eine neue Smad4-Mutation identifiziert werden. In Seminomen wurde eine Insertion eines einzelnen Thymins zwischen dem Basenpaar 1521 und 1522 gefunden, was zu einem neuen Stop-Codon und somit zu einem gestutzten Smad4-Protein führt (Bouras, Tabone et al. 2000). Diese Veränderung der Proteinstruktur kann die TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktionskaskade blockieren und führt zu einer TGF- $\beta$ 1-Resistenz der Zielzelle (Yue and Mulder 2001).

## **2.2 TGF- $\beta$ 1-SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADE UND IHRE EFFEKTE AUF DIE EXPRESSION VON p21 UND c-myc IN EPITHELIALEN ZELLEN**

### **2.2.1 TGF- $\beta$ 1-Aktivierung**

Bevor das Protein TGF- $\beta$ 1 seine biologischen Funktionen ausüben kann, muss das Cytokin zunächst aktiviert werden. Unter physiologischen Bedingungen ist der am häufigsten beobachtete Aktivierungsmechanismus die Proteolyse (Saharinen, Hyytiainen et al. 1999; Massague and Chen 2000). So kann die TGF- $\beta$ 1-Aktivierung z. B. durch enzymatische Abspaltung der glykosilierten Kohlenhydratstrukturen des LAP-Peptids erfolgen (Miyazono and Heldin 1989). Weiterhin können u. a. die Enzyme Transglutaminase, Thrombin und Plasmin das LAP und LTBP`s zur Spaltung (und somit TGF- $\beta$ 1-Aktivierung) führen (Fortunel, Hatzfeld et al. 2000).

In-vivo repräsentieren Thrombospondin (TSP) und  $\alpha$ v $\beta$ 6-Integrin wichtige Komponenten der TGF- $\beta$ 1-Aktivierung. Das ECM-Protein TSP wird von vielen Zelltypen produziert und ist mit einer definierten Sequenz mit dem latenten TGF- $\beta$ 1-Komplex (am LAP) assoziiert (Murphy-Ullrich, Schultz-Cherry et al. 1992). Ein anderer TSP-Bereich interagiert simultan mit dem reifen TGF- $\beta$ 1. Dies ändert die Konformation zwischen LAP und reifem TGF- $\beta$ 1, was die TGF- $\beta$ 1-Aktivierung zur Folge hat (Schultz-Cherry, Chen et al. 1995).

Der kleine latente TGF- $\beta$ 1-LAP-Komplex ist ein Ligand für  $\alpha\beta$ 6-Integrin (Munger, Huang et al. 1999). Integrine sind ECM-Proteine, mit deren Hilfe die Extrazellulärmatrix Zellsignale direkt modulieren kann (Clark and Brugge 1995).  $\alpha\beta$ 6-Integrin-exprimierende Zellen können eine räumlich begrenzte TGF- $\beta$ 1-Aktivierung vermitteln (Annes, Chen et al. 2004).

### 2.2.2 TGF- $\beta$ 1-Rezeptorbindung

Die Rezeptoraktivierung repräsentiert den ersten Schritt der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktion, wobei sich die TGF- $\beta$ 1-Isoformen in ihrer Rezeptorbindungsaffinität unterscheiden.

TGF- $\beta$ 1 bindet entweder den TGF- $\beta$ -Rezeptor T $\beta$ R3, der das Cytokin daraufhin dem TGF- $\beta$ 1-Rezeptor T $\beta$ R2 präsentiert, oder TGF- $\beta$ 1 bindet direkt T $\beta$ R2 (Blobe, Schieman et al. 2000) (siehe Abbildung 3). Ohne die Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 formen die TGF- $\beta$ -Rezeptoren T $\beta$ R1 und T $\beta$ R2 einen latenten Rezeptorkomplex, dessen Aktivierung eine Ligandenbindung benötigt (Zhu and Burgess 2001). Der Ligand TGF- $\beta$ 1 bindet den vorgeformten Rezeptorkomplex, wodurch eine Rezeptorrotation zwischen den beiden Rezeptoruntereinheiten T $\beta$ R1 und T $\beta$ R2 induziert wird (Zhu and Sizeland 1999).

### 2.2.3 TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktion

Die durch TGF- $\beta$ 1-Rezeptorbindung ausgelöste Drehung der Rezeptoruntereinheiten T $\beta$ R1 und T $\beta$ R2 ermöglicht Interaktionen zwischen den Kinasedomänen des Rezeptorkomplexes, was mit einer Kinaseaktivierung einhergeht (Zhu and Sizeland 1999).

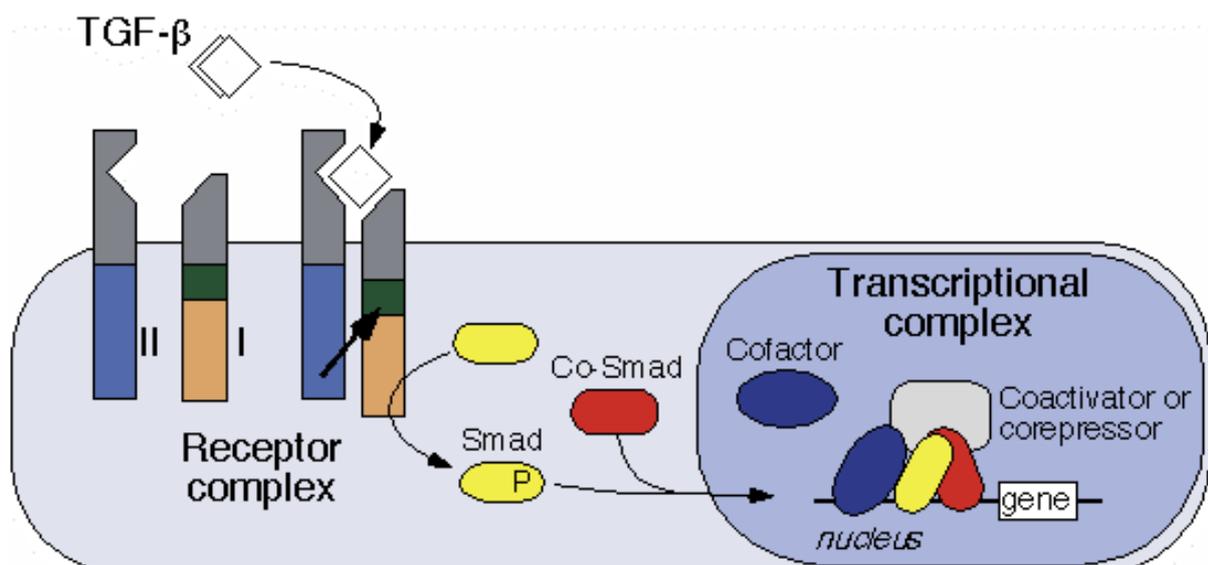


Abbildung 4 Das TGF- $\beta$ 1-Signal von der Zelloberfläche bis zum Kern ([www.molmed.lu.se/images/webfig6.gif](http://www.molmed.lu.se/images/webfig6.gif))

Smad:	Smad2 oder Smad3
Co-Smad:	Smad4 oder Smad4B
Cofactor:	Transkriptionsfaktor

Die Bindung von TGF- $\beta$ 1 an T $\beta$ R2 bewirkt dessen Assoziation mit T $\beta$ R1. Dies führt zur Phosphorylierung des T $\beta$ R1, wodurch eine Proteinkinase aktiviert wird, die wiederum die Transkriptionsfaktoren Smad2 oder Smad3 phosphoryliert (Blobe, Schiemann et al. 2000).

In phosphoryliertem Zustand binden diese Smad-Proteine Smad4 oder Smad4B.

Der daraus resultierende Komplex gelangt zum Zellkern (Nukleus) und interagiert in zellspezifischer Art und Weise mit anderen Transkriptionsfaktoren, um als »transkriptionaler Aktivierungs-komplex« die Transkription von TGF- $\beta$ 1-Zielgenen zu regulieren (Attisano and Wrana 2000; Blobel, Schiemann et al. 2000). Ein vereinfachtes Schema der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktionskaskade zeigt die Abbildung 4.

## **2.2.4 TGF- $\beta$ 1-vermittelte Wachstumshemmung in epithelialen Zellen**

### **2.2.4.1 Einleitung**

Der Transforming Growth Factor beta ist ein äußerst potenter Wachstumsinhibitor epithelialer Zellen. Die Zugabe von TGF- $\beta$ 1 stoppt die Zellen in der G1-Phase ihres Zellzyklus (Yue and Mulder 2001). Zwei Klassen antiproliferativer Genantworten sind hierbei involviert: Genantworten, die Cyclin-abhängige Kinasen hemmen (u. a. durch Überexpression des G1 CDKI p21, siehe 2.2.4.2) sowie die verminderte Expression des Protoonkogens c-myc (siehe 2.2.4.4) (Massague, Blain et al. 2000). Aufgrund seiner pleiotropen Eigenschaften variieren die Mechanismen der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Wachstumshemmung in den unterschiedlichen Zelltypen und hängen zusätzlich von diversen Versuchsbedingungen ab. In epithelialen Zellen ist die TGF- $\beta$ 1-abhängige Wachstumsinhibition allerdings grundsätzlich assoziiert mit Effekten u. a. auf die G1-Phase Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (Yue and Mulder 2001).

### **2.2.4.2 Funktion der G1-Phase Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (G1 CDKI`s) im Verlauf des Zellzyklus**

Der eukaryontische Zellzyklus wird in vier Phasen eingeteilt (siehe Abbildung 5) Die G1-Phase, Synthese-(S-)Phase, G2-Phase und Mitose-(M-)Phase. Nach der M-Phase können die neu geteilten Zellen aus der G1-Phase heraus in die S-Phase eintreten. Die Festlegung, ob eine Zelle in die S-Phase eintritt, entscheidet sich am Restriktionspunkt in der späten G1-Phase und hängt von Wachstumsbedingungen wie Anwesenheit von mitogenen Wachstumsfaktoren oder Wachstumsinhibitoren ab.

In Abwesenheit mitogener Wachstumsfaktoren verlassen Zellen den Zellzyklus und sistieren in einem Ruhezustand, der G0-Phase.

Mitogene Wachstumsfaktoren sind für Zellen von essentieller Bedeutung, um fortlaufend den Zellzyklus zu durchlaufen und von der G<sub>0</sub>-Phase in den Zyklus zurückkehren zu können (Yue and Mulder 2001).

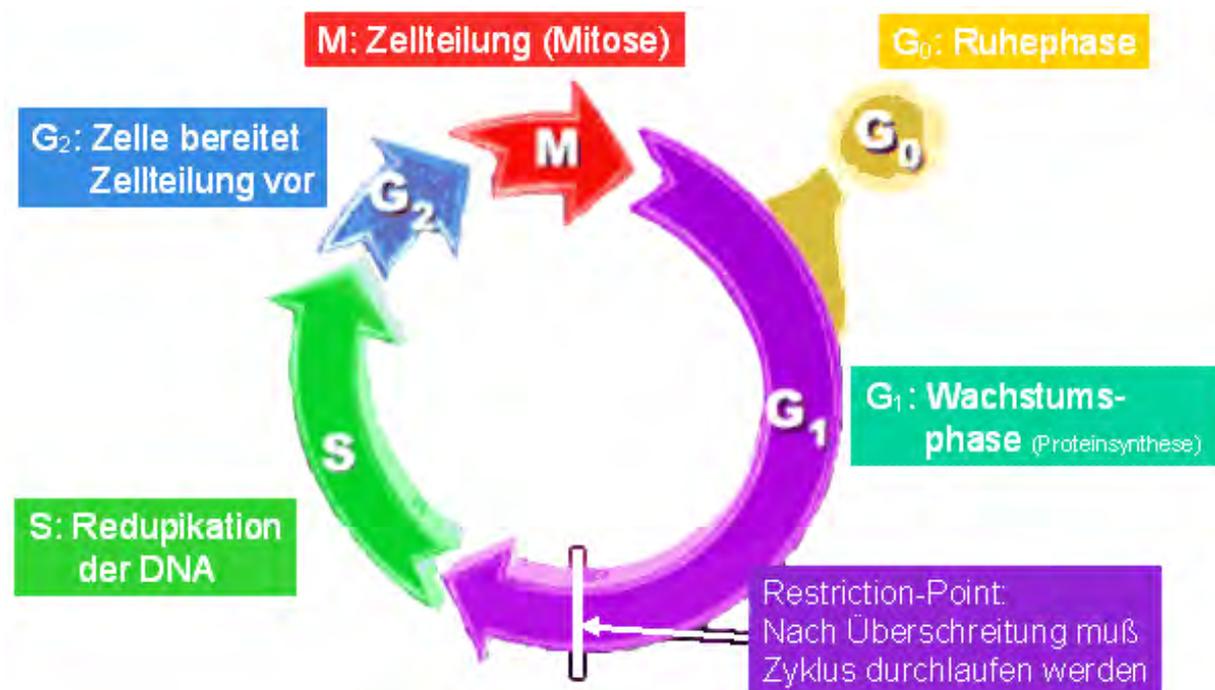


Abbildung 5 Der eukaryontische Zellzyklus ([www.uni-leipzig.de](http://www.uni-leipzig.de))

Das Fortschreiten durch den Zellzyklus wird durch Proteinkinasekomplexe kontrolliert, die aus zwei Proteinfamilien bestehen. Die eine ist die Familie der CDK's (Cyclin Dependent Kinases), die andere sind die Cykline, die mit den CDK's assoziieren, um deren Aktivität zu regulieren (Morgan 1995). In den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus bilden sich verschiedene CDK-Cyclin-Komplexe, um den Fortlauf der Zellen durch den Zyklus zu begünstigen. Assoziation, Aktivierung und Dissoziation der CDK-Cyclin-Komplexe dienen als kritische Punkte der Zyklus-Progression (Yue and Mulder 2001). Die Aktivität der CDK-Cyclin-Komplexe wird unter anderem durch CDKI's (Cyclin Dependent Kinase Inhibitores, Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren) inhibiert (Sherr and Roberts 1999). Eines der potentesten CDKI's ist das p21, das als erstes CDKI identifiziert wurde. p21 ist ein universeller Wachstumsinhibitor, der bei Überexpression durch Hemmung der G<sub>1</sub>- und S-Phase-CDK-Cyclin-Komplexe bewirkt, dass die Zielzelle in der späten G<sub>1</sub>-Phase gehalten wird (Harper, Adami et al. 1993).

### **2.2.4.3 TGF- $\beta$ 1-Effekte auf das G1 CDKI p21**

Eines der bedeutendsten Ziele des TGF- $\beta$ 1-Signals ist die Zellzyklus-Progression, speziell der Übergang der G1- zur S-Phase. In den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus bilden sich verschiedene CDK-Cyclin-Komplexe, um den Fortlauf der Zellen durch den Zyklus zu begünstigen (Pardali, Kowanetz et al. 2005). TGF- $\beta$ 1 fungiert hierbei als Regulator dieser Substrate durch zwei hauptsächliche Mechanismen (Dupont, Zacchigna et al. 2004): (1) durch transkriptionelle Aktivierung insbesondere des CDKI p21 (Seoane 2004) und (2) durch Inhibition des wachstumsfördernden Transkriptionsfaktors und Protoonkogens c-myc (Chen, Kang et al. 2002) (siehe 2.2.4.4).

Die transkriptionelle Induktion des p21 durch TGF- $\beta$ 1 wird primär über die mit dem TGF- $\beta$ 1-Signal korrespondierenden Smad-Effektoren vermittelt (siehe Abbildung 6) (Hu, Shen et al. 1999; Kivinen and Laiho 1999; Pardali, Kurisaki et al. 2000; Pouliot and Labrie 2002). Die Smadkaskade des TGF- $\beta$ 1-Signals zielt auf eine proximale Sequenz des p21-Promotors ab. Diese proximale Sequenz bildet das essentielle Transaktivator-Element des Promotors. Zusätzlich bindet Smad3 als Antwort auf das TGF- $\beta$ 1-Signal im Komplex mit einem Transkriptionsfaktoren an ein benachbartes, aber distales Element des p21-Promotors (Seoane, Le et al. 2004). Überdies führt TGF- $\beta$ 1 über die Induktion einer Phosphorylierung durch Kinasen zu einer posttranslationalen Stabilisierung des labilen p21-Proteins (Kim, Mercer et al. 2002; Gong, Ammanamanchi et al. 2003; Pardali, Kowanetz et al. 2005). Darüber hinaus stimuliert TGF- $\beta$ 1 die p53-Protein-Aktivierung (Ewan, Henshall-Powell et al. 2002). Das Protein p53 gilt ebenfalls im weiteren Sinne als Tumorsuppressor. Aktives p53 induziert p21, welches daraufhin bestimmte CDK-Cyclin-Komplexe hemmt und somit den Übergang der G1- in die S-Phase blockiert. Dieser Vorgang führt in Folge zu einem Verbleiben der Zielzelle in der G1-Phase (Fleisch, Maxwell et al. 2006).

Der wachstumshemmende Effekt von TGF- $\beta$ 1 basiert somit maßgeblich auf seiner Fähigkeit, die Expression des CDKI p21 zu verstärken (Roberts and Wakefield 2003).

### **2.2.4.4 TGF- $\beta$ 1-Effekte auf andere G1-Regulatoren wie das Protoonkogen c-myc**

Die tumorsuppressive Eigenschaft von TGF- $\beta$ 1 äußert sich neben den in Absatz 2.2.4.3 genannten Mechanismen durch eine Inhibition der c-myc-Expression (siehe Abbildung 6) (Wakefield and Roberts 2002). Mit seinen stimulierenden Eigenschaften auf Zellwachstum und Proliferation wirkt das ubiquitäre c-myc-Protein abhängig vom Zielgen als ein transkriptioneller Aktivator oder Inhibitor (Chen, Kang et al. 2001). Die Expression des Protoonkogens c-myc fördert die Zellzyklus-Progression und verkürzt die G1-Phase (Claassen and Hann 2000).

Die TGF- $\beta$ 1-vermittelte expressionshemmende Wirkung auf c-myc konnte noch nicht vollständig geklärt werden (Frederick, Liberati et al. 2004), aktuelle Studien zeigen jedoch, dass als Antwort auf ein TGF- $\beta$ 1-Signal das Second Messenger Protein Smad3 mit c-myc interagiert (Li, Xu et al. 2006). In Keratinozyten blockiert die c-myc-Expression die TGF- $\beta$ 1-Aktivierung des G1 CDKI p21. Dies legt nahe, dass TGF- $\beta$ 1 das Protoonkogen c-myc herabregulieren muss, um einen p21-vermittelten Zellzyklus-Stop zu induzieren (Massague, Blain et al. 2000).

Der wachstumshemmende Effekt von TGF- $\beta$ 1 basiert daher auch auf seiner Fähigkeit, die Expression des Protoonkogens c-myc zu vermindern (Roberts and Wakefield 2003).

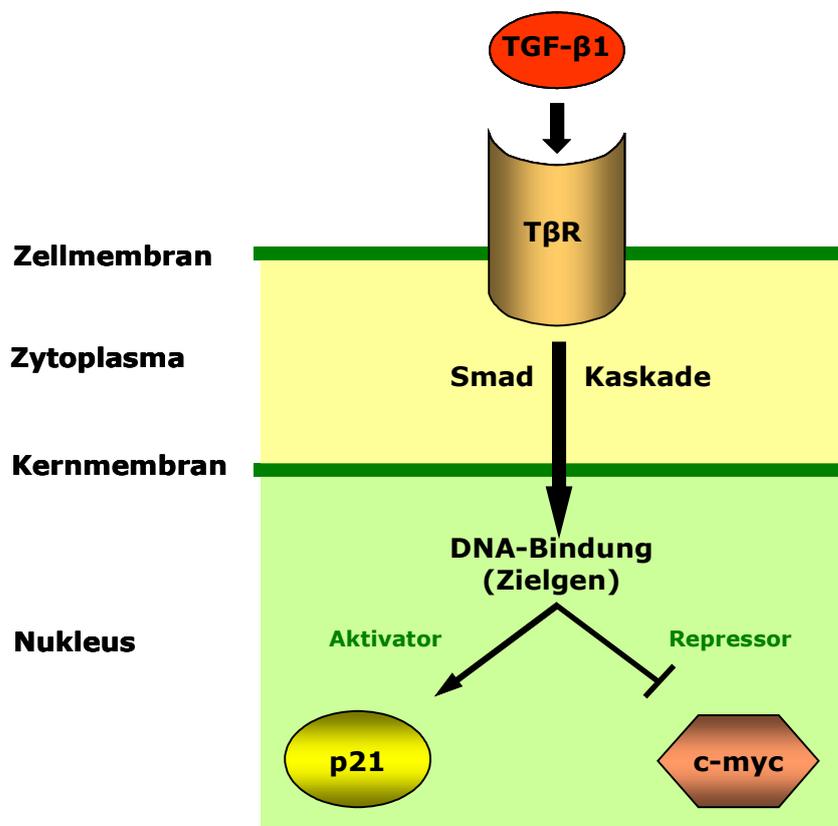


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Einflusses der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktionskaskade auf das Tumorsuppressorgen p21 und das Protoonkogen c-myc.