

## 5 DISKUSSION

Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor beta 1) reguliert in Assoziation mit seinem Bindungsprotein LTBP-4 (Latent TGF- $\beta$  Binding Protein 4) verschiedenste Funktionen in epithelialen Zellen, wobei seine antiproliferative und somit tumorsuppressive Wirkung eine Hauptfunktion darstellt.

Mutationen derjenigen Gene, die mit TGF- $\beta$  in funktionellem Zusammenhang stehen, führen zu Tumoren epithelialer Gewebe, wie zum Beispiel Mammakarzinomen. Seine extrazelluläre Verfügbarkeit und Aktivität ist von seinen Bindungsproteinen (wie LTBP-4) abhängig, mit welchen TGF- $\beta$ 1 in einem Komplex in den extrazellulären Raum sezerniert wird.

Experimentelle Vorarbeiten zeigen, dass ein Mangel an TGF- $\beta$ 1 sowohl zu einer reduzierten Expression von tumorsuppressiven Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (CDKI's) und hier insbesondere p21 führt, als auch eine vermehrte Expression von Protoonkogenen, insbesondere c-myc, bewirkt. Beide Mechanismen bedingen sich gegenseitig, sind somit prokanzerogen und induzieren eine verstärkte und ungehemmte Proliferation epithelialer Zellen.

In dem vorliegenden Projekt galt es zu untersuchen, inwiefern p21 und c-myc in Zellen mit einer modulierten sLTBP-4-Expression einer differentiellen Expression unterliegen. Ziel war hierbei die Korrelationsanalyse des TGF- $\beta$ 1-Bindungsproteins short LTBP-4 (sLTBP-4) mit dem CDKI p21 und dem Protoonkogen c-myc in der Karzinogenese epithelialer Zellen.

Für die *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene kamen humane embryonale Nierenepithelzellen der Linie HEK293T zur Anwendung. Eine permanente Zelllinie stellt als homogene Zellpopulation mit homogenem genetischen Pool ein ideales Medium für explizite Aussagen über Genexpressionsprofile dar. Eine Neoplasie zeichnet sich jedoch zumeist durch ein heterogenes Zellbild aus. Somit spiegeln die Ergebnisse aus diesem Untersuchungsansatz nicht das komplexe Zusammenspiel diverser Zellpopulationen im biologischen Organismus wider und besitzen daher Modellcharakter.

Ein wesentlicher Schritt bei der experimentellen Durchführung der vorliegenden Arbeit war die differentielle Genexpression des Tumorsuppressorgens sLTBP-4. Da die vollständige cDNA der langen Splicevariante (long form) LTBP-4L bisher noch nicht kloniert werden konnte, bezogen sich sämtliche Untersuchungen auf die kurze Variante (short form) sLTBP-4 (Giltay, Kostka et al. 1997).

Neben der erfolgreich durchgeführten Überexpression des sLTBP-4-Gens in HEK293T Zellen mit Hilfe des adenoviralen Expressionsvektors pCMVsL4V5blas wurde für das gelungene sLTBP-4-Gen-knock-down die RNA-Interferenz-Technologie verwendet.

RNA-Interferenz induziert den Mechanismus des »Genesilencing«, in dem mRNAs mit Hilfe doppelsträngiger RNA degradiert werden (Kuhlmann 2004).

RNA-Interferenz (RNAi) wird erfolgreich eingesetzt, um Signaltransduktionswege zu identifizieren, bei denen der Funktionsverlust spezifischer Gene einen direkten Einfluss auf den Tumor-Phänotyp hatte (Gaither and Iourgenko 2007). Zum Beispiel führte das knock-down von »Ras« (Rat sarcoma, Protoonkogen) (Brummelkamp, Bernards et al. 2002), »Bcr-Abl« (Fusionsgen auf humanem Chromosom 22) (Lage 2005) und »VEGF« (Vascular endothelial growth factor) (Zhang, Yang et al. 2003) zur Modulation des Zellwachstums in multiplen Tumormodellen (Gaither and Iourgenko 2007).

Um die Karzinogenese (nicht nur) epithelialer Neoplasien weitergehend zu erforschen, eignet sich die RNA-Interferenz-(RNAi-)Technologie ganz besonders. Durch Genesilencing eröffnen sich möglicherweise neue Behandlungsstrategien im Rahmen gentherapeutischer Ansätze. Zum Beispiel wäre der Einsatz von RNAi bei Erkrankungen denkbar, deren Ursache in einer Mutation von Tumorsuppressor- oder Protoonkogenen liegt, wie das bei vielen Krebsformen epithelialer Gewebe der Fall ist.

Seit einiger Zeit ist jedoch bekannt, dass längere doppelsträngige RNAs nicht nur die RNAi-Antwort, sondern auch eine Interferonantwort auslösen, indem sie die Proteinkinase R (PKR) aktivieren (Kuhlmann 2004). Diese greift hemmend in die Translationsmaschinerie ein und verursacht letztendlich den apoptotischen Zelltod. Deshalb wurden 2001 erstmals synthetische doppelsträngige 21mere als Agens zum Genesilencing eingesetzt (Elbashir, Harborth et al. 2001). Diese siRNAs sind nach biochemischen Untersuchungen zu klein, um die PKR zu aktivieren und umgehen somit das zelluläre Apoptoseprogramm. Tatsächlich konnte im Modellorganismus Maus ein Markergen fast im gesamten Körper durch intravenöse Gabe von siRNAs abgeschaltet werden (Kuhlmann 2004).

Zunächst scheint diese Methode einen großen Vorteil zu bieten, denn man kann auf virale Vektoren, die bei einer Gentherapie Probleme bereiten können, verzichten. Mehrere Untersuchungen zeigten aber, dass – in Abhängigkeit von der siRNA Dosis – dennoch eine Interferonantwort erfolgen kann. Es ist bisher unklar, wie diese Reaktion ausgelöst wird, die nach biochemischen Daten eigentlich nicht durch siRNAs verursacht werden sollte. Die zu erwartenden Interferon-induzierten Nebenwirkungen bei *in vivo*-Anwendung geben zu größter Vorsicht Anlass (Kuhlmann 2004).

Ein weiteres potentiell Problem liegt in der Überschwemmung des Organismus durch große Mengen an synthetischen siRNAs (Tang, Reinhart et al. 2003).

Obwohl diese mit großer Wahrscheinlichkeit nicht immunogen wirken, sind Effekte auf endogene Mechanismen denkbar.

In der Tat wurde beobachtet, dass die Endonuklease RISC (RNA induced silencing complex) *in vivo* zumindest teilweise kompetitiv hemmbar ist. Wenn RISC im Rahmen einer Therapie von den synthetischen siRNAs besetzt wird, könnten viele essentielle endogene RNAs nicht mehr ausreichend verarbeitet werden und es müsste bei einer medizinischen Applikation mit breiten Nebenwirkungen gerechnet werden.

Für die Erstellung von Expressionsprofilen einzelner Gene stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, darunter Northern Blot und quantitative Polymerasekettenreaktion (Sambrook 1989; Bustin 2000).

Von diesen wurde die qRT-PCR in den vergangenen Jahren als *state of the art* Verfahren etabliert. Obwohl keine absolute Quantifizierung erfolgt, besteht ein wesentlicher Vorteil dieser Methode darin, dass nicht nur eine relative Quantifizierung möglich ist, sondern parallel dazu auch ein qualitativer Nachweis spezifischer Zielgene erbracht wird. Dadurch können Arbeitsschritte wie die Durchführung einer konventionellen PCR einschließlich kPCR-spezifischer Primerplanung und -synthese eingespart werden. Daher wurde die qRT-PCR in der vorliegenden Arbeit zur Erstellung von Genexpressionsprofilen gewählt.

RNA wird schnell durch weit verbreitet auftretende RNAsen abgebaut und ist daher eine besonders labile Molekülklasse (Hamasaki, Iida et al. 2001; Schroeder, Mueller et al. 2006). Für die Arbeit mit RNA sind daher besondere Vorsichtsmaßnahmen und Kontrollschritte notwendig (Schroeder, Mueller et al. 2006).

Die RNA-Isolierung erfolgte in der vorliegenden Arbeit unter RNase-freien Bedingungen mit Einsatz von Puffern, die chaotrope Salze enthalten (siehe 3.2.3.2.1). Diese Form der RNA-Isolierung gewährleistet nach Einschätzung vieler Autoren den Schutz der Proben-RNA vor Degradierung (Sambrook 1989; Noonberg, Scott et al. 1995; Bonham and Danielpour 1996; Bastard, Chambert et al. 2002).

Die oben erwähnten Kontrollschritte zur Feststellung der RNA-Integrität erfolgten in der vorliegenden Arbeit durch kapillarelektrophoretische Analyse der Proben-RNA (siehe 3.2.3.2.3). Da bei diesem Verfahren hauptsächlich die ribosomale RNA (rRNA) als Indikator für die Integrität der mRNA genutzt wird, bleibt die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens Gegenstand kontroverser Diskussion (Schroeder, Mueller et al. 2006). Trotzdem sind einige Autoren der Meinung, dass die kapillarelektrophoretisch gemessene RNA-Integrität einen geeigneten Indikator für die Bewertung von Proben-RNA darstellt (Bastard, Chambert et al. 2002; Fleige and Pfaffl 2006; Micke, Ohshima et al. 2006; Schroeder, Mueller et al. 2006).

Zur Erstellung von Genexpressionsprofilen durch qPCR ist die reverse Transkription der Proben-RNA in cDNA notwendig (cDNA). Für die Erstellung biologisch präziser Daten muss in diesem Schritt eine proportionale Darstellung der Kopienzahlen der in der Probe enthaltenen RNA-Sequenzen stattfinden (Bustin 2002). Daher wurde in dieser Arbeit ein kommerziell erhältliches System verwendet (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories GmbH, München), für das die Proportionalität dieser Darstellung experimentell nachgewiesen war (Ginzinger 2002).

Zur Normalisierung der Daten aus qPCR-Experimenten wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsraten von Referenzgenen in den entsprechenden Proben in die Auswertung einbezogen (siehe 3.2.3.4.4).

Da sich in zahlreichen Untersuchungen gezeigt hat, dass kein Gen als universell einsetzbares Referenzgen geeignet ist, wurde im Einklang mit entsprechenden Vorgaben aus der Literatur eine Kombination aus drei, in Voruntersuchungen experimentell ausgewählten Referenzgenen (siehe 3.2.3.4.5) verwendet (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Etschmann, Wilcken et al. 2006).

Die relative Expressionsrate des zu untersuchenden Gens (Zielgen, gene of interest, GOI) wurde mit Hilfe der  $\delta\delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak and Schmittgen 2001). Auf eine Verwendung einer abgewandelten, um die qPCR-Effizienz korrigierten Version dieser Berechnungsmethode wurde verzichtet, da für alle eingesetzten qPCR-Untersuchungsmethoden bekannt war, dass die Effizienz über 90 % beträgt (Pfaffl 2001).

Im Rahmen des vorliegenden Projektes konnte ein erfolgreiches Genesilencing sowie die erfolgreiche Überexpression des sLTBP-4-Gens induziert werden (siehe Ergebnisse, Absätze 4.3.2.5.6.1 und 4.3.2.5.7.1).

In seiner Regulationsfunktion als Modulator der TGF- $\beta$ 1-Bioverfügbarkeit (Todorovic, Jurukovski et al. 2005) ist sLTBP-4 für eine effektivere Sekretion des TGF- $\beta$ 1 aus der Zelle und für dessen Aktivierung durch Abspaltung verantwortlich.

Da die TGF- $\beta$ 1-Funktion potentiell von der sLTBP-4-Expression abhängt (Sternier-Kock, Thorey et al. 2002) und sLTBP-4 in neoplastisch veränderten Epithelien einem knock-down unterliegt (Kruse 2005), wäre zu erwarten, dass im vorliegenden Modell des sLTBP-4-knock-down via RNA-Interferenz TGF- $\beta$ 1 vermindert exprimiert wird, wie auch 2004 von Koli beschrieben (Koli, Wempe et al. 2004): In dieser Studie führte eine gestörte LTBP-4-Funktion in Mäuselungen zu verringerter Sekretion von aktivem TGF- $\beta$ 1.

Entgegen den Erwartungen unterlagen die Gene TGF- $\beta$ 1, p21 und c-myc im *in-vitro* Modell des sLTBP-4-knock-down in HEK293T Zellen keiner eindeutigen Expressionsregulation.

Die Ursache für das Ausbleiben der TGF- $\beta$ 1-Regulation könnte durch kompensatorische Bindungen anderer LTBP-Isoformen (Saharinen and Keski-Oja 2000; Sterner-Kock, Thorey et al. 2002; Rifkin 2005) begründet sein.

Eines der bedeutendsten Funktionen des TGF- $\beta$ 1-Signals ist die Inhibition der Zellzyklus-Progression. TGF- $\beta$ 1 fungiert hierbei als Regulator durch zwei hauptsächliche Mechanismen (Dupont, Zacchigna et al. 2004):

- (1.) durch transkriptionelle Aktivierung insbesondere des tumorsuppressiven Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 (Seoane 2004) und
- (2.) durch Inhibition des wachstumsfördernden Transkriptionsfaktors und Protoonkogens c-myc (Chen, Kang et al. 2002).

Viele Studien der vergangenen Jahre demonstrieren die Regulation von p21 durch TGF- $\beta$ 1 (Pardali, Kowanetz et al. 2005). Pardali (Pardali, Kurisaki et al. 2000) und andere (Pouliot and Labrie 2002) haben bereits von einer TGF- $\beta$ 1-induzierten Transkriptionsregulation des p21 durch Smad3- und Smad1-Proteine (Second messenger in der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktionskaskade) berichtet.

Die Tatsache, dass eine vermehrte p21-Expression in verschiedenen, durch TGF- $\beta$ 1 in ihrem Wachstum gehemmten, epithelialen Zellen nach Smad4-Substitution wieder beobachtet werden konnte zeigt, dass in diesem Zelltyp ein allgemeiner Mechanismus der p21-Regulation vorherrscht und dieser durch die Smad-Kaskade vermittelt wird (Pardali, Kowanetz et al. 2005). Die TGF- $\beta$ 1-induzierte Smad-Kaskade (siehe 2.2.3 und Abbildung 4) ist nicht *nur* in die Regulation von p21 involviert, scheint jedoch bei dessen Genexpression eine essentielle Rolle zu spielen. In Smad4-Null-Zellen (Smad4-knock-out) mit exogen induziertem hohem Level an Smad2 und Smad3, d. h. R-Smads (Regulatorische Smads), wurde eine nur schwache Aktivierung von p21 beobachtet, was vermuten lässt, dass Smad4 unter physiologischen Bedingungen absolut erforderlich ist. Dies stimmt mit der feststehenden Rolle des Smad4 als »Co-Smad« der TGF- $\beta$ 1-Signalkaskade und Verstärker des R-Smad-Signals überein (Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001; Shi and Massague 2003).

Die transkriptionelle Repression von c-myc und Aktivierung von p21 durch TGF- $\beta$ 1 ist der bislang am besten erfasste Mechanismus der TGF- $\beta$ 1-abhängigen Hemmung des Zellzyklus epithelialer Zellen (Ten Dijke, Goumans et al. 2002; Siegel and Massague 2003). Die Voraussetzung der verstärkten p21-Expression und somit Inhibition der Zellzyklus-Progression ist eine transkriptionelle Repression (Downregulation) von c-myc (Claassen and Hann 2000; Chen, Kang et al. 2001). Im Gegensatz dazu heben hohe c-myc-Level in Zellen, wie zum Beispiel Krebszellen, den TGF- $\beta$ 1-Einfluss auf p21 auf (siehe Abbildung 35).

In *in vitro* - Studien wurde festgestellt, dass überexprimiertes c-myc die TGF- $\beta$ 1-induzierte p21-Aktivierung hemmt, was c-myc eine zentrale Rolle in der p21-Repression suggeriert (Pardali, Kowanetz et al. 2005).

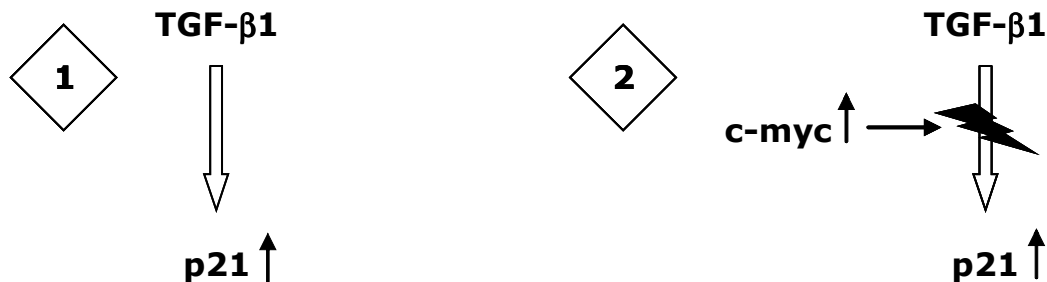


Abbildung 35 1 Physiologische, TGF- $\beta$ 1-induzierte p21-Aktivierung  
2 Hemmung der TGF- $\beta$ 1-induzierten p21-Aktivierung durch c-myc-Überexpression

Der c-myc-induzierten p21-Repression könnten zwei Mechanismen zugrunde liegen:

- Eine Verdrängung von Aktivierungsfaktoren vom p21-Promotor (Seoane, Pouponnot et al. 2001).
- Die Fähigkeit von c-myc, mit Co-Smad-Proteinen zu interagieren, um deren Transkriptionsaktivität zu blockieren (Feng, Liang et al. 2002).

Die o. g. *in vitro* - Studien verdeutlichen die essentielle Bedeutung von p21 für die Hemmung der Zellzyklus-Progression durch TGF- $\beta$ 1 sowie die Eigenschaft aktivierter Protoonkogene wie c-myc, p21 auszuschalten.

Dennoch existieren Hinweise, die auf eine Hemmung der Zellzyklus-Progression durch TGF- $\beta$ 1 trotz fehlender p21-Expression hindeuten (Cheng, Shen et al. 2001). Diverse Studien zeigten, dass eine Hemmung der Zellzyklus-Progression unter *in vivo*-Bedingungen im p21-knock-out-Modell trotzdem vorhanden ist. Dies lässt Zweifel an der essentiellen Bedeutung von p21 für die Hemmung der Zellzyklus-Progression durch TGF- $\beta$ 1 aufkommen. Die abschließende Klärung dieser Korrelationen bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Zunächst kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich das in den vorliegenden sLTBP-4-knock-down-Untersuchungen dokumentierte Ausbleiben einer p21- und c-myc-Regulation durch das Fehlen einer aberranten TGF- $\beta$ 1-Expression erklärt.

In den sLTBP-4-überexprimierten Zellen wurde im Umkehrschluss mit einer vermehrten Genexpression von TGF- $\beta$ 1 und p21 sowie einer geringeren c-myc-Konzentration gerechnet. Hierbei wiesen die Proben wie erwartet eine verstärkte Genexpression von TGF- $\beta$ 1 und p21 auf, was mit der transkriptionellen Aktivierung durch TGF- $\beta$ 1 zu erklären ist (Seoane 2004).

Das Protoonkogen c-myc war im Modell der sLTBP-4-Überexpression herabreguliert. Diese Beobachtung korreliert mit der Feststellung, dass TGF- $\beta$ 1 c-myc inhibiert (Chen, Kang et al. 2002).

Ein Erklärungsmodell für die geringe Genregulation nach sLTBP-4-knock-down bzw. -Überexpression im Transfektionsversuch liefert die Tatsache, dass Downstream-Effekte der Gene sowohl im physiologischen Prozess als auch in der Karzinogenese langsam und progressiv ablaufen. Es wäre durchaus möglich, dass eine Regulation auf Gen- und Proteinebene ein größeres kinetisches Zeitfenster benötigt, als in der vorliegenden Studie methodisch berücksichtigt wurde.

Die Ergebnisse der proteinbiochemischen Untersuchungen ergänzten auf qualitativer Basis den molekularbiologischen, quantitativen Nachweis einer erfolgreichen sLTBP-4-Überexpression in HEK293T Zellen. In diesen Zellen wurde das sL4-V5-Fusionsprotein regelmäßig detektiert, was eine erfolgreiche Translation dokumentiert.

Dabei bleibt die Frage offen, ob das Fusionsprotein aufgrund des V5-Epitop-Markers einer kryptischen Expression unterlag und daher unter Umständen die Bindungsaffinität von sLTBP-4 zu TGF- $\beta$ 1 beeinträchtigt war. Diese These könnte u. a. die unerwartet geringe Genregulation bei sLTBP-4-Überexpression erklären und bedarf einer Abklärung in zukünftigen Untersuchungen.

Insgesamt zeigen die Dissertationsergebnisse auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene, dass das Modell des sLTBP-4-knock-down bzw. der sLTBP-4-Überexpression erfolgreich etabliert werden konnte. Lediglich in Bezug auf Downstream-Effekte entsprachen die Resultate nicht den Erwartungen. In weiteren Untersuchungen gilt es daher zu prüfen, ob der beschriebene Einfluss von LTBP-4 auf TGF- $\beta$ 1 (Sterner-Kock, Thorey et al. 2002) und somit auch auf TGF- $\beta$ 1-Downstream-Targets im *in vitro*-Modell zu reproduzieren ist.

Zudem wäre die Durchführung einer differentiellen TGF- $\beta$ 1-Expression in epithelialen Zellen denkbar, um eine eindeutige Genregulation der Downstream-Targets zu provozieren. Im Anschluss daran könnte eine LTBP-4-Quantifizierung interessant sein, um retrograd bestehende Abhängigkeiten der Genexpression zu analysieren.

Neben einer differentiellen TGF- $\beta$ 1-Expression könnte zudem ein *in vitro*-Versuch mit TGF- $\beta$ 1-Inhibitoren zur Anwendung kommen, um p21- und c-myc-Regulation auch unter standardisierter, experimentell modifizierter TGF- $\beta$ 1-Rezeptoraktivierung kinetisch beurteilen zu können.

Aktuelle Studien haben Inhibitoren von TGF- $\beta$  untersucht (Fleisch, Maxwell et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass Quinazolin-Abkömmlinge als Inhibitoren des TGF- $\beta$ -Rezeptors 1 (T $\beta$ 1) im Zellkulturmodell sehr effektiv sind. Das Molekül hemmt die Kinase des Rezeptors, indem es die ATP-Bindungsstelle blockiert und die Kinase somit in ihrer inaktiven Konformation hält (Ge, Rajeev et al. 2004).

Weiterhin wurden neutralisierende Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörper im Tiermodell getestet. Dabei wurde festgestellt, dass monoklonale Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörper die TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktion (Smad-Kaskade, siehe Literaturübersicht, Absatz 2.2.3) blockieren (Schultze-Mosgau, Blaese et al. 2004) und Cyclosporin-induzierte Metastasierung verhindern (Hojo, Morimoto et al. 1999). In allen Studien zeigte sich eine modifizierte p21-Expression, die folglich auf eine fehlende TGF- $\beta$ -Rezeptoraktivierung zurückzuführen ist.

Zusammengefasst konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Protoonkogen c-myc und der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p21 elementare Zielmoleküle der TGF- $\beta$ 1-Regulation in Abhängigkeit von LTBP-4 darstellen und den Ablauf molekularer Mechanismen im Rahmen von TGF- $\beta$ 1-vermittelter maligner Transformation epithelialer Zellen beeinflussen.