

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 DAS CANINE GESÄUGE

2.1.1 Anatomie und Histologie

Die Milchdrüse oder »Mamma« wird bei Fleischfressern (Carnivoren) als Gesäuge bezeichnet. Sie besteht beim Hund in der Regel aus fünf (4-6) Paaren von Komplexen, die bilateral-symmetrisch paramedian an der ventralen Bauchwand aufgehängt sind (Evans 1993; Habermehl 1996). Die Mammakomplexe werden von kranial nach kaudal als thorakal kranial (T1), thorakal kaudal (T2), abdominal kranial (A1), abdominal kaudal (A2) und inguinal (I) eingeteilt (Warner 1976). In einer weiteren gebräuchlichen Nomenklatur werden die Mammakomplexe als axillar (T1), thorakal (T2), mittlerer (A1), abdominal (A2) und inguinal (I) bezeichnet (Owen 1979).

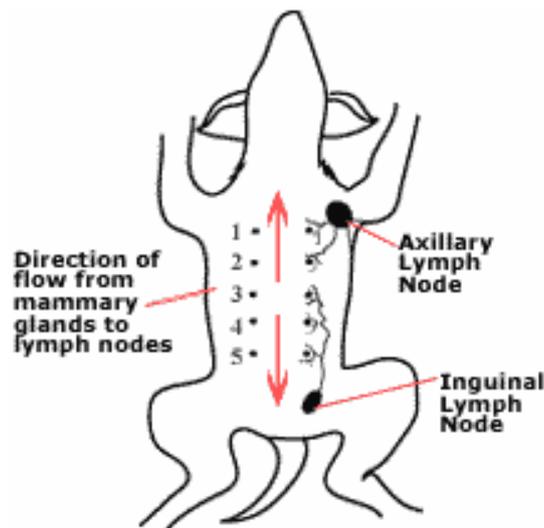


Abbildung 1 Schema der caninen Mammaleiste (<http://www.peteducation.com>)

Die »Mamma« des Hundes ist eine modifizierte, zusammengesetzte, apokrine Schweißdrüse. Die einzelnen Mammakomplexe besitzen einen tubuloalveolären Aufbau, bestehend aus einem Milchdrüsenkörper, *Corpus mammae*, sowie der Zitze, *Papilla mammae*. Der von Haut bedeckte Drüsenkörper setzt sich aus dem epithelialen Drüsenparenchym, *Glandula mammariae*, sowie dem interparenchymatösen Bindegewebe zusammen. Dieses unterteilt den Drüsenkörper in Lobuli (Habermehl 1996). Das Hohlraumsystem besteht aus Alveolen als Ort der Milchbildung und –abgabe und aus den nachfolgenden vom Drüsengewebe umhüllten interlobulären Ausführungsgängen, den *Ductus lactiferi*. Diese vereinigen sich zu größeren Milchgängen, welche dann in Milchzysternen *Sinus lactiferi* in der Zitze münden. Über 6-20 Strichkanäle *Ductus lactiferi*

gelangt die Milch durch die an der Zitzenkuppe gelegenen Zitzenöffnungen *Ostia papillaria* nach außen, siehe Abbildung 2.

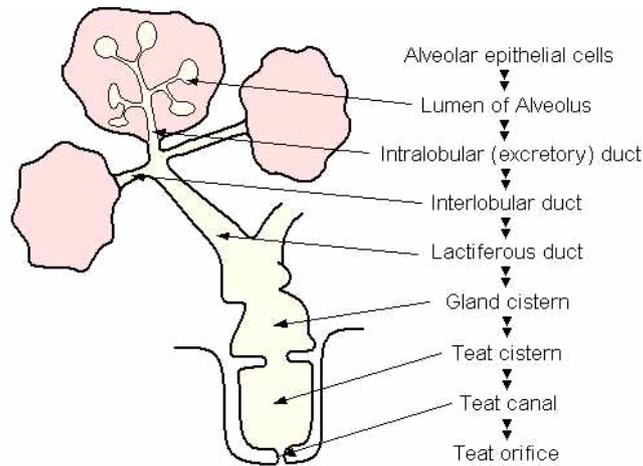


Abbildung 2 Schematischer Aufbau eines Mammakomplexes
(<http://137.222.110.150/calnet/mammary1/page2.htm>)

Der Aufhängeapparat der Gesäugeleiste, gebildet aus dem tiefen und oberflächlichen Blatt der äußeren Rumpffaszie (Fascia trunci externa profunda) und dem lockerem Binde- und Fettgewebe, gewährleistet die Fixation der Mamma an der Bauchwand .

Histologisch werden im Gesäuge epitheliale (Drüsenepithelzellen, Myoepithelzellen) und mesenchymale Anteile unterschieden.

Drüsenepithelzellen stellen den Hauptbestandteil der Alveolarwand dar. Sie sind einschichtig angeordnet und zur Milchsynthese befähigt (Mosimann 1990). Nach Michel (1994) besitzen die englumigen, proximalen Abschnitte des Ausführungsgangsystems ein einschichtiges, noch zur Sekretion befähigtes Epithel. Die folgenden Milchgänge sind zweischichtig.

Die *Myoepithelzellen* sind zwischen Drüsenepithel und Basalmembran eingeschaltete Zellen. Sie umspannen vorwiegend die alveolären Drüsenendstücke netzartig sowie auch Teile der Milchgänge. Nach Liebich (2003) sind sie modifizierte Derivate des ektodermalen Hautblattes und gleichen in Bezug auf ihre innere Organisation und Funktion glatten Muskelzellen (Wiesner 2000). Sie tragen aufgrund oxytocininduzierter Kontraktionen entscheidend zur Milchejektion bei (Mosimann 1990).

In dem interstitiellen Bindegewebe verlaufen ein Kapillarnetz, Arteriolen, Venolen, Lymphgefäße und vegetative Nerven. In der ruhenden oder juvenilen Milchdrüse sind in das lockere Bindegewebe tierartspezifisch eine unterschiedliche Art von Adipozyten (Fettzellen) eingelagert.

Die arterielle Blutversorgung des Gesäuges erfolgt über die Rami mammarii der Arteria thoracica interna, der Arteriae intercostales, der Arteria epigastrica cranialis superficialis und caudalis superficialis sowie der Arteria pudenda externa (Michel 1994). Die Nomenklatur der

begleitenden Venen ist entsprechend; kontralaterale Anastomosen kommen vor (Moulton et al 1990).

Der kraniale Abschnitt des caninen Gesäuges ist Einzugsgebiet des *Lymphozentrum axillare*. Der kaudale Abschnitt ist Einzugsgebiet des *Lymphozentrum inguinale superficiale*. Besonderheiten bestehen im Lymphabfluss des kranialen abdominalen Komplexes. Hier fließt die Lymphe in das kraniale und das kaudale Lymphzentrum. Es bestehen mögliche Lymphgefäßanastomosen zwischen den Mammakomplexen, was ein wichtiger Aspekt für mögliche Metastasewege darstellt (Gutberlet 1996).

Die sensible Versorgung des Gesäuges erfolgt durch die *Rami mammarii laterales*, die über mehrere Aufzweigungen den *Nervi intercostales* entstammen. Die inguinalen Mammakomplexe werden durch den *Nervus genitofemoralis (Plexus lumbalis)* versorgt (Böhme 1992). Die Haut im Bereich der Drüsenkomplexe wird durch den *Nervus thoracicus lateralis* mit Ursprung im *Plexus brachialis* innerviert.

Die Embryonalentwicklung der Milchdrüse wird im folgenden Absatz erläutert.

2.1.2 Ontogenese der caninen Milchdrüse

Das Parenchym der Milchdrüse entsteht aus der Epidermis des ektodermalen Hautblattes. Ihre Anlagen erscheinen in der embryonalen Entwicklung relativ früh (Rüsse 1998) in Form eines verdickten Epidermisstreifens (Milchlinie). In der Embryonalphase entwickelt sich aus der Milchlinie die Milchleiste, die sich bis in die Leistenegend erstreckt. Aus ihr gehen die Milhhügel (Mammary buds) hervor (Sinowatz 1998), dargestellt in Abbildung 3. Diese stellen die Vorläufer der einzelnen Mammakomplexe dar. Das Milhhügelepithel bildet oberflächlich die Alveolarzone, aus der sich eine Eversionszitze entwickelt. Es wächst zapfenförmig in die Tiefe und verzweigt sich ein erstes Mal. Die Zahl dieser Primärsprosse entspricht der Zahl der späteren Hohlraumsysteme (Sinowatz 1998). Die bereits bei der Geburt vorhandenen Primär- und Sekundärsprosse der Milchdrüsenanlagen beginnen bei Eintritt der Geschlechtsreife zu proliferieren (siehe Abbildung 3).

Sie bilden in jedem weiteren Brunstzyklus neue Drüsenepithelsprosse. Mit der ersten Gravidität und Laktation erlangt die Milchdrüse ihre volle Größe und Funktion (Michel 1994; Habermehl 1996).

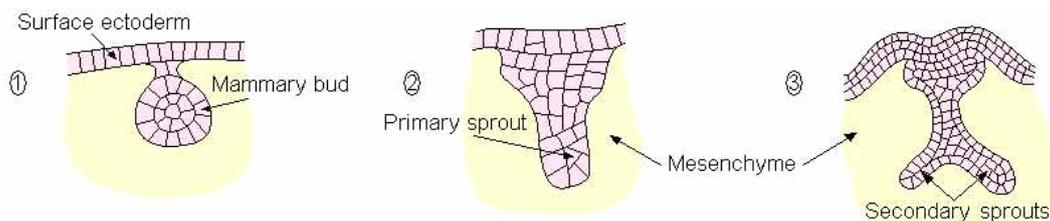


Abbildung 3 Ontogeneseschema der Milchdrüse (<http://137.222.110.150/calnet/mammary1/page2>)

2.2 CANINE MAMMATUMORE



Abbildung 4 Caniner Mammatumor (http://www.rgv-ayern.de/html/body_mammatumore.html)

2.2.1 Epidemiologie

Die epidemiologischen Daten zur Prävalenz von Mammatumoren beim Hund werden in der Literatur uneinheitlich diskutiert. Von den meisten Autoren werden Mammatumore mit 50 % (-52 %) als häufigste neoplastische Erkrankung der Hündin angesehen (Nolte and Nolte 2000; Ruttemann 2001; Withrow 2001). In Bezug auf den Anteil der Gesäugeumore am gesamten Tumorgeschehen dieser Spezies reiht Moulton (1990) sie nach den Neoplasien der Haut ein. Mann (1984) fand Mammatumore nach Neoplasien des hämatopoetischen Systems als zweithäufigste canine Tumorerkrankung im Sektionsgut. In einer neueren Untersuchung zur Prävalenz von caninen Gesäugeleistentumoren wurden diese hinter Neoplasien der Haut und des Gastrointestinaltraktes als dritthäufigste Tumorgruppe in der untersuchten Gesamtpopulation eingestuft (Dobson, Samuel et al. 2002).

Bei männlichen Hunden ist die Prävalenz von Mammatumoren eher niedrig. Die Häufigkeitsangaben schwanken bezogen auf eine Gesamtpopulation zwischen 0,4 – 2,7 % (Frese 1989; Bostedt 1994).

Der Anteil maligner Neoplasien an Mammatumoren wird in der Literatur uneinheitlich genannt. Der Grund dafür sind die unterschiedlich angewendeten Klassifizierungssysteme von caninen Gesäugeleistentumoren (Brodey, Goldschmidt et al. 1983). Die Spannweite der Angaben zu prozentualen Anteilen maligner Tumoren reichen von 10 % (Moulton, Rosenblatt et al. 1986) bis zu einem Anteil von 75,6 % bezogen auf eine definierte Grundgesamtheit (Simon, Goronzy et al. 1996).

Die Entstehung von Mammtumoren wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst (siehe auch 2.2.2). Neben dem Alter der Hündinnen spielen der Zeitpunkt der Kastration sowie das Vorkommen und die Art der Läufigkeitsunterdrückung eine Rolle. Die Anzahl der Trächtigkeiten, Laktationen oder Scheinträchtigkeiten scheinen keinen Einfluss auf das Mammatumorrisiko zu nehmen (Kessler 2005).

Das Durchschnittsalter der von Mammatumoren betroffenen Hunde liegt bei 9,5 Jahren. Am häufigsten erkranken Tiere im Alter von 7-13 Jahren. Selten erkranken Hündinnen unter 5 Jahren. Einheitlich werden Mammatumore als Altersleiden bezeichnet. Die Autoren Mitchell (1974) und Nolte (2000) weisen auf die von Jahr zu Jahr zunehmende Inzidenz für Mammatumore hin. Dieser Anstieg wird von Ruttemann (2001) auf die gestiegene Lebenserwartung der Hunde in Europa zurückgeführt.

Neben dem Alter werden auch Rassedispositionen diskutiert. Hierzu finden sich in der Literatur kontroverse Angaben. Einige Autoren geben eine höhere Disposition bei reinrassigen Hunden an (Schneider, Dorn et al. 1969). Andere weisen auf ein höheres Risiko bei kleinwüchsigen Rassen hin (Gottwald 1998). Einzelne Autoren beschreiben ein erhöhtes Mammatumorrisiko für einzelne Rassen. Laut Moe (2001) ist der Boxer stark repräsentiert, während Bichon Frise und Berner Sennenhund offenbar ein niedrigeres Erkrankungsrisiko tragen. Diese Feststellung ist aufgrund der regionalen Bevorzugung bestimmter Rassen nur schwer zu bestätigen (Ruttemann 2001; Withrow 2001).

Bezüglich der Lokalisation von Mammatumoren wird beschrieben, dass die kaudalen Drüsenkomplexe der Mamma eine deutlich höhere Prävalenz der Neoplasien zeigen, als die kranialen Komplexe. Über 80 % der Mammatumoren sind in den inguinalen und abdominalen Drüsenkomplexen zu finden (Gutberlet, Wey et al. 1998).

Bei bis zu 80 % der Hündinnen werden multiple Tumore gefunden (primäre Multiplizität), die auch unterschiedliche histologische Befunde liefern. Sie differieren in ihrer Dignität und können in einer oder in beiden Mammaleisten nebeneinander lokalisiert sein (Gutberlet, Wey et al. 1998; MacEven and Withrow 2001).

2.2.2 Ätiologie

Über die Ursachen für Neoplasien des Gesäuges ist nur wenig bekannt. Es wird von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen (Ferguson 1985). In diesem werden sowohl endogene (genetische Faktoren, Zyklusunregelmäßigkeiten, Gravidität und Pseudogravidität) als auch exogene Faktoren (Viren, Ernährung, Umwelteinflüsse, immunologische Faktoren) diskutiert.

Die Applikation von Geschlechtshormonen wie Progesteron zur Läufigkeitsunterdrückung kann unabhängig von der Dosierung und Behandlungsdauer benigne Mammatumore induzieren. Nach den Untersuchungen von Misdorp (1988) erhöhen hormonelle Läufigkeitsverhütungen die Gefahr für benigne Tumore um ungefähr 40 %, haben aber im Vergleich zum Risiko intakter, unbehandelter Hündinnen keinen Einfluss auf die Häufigkeit maligner Tumore.

Zum Einfluss von Progesteron bei der Entstehung maligner Neoplasien der Mamma bestehen jedoch kontroverse Meinungen (Gutberlet, Wey et al. 1998; Nolte and Nolte 2000).

Des Weiteren ist der Einfluss des Prolaktins auf Mammatumore bekannt. Unter Einsatz von Prolaktinhemmern (Unterdrückung der Pseudogravidität) verkleinern sich klinisch manifeste Neoplasien (Gutberlet, Wey et al. 1998).

Ferner spielt der Kastrationszeitpunkt eine wichtige Rolle. In der Literatur werden Klone praeneoplastischer epithelialer Zellen erwähnt, die während der ersten Geschlechtszyklen auftreten und sich später zu echten sich ausprägenden Tumoren entwickeln können (Bostock 1986). Durch Ovariectomie vor der ersten Läufigkeit (erster Zyklus) wird das Mammatumorrisiko auf 0,5 %, nach dem ersten Zyklus auf 8 % und nach dem zweiten Zyklus auf 26 % gesenkt (Ruttemann 2001; Withrow 2001). Ab einem Alter von 2,5 Jahren besteht kein protektiver Einfluss mehr (Mann 1984; Bostock 1986; Moulton 1990; Gutberlet, Wey et al. 1998). Die Kastration nach der Diagnose eines Mammatumors hat keinen Einfluss auf die Überlebenszeit *post operationem*, verhindert aber in seltenen Fällen die Entstehung bzw. Ausbildung weiterer Tumore in anderen Komplexen (Gutberlet, Wey et al. 1998).

Die oben genannten Umweltfaktoren beeinflussen die Pathogenese von Mammatumoren auf der genetischen Ebene (Robbins, Cotran et al. 2004).

Zu Beginn der Tumorgenese steht die Mutation eines Genes durch Einwirkung der oben genannten Faktoren. Die Mutation betrifft ein Protoonkogen, das physiologisch für ein die Zellteilung oder –differenzierung beeinflussendes Signalprotein kodiert. Mutierte Protoonkogene können nicht mehr deaktiviert werden und setzen unter anderem ihre Zellteilung unkontrolliert fort. Die Kontrolle u. a. über Zellteilung, Apoptose von mutierten und normalen Zellen wird normalerweise von Tumorsuppressorgenen übernommen, die somit unkontrolliertes Wachstum (etc.) der Zellen verhindern (Meurer 1999; Robbins, Cotran et al. 2004).

2.2.3 Klassifikation

Die vorliegende Arbeit orientiert sich an der neuen Klassifikation der WHO (World Health Organisation) nach Misdorp (1999), nachzuvollziehen in der Abbildung 5. So werden die beim Hund häufigsten malignen Mammatumore nach steigendem Malignitätsgrad wie folgt benannt:

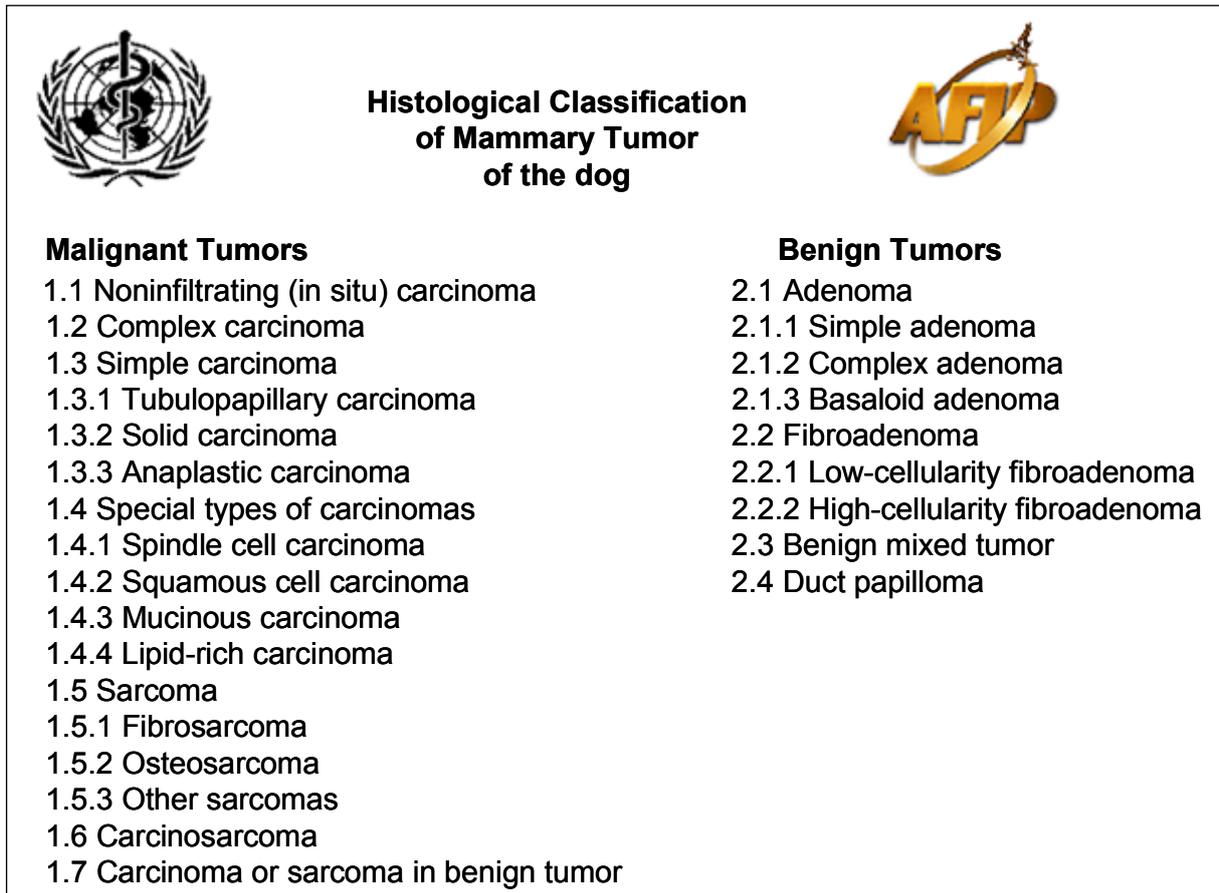


Abbildung 5 Ausschnitt aus den WHO-Richtlinien zur histopathologischen Klassifikation von caninen Mammatumoren (Misdorp 1999)

2.2.3.1 Epitheliale Tumore

Epitheliale Tumore machen mit Abstand den größten Anteil caniner Mammatumore aus. Ihnen werden Neoplasien der Mamma zugeordnet, in denen das Drüsenepithel tubulär, tubulopapillär, papillär oder alveolär verändert ist. Man bezeichnet sie als Adenome (benigne) oder simple Karzinome (maligne). Liegen die Drüsenstrukturen in einem simplen Karzinom nur noch zu einem geringen Anteil vor oder fehlen diese gänzlich, so spricht man von soliden Karzinomen. Als anaplastisches Karzinom werden überwiegend undifferenzierte Tumore mit fehlender Drüsenstruktur bezeichnet. Sie zeichnen sich durch vorwiegend anaplastische epitheliale Zellen aus.

Ist neben dem sekretorischem Epithel auch Myoepithel neoplastisch entartet, werden die Tumore als komplexes Adenom (benigne) bzw. komplexes Karzinom (maligne) bezeichnet (Gutberlet, Wey et al. 1998; Kessler 2005).

2.2.3.2 Mesenchymale Tumore und Karzinosarkome

Repräsentanten für mesenchymale Tumore in der caninen Mamma sind Fibrome oder Sarkome. Sie bestehen ausschließlich aus mesenchymalen Anteilen. Diese Tumorformen, bei denen Osteo- und Fibrosarkome die häufigsten Tumore darstellen, machen nur etwa 3 % der caninen Gesäugetumore aus.

Von den Tumoren, die aus epithelialen und mesenchymalen Zellen nebeneinander bestehen, werden bei der Hündin in den meisten Fällen Fibroadenome (benigne), benigne Mischtumore und sehr selten Karzinosarkome diagnostiziert (Kessler 2005).

2.3 TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA (TGF-BETA)

2.3.1 Einleitung

Der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ist ein ubiquitäres und multipotentes Zytokin. Zu den biologischen Effekten gehören unter anderem die Regulation zellulärer, physiologischer Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Apoptose in der Embryonalentwicklung bis hin zur Homöostaseaufrechterhaltung adulter Gewebe (Massague 1998; Herpin, Lelong et al. 2004; Elliott and Blobe 2005) (siehe biologische Funktionen unter 2.3.5). Heute sind über 40 Mitglieder der TGF-beta-Superfamilie bei Wirbeltieren und Wirbellosen bekannt. Die Wichtigsten sind die »TGF- β -Moleküle« selbst (Prototypen), die »BMPs« (Bone Morphogenetic Proteins), »Activine«, die »GDFs« (Growth and Differentiation Factors) und »AMHs« (Anti-Mullerian Hormons) (Massague and Chen 2000). Alle Subfamilien ähneln sich in ihrer Struktur (Hyytiäinen, Penttinen et al. 2004).

Für Wirbeltiere spielen die hoch konservierten Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2, und TGF- β 3 eine essentielle Rolle. TGF-beta1 wurde erstmals in humaner Plazenta (Frolik, Dart et al. 1983) und in Thrombozyten (Assoian, Komoriya et al. 1983) nachgewiesen und 1985 kloniert (Derynck, Jarrett et al. 1985). TGF-beta2 wurde erstmals 1988 als eigenes Gen beschrieben (Hanks, Armour et al. 1988). Auch TGF-beta3 wurde 1988 nachgewiesen (Derynck, Lindquist et al. 1988). Die TGF-beta-Isoformen 4-12 sind weitgehend unerforscht (Jakowlew, Dillard et al. 1988; Hyytiäinen, Penttinen et al. 2004).

Die TGF-beta-Isoformen 1-3 werden von unterschiedlichen Genen kodiert und je nach Entwicklung und Gewebe unterschiedlich exprimiert.

2.3.2 TGF-beta-Proteinstruktur

Die TGF-beta-Isoformen 1-3 werden initial als große (390-412 Aminosäuren) Precursor (Propeptide) synthetisiert und bestehen aus drei Domänen: der N-terminalen Signaldomäne, der variablen Pro-Domäne und dem C-terminalen Fragment (reifes TGF-beta) (Piek, Heldin et al. 1999). Die Signaldomäne leitet das Propeptid bis zur Phase der Sekretion. Die Aufgabe der Pro-Domäne besteht in der Faltung, Dimerisation und Regulation der biologischen Aktivität des schmalen C-terminalen Fragments. Das reife TGF-beta-Molekül (C-terminale Fragment) ist ein über Disulfidbrücken verbundenes Homodimer (Roberts 1998). Die Proteinstruktur wird in der Abbildung 6 unter 2.3.3 dargestellt. Die TGF-beta-Isoformen unterscheiden sich in der Faltung der Tertiärform ihrer Proteinstruktur. Diese Differenz könnte laut Literatur einen Unterschied in der Rezeptorbindung bzw. -affinität bewirken (Hinck, Archer et al. 1996).

2.3.3 TGF-beta-Aktivierung

Alle drei für Säugetiere essentiellen TGF-beta-Isoformen sind in hohem Maße sequenzhomolog und überlappen in einigen ihrer Funktionen. Nahezu alle Zellen sezernieren latentes TGF-beta und exprimieren auch TGF-beta-Rezeptoren 1-3 (T β RI-III).

Die TGF-beta-Isoformen stellen Proteine dar. Diese Proteine binden an einem Vorläuferprotein, wodurch sie als latente und inaktive Form (inaktiver Komplex) vorliegen. Für Sekretion, korrekte Faltung, Prozessierung und Bindung an die Extrazellulärmatrix benötigt die inaktive Form die Ko-sekretion des latenten TGF-beta bindenden Proteins (LTBP) (Siegel, Shu et al. 2003; Rifkin 2005).

Zellen synthetisieren als TGF-beta-Vorläufermolekül ein Propeptid (Precursor), bestehend aus 390 - 412 Aminosäuren (Piek, Heldin et al. 1999; Hyytiainen, Penttinen et al. 2004). Das Vorläufermolekül wird im Golgiapparat durch eine Endoprotease (Furin) proteolytisch gespalten. Aus dem C-terminalen Fragment entsteht das reife TGF-beta-Molekül, ein Homodimer, bestehend aus 110 - 114 Aminosäuren (Blanchette, Day et al. 1997). Das reife TGF-beta wird im Folgenden aus dem Golgiapparat ausgeschleust und bleibt mit dem N-terminalen Fragment, dem »Latency Associated Peptide« (LAP), nichtkovalent verbunden. Dieser Komplex, gebildet aus dem maturen TGF-beta und dem LAP, wird als »Small Latent Complex« (SLC, siehe Abbildung 6) bezeichnet (Saharinen, Hyytiainen et al. 1999). Der SLC verhindert die Bindung des maturen TGF-beta an seinem Rezeptor, TGF-beta bleibt inaktiv (Miyazono and Heldin 1989). Erst die Abspaltung des LAP, aufgebaut aus zwei 40 kDa schweren Proteinkomponenten, ermöglicht die Aktivierung von TGF-beta. In den meisten Fällen erfolgt in der Zelle die Bindung des SLC an eine der LTBP-Isoformen (siehe 2.4). Durch die kovalente Bindung des LAP an die Matrixproteine (LTBPs, Latent TGF-beta Binding Proteins) über zwei Disulfidbrücken entsteht der »Large Latent Complex« (LLC, siehe auch Abbildung 6.) (Olofsson, Miyazono et al. 1992; Mazzieri, Jurukovski et al. 2005; Rifkin 2005). Der LLC wird effektiver aus der Zelle sezerniert als der SLC (Sinha, Nevett et al. 1998).

Die LTBPs spielen somit eine wichtige Rolle als Modulatoren der TGF-beta-Bioverfügbarkeit, da sie unter anderem die Sekretion und die Anhaftung von TGF-beta an die Extrazellulärmatrix steuern (Taipale, Miyazono et al. 1994; Rifkin 2005; Todorovic, Jurukovski et al. 2005).

Die Reize, die eine Aktivierung des latenten TGF-beta`s bewirken, sind bisher noch nicht ausreichend bekannt. Für die Aktivierung von TGF-beta sind viele unterschiedliche Mechanismen verantwortlich. Zum einen führen Proteasen wie Plasmin oder Cathepsin zu einer Dissoziation des LAP von TGF-beta und damit zu einer Aktivierung von TGF-beta (Grainger, Mosedale et al. 1995).

In vivo wurde Thrombospondin als einer der Hauptaktivatoren durch die Bindung an LAP und folgenden Konformationsänderungen im »SLC« von TGF-beta identifiziert. Durch eine Veränderung der Proteinstruktur wird das Rezeptorepitop des latenten TGF-beta demaskiert und TGF-beta aktiviert (Ribeiro, Poczatek et al. 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Integrin α V β 6 an das Protein LAP binden kann. Auch hier erfolgt eine Konformationsänderung des inaktiven TGF-beta-Komplexes, so dass das Zytokin am Rezeptor binden kann (Munger, Huang et al. 1999; Annes, Chen et al. 2004).

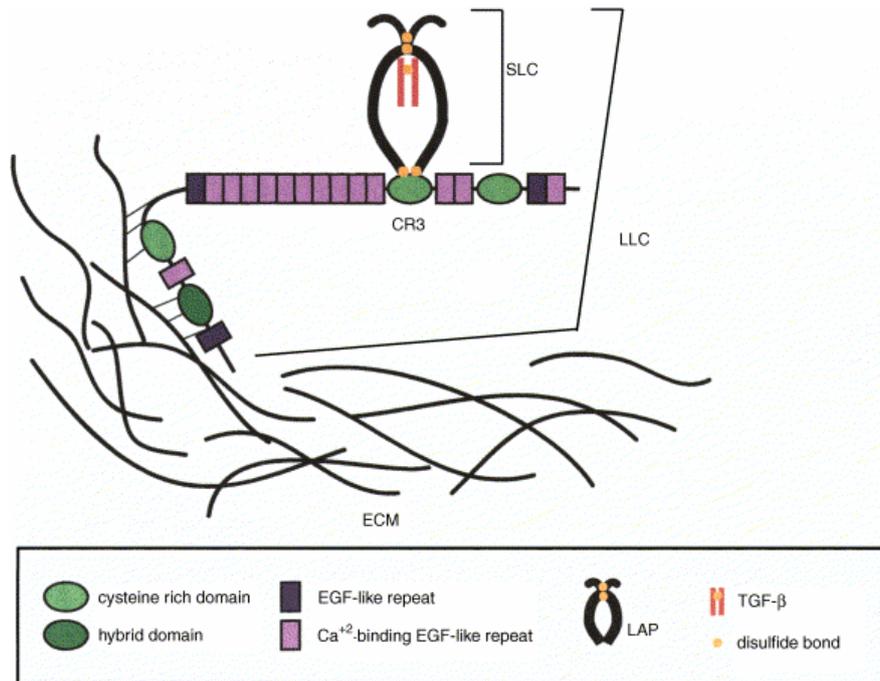


Abbildung 6 Darstellung der Proteinstruktur des SLC (Small Latent Complex) und des LLC (Large Latent Complex) in Assoziation mit der Extrazellulärmatrix (Todorovic, Jurukovski et al. 2005)

2.3.4 TGF-beta-Signaltransduktionskaskade

In Säugetierzellen gibt es drei TGF-beta-Isoformen, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Die Signaltransduktion erfolgt über die gleiche Kaskade.

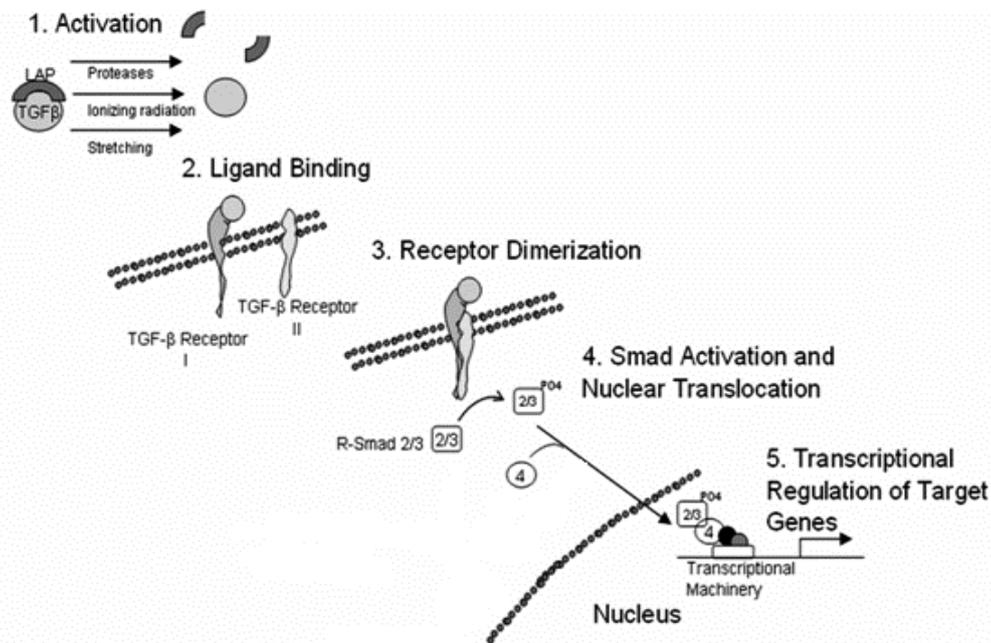


Abbildung 7 TGF-beta Aktivierung und Signaltransduktionskaskade (Fleisch, Maxwell et al. 2006)

Nachdem TGF-beta in den Extrazellulärraum sezerniert und durch die Abspaltung von LAP aktiviert wurde (siehe 2.3.3), bindet es an einem Rezeptorkomplex der Zielzellen. Es sind drei Rezeptortypen (T β R I – III) bekannt. Die Typen I (T β R I) und II (T β R II) stellen transmembranale Serin-Threonin-Kinasen dar, während es sich bei dem Typ III (T β R III) um ein membrangebundenes Proteoglykan (Beta-Glykan) handelt. Der Typ III-Rezeptor besitzt keine Kinaseaktivität. Die Funktion dieses Rezeptors besteht darin, zwei TGF-beta-Moleküle gleichzeitig kovalent zu binden, um die Konzentration von TGF-beta an der Zelloberfläche zu erhöhen und um dadurch eine Maximierung der Interaktion des Moleküls mit den anderen beiden Rezeptoren zu erreichen (Lopez-Casillas, Wrana et al. 1993; Kim, Kim et al. 2005; Fleisch, Maxwell et al. 2006). Nachdem TGF-beta am Rezeptorkomplex an den Typ II-Rezeptor bindet, kann dieser den Typ I-Rezeptors durch eine Phosphorylierung aktivieren. Nach der Aktivierung des Rezeptortyps I erfolgen Autophosphorylierungen und Phosphorylierungen durch Second messenger Proteine (Sporn and Roberts 1990; Derynck, Akhurst et al. 2001; Fleisch, Maxwell et al. 2006). Hierbei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, den rezeptorabhängigen Smad-Proteinen (R-Smads, R-Similar to mother against decapentaplegic proteins), Smad 2 und Smad 3. Phosphoryliert und damit aktiviert binden die R-Smads an Smad 4 und 4B (Co-SMADs) und translozieren als Komplex

in den Kern. Im Zellkern formen Smad2/3/4 einen Komplex mit zellspezifischen Co-Transkriptionsfaktoren. Der gebildete »transkriptionale Aktivierungskomplex« dient als Transkriptionsregulator von TGF-beta-Zielgenen (Blobe, Schiemann et al. 2000; Massague and Chen 2000; Fleisch, Maxwell et al. 2006). Eine vereinfachte Darstellung des Signaltransduktionsweges von TGF-beta findet sich in der Abbildung 7.

2.3.5 TGF-beta-biologische Funktion

Bei TGF-beta handelt es sich um ein pleiotropes (ubiquitäres) Zytokin mit einer Vielzahl an kontextabhängigen biologischen Funktionen. Das Molekül zeichnet sich durch seine regulatorischen Effekte auf Zellproliferation, -differenzierung, -migration, -adhäsion, -apoptose in verschiedensten Geweben aus. Es spielt eine maßgebende Rolle in der Produktion von Extrazellulärmatrix, in regulatorischen Prozessen des Immunsystems und in der Embryologie (Sporn and Roberts 1990). Des Weiteren ist die duale Rolle des TGF-beta's in der Karzinogenese zu erwähnen.

TGF-beta stellt für viele Zelltypen wie z.B. für Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten u. a. ein potenter Wachstumsinhibitor dar.

Ferner reguliert das Zytokin TGF-beta die Produktion von Extrazellulärmatrix (EZM), indem es die Neusynthese und Umstrukturierung von EZM-Komponenten ausbalanciert (Hartsough and Mulder 1997). TGF-beta kann weiterhin die Synthese einiger EZM-Komponenten unter anderem von Kollagen, Fibronectin, Laminin und Proteoglykane verstärken als auch die Expression von Proteaseinhibitoren induzieren. Im Gegensatz dazu inhibiert TGF-beta die Expression von proteolytischen Enzymen (Kollagenasen, Transin etc.). Zusammenfassend fördert TGF-beta die Produktion und die Deposition von Extrazellulärmatrix. In diesem Zusammenhang spielt das Molekül eine wichtige Rolle für die Wundheilung. Als Reaktion auf eine Gewebeschädigung kann es die Zellproliferation, die Bildung von Extrazellulärmatrix stimulieren und somit die Heilung von Wunden fördern (Border and Noble 1994; Yue and Mulder 2001).

TGF-beta kann die Zelldifferenzierung abhängig vom Zelltyp und Wachstumsbedingungen verändern. Frühere Untersuchungen ergaben, dass TGF-beta die Differenzierung von Epithelzellen wie Keratinozyten, Bronchialepithelzellen und Kolonkarzinomzellen stimulieren kann (Yue and Mulder 2001).

Das Immunsystem wird auch durch regulatorische Effekte von TGF-beta beeinflusst (Letterio and Roberts 1998). So kann das Zytokin abhängig von Zelltyp und Differenzierungsgrad und in An- oder Abwesenheit von anderen Zytokinen sowohl positive als auch negative Effekte auf das Wachstum und die Aktivität von Leukozyten, T-Zellen und Makrophagen ausüben (Yue and Mulder 2001).

Ferner beeinflusst TGF-beta die Entwicklung und Homöostase des zentralen Nervensystems (ZNS). Das Molekül hat einen maßgebenden Einfluss auf Proliferation, Aktion und Überleben der Neuronen, Gliazellen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten (Martinou, Le Van Thai et al. 1990; Gouin, Bloch-Gallego et al. 1996).

Die Bedeutung von TGF-beta im Entwicklungsprozess wurde anhand TGF-beta knock out-Versuchen an Mäusen gezeigt.

TGF-beta1 knock out-Mäuse starben kurz nach der Geburt an einer Infiltration von Immunzellen ins Gewebe (multifactoral inflammatory disease) (Shull, Ormsby et al. 1992).

TGF-beta2 knock out-Mäuse zeigten Defekte im Bereich von Herz, Lunge, Urogenitaltrakt, Gesicht und Schädel. Sie starben um den Geburtszeitraum herum (Sanford, Ormsby et al. 1997).

Mäuse, denen TGF-beta3 fehlte, bildeten Gaumenspalten aus (Proetzel, Pawlowski et al. 1995).

Die biologische Funktion von TGF-beta in der caninen Milchdrüse und in der Karzinogenese epithelialer Neoplasien insbesondere caniner Mammatumoren werden in den folgenden Absätzen erläutert.

2.3.5.1 Biologische Funktion von TGF-beta in der Milchdrüse

TGF-beta ist an der Embryogenese der Milchdrüse beteiligt. Dazu gehören die Einrichtung der embryologischen Achse, das Induzieren von Meso- und Endoderm, das Formen des Nervensystems und die Festlegung der Links-Rechtsasymmetrie bei Wirbeltieren (Schier 2003; Fleisch, Maxwell et al. 2006). Im engeren Sinne wird vermutet, dass TGF-beta eine wichtige Rolle in der Aufzweigungsmorphogenese (branching morphogenesis), der funktionellen Differenzierung, Zelllinienentscheidungen und der Involution während der Entwicklung der normalen Mamma spielt. TGF-beta konnte sowohl im Epithel als auch im Stroma der Mamma nachgewiesen werden. Die durch TGF-beta vermittelten reversiblen, wachstumssuppressiven Effekte auf epitheliale Strukturen (Drüsenepithelien, Myoepithelien) entstehen durch auf Epithel und Stroma eingehende Signale (Serra and Crowley 2005), siehe auch Abbildung 8.

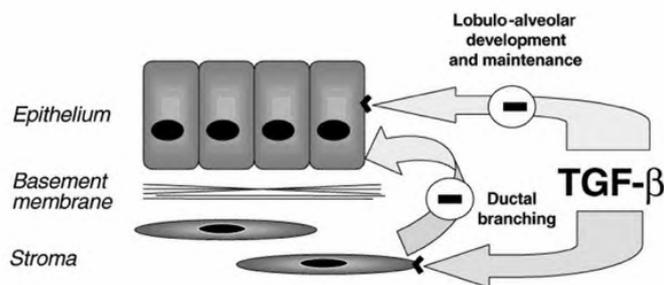


Abbildung 8 Einfluss von TGF-beta auf das Epithel, Stroma und die Basalmembran der Milchdrüse

Die adulte Milchdrüse unterliegt hormonellen Veränderungen im Geschlechtszyklus, die sich in Phasen der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen äußern. Hier spielt TGF-beta wie oben schon benannt eine wichtige Rolle im Involutionsprozess. Es handelt sich um den Zeitraum, der nach Abschluss des Stillens beginnt. Die Involution erfolgt in zwei Schritten. Zunächst induziert TGF-beta den programmierten Zelltod (Apoptose) von milchproduzierenden Zellen. Anschließend wird die Mamma, um wieder in ein inaktives Stadium (Anöstrus) zu gelangen, einem Prozess der Matrixumgestaltung unterworfen (Serra and Crowley 2005).

2.3.5.2 Biologische Funktion von TGF-beta in der Karzinogenese epithelialer Neoplasien

Die Mitglieder der TGF-beta-Familie erhalten die Homöostase in vielen Organsystemen unter physiologischen Konditionen, indem sie durch Apoptose und antiproliferative Effekte das Wachstum multipler epithelialer Zellen limitieren (Siegel and Massague 2003). Diese Funktion können sie über den Signaltransduktionsweg (siehe 2.3.4) indirekt durch eine Blockierung/Inhibition der Progression des Zellzyklus erfüllen. TGF-beta greift in den Zellzyklus ein, indem es die G1-Phase (postmitotische oder präsynthetische Phase) durch Aktivierung von zyklin-abhängige Kinase Inhibitoren (CDKIs) anhält (Ewan, Shyamala et al. 2002).

Komponenten der TGF-beta-Signaltransduktionskaskade sind in den verschiedensten Neoplasien (u. a. Mamma) unterbrochen, so dass TGF-beta anhand seiner Charakteristika als potentieller Tumorsuppressor angesehen wird (Massague, Blain et al. 2000). Bisherige Erkenntnisse zeigen, dass die Hemmung der TGF-beta-Signalausstrahlung in Mammatumoren durch Mutationen der TGF-beta-Rezeptortypen I und II und der Smad-Proteine (Smads, Wachstumsfaktoren, engl. similar to mother against decapentaplegic proteins) in den Tumorzellen erfolgt (Siegel and Massague 2003). Es hat sich herausgestellt, dass TGF-beta einen biphasischen Effekt auf die Tumorprogression hat. In der frühen Phase der Tumorprogression wirkt das Zytokin als Tumorsuppressor. In der späten Phase fördert es protoonkogen die Invasivität und Metastasierung des Tumors (Serra and Crowley 2003; Kim, Kim et al. 2005; Serra and Crowley 2005).

Einige Tumore entwickeln eine Resistenz gegenüber der TGF-beta vermittelten Wachstumshemmung. In diesen Fällen wurde noch keine Mutation festgestellt, die zu einer Unterbrechung des TGF-beta-Signaltransduktionsweges führt und somit einen Erklärungsansatz abliefern könnte. TGF-beta induziert in Zellen hochmaligner Neoplasien eine Umwandlungsentropie von epithelial zu mesenchymal (Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT). Das Zytokin fördert ab dem Zeitpunkt, d.h. nach Umwandlung des epithelialen Tumors in einen mesenchymalen Phenotyp, die Tumorprogression und

Metastasierung. Zudem kommt es in einigen Fällen durch TGF-beta zu proangiogenetischen und immunsuppressiven Effekten, die zusätzlich Tumorwachstum und Metastasierung begünstigen (Siegel and Massague 2003; Fleisch, Maxwell et al. 2006).

2.4 LATENT TGF-BETA BINDING PROTEIN (LTBP)

2.4.1 Einleitung

Die »Latent TGF-beta Binding Proteins« (LTBPs) sind Mehrfachdomänen-Glykoproteine. Sie besitzen alle eine sich stark wiederholende strukturelle Organisation und ein sich partiell wiederholendes Expressionsmuster. Die LTBPs wurden im Rahmen von Detailstudien über das Zytokin TGF-beta (siehe 2.3) in Thrombozyten entdeckt. Es sind bisher vier Isoformen beim Säugetier bekannt. 1990 wurde LTBP-1 (Tsuji, Okada et al. 1990), 1994 wurde LTBP-2 (Moren, Olofsson et al. 1994), 1995 wurde LTBP-3 (Moren, Olofsson et al. 1994) und 1997 wurde LTBP-4 (Giltay, Kostka et al. 1997) als bisher letztes geklont und sequenziert.

Drei der Isoformen spielen eine zentrale Rolle im Aktivierungsprozess von TGF-beta (siehe 2.3.3) (Mangasser-Stephan and Gressner 1999; Koli, Saharinen et al. 2001; Rifkin 2005). LTBP-1, -3 und -4 binden latentes TGF-beta. Darauf basierend wurden unter anderem die biologischen Funktionen der LTBPs begründet. Strukturell handelt es sich bei ihnen um Matrixproteine, und im regulatorischen Sinne sind es Modulatoren der Bioverfügbarkeit von TGF-beta.

2.4.2 LTBP-Proteinstruktur

Die LTBPs sind große Extrazellulärmatrix-(ECM)-Proteine und strukturell mit den Fibrillinen (1, 2 und 3) verwandt. Sie gehören gemeinsam der Fibrillin-LTBP Superfamilie an (Kanzaki, Olofsson et al. 1990; Saharinen, Taipale et al. 1998; Saharinen, Hyytiainen et al. 1999). Die molekulare Masse der LTBPs liegt zwischen 120 und 210 kDa. Die N-terminale Region der LTBPs vermittelt deren Assoziation mit der Extrazellulärmatrix, während LAP und dessen N-Terminus mit der C-terminalen Region der LTBPs in Form von Disulfidbrücken interagieren (Saharinen, Taipale et al. 1998).

Die LTBPs setzen sich aus 15-20 Epidermal growth factor (EGF)-like repeats, flankierenden prolin- oder glycinreichen Regionen sowie Cystein-reichen-(CR) Domänen zusammen, die aus einem Motif von acht sich aneinanderreihenden Cysteinmolekülen bestehen. Die Darstellung der Struktur der LTBP-Isoformen 1, 2, 3 und 4 erfolgt in Abbildung 9. Die meisten EGF-like-Domänen (EGF-like-repeats) binden Calcium (Ca^{2+}). Vermutlich sind sie für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich. Das Calciumbindungsvermögen trägt höchstwahrscheinlich zur Stabilität des LTBP-Proteins bei (Koli, Saharinen et al. 2001).

Alle vier LTBP-Isoformen beinhalten vier CR-Domänen. Die erste wird aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit sowohl der CR- als auch der EGF-like-Domäne »Hybrid-Domäne« genannt. Die dritte CR-Domäne von LTBP-1, -3 und -4 stellt die kovalente Bindungsstelle für den SLC (siehe 2.3.3) dar. Die Funktion der anderen CR-Domänen ist bislang unklar (Todorovic, Jurukovski et al. 2005). Es wird diskutiert, ob die Calciumbindungen von LTBP und Fibrillin den Proteinen Resistenz gegen Proteolyse verleihen (Reinhardt, Ono et al. 2000) und die EGF-like-Domänen an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Rebay, Fleming et al. 1991). Die EGF-like-Domänen und die 8-Cys-Domänen machen über 80 % der Proteinstruktur der Isoformen aus (Sterner-Kock, Thorey et al. 2002). LTBPs weisen ferner N-Glykolysierungsstellen auf, sieben bei LTBP-1, neun bei LTBP-2 und fünf bei LTBP-3 und -4 (Sinha, Nevett et al. 1998). Viele Extrazellulärmatrixproteine besitzen EGF-like-Domänen. Im Gegensatz dazu weisen aber nur die LTBP-Isoformen und die Fibrilline 8-Cys-Domänen auf (Annes, Munger et al. 2003). Zusätzlich zeichnen sich die LTBPs durch eine proteaseempfindliche, basische prolinreiche Aminosäurekette aus, der so genannten »Hinge-Region« (Scharniergelenk) (Rifkin 2005). Diese Region befindet sich hinter der letzten 8-Cys Domäne nahe des N-terminalen Endes des Proteins (Saharinen, Taipale et al. 1998). Sie verbindet den N-terminalen Teil des LTBP`s mit der LAP-bindenden Domäne (Mangasser-Stephan and Gressner 1999). Die Hinge-Regionen der LTBP-Isoformen 1 und 2 sind proteaseempfindlich, dies gilt nicht für die Hinge-Regionen von LTBP-3 und 4 (Penttinen, Saharinen et al. 2002).

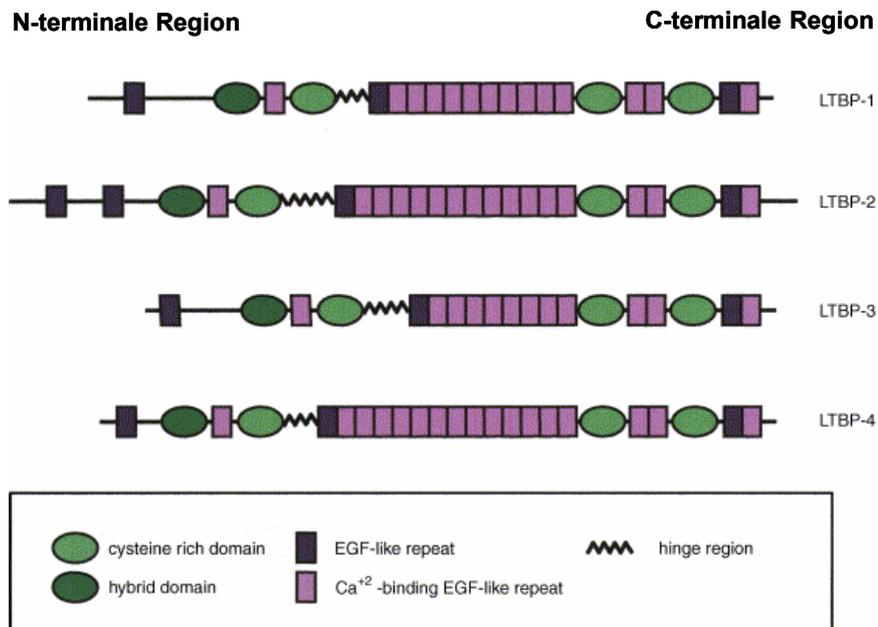


Abbildung 9 Proteinstruktur der LTBP-Isoformen (Todorovic, Jurukovski et al. 2005)

Aufgrund der Nutzung unterschiedlicher Promoter, Splicevarianten und proteolytischer Prozessierung weisen LTBP's strukturelle und funktionelle Unterschiede auf (Koli, Saharinen et al. 2001). Für jede der LTBP-Isoformen konnten mehrere Splicevarianten nachgewiesen werden. Alle vier weisen mindestens 2 Splicevarianten (eine Long (L) und Small (S) Variante) auf, für LTBP-4 wurden bisher fünf nachgewiesen (Koli, Saharinen et al. 2001). Die Splicevarianten unterscheiden sich in Bezug auf die EGF-like Domänen, einigen fehlt die Hinge-Region und andere besitzen keine TGF-beta Bindungsstellen. Dies lässt vermuten, dass die biologische Funktion der LTBP-Isoformen nicht nur untereinander, sondern auch innerhalb der Splicevarianten der vier bekannten LTBP's, sehr stark variiert (Koli, Saharinen et al. 2001).

2.4.3 LTBP in der TGF-beta-Aktivierung und -Signaltransduktion

Die LTBP-Isoformen (1, 3 und 4) spielen für das TGF-beta-Molekül im Aktivierungsprozess und in der Signaltransduktion eine maßgebende Rolle. In der Zelle wird matures TGF-beta an das LAP-Protein gebunden und infolgedessen der »Small Latent Complex« (SLC) gebildet. Das LAP-Protein wird anhand von Disulfidbrücken kovalent an LTBP gebunden. Der gebildete Komplex wird als »Large Latent Complex« (LLC) bezeichnet (siehe auch 2.3.3 und 2.3.4). Die Komplexbildung zwischen LAP und LTBP wird durch einen Disulfidaustausch zwischen der 8-Cys3-Domäne von LTBP mit einem Cysteinrestpaar des LAP-Proteins vermittelt (Gleizes, Beavis et al. 1996). Nur für drei der bisher 34 bekannten 8-Cys-Domänen, die in LTBP's und Fibrillinen gefunden wurden, ist nachgewiesen worden, dass sie den SLC binden können (Saharinen and Keski-Oja 2000). Die 8-Cys-Domänen erleichtern die Interaktion mit dem SLC, indem sie eine hydrophobe Oberfläche schaffen. Dies geht mit einer besseren Verfügbarkeit von Sulfhydrylgruppen einher. In fast allen Fällen erfolgt die Sezernierung des reifen TGF-beta-Moleküls gebunden an LAP und LTBP in Form eines LLC (Dallas, Park-Snyder et al. 1994; Taipale, Miyazono et al. 1994).

Im Extrazellulärraum (EZM) kann TGF-beta entweder mit Hilfe von LTBP mit der Matrix assoziieren und so als Depotform vorliegen oder als freier LLC mit latenten TGF-beta-Aktivatoren (siehe 2.3.3) interagieren (Rifkin 2005).

2.4.4 Bindungsaffinität der LTBP-Isoformen an den TGF-beta-Isoformen

Die 8-Cys3-Regionen von LTBP-1 und -3 können alle TGF-beta-Isoformen (1-3) binden. LTBP-2 bindet keines der drei TGF-beta-Isoformen. LTBP-4 zeichnet sich durch sein eher schwaches Bindungsvermögen an TGF-beta1 aus (Saharinen and Keski-Oja 2000; Rifkin 2005). Es wird die Vermutung dargelegt, dass diese Bindungsschwäche aufgrund der Substitution dreier Aminosäuren (Alanin, Serin und Arginin) entsteht. Durch die gezielte Deletion der genannten Aminosäuren konnte eine engere Bindung von LTBP-4 an das LAP-Protein (Bestandteil des SLC) nachgewiesen werden (Chen, Ali et al. 2005).

2.4.5 LTBP-Interaktionen mit der Matrix

LTBPs als Komponenten von Bindegewebsmikrofibrillen interagieren mit einer Vielzahl von Matrixkomponenten des Extrazellulärraums einschließlich Kollagen Typ IV und Fibronectin (Taipale, Saharinen et al. 1996). Die LTBP-Isoformen binden an den elastischen Fasern mit Hilfe ihres Zelladhäsionsmotivs, dem so genannten »RGD-Motiv« (Mangasser-Stephan and Gressner 1999). RGD, ein Arginin-Glycin-Aspartat-Tripeptid-Motiv, ist eine Integrin-Erkennungssequenz (Derynck, Jarrett et al. 1985) und kommt in vielen Extrazellulärmatrixproteinen vor.

LTBP-1, -2 und -4 werden effektiv in die Extrazellulärmatrix eingegliedert. Es ist bisher unklar, ob LTBP-3 nur in freier Form vorkommt (Penttinen, Saharinen et al. 2002). Die an die Matrix gebundenen LTBP-1- und -4-Isoformen halten TGF-beta in einer Depotform (siehe auch 2.4.6). Aus diesem Reservoir kann TGF-beta jederzeit über ein Aktivierungssignal freigesetzt werden (Hyytiainen, Penttinen et al. 2004). Die kovalente Bindung der LTBP-Isoformen an die Matrix erfolgt nach Sekretion unabhängig davon, ob die Moleküle frei oder gebunden an dem SLC (siehe 2.3.3) vorliegen (Taipale, Miyazono et al. 1994). Der größte Teil des sezernierten LTBP liegt gebunden an der Matrix vor, nur ein kleiner Teil verbleibt ungebunden (frei) (Taipale, Miyazono et al. 1994).

Der Bindungscharakter der LTBP-Isoformen mit der Matrix ist kovalent (feste Bindung). Das Bindungsvermögen der LTBPs wird über das N-terminale Ende der Proteinstruktur (siehe Abbildung 6 und Abbildung 9) vermittelt (Saharinen, Taipale et al. 1996; Unsold, Hyytiainen et al. 2001). Eine weitere Bindung des LTBP-1 und -4 mit der Matrixkomponente Fibrillin-1 und dessen N-terminale Region wird über die C-terminale Domäne der beiden genannten LTBP-Isoformen vermittelt (Isogai, Ono et al. 2003). Das Bindungsvermögen der LTBP-Isoformen an der Matrix wurde in unterschiedlichen Geweben und Zelllinien beschrieben. Die Interaktion von LTBP-1 mit der Extrazellulärmatrix wurde in verschiedenen Zelllinien (unter anderem Ratten-Mesangialzellen) eruiert. Sie erfolgt vermittelt durch N- und C-terminale Motive (Nunes, Gleizes et al. 1997; Hori, Katoh et al. 1998; Unsold, Hyytiainen

et al. 2001). LTBP-2 wurde 1995 in Ko-Lokalisation von elastischen Fasermikrofibrillen in bovinen Sehnen entdeckt (Gibson, Hatzinikolas et al. 1995). LTBP-3, das kleinste LTBP-Molekül, wurde bis heute in keiner Assoziation mit der Matrix gefunden (Hyytiainen, Penttinen et al. 2004). Es wird von den Zellen hauptsächlich im Komplex mit TGF-beta sezerniert und selten in freier Form, wie es bei den anderen Isoformen der Fall ist. Daraus wurde gefolgert, dass insbesondere LTBP-3 in einer Chaperonfunktion zu TGF-beta steht (Chen, Dabovic et al. 2002; Penttinen, Saharinen et al. 2002). Die Chaperonfunktion übernimmt ein Protein (LTBP-3), um die korrekte Faltung und den Transport eines anderen (TGF-beta) zu erleichtern. Genaue Interaktionen von LTBP-4 an der Matrix sind unbekannt. Die Bedeutung der Matrixinteraktion der LTBP-Isoformen für TGF-beta wird im nächsten Absatz genauer erläutert.

2.4.6 LTBP-biologische Funktion

Die LTBP-Isoformen haben übergeordnet zwei unterschiedliche biologische Funktionen. Sie sind aufgrund ihrer Struktur und ihrer Zugehörigkeit zu den Matrixproteinen wichtige Strukturkomponenten der Extrazellulärmatrix (siehe 2.4.5). Mindestens drei Mitglieder der LTBP-Familie (LTBP-1, -2 und -4) sind Bestandteile der ECM und an elastinhaltigen Mikrofibrillen lokalisiert.

Ferner werden sie als Modulatoren bezeichnet, die die Bioverfügbarkeit der TGF-beta-Isoformen regulieren (Rifkin 2005; Todorovic, Jurukovski et al. 2005).

Diese Erkenntnis erschließt sich aus den unterschiedlichen Teilfunktionen der LTBP-Isoformen. Die Expression der LTBP-Isoformen 1, 3 und 4 ist vermutlich koreguliert mit der TGF-beta1, 2 und 3-Expression (Taipale, Saharinen et al. 1996): Sie besitzen eine zentrale Rolle in der Prozessierung und Sekretion von TGF-beta aus der Zelle. In Abwesenheit von LTBP wird der »Small Latent Complex« (SLC) nur sehr langsam aus der Zelle sezerniert. Die Mehrzahl der SLC verbleibt im Golgi Apparat (Miyazono, Olofsson et al. 1991). In Assoziation des LTBP mit dem SLC entsteht der »Large Latent Complex« (LLC), der beschleunigt aus der Zelle gelangt.

Des Weiteren liegen freie latente TGF-beta-Moleküle in der ECM nur in geringer Konzentration vor. Sezernierte TGF-beta-Moleküle werden mit Hilfe der LTBP-Isoformen an der Extrazellulärmatrix gebunden und in Depotform gehalten (Dallas, Miyazono et al. 1995). Die proteolytische Spaltung von LTBP vom LLC ist essentiell für die TGF-beta-Aktivierung (Oklu and Hesketh 2000). Zudem besitzen sie die Fähigkeit, plasmin-sensitive Bereiche des LAP (Latency Associated Protein) zu maskieren. Dies erweitert zusätzlich ihre Fähigkeit, die Aktivierung von TGF-beta zu modulieren (Taipale, Miyazono et al. 1994). Eine weitere Funktion der LTBP liegt in der korrekten Faltung des TGF-beta-Moleküls. Dies wurde auch durch *in vitro*-Versuche belegt.

Die Koexpression von LTBP und dem SLC führte zu Komplexen mit Disulfidbrücken. In Abwesenheit von LTBP entstand eine aberrante Faltung des TGF-beta-Moleküls. Daraus resultierten modifizierte Bindungsaffinitäten des TGF-beta-Moleküls zu seinem LLC. Die Bindung von TGF-beta an der 8-Cys3-Domäne von LTBP führte zu einer exakten Faltung des SLC in der Zelle. Für diese Funktion werden die LTBP-Isoformen als Chaperonmoleküle bezeichnet (Miyazono, Olofsson et al. 1991; Annes, Chen et al. 2004).

Es werden null und hypomorphe Mutationen (d. h. zu 98 % knock out-Mäuse) für LTBP-2, -3 und -4 beschrieben. Anhand dieser Versuche konnten für jede LTBP-Isoform gewebespezifische Affinitäten und Funktionen festgestellt werden (Rifkin 2005).

LTBP-2 (-/-) Mäuse starben bereits in der frühen Phase der Gestation (Shiple, Mecham et al. 2000). Hierbei wurden Implantationsdefekte vermutet, die aufgrund der fehlenden LTBP-2 anti- (Hyytiainen and Keski-Oja 2003) und proadhäsiven (Vehvilainen, Hyytiainen et al. 2003) Eigenschaften entstehen.

LTBP-3 (-/-) Mäuse zeigten verschiedene phänotypische Abnormalitäten auf. Sie blieben fertil und überlebten zwei Jahre (Dabovic, Chen et al. 2002; Dabovic, Chen et al. 2002). Homozygote Mutanten entwickelten neben Entwicklungsemphysemen im Bereich der Lunge (Colarossi, Chen et al. 2005), Milz- und Thymusinvolution, eine Reduktion von CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen sowie diverse skelettale und kraniofaziale Deformationen wie etwa kraniale Vorwölbungen und verkürzte Röhrenknochen (Dabovic, Chen et al. 2002). Im fortschreitenden Alter wurden diese osteopetrotisch und polyarthritisch. Dies wurde auf eine veränderte TGF-beta-Signaltransduktion zurückgeführt (Yang, Chen et al. 2001). Die LTBP-3-null-Mäuse wiesen in diesen Geweben auf dem zellulären Level einen konstant niedrigen Level an TGF-beta auf.

LTBP-4 hypomorphe-(suppressierte) Mäuse zeigten Kolorektaladenokarzinome, Kardiomyopathie und eine abnormale Lungenentwicklung. Die genannten phänotypischen Ausprägungen werden auf profunde Defekte in den elastischen Faserstrukturen und auf eine verminderte Ausschleusung von TGF-beta in den Extrazellulärraum zurückgeführt. In immunhistochemischen Analysen von Darm, Herz und Lunge der LTBP-4 hypomorphen Tiere konnte ein Fehlen von extrazellulärem und matrixgebundenem TGF-beta nachgewiesen werden. Ebenso wurde in den Analysen gezeigt, dass TGF-beta intrazellulär in normaler Konzentration vorlag (Sterner-Kock, Thorey et al. 2002).

Die Existenz der drei strukturell verwandten LTBP-Isoformen (-1, -3 und -4) mit teilweise überlappenden Expressionsmustern und deren Fähigkeit, die TGF-beta-Isoformen jeweils unter anderen Affinitätsbedingungen zu binden, macht sie zu einer regulatorischen Einheit,

die von zentraler Bedeutung für die Bioverfügbarkeit von TGF-beta ist (Sterner-Kock, Thorey et al. 2002; Todorovic, Jurukovski et al. 2005).

2.4.6.1 Biologische Funktion von LTBP in der Karzinogenese epithelialer Neoplasien

Die Bedeutung der LTBP-Isoformen für den Karzinogeneseprozess ist weitestgehend ungeklärt. Es ist bekannt, dass neoplastisch transformierte Zellen epithelialer Gewebe eine vom Normalzustand abweichende Konzentration an TGF-beta produzieren. Ihnen fehlt ferner die Fähigkeit, TGF-beta aus der Zelle zu schleusen und matrixgebundene TGF-beta-Depots zu bilden. Da die LTBP-Isoformen für die Bioverfügbarkeit von TGF-beta von zentraler Bedeutung sind, ist es wahrscheinlich, dass sie in der Genese mammärer Neoplasien involviert sind. Einige Autoren vermuten die Ursache der gestörten TGF-beta-Verfügbarkeit in einer erniedrigten Produktion von LTBP in der Tumorzelle sowie einer dadurch erniedrigten Sezernierung des Moleküls in den EZR (Koli, Saharinen et al. 2001). Diese Hypothese wurde bisher für LTBP-4 anhand der »knock out-Modelle« in Adenokarzinomen des Darmes durch weiterführende immunhistochemische Nachweise des TGF-beta-Moleküls im Intra- und Extrazellulärraum bestätigt. Innerhalb der Zelle wurde eine normale Konzentration an TGF-beta gemessen. Die Konzentration im Extrazellulärraum war erniedrigt (Sterner-Kock, Thorey et al. 2002)

Roth-Eichhorn und Higashi untersuchten die Expression und Translation von LTBP-1 in Leberkarzinomen und in Ovarialkarzinomen. In Leberkarzinomen wurde eine im Vergleich zu normalem Lebergewebe erniedrigte Expression und Proteinbiosynthese von LTBP-1 festgestellt (Roth-Eichhorn, Heitmann et al. 2001). Im Unterschied dazu wurde bei einer größeren Anzahl an Ovarialkarzinomen eine stark erhöhte Expression von LTBP-1 nachgewiesen (Higashi, Sasagawa et al. 2001; Higashi, Kyo et al. 2006). Diese Erhöhung ist vermutlich auf einen Nukleotidpolymorphismus an dem LTBP-1-Promotor zurückzuführen (Higashi, Kyo et al. 2006).

Somit scheint die kontrollierte, zelluläre LTBP-Expression eine zentrale Rolle im Transformationsprozess epithelialer Zellen zu spielen.