

Erratum zur Dissertation „Experimentelle Beeinflussung des Wachstumsverhaltens der Leberkarzinom-Zelllinie HuH7 durch TGF-beta Rezeptormutanten“ von Frau Mignon-Denise Keyver-Paik

Entsprechend des Beschlusses der Hohen Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn vom 27.04.2017 wird die oben genannte Dissertation um ein Erratum ergänzt. Die Änderungen wurden durch Unterstrich gekennzeichnet.

Ss. 11/12:

Originalarbeit	Erratum
<p>1.3.1 TGF-beta Rezeptor Typ I und Typ II 1.3.1.1 Die extrazelluläre Region Die TGF-beta Typ I und II Rezeptoren sind transmembranäre Glykoproteine (Lin et al., 1992; Mathews et al., 1991). Die extrazelluläre Region besteht aus etwa 150 Aminosäuren (AS) und ist N-glycosyliert (Cheifetz et al., 1988).</p> <p>1.3.1.2 Die juxtamembranäre zytoplasmatische Seite Obwohl die juxtamembranäre zytoplasmatische Seite der Rezeptoren keine herausragenden strukturellen Eigenschaften zeigt, so sind Ser213 in TGFβRII und Ser165 in TGFβRI von besonderer Bedeutung. Ser213 in TGFβRII wird von der Rezeptor Kinase Liganden-unabhängig autophosphoryliert und ist für die Signalgebung des Rezeptors notwendig (Luo et al., 1997). Ser165 in TGFβRI hingegen wird Liganden abgängig durch den TGF beta Rezeptor Typ II phosphoryliert und scheint so die Intensität der Zellantwort zu modulieren (Souchelnytskyi et al., 1996).</p> <p>1.3.1.3 Die GS Domäne von TGFβRI Die GS Domäne ist eine hoch konservierte, dem Typ I Rezeptor eigene, 30 AS Region, welche ihren Namen der charakteristischen SGS GSG Sequenz verdankt. Die Phosphorylierung der</p>	<p>1.3.1 TGF-beta Rezeptor Typ I und Typ II 1.3.1.1 Die extrazelluläre Region In der Übersichtsarbeit von Massagué J. werden <u>die TGF-beta Typ I und II Rezeptoren unter Hinweis der im Abschnitt 1.3.1.1. bis 1.3.1.4. genannten Originalarbeiten wie folgt beschrieben (Massagué et al., 1998):</u> Die TGF-beta Typ I und II Rezeptoren sind transmembranäre Glykoproteine (Lin et al., 1992; Mathews et al., 1991). Die extrazelluläre Region besteht aus etwa 150 Aminosäuren (AS) und ist N-glycosyliert (Cheifetz et al., 1988).</p> <p>1.3.1.2 Die juxtamembranäre zytoplasmatische Seite Obwohl die juxtamembranäre zytoplasmatische Seite der Rezeptoren keine herausragenden strukturellen Eigenschaften zeigt, so sind Ser213 in TGFβRII und Ser165 in TGFβRI von besonderer Bedeutung. Ser213 in TGFβRII wird von der Rezeptor Kinase Liganden-unabhängig autophosphoryliert und ist für die Signalgebung des Rezeptors notwendig (Luo et al., 1997). Ser165 in TGFβRI hingegen wird Liganden abgängig durch den TGF beta Rezeptor Typ II phosphoryliert und scheint so die Intensität der Zellantwort zu modulieren (Souchelnytskyi et al., 1996).</p>

<p>Serine und Threonine in der TTSGSGSG Sequenz von TGFβRI durch den Typ II Rezeptor aktiviert das Signal (Souchelnytskyi et al., 1996; Wieser et al., 1995; Wrana et al., 1994). Die vorletzte AS in der GS Domäne, an der Grenze zur nachfolgenden Kinase des Rezeptors, ist immer ein Threonin oder Glutamin. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation dieser AS zu Glutamat oder Aspartat (saure AS mit elektronegativen Eigenschaften) zu der Entwicklung eines konstitutiv aktiven Rezeptors führt, dessen Signalgebung sowohl von der Anwesenheit eines Liganden, als auch vom Typ II Rezeptors unabhängig ist (Wieser et al., 1995).</p> <p>1.3.1.4 Die Rezeptor Kinase</p> <p>Weiter downstream in der AS Sequenz besitzen sowohl Rezeptor I als auch Rezeptor II eine Rezeptor Kinase, die das katalytische Zentrum der Rezeptoren enthält. In Typ I Rezeptoren finden durch die aktivierte Rezeptor Kinase die Phosphorylierungen des Substrats -SMAD-Proteine- an der AS Serin statt (Kretschmar et al., 1997; Macias-Silva et al., 1996). Typ II Rezeptoren benutzen die Kinase zur Liganden abhängigen Phosphorylierung von Typ I Rezeptoren an Serin und Threonin Stellen und zur konstitutiv aktiven Autophosphorylierung dieser Residuen (Lin et al., 1992; Luo et al., 1997; Wrana et al., 1994)</p>	<p>1.3.1.3 Die GS Domäne von TGFβRI</p> <p>Die GS Domäne ist eine hoch konservierte, dem Typ I Rezeptor eigene, 30 AS Region, welche ihren Namen der charakteristischen SGSGSG Sequenz verdankt. Die Phosphorylierung der Serine und Threonine in der TTSGSGSG Sequenz von TGFβRI durch den Typ II Rezeptor aktiviert das Signal (Souchelnytskyi et al., 1996; Wieser et al., 1995; Wrana et al., 1994). Die vorletzte AS in der GS Domäne, an der Grenze zur nachfolgenden Kinase des Rezeptors, ist immer ein Threonin oder Glutamin. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation dieser AS zu Glutamat oder Aspartat (saure AS mit elektronegativen Eigenschaften) zu der Entwicklung eines konstitutiv aktiven Rezeptors führt, dessen Signalgebung sowohl von der Anwesenheit eines Liganden, als auch vom Typ II Rezeptors unabhängig ist (Wieser et al., 1995).</p> <p>1.3.1.4 Die Rezeptor Kinase</p> <p>Weiter downstream in der AS Sequenz besitzen sowohl Rezeptor I als auch Rezeptor II eine Rezeptor Kinase, die das katalytische Zentrum der Rezeptoren enthält. In Typ I Rezeptoren finden durch die aktivierte Rezeptor Kinase die Phosphorylierungen des Substrats -SMAD-Proteine- an der AS Serin statt (Kretschmar et al., 1997; Macias-Silva et al., 1996). Typ II Rezeptoren benutzen die Kinase zur Liganden abhängigen Phosphorylierung von Typ I Rezeptoren an Serin und Threonin Stellen und zur konstitutiv aktiven Autophosphorylierung dieser Residuen (Lin et al., 1992; Luo et al., 1997; Wrana et al., 1994)</p>
--	--

Ss. 14/15:

Originalarbeit	Erratum
1.4 Die TGF-beta Rezeptor Substrate:	1.4 Die TGF-beta Rezeptor Substrate:

Smad Proteine

In Drosophila wurden 1995 neue zytoplasmatischer Signalproteine entdeckt, die so genannten Mother against decapentaplegic (MAD) Proteine (Raftery et al., 1995; Sekelsky et al., 1995). Es folgte die Identifizierung weiterer homologer Proteine in C. elegans, die im Folgenden als sma Proteine (für „small“) bezeichnet wurden (Savage et al., 1996). Auch in humanen Zellen wurden letztendlich homologe Proteine nachgewiesen, die als sma/MAD verwandte Proteine, als Smads bezeichnet wurden.

Diese Proteine werden nach Aktivierung des TGF-beta Rezeptors phosphoryliert, sammeln sich im Nukleus und aktivieren die Transkription (Lagna et al., 1996; Liu et al., 1996; Zhang et al., 1996). Die Smad Proteine stellen also die zytoplasmatische Signaltransduktionskette downstream der Rezeptorebene dar.

Bis heute wurden 9 dieser Smads in Vertebraten identifiziert, für die zytoplasmatische Signaltransduktion der TGF-beta Rezeptoren von Bedeutung sind allerdings nicht alle, da die Substrate rezeptorspezifisch agieren (Wrana, 1998).

Die Einteilung der Smads erfolgt in 3 Gruppen: Die so genannten R-Smads (Smad2 und Smad3) sind Rezeptor regulierte Proteine, die in der Signaltransduktion direkt von TGFβRI phosphoryliert werden. Co-Smads sind Smad4 Proteine, die mit aktivierten R-Smads Heterodimere bilden und so in die Signaltransduktion eingreifen. Inhibitorische Smads sind Smad6 und Smad7, sie können die Signaltransduktion blockieren (Massague, 1998).

1.4.1.1 Struktur der Smads

Im Basalstatus bilden die Smads Homo-oligomere und sind inaktiviert durch Interaktion zwischen der MH1 (N-terminal) und MH2 (C-terminal) Domäne (Baker et al., 1996; Kim et al.,

Smad Proteine

In der Übersichtsarbeit von Massagué J. werden die TGF-beta Rezeptor Substrate (Smad Proteine) unter Hinweis der im Abschnitt 1.4. bis 1.4.1.1. genannten Originalarbeiten wie folgt beschrieben (Massagué et al., 1998):

In Drosophila wurden 1995 neue zytoplasmatischer Signalproteine entdeckt, die so genannten Mother against decapentaplegic (MAD) Proteine (Raftery et al., 1995; Sekelsky et al., 1995). Es folgte die Identifizierung weiterer homologer Proteine in C. elegans, die im Folgenden als sma Proteine (für „small“) bezeichnet wurden (Savage et al., 1996). Auch in humanen Zellen wurden letztendlich homologe Proteine nachgewiesen, die als sma/MAD verwandte Proteine, als Smads bezeichnet wurden.

Diese Proteine werden nach Aktivierung des TGF-beta Rezeptors phosphoryliert, sammeln sich im Nukleus und aktivieren die Transkription (Lagna et al., 1996; Liu et al., 1996; Zhang et al., 1996). Die Smad Proteine stellen also die zytoplasmatische Signaltransduktionskette downstream der Rezeptorebene dar.

Bis heute wurden 9 dieser Smads in Vertebraten identifiziert, für die zytoplasmatische Signaltransduktion der TGF-beta Rezeptoren von Bedeutung sind allerdings nicht alle, da die Substrate rezeptorspezifisch agieren (Wrana, 1998).

Die Einteilung der Smads erfolgt in 3 Gruppen: Die so genannten R-Smads (Smad2 und Smad3) sind Rezeptor regulierte Proteine, die in der Signaltransduktion direkt von TGFβRI phosphoryliert werden. Co-Smads sind Smad4 Proteine, die mit aktivierten R-Smads Heterodimere bilden und so in die Signaltransduktion eingreifen. Inhibitorische Smads sind Smad6 und Smad7, sie können die Signaltransduktion blockieren (Massague, 1998).

<p>1997; Liu et al., 1996). Rezeptor regulierte Smads binden über die MH2 Domäne an den aktivierten Typ I Rezeptor und werden am C-terminalen Ende im SS(V/M)S Motiv phosphoryliert (Kretzschmar et al., 1997; Macias-Silva et al., 1996). In diesem aktivierten Status assoziieren sie mit Smad4 und mit DNA-bindenden Proteinen über die MH2 Domäne (Chen et al., 1997; Hata et al., 1997; Liu et al., 1997). Die MH1 Domäne besitzt DNA-bindende Eigenschaften, während das MH2 terminale Ende an der Aktivierung der Transkription beteiligt ist (Liu et al., 1997). In der Linker Region besitzen Smads eine MAP Kinase Phosphorylierungsstelle, über die die Akkumulation von Smads im Nukleus inhibiert werden kann (Kretzschmar et al., 1999).</p>	<p>1.4.1.1 Struktur der Smads</p> <p>Im Basalstatus bilden die Smads Homooligomere und sind inaktiviert durch Interaktion zwischen der MH1 (N-terminal) und MH2 (C-terminal) Domäne (Baker et al., 1996; Kim et al., 1997; Liu et al., 1996). Rezeptor regulierte Smads binden über die MH2 Domäne an den aktivierten Typ I Rezeptor und werden am C-terminalen Ende im SS(V/M)S Motiv phosphoryliert (Kretzschmar et al., 1997; Macias-Silva et al., 1996). In diesem aktivierten Status assoziieren sie mit Smad4 und mit DNA-bindenden Proteinen über die MH2 Domäne (Chen et al., 1997; Hata et al., 1997; Liu et al., 1997). Die MH1 Domäne besitzt DNA-bindende Eigenschaften, während das MH2 terminale Ende an der Aktivierung der Transkription beteiligt ist (Liu et al., 1997). In der Linker Region besitzen Smads eine MAP Kinase Phosphorylierungsstelle, über die die Akkumulation von Smads im Nukleus inhibiert werden kann (Kretzschmar et al., 1999).</p>
--	---

Ss. 19/20

Originalarbeit	Erratum
<p>1.5 Genexpression unter TGF-beta Kontrolle</p> <p>Unter direkter Kontrolle des TGF-beta Signaltransduktionswegs stehen vor allem zwei Gene: über ein unbekanntes Protein das humane PAI-1 Gen und über CRE bindendes Protein die Expression seiner Zielsequenz (Kramer et al., 1991; Riccio et al., 1992). Alle anderen Wirkungen von TGF-beta nehmen ihren Weg über die Synthese von Transkriptionsfaktoren, wie c-jun oder jun-B (AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplex) oder die Herunterregulation von Proteinen wie c-myc oder B-myb (Li et al., 1990; Pertovaara et al., 1989; Pietenpol et al., 1990)</p>	<p>1.5 Genexpression unter TGF-beta Kontrolle</p> <p><u>Die Genexpression unter TGF-beta Kontrolle wird von Taipale et al. unter Bezugnahme auf die in diesem Abschnitt genannten Originalarbeiten wie folgt beschrieben (Taipale et al., 1998):</u></p> <p>Unter direkter Kontrolle des TGF-beta Signaltransduktionswegs stehen vor allem zwei Gene: über ein unbekanntes Protein das humane PAI-1 Gen und über CRE bindendes Protein die Expression seiner Zielsequenz (Kramer et al., 1991; Riccio et al., 1992). Alle anderen Wirkungen von TGF-beta nehmen ihren Weg über die Synthese von Transkriptionsfaktoren,</p>

<p>(Pietenpol et al., 1990). Darüber hinaus kann vermehrte TGF-beta Wirkung die Halbwertszeit von mRNA der extrazellulären Matrix verlängern, oder mRNA über Induktion von entsprechenden Proteinen stabilisieren (Amara et al., 1995; Penttinen et al., 1988). All dies sind weitere Beispiele für die außerordentlich komplexen Interaktionen des TGF-beta Systems mit anderen Kaskaden. Auf eine weitere ausführliche Erörterung muss an dieser Stelle verzichtet werden.</p>	<p>wie c-jun oder jun-B (AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplex) oder die Herunterregulation von Proteinen wie c-myc oder B-myb (Li et al., 1990; Pertovaara et al., 1989; Pietenpol et al., 1990) (Pietenpol et al., 1990). Darüber hinaus kann vermehrte TGF-beta Wirkung die Halbwertszeit von mRNA der extrazellulären Matrix verlängern, oder mRNA über Induktion von entsprechenden Proteinen stabilisieren (Amara et al., 1995; Penttinen et al., 1988). All dies sind weitere Beispiele für die außerordentlich komplexen Interaktionen des TGF-beta Systems mit anderen Kaskaden. Auf eine weitere ausführliche Erörterung muss an dieser Stelle verzichtet werden.</p>
<p>1.6 Biologische Effekte von TGF-beta</p> <p>Die drei hauptsächlichen TGF-beta Effekte sind die Wachstumsinhibition epithelialer, endothelialer und hämatopoetischer Zellen, die Stimulation extrazellulärer Matrix und die Immunsuppression. Einige Besonderheiten sollen im Folgenden kurz angesprochen werden, auf die antiproliferative Wirkung wird im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit näher eingegangen.</p> <p>1.6.1 Zell Bewegungen</p> <p>TGF-beta wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und Monozyten, unterdrückt jedoch die lokale Motilität endothelialer Zellen (Parekh et al., 1994; Sato et al., 1989; Wahl et al., 1987).</p> <p>1.6.2 Synthese und Degradation extrazellulärer Matrix</p> <p>TGF-beta wirkt fördernd auf die Formation extrazellulärer Matrix</p> <ul style="list-style-type: none"> durch die Synthese von embryonalen Matrix Proteinen wie Tenascin, Thrombospondin, Fibronectin und von maturen Matrix Proteinen wie Elastin und Kollagen I (Bassols et al., 1988; Ignatz et al., 1987; Koli et al., 1991; Pearson et al., 1988; Penttinen et al., 1988; Raghov et al., 1987). 	<p>1.6 Biologische Effekte von TGF-beta</p> <p>Die drei biologischen TGF-beta Effekte werden durch Taibale et al. unter Bezugnahme auf die im Abschnitt 1.6 bis 1.6.3 genannten Originalarbeiten wie folgt beschrieben:</p> <p>Die drei hauptsächlichen TGF-beta Effekte sind die Wachstumsinhibition epithelialer, endothelialer und hämatopoetischer Zellen, die Stimulation extrazellulärer Matrix und die Immunsuppression. Einige Besonderheiten sollen im Folgenden kurz angesprochen werden, auf die antiproliferative Wirkung wird im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit näher eingegangen.</p> <p>1.6.1 Zell Bewegungen</p> <p>TGF-beta wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und Monozyten, unterdrückt jedoch die lokale Motilität endothelialer Zellen (Parekh et al., 1994; Sato et al., 1989; Wahl et al., 1987).</p> <p>1.6.2 Synthese und Degradation extrazellulärer Matrix</p> <p>TGF-beta wirkt fördernd auf die Formation extrazellulärer Matrix</p> <ul style="list-style-type: none"> durch die Synthese von embryonalen Matrix Proteinen wie Tenascin, Thrombospondin, Fibronectin und von maturen Matrix Proteinen

- durch die Modulation der Expression von Rezeptoren der extrazellulären Matrix: Fibronectin, Vitronectin, Kollagen I, III, V, VI, Laminin (Heino et al., 1989) (Heino et al., 1989; Ignatz et al., 1987).

- durch die Suppression der Expression von Proteinase: Plasminogen Aktivatoren, Kollagenasen, Stromelysin (Edwards et al., 1987; Kerr et al., 1990; Laiho et al., 1986).

- durch die Induktion von Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) 1, Tissue Inhibitor Metalloproteinase (TIMP) 1 und Cystatin C (Edwards et al., 1987; Laiho et al., 1986; Solem et al., 1990).

TGF-beta induziert fibrotische und entzündliche Reaktionen des Gewebes, wahrscheinlich durch die gleichzeitige Stimulation der Fibroblasten und der Chemotaxis proinflammatorischer Zellen, der Inhibition epithelialer Regeneration und der Induktion extrazellulärer Matrix (Roberts et al., 1980; Sanderson et al., 1995). Die entscheidende Rolle von TGF-beta konnte in mehreren bekannten Krankheiten belegt werden, in denen es zu einer sklerösen oder fibrotischen Veränderung von Gewebe kommt. Von besonderem Interesse ist hier die Leberzirrhose (Castilla et al., 1991; Czaja et al., 1989).

1.6.3 Immunsuppression

TGF-beta Zytokine sind im hohen Maße immunsuppressiv, sie inhibieren die Proliferation und Effektorfunktionen von T-, B- und NK-Zellen und Makrophagen (Letterio et al., 1998). Man vermutet, dass die Induktion von TGF-beta Zytokinen eine zentrale Rolle in der Vermittlung der antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung von Medikamenten wie Retinoiden und Glucocorticoiden spielt (Glick et al., 1989; Koli et al., 1993; Oursler et al., 1993).

wie Elastin und Kollagen I (Bassols et al., 1988; Ignatz et al., 1987; Koli et al., 1991; Pearson et al., 1988; Penttinen et al., 1988; Raghov et al., 1987).

- durch die Modulation der Expression von Rezeptoren der extrazellulären Matrix: Fibronectin, Vitronectin, Kollagen I, III, V, VI, Laminin (Heino et al., 1989) (Heino et al., 1989; Ignatz et al., 1987).

- durch die Suppression der Expression von Proteinase: Plasminogen Aktivatoren, Kollagenasen, Stromelysin (Edwards et al., 1987; Kerr et al., 1990; Laiho et al., 1986).

- durch die Induktion von Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) 1, Tissue Inhibitor Metalloproteinase (TIMP) 1 und Cystatin C (Edwards et al., 1987; Laiho et al., 1986; Solem et al., 1990).

TGF-beta induziert fibrotische und entzündliche Reaktionen des Gewebes, wahrscheinlich durch die gleichzeitige Stimulation der Fibroblasten und der Chemotaxis proinflammatorischer Zellen, der Inhibition epithelialer Regeneration und der Induktion extrazellulärer Matrix (Roberts et al., 1980; Sanderson et al., 1995). Die entscheidende Rolle von TGF-beta konnte in mehreren bekannten Krankheiten belegt werden, in denen es zu einer sklerösen oder fibrotischen Veränderung von Gewebe kommt. Von besonderem Interesse ist hier die Leberzirrhose (Castilla et al., 1991; Czaja et al., 1989).

1.6.3 Immunsuppression

TGF-beta Zytokine sind im hohen Maße immunsuppressiv, sie inhibieren die Proliferation und Effektorfunktionen von T-, B- und NK-Zellen und Makrophagen (Letterio et al., 1998). Man vermutet, dass die Induktion von TGF-beta Zytokinen eine zentrale Rolle in der Vermittlung der antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung von Medikamenten wie Retinoiden und Glucocorticoiden spielt (Glick

	et al., 1989; Koli et al., 1993; Oursler et al., 1993).
--	---

Ss. 24-28:

Originalarbeit	Erratum
<p>1.7.1.1 Veränderungen der TGF-beta Rezeptor Signalgebung</p> <p>Somatische Mutationen im Gen des TGF-beta Typ II Rezeptors (TGFB2) werden besonders in Patienten mit HNPCC (hereditary non-polyposis colon cancer) vorgefunden. Hier kommt es in einer Frequenz von 10 Adeninen des Gens zu einer Mutation (zumeist eine Deletion), die zu einer Leserasterverschiebung und zu einem trunkierten, funktionslosen TGFβRII führt (Lu et al., 1996; Markowitz et al., 1995; Myeroff et al., 1995).</p> <p>TGFB2 Mutationen kommen jedoch auch in anderen Karzinomen relativ häufig vor. So weiß man, dass bis zu 25% aller Kolonkarzinome inaktivierende Mutationen im TGFβRII Rezeptor tragen. Aber auch andere gastrale Tumore, Gliome und andere zeigen häufig die Abrogation des TGF-beta Signalwegs auf dieser ersten Ebene (Izumoto et al., 1997) (Myeroff et al., 1995; Reiss, 1999).</p> <p>TGFB1 Mutationen kommen ebenfalls, wenn auch nicht in der gleichen Häufigkeit vor. Bekannt sind sie von Ovarialkarzinomen und Metastasen von Mammakarzinomen, sowie Pankreaskarzinomen und T-Zell-Lymphomen (Chen et al., 1998) (Chen et al., 2001; Goggins et al., 1998; Schieman et al., 1999; Wang et al., 2000). Eine gleichzeitige Inaktivierung von TGFβRI und TGFβRII dagegen konnte bis jetzt nicht gezeigt werden (Wang et al., 2000).</p> <p>Eine weitere Möglichkeit des Signalverlustes liegt in der verminderten Expression des Typ II Rezeptors. Dies könnte beispielsweise durch</p>	<p>1.7.1.1 Veränderungen der TGF-beta Rezeptor Signalgebung</p> <p><u>Die Veränderungen der TGF-beta Rezeptor Signalgebung werden in der Übersichtsarbeit von Derynck et al. unter Bezugnahme auf die in den Abschnitten 1.7.1.1. bis 1.7.2 genannten Originalarbeiten wie folgt beschrieben:</u></p> <p>Somatische Mutationen im Gen des TGF-beta Typ II Rezeptors (TGFB2) werden besonders in Patienten mit HNPCC (hereditary non-polyposis colon cancer) vorgefunden. Hier kommt es in einer Frequenz von 10 Adeninen des Gens zu einer Mutation (zumeist eine Deletion), die zu einer Leserasterverschiebung und zu einem trunkierten, funktionslosen TGFβRII führt (Lu et al., 1996; Markowitz et al., 1995; Myeroff et al., 1995).</p> <p>TGFB2 Mutationen kommen jedoch auch in anderen Karzinomen relativ häufig vor. So weiß man, dass bis zu 25% aller Kolonkarzinome inaktivierende Mutationen im TGFβRII Rezeptor tragen. Aber auch andere gastrale Tumore, Gliome und andere zeigen häufig die Abrogation des TGF-beta Signalwegs auf dieser ersten Ebene (Izumoto et al., 1997) (Myeroff et al., 1995; Reiss, 1999).</p> <p>TGFB1 Mutationen kommen ebenfalls, wenn auch nicht in der gleichen Häufigkeit vor. Bekannt sind sie von Ovarialkarzinomen und Metastasen von Mammakarzinomen, sowie Pankreaskarzinomen und T-Zell-Lymphomen (Chen et al., 1998) (Chen et al., 2001; Goggins et al., 1998; Schieman et al., 1999; Wang et al., 2000). Eine gleichzeitige Inaktivierung von</p>

verminderte Transkriptionsfaktoren oder einer Mutation in der Promotorregion des Gens verursacht werden (Kim et al., 2000). Interessanter Weise muss eine herabgesetzte TGF β RII Funktion dabei nicht den totalen Ausfall aller TGF-beta vermittelten Effekte bedeuten. Häufig ist allein die Wachstumsinhibition gestört. Dies könnte an einer unterschiedlichen Schwellenwirkung der TGF-beta Antwort für die verschiedenen Effekte liegen (Chen et al., 1993; Fafeur et al., 1993; Feng et al., 1995; Geiser et al., 1992; Portella et al., 1998; Wieser et al., 1993).

Die Rolle des TGF β RII als Tumorsuppressor konnte indes eindrucksvoll durch verschiedene Experimente belegt werden. So führt die Wiedereinführung eines Wildtyp (wt) TGF β RII in TGFBR2 defekte Kolon- oder Mammakarzinomzellen und die Überexpression von TGF β RII in Schilddrüsenkarzinomen sowohl zu einer Wachstumsinhibition als auch zu einer Unterdrückung des verankerungsunabhängigen Wachstums der Zellen (Sun et al., 1994; Turco et al., 1999; Wang et al., 1995). Andererseits führt ein eingeführter dominant negativer TGF β RII in der Haut oder in der Brustdrüse von Mäusen zu erhöhtem Tumoraufkommen (Bottinger et al., 1997; Go et al., 1999).

Schlussendlich korreliert eine verminderte Expression von TGF β RII mit höherem Grading in menschlichen Tumoren und in Experimenten (Kim et al., 2000; Kim et al., 2001; Tang et al., 1999; Venkatasubbarao et al., 2000).

1.7.1.2 Smads als Tumorsuppressoren

Mutationen hat man in den Genen für Smad4 (MADH4) und Smad2 (MADH2), aber nicht in Smad3, Smad7 oder Smad6 in verschiedenen Karzinomen vorgefunden (Hata et al., 1998; Massague et al., 2000). Häufig ist die Deletion von MADH4 in Pankreaskarzinomen, in denen sie zuerst entdeckt wurden (Hahn et al., 1996).

TGF β RI und TGF β RII dagegen konnte bis jetzt nicht gezeigt werden (Wang et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit des Signalverlustes liegt in der verminderten Expression des Typ II Rezeptors. Dies könnte beispielsweise durch verminderte Transkriptionsfaktoren oder einer Mutation in der Promotorregion des Gens verursacht werden (Kim et al., 2000). Interessanter Weise muss eine herabgesetzte TGF β RII Funktion dabei nicht den totalen Ausfall aller TGF-beta vermittelten Effekte bedeuten. Häufig ist allein die Wachstumsinhibition gestört. Dies könnte an einer unterschiedlichen Schwellenwirkung der TGF-beta Antwort für die verschiedenen Effekte liegen (Chen et al., 1993; Fafeur et al., 1993; Feng et al., 1995; Geiser et al., 1992; Portella et al., 1998; Wieser et al., 1993).

Die Rolle des TGF β RII als Tumorsuppressor konnte indes eindrucksvoll durch verschiedene Experimente belegt werden. So führt die Wiedereinführung eines Wildtyp (wt) TGF β RII in TGFBR2 defekte Kolon- oder Mammakarzinomzellen und die Überexpression von TGF β RII in Schilddrüsenkarzinomen sowohl zu einer Wachstumsinhibition als auch zu einer Unterdrückung des verankerungsunabhängigen Wachstums der Zellen (Sun et al., 1994; Turco et al., 1999; Wang et al., 1995). Andererseits führt ein eingeführter dominant negativer TGF β RII in der Haut oder in der Brustdrüse von Mäusen zu erhöhtem Tumoraufkommen (Bottinger et al., 1997; Go et al., 1999).

Schlussendlich korreliert eine verminderte Expression von TGF β RII mit höherem Grading in menschlichen Tumoren und in Experimenten (Kim et al., 2000; Kim et al., 2001; Tang et al., 1999; Venkatasubbarao et al., 2000).

1.7.1.2 Smads als Tumorsuppressoren

Mutationen hat man in den Genen für Smad4 (MADH4) und Smad2 (MADH2), aber nicht in

Auch Kolonkarzinome zeigen eine deutliche Frequenz MADH4 mutierter Tumore, in anderen Karzinomen sind sie jedoch deutlich seltener anzutreffen als Mutationen der Rezeptoren (Hata et al., 1998; Massague et al., 2000). MADH2 deletierte Tumoren sind selten, und kommen in kolorektalen und pulmonalen Neoplasien vor (Eppert et al., 1996; Ohtaki et al., 2001; Takagi et al., 1998; Yakicier et al., 1999).

Die Rolle besonders von Smad4 als Tumorrepressor konnte in Studien gezeigt werden, die belegten, dass die Mutation beider Allele gehäuft in Pankreas und Kolonkarzinomen vorkommt, und schon der Defekt eines Allels zur Progression des Karzinoms beiträgt (Luttges et al., 2001; Xu et al., 2000). In heterozygot MADH4 deletierten Mäusen (die homozygote Form ist intrauterin letal), die zusätzlich ein inaktiviertes Gen der polypösen adenomatosis coli (Apc) tragen, führt der Verlust der Wildtyp Allele zur Entstehung multipler Polypen, die jedoch schnell in heterogene invasive Adenokarzinome progredient sind (Takaku et al., 1998).

Problematisch ist vor allen Dingen die selektive Abrogation der Wachstumsinhibition der Zellen, während eine Restantwort erhalten bleibt. Vier Beispiele:

- Die tumorsuppressive Wirkung von Smad2 erklärt sich durch seine Schlüsselrolle in der Induktion der Expression der CDK Inhibitoren p21 CIP1 und p15 INK4B. Mutationen in Smad2 könnten so die Zyklusarretierung inaktivieren, so dass die Zellen resistent gegen TGF-beta vermittelte Wachstumsinhibition sind. Andere TGF-beta Funktionen können jedoch weiter auch über den Smad3 Weg ablaufen, und so der Zelle entscheidenden Vorteil in der Karzinogenese bringen, beispielsweise durch die weitere Induktion Extrazellulärer Matrix Proteine (Feng et al., 2000; Pardali et al., 2000).

- Fehlende Smad4 Expression scheint

Smad3, Smad7 oder Smad6 in verschiedenen Karzinomen vorgefunden (Hata et al., 1998; Massague et al., 2000). Häufig ist die Deletion von MADH4 in Pankreaskarzinomen, in denen sie zuerst entdeckt wurden (Hahn et al., 1996). Auch Kolonkarzinome zeigen eine deutliche Frequenz MADH4 mutierter Tumore, in anderen Karzinomen sind sie jedoch deutlich seltener anzutreffen als Mutationen der Rezeptoren (Hata et al., 1998; Massague et al., 2000). MADH2 deletierte Tumoren sind selten, und kommen in kolorektalen und pulmonalen Neoplasien vor (Eppert et al., 1996; Ohtaki et al., 2001; Takagi et al., 1998; Yakicier et al., 1999).

Die Rolle besonders von Smad4 als Tumorrepressor konnte in Studien gezeigt werden, die belegten, dass die Mutation beider Allele gehäuft in Pankreas und Kolonkarzinomen vorkommt, und schon der Defekt eines Allels zur Progression des Karzinoms beiträgt (Luttges et al., 2001; Xu et al., 2000). In heterozygot MADH4 deletierten Mäusen (die homozygote Form ist intrauterin letal), die zusätzlich ein inaktiviertes Gen der polypösen adenomatosis coli (Apc) tragen, führt der Verlust der Wildtyp Allele zur Entstehung multipler Polypen, die jedoch schnell in heterogene invasive Adenokarzinome progredient sind (Takaku et al., 1998).

Problematisch ist vor allen Dingen die selektive Abrogation der Wachstumsinhibition der Zellen, während eine Restantwort erhalten bleibt. Vier Beispiele:

- Die tumorsuppressive Wirkung von Smad2 erklärt sich durch seine Schlüsselrolle in der Induktion der Expression der CDK Inhibitoren p21 CIP1 und p15 INK4B. Mutationen in Smad2 könnten so die Zyklusarretierung inaktivieren, so dass die Zellen resistent gegen TGF-beta vermittelte Wachstumsinhibition sind. Andere TGF-beta Funktionen können jedoch weiter auch über den Smad3 Weg ablaufen, und so der Zelle

ebenfalls entgegen der allgemeinen Auffassung nicht zu einer kompletten Abrogation der Zellantwort auf TGF-beta zu führen. Auch vollständig deletierte Zellen zeigen noch einen Rest der Antwort. So wird vermutet, dass die hohe Frequenz MADH4 deletierter Tumore durch einen Selektivenvorteil der Teilabrogation des TGF-beta Signals in der Karzinogenese zu erklären ist (Dai et al., 1999; Fink et al., 2001; Hocevar et al., 1999).

- Darüber hinaus soll die fehlende Smad4 Expression zu einer Hochregulation des Ras Systems führen und so die Progression in weiter entdifferenzierte Tumoren ermöglichen (Iglesias et al., 2000).

- Smad7 Überexpression in Zellen führt zu einer Resistenz gegen Wachstumsinhibition, ohne das TGF-beta induzierte oberflächenverankerungsabhängige Wachstum und die Tumorigenität der Zellen zu beeinflussen (Kleeff et al., 1999). Ein klarer Selektivenvorteil der Zellen.

1.7.2 TGF-beta als Promotor der Karzinogenese

Trotz der Tumorsuppressor Eigenschaften von TGF-beta produzieren gerade viele epitheliale Tumorzellen selbst diesen Wachstumsfaktor (Derynck et al., 1987; Dickson et al., 1987). Außerdem werden im Umfeld von tumorig transdifferenzierten Zellen und an Orten invasiven Zellwachstums vermehrt Plasminogen, Metalloproteinasen und Integrine freigesetzt, die zu einer vermehrten Aktivierung von TGF-beta führen (Munger et al., 1999; Sato et al., 1989; Yu et al., 2000).

Es konnte bewiesen werden, dass das Zytokin auch eine Rolle als Promotor der Karzinogenese spielt und dass besonders die selektive Überwindung der Wachstumsinhibition und gleichzeitige auto- oder parakrine Stimulation durch TGFβ der Zelle Selektivenvorteile

entscheidenden Vorteil in der Karzinogenese bringen, beispielsweise durch die weitere Induktion Extrazellulärer Matrix Proteine (Feng et al., 2000; Pardali et al., 2000).

- Fehlende Smad4 Expression scheint ebenfalls entgegen der allgemeinen Auffassung nicht zu einer kompletten Abrogation der Zellantwort auf TGF-beta zu führen. Auch vollständig deletierte Zellen zeigen noch einen Rest der Antwort. So wird vermutet, dass die hohe Frequenz MADH4 deletierter Tumore durch einen Selektivenvorteil der Teilabrogation des TGF-beta Signals in der Karzinogenese zu erklären ist (Dai et al., 1999; Fink et al., 2001; Hocevar et al., 1999).

- Darüber hinaus soll die fehlende Smad4 Expression zu einer Hochregulation des Ras Systems führen und so die Progression in weiter entdifferenzierte Tumoren ermöglichen (Iglesias et al., 2000).

- Smad7 Überexpression in Zellen führt zu einer Resistenz gegen Wachstumsinhibition, ohne das TGF-beta induzierte oberflächenverankerungsabhängige Wachstum und die Tumorigenität der Zellen zu beeinflussen (Kleeff et al., 1999). Ein klarer Selektivenvorteil der Zellen.

1.7.2 TGF-beta als Promotor der Karzinogenese

Trotz der Tumorsuppressor Eigenschaften von TGF-beta produzieren gerade viele epitheliale Tumorzellen selbst diesen Wachstumsfaktor (Derynck et al., 1987; Dickson et al., 1987). Außerdem werden im Umfeld von tumorig transdifferenzierten Zellen und an Orten invasiven Zellwachstums vermehrt Plasminogen, Metalloproteinasen und Integrine freigesetzt, die zu einer vermehrten Aktivierung von TGF-beta führen (Munger et al., 1999; Sato et al., 1989; Yu et al., 2000).

Es konnte bewiesen werden, dass das Zytokin

einbringt, die zur klonalen Expansion, und damit zu manifesten Tumorformation führt:

So wurde gezeigt, dass HNPCC Patienten mit TGFBR2 Mutationen eine bessere Prognose haben, als sporadische Kolonkarzinom Patienten, bei denen diese Mutation selten ist (Bubb et al., 1996; Markowitz et al., 1995). Die Etablierung eines funktionierenden TGF β RII Signals in TGFBR2 mutierten HNPCC Zellen führte hier zu einem invasiven Phänotyp der vormals nicht-invasiven Zellen (Oft et al., 1998). Die am Beginn der Karzinogenese als Tumorprogressor auftretende Signalabrogation erweist sich also in späteren Stadien als eher protektiv gegen das Fortschreiten der Läsion. Für zwei Mutationen von Smad2 in kolorektalen Karzinomen und für bestimmte Mutationen im TGF β RI konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sie die Invasivität der Tumorzellen förderten (Chen et al., 1998; Prunier et al., 1999).

Eng verbunden mit der Fähigkeit zur Invasivität und Migration ist die Transdifferenzierung von Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Typ (Thiery et al., 1999). TGF-beta induziert z. B. die physiologische embryonale mesenchymale Transdifferenzierung (Brown et al., 1999; Kaartinen et al., 1995). In der Karzinogenese wurde diese Fähigkeit ebenfalls in verschiedenen Karzinomen nachgewiesen. Die Klonierung eines dominant negativen TGF β RII in solche Zellen führt zur Prävention der Transdifferenzierung und kann sogar eine Wiederherstellung des epithelialen Phänotyps bewirken (Oft et al., 1998; Oft et al., 1996; Portella et al., 1998).

In Mammakarzinomen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Metastasierung und TGF-beta Signalantwort der Zellen gezeigt werde. So ließ sich einerseits das Metastasierungsverhalten in Knochen von Mäusen durch Klonierung eines dominant negativen TGF β RII signifikant attenuieren,

auch eine Rolle als Promotor der Karzinogenese spielt und dass besonders die selektive Überwindung der Wachstumsinhibition und gleichzeitige auto- oder parakrine Stimulation durch TGF β der Zelle Selektionsvorteile einbringt, die zur klonalen Expansion, und damit zu manifesten Tumorformation führt:

So wurde gezeigt, dass HNPCC Patienten mit TGFBR2 Mutationen eine bessere Prognose haben, als sporadische Kolonkarzinom Patienten, bei denen diese Mutation selten ist (Bubb et al., 1996; Markowitz et al., 1995). Die Etablierung eines funktionierenden TGF β RII Signals in TGFBR2 mutierten HNPCC Zellen führte hier zu einem invasiven Phänotyp der vormals nicht-invasiven Zellen (Oft et al., 1998). Die am Beginn der Karzinogenese als Tumorprogressor auftretende Signalabrogation erweist sich also in späteren Stadien als eher protektiv gegen das Fortschreiten der Läsion. Für zwei Mutationen von Smad2 in kolorektalen Karzinomen und für bestimmte Mutationen im TGF β RI konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sie die Invasivität der Tumorzellen förderten (Chen et al., 1998; Prunier et al., 1999).

Eng verbunden mit der Fähigkeit zur Invasivität und Migration ist die Transdifferenzierung von Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Typ (Thiery et al., 1999). TGF-beta induziert z. B. die physiologische embryonale mesenchymale Transdifferenzierung (Brown et al., 1999; Kaartinen et al., 1995). In der Karzinogenese wurde diese Fähigkeit ebenfalls in verschiedenen Karzinomen nachgewiesen. Die Klonierung eines dominant negativen TGF β RII in solche Zellen führt zur Prävention der Transdifferenzierung und kann sogar eine Wiederherstellung des epithelialen Phänotyps bewirken (Oft et al., 1998; Oft et al., 1996; Portella et al., 1998).

In Mammakarzinomen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Metastasierung und

andererseits führte ein partiell aktivierter TGF β RI zu einer vermehrten Metastasenbildung im Knochen dieser Mäuse (Yin et al., 1999). Ebenfalls günstig für die Tumorprogression sind die Auswirkungen von TGF-beta auf die Mikroumwelt der Zelle: TGF-beta ist ein potenter Induktor embryonaler Angiogenese (Dickson et al., 1987; Larsson et al., 2001; Oshima et al., 1996). In mehreren Mausversuchen konnte auch in der Karzinogenese die wichtige Rolle von TGF-beta gezeigt werden, indem TGF β überexprimierende Karzinomzellen in immundefizienten Mäusen starke Angiogenese induzierten, und diese durch TGF β Antikörper hemmbar war (Stearns et al., 1999; Ueki et al., 1992). Die Reexpression von Smad4 in Smad4 defizienten Pankreastumoren führte zur Tumorsuppression primär über eine verminderte Angiogenese (Schwarte-Waldhoff et al., 2000). TGF-beta induziert darüber hinaus auch VEGF (vascular endothelial growth factor), der Endothelzellen direkt zu Migration und Invasion anregen kann (Pertovaara et al., 1994; Saito et al., 1999). Dies sind nur Beispiele direkter und Indirekter Wirkung auf die Angiogenese. Ein weiterer putativer Mechanismus der Tumorprogression ist die immunsupprimierende Wirkung von TGF-beta. So kann die Inhibition von T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen und Neutrophilen zu einer verminderten Immunantwort des Körpers gegen die veränderten Zellen führen, die so einer Beseitigung durch die Abwehrzellen entkommen (Chen et al., 1998; Horwitz et al., 1997; Kehrl et al., 1986), (Kehrl et al., 1986; Torre-Amione et al., 1990; Wallick et al., 1990). Darüber hinaus kann die Expression von TGF β in der Zelle zu einer verminderten Expression von MHC II (major histocompatibility complex class II) Antigenen, und damit zu einer verminderten Immunogenität der Tumorzelle führen

TGF-beta Signalantwort der Zellen gezeigt werde. So ließ sich einerseits das Metastasierungsverhalten in Knochen von Mäusen durch Klonierung eines dominant negativen TGF β RII signifikant attenuieren, andererseits führte ein partiell aktivierter TGF β RI zu einer vermehrten Metastasenbildung im Knochen dieser Mäuse (Yin et al., 1999). Ebenfalls günstig für die Tumorprogression sind die Auswirkungen von TGF-beta auf die Mikroumwelt der Zelle: TGF-beta ist ein potenter Induktor embryonaler Angiogenese (Dickson et al., 1987; Larsson et al., 2001; Oshima et al., 1996). In mehreren Mausversuchen konnte auch in der Karzinogenese die wichtige Rolle von TGF-beta gezeigt werden, indem TGF β überexprimierende Karzinomzellen in immundefizienten Mäusen starke Angiogenese induzierten, und diese durch TGF β Antikörper hemmbar war (Stearns et al., 1999; Ueki et al., 1992). Die Reexpression von Smad4 in Smad4 defizienten Pankreastumoren führte zur Tumorsuppression primär über eine verminderte Angiogenese (Schwarte-Waldhoff et al., 2000). TGF-beta induziert darüber hinaus auch VEGF (vascular endothelial growth factor), der Endothelzellen direkt zu Migration und Invasion anregen kann (Pertovaara et al., 1994; Saito et al., 1999). Dies sind nur Beispiele direkter und Indirekter Wirkung auf die Angiogenese. Ein weiterer putativer Mechanismus der Tumorprogression ist die immunsupprimierende Wirkung von TGF-beta. So kann die Inhibition von T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen und Neutrophilen zu einer verminderten Immunantwort des Körpers gegen die veränderten Zellen führen, die so einer Beseitigung durch die Abwehrzellen entkommen (Chen et al., 1998; Horwitz et al., 1997; Kehrl et al., 1986), (Kehrl et al., 1986; Torre-Amione et al., 1990; Wallick et al., 1990). Darüber hinaus

<p>(Czarniecki et al., 1988; Geiser et al., 1993; Letterio et al., 1996)</p> <p>Zusammenfassend lässt sich daher sagen: TGF-beta ist ein potenter Suppressor im Frühstadium der Karzinogenese, da er epitheliale Zellen wachstumshemmt. Entkommen die Zellen jedoch dieser Wachstumshemmung, so kann dies zu einem erheblichen Selektionsvorteil führen. In einem späteren Stadium der Karzinogenese hingegen, ist eine restliche oder erhaltene TGF-beta Antwort wahrscheinlich Promotor der Karzinogenese, denn Förderung von Invasivität, Angiogenese und Immunsuppression bilden einen idealen Boden für Tumorbildung und Metastasierung</p>	<p>kann die Expression von TGFβ in der Zelle zu einer verminderten Expression von MHC II (major histocompatibility complex class II) Antigenen, und damit zu einer verminderten Immunogenität der Tumorzelle führen (Czarniecki et al., 1988; Geiser et al., 1993; Letterio et al., 1996)</p> <p>Zusammenfassend lässt sich daher sagen: TGF-beta ist ein potenter Suppressor im Frühstadium der Karzinogenese, da er epitheliale Zellen wachstumshemmt. Entkommen die Zellen jedoch dieser Wachstumshemmung, so kann dies zu einem erheblichen Selektionsvorteil führen. In einem späteren Stadium der Karzinogenese hingegen, ist eine restliche oder erhaltene TGF-beta Antwort wahrscheinlich Promotor der Karzinogenese, denn Förderung von Invasivität, Angiogenese und Immunsuppression bilden einen idealen Boden für Tumorbildung und Metastasierung</p>
--	---

Abbildung 4 (Seite 16)

Originalarbeit	Erratum
Abb. 4 Smad Domänen und ihre Funktion.	Abb. 4: Smad Domänen und ihre Funktion <u>(Abbildung modifiziert nach Massagué et al., 1998).</u>

Abbildung 5 (Seite 17)

Originalarbeit	Erratum
Abb. 5 Übersicht über die wichtigsten Modulationswege der Signaltransduktion	Abb. 5 Übersicht über die wichtigsten Modulationswege der Signaltransduktion <u>nach dem Review Massagué et al., 1998 (Massagué et al., 1998)</u>

Abbildung 6 (Seite 18)

Originalarbeit	Erratum
<p>Abb. 6 Durch Bindung von TGF-beta Dimeren an TGFβRII wird TGFβRI in den heterotetrameren Komplex rekrutiert und in der GS Domäne phosphoryliert. Der aktivierte TGFβRI phosphoryliert die Rezeptor regulierten Smads (R-Smads), die mit Smad4 einen Komplex bilden, welcher in den Nukleus wandert. Hier nehmen Co-Faktoren, -Aktivatoren und –Repressoren Einfluss auf die Zielsequenz und die Qualität des Signals. Die Signaltransduktion wird hierbei durch verschiedene Faktoren und Crosstalk mit anderen Signaltransduktionswegen moduliert.</p>	<p>Abb. 6 Durch Bindung von TGF-beta Dimeren an TGFβRII wird TGFβRI in den heterotetrameren Komplex rekrutiert und in der GS Domäne phosphoryliert. Der aktivierte TGFβRI phosphoryliert die Rezeptor regulierten Smads (R-Smads), die mit Smad4 einen Komplex bilden, welcher in den Nukleus wandert. Hier nehmen Co-Faktoren, -Aktivatoren und –Repressoren Einfluss auf die Zielsequenz und die Qualität des Signals. Die Signaltransduktion wird hierbei durch verschiedene Faktoren und Crosstalk mit anderen Signaltransduktionswegen moduliert (<u>Abbildung modifiziert nach Massagué et al., 1998</u>).</p>

Abbildung 7 (Seite 28)

Originalarbeit	Erratum
<p>Abb. 7 Transformierte Tumorzellen sezernieren TGF-beta in die Mikroumwelt. Weitere Transformation führt zu einer Resistenz gegen die TGF-beta vermittelte Wachstumsinhibition bei gleichzeitiger Zunahme der Invasion und Metastasierung fördernden Elemente in der Mikroumwelt des Tumors. Es entsteht eine Selektionsvorteil der Tumorzelle gegenüber nicht transformierter Epithelzellen.</p>	<p>Abb. 7 Transformierte Tumorzellen sezernieren TGF-beta in die Mikroumwelt. Weitere Transformation führt zu einer Resistenz gegen die TGF-beta vermittelte Wachstumsinhibition bei gleichzeitiger Zunahme der Invasion und Metastasierung fördernden Elemente in der Mikroumwelt des Tumors. Es entsteht eine Selektionsvorteil der Tumorzelle gegenüber nicht transformierter Epithelzellen. (<u>Abbildung modifiziert nach Derynck et al., 2001</u>)</p>

Abbildung 10 (Seite 53)

Originalarbeit	Erratum
<p>3 Ergebnisse</p> <p>3.1 Wachstumsexperimente</p> <p>3.1.1 Einfluss von exogenem TGFβ1 auf das Wachstum von Wildtyp HuH7</p>	<p>3 Ergebnisse</p> <p><u>Die folgenden Abbildungen zeigen neben den für diese Doktorarbeit relevanten Ergebnissen auch Ergebnisse von Herrn M. Berna, der gleichzeitig zu meiner Doktorarbeit mit der HepG2 Zelllinie zum Thema TGF-beta Rezeptoren im Labor beschäftigt war. Die gemeinsam erstellten Abbildungen wurden in Teilen 2001 in der Dissertation von M. Berna und 2005 in der zusammenfassenden Publikation von Musch et al. in Digestion veröffentlicht.</u></p> <p>3.1 Wachstumsexperimente</p> <p>3.1.1 Einfluss von exogenem TGFβ1 auf das Wachstum von Wildtyp HuH7</p>
<p>Abb 10 Einfluss von exogenem TGFβ1 auf Wildtyp HuH7 und als Kontrolle verwendete HepG2 Zellen. HuH7 Zellen zeigen unter ansteigenden Konzentrationen eine deutliche Proliferationshemmung durch exogenes TGFβ1, ab 10 pmol/l sterben Zellen ab. HepG2 Zellen zeigen weitgehende TGFβ1 Resistenz. Der Rahmen markiert den klinischen Serum Konzentrationsbereich an HCC erkrankter Patienten.</p>	<p>Abb 10 Einfluss von exogenem TGFβ1 auf Wildtyp HuH7 und als Kontrolle verwendete HepG2 Zellen. HuH7 Zellen zeigen unter ansteigenden Konzentrationen eine deutliche Proliferationshemmung durch exogenes TGFβ1, ab 10 pmol/l sterben Zellen ab. HepG2 Zellen zeigen weitgehende TGFβ1 Resistenz. Der Rahmen markiert den klinischen Serum Konzentrationsbereich an HCC erkrankter Patienten (<u>Abbildung veröffentlicht in M. Berna 2001</u>)</p>

Abbildung 11 (Seite 54)

Originalarbeit	Erratum
<p>Abb. 11: Repräsentative Gesichtsfelder gleicher Vergrößerung (10-fach) von HuH7 und HepG2 Zellen unter 200pmol/l TGFβ1 am 7. Tag im Vergleich zur Negativkontrolle. Konfluentes Wachstum der Negativkontrollen (links). HuH7</p>	<p>Abb. 11: Repräsentative Gesichtsfelder gleicher Vergrößerung (10-fach) von HuH7 und HepG2 Zellen unter 200pmol/l TGFβ1 am 7. Tag im Vergleich zur Negativkontrolle. Konfluentes Wachstum der Negativkontrollen (links). HuH7</p>

Zellen zeigen unter maximaler TGF β Konzentration (oben rechts) nur noch vereinzelte Zellhaufen, die Zellen sind zudem balloniert. HepG2 Zellen wachsen dagegen unter 200pmol/l noch in deutlichen Zellhaufen (unten rechts) bei unauffälliger Morphologie.	Zellen zeigen unter maximaler TGF β Konzentration (oben rechts) nur noch vereinzelte Zellhaufen, die Zellen sind zudem balloniert. HepG2 Zellen wachsen dagegen unter 200pmol/l noch in deutlichen Zellhaufen (unten rechts) bei unauffälliger Morphologie <u>Abbildung veröffentlicht in M. Berna 2001).</u>
---	---

Abbildung 19 (Seite 60)

Originalarbeit	Erratum
Abb. 19 Wachstumskonstante μ zwischen dem 3. und 7. Tag nach Ausplattierung. Median IRES= 0,52 ; Median CA= 0,18 ; Median DN= 0,40.	Abb. 19 Wachstumskonstante μ zwischen dem 3. und 7. Tag nach Ausplattierung. Median IRES= 0,52 ; Median CA= 0,18 ; Median DN= 0,40 (<u>Abbildung veröffentlicht in Musch et al., 2005).</u>

Abbildung 20 (Seite 62)

Originalarbeit	Erratum
Abb. 20 Nachweis der Transkription von TGF-beta Rezeptor I RNA in 10 Tumor (gerade Zahlen) und korrespondierenden Peritumoren (ungerade Zahlen) (Spur 1-20), HuH7 Zellen (21) und HepG2 Zellen (22). Spur 23: Negativkontrolle ohne RNA, Spur 24: ohne Reverse Transkription. L= Längenstandart.	Abb. 20 Nachweis der Transkription von TGF-beta Rezeptor I RNA in 10 Tumor (gerade Zahlen) und korrespondierenden Peritumoren (ungerade Zahlen) (Spur 1-20), HuH7 Zellen (21) und HepG2 Zellen (22). Spur 23: Negativkontrolle ohne RNA, Spur 24: ohne Reverse Transkription. L= Längenstandart (<u>Abbildung veröffentlicht in M. Berna 2001).</u>

Abbildung 21 (Seite 63)

Originalarbeit	Erratum
Abb. 21 Nachweis der Transkription von TGF-beta Rezeptor I RNA in 10 Tumor (gerade Zahlen) und korrespondierenden Peritumoren (ungerade Zahlen) aus humanen HCC (Spur 1-20), HuH7 Zellen (21) und HepG2 Zellen (22). Spur 23: Negativkontrolle ohne RNA, Spur 34: ohne Reverse Transkription L= Längenstandart.	Abb. 21 Nachweis der Transkription von TGF-beta Rezeptor I RNA in 10 Tumor (gerade Zahlen) und korrespondierenden Peritumoren (ungerade Zahlen) aus humanen HCC (Spur 1-20), HuH7 Zellen (21) und HepG2 Zellen (22). Spur 23: Negativkontrolle ohne RNA, Spur 34: ohne Reverse Transkription L= Längenstandart (<u>Abbildung veröffentlicht in M. Berna 2001).</u>

Abbildung 22 (Seite 64)

Originalarbeit	Erratum
<p>Abb. 22 Nachweis von TGF beta Rezeptor Proteinen in HuH7 und HepG2 Zellen. Abb. 22a: Western Blot mit polyklonalem Antikörper gegen TGF-beta Typ I Rezeptor. Die erste Spur zeigt HepG2 Zellen, die zweite HuH7 Zellen. In der dritten Bahn wurde FCS als Negativkontrolle mitgeführt. Die Proteinbanden sind sowohl für HuH7 als auch HepG2 Zellen deutlich sichtbar. Sie liegen in der erwarteten Höhe. Eine Positivkontrolle ist nicht erhältlich. Abb. 22b Western Blot mit polyklonalem Antikörper gegen TGF-beta Rezeptor Typ II. In der ersten Spur eine Positivkontrolle mit TGF-beta Rezeptor II Protein, ein kommerziell erhältliches, gentechnisch synthetisiertes Protein. In Spur 3 HepG2 Zellen, Spur 4 HuH7 Zellen. Der Pfeil weist auf die Höhe der erwarteten Bande. HepG2 Zellen zeigen eine deutliche Expression (erste Bande von unten). HuH7 Zellen zeigen keine Bande in der erwarteten Höhe.</p>	<p>Abb. 22 Nachweis von TGF beta Rezeptor Proteinen in HuH7 und HepG2 Zellen. Abb. 22a: Western Blot mit polyklonalem Antikörper gegen TGF-beta Typ I Rezeptor. Die erste Spur zeigt HepG2 Zellen, die zweite HuH7 Zellen. In der dritten Bahn wurde FCS als Negativkontrolle mitgeführt. Die Proteinbanden sind sowohl für HuH7 als auch HepG2 Zellen deutlich sichtbar. Sie liegen in der erwarteten Höhe. Eine Positivkontrolle ist nicht erhältlich. Abb. 22b Western Blot mit polyklonalem Antikörper gegen TGF-beta Rezeptor Typ II. In der ersten Spur eine Positivkontrolle mit TGF-beta Rezeptor II Protein, ein kommerziell erhältliches, gentechnisch synthetisiertes Protein. In Spur 3 HepG2 Zellen, Spur 4 HuH7 Zellen. Der Pfeil weist auf die Höhe der erwarteten Bande. HepG2 Zellen zeigen eine deutliche Expression (erste Bande von unten). HuH7 Zellen zeigen keine Bande in der erwarteten Höhe (<u>Abbildung veröffentlicht in Musch et al., 2005</u>).</p>

Abbildung 24 (Seite 66)

Originalarbeit	Erratum
<p>Abb. 24 Western Blot der Protein Extraktionen aus klinischen Tumoren und peritumoralem Gewebe (SDS-Page (10%). Die Abbildung zeigt die 10 Tumor/ Peritumor Paare, gerade Zahlen zeigen die Tumore, ungerade Zahlen das peritumorale Gewebe. Für TGFβRII Protein Assays (70 kD positiv Kontrolle) war die Expression im Peritumor größer als im Tumor (6 von 10), der TGFβRI wurde im Tumor stärker als im Peritumor exprimiert (8 von 10).</p>	<p>Abb. 24 Western Blot der Protein Extraktionen aus klinischen Tumoren und peritumoralem Gewebe (SDS-Page (10%). Die Abbildung zeigt die 10 Tumor/ Peritumor Paare, gerade Zahlen zeigen die Tumore, ungerade Zahlen das peritumorale Gewebe. Für TGFβRII Protein Assays (70 kD positiv Kontrolle) war die Expression im Peritumor größer als im Tumor (6 von 10), der TGFβRI wurde im Tumor stärker als im Peritumor exprimiert (8 von 10) (<u>Abbildung</u></p>

	veröffentlicht in Musch et al., 2005).
--	--

Seite 82

Originalarbeit	Erratum
	<u>Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nature Genetics 2001; 29: 117-129</u>