
Experimentelle Beeinflussung des Wachstumsverhaltens
der Leberkarzinom Zelllinie HuH7
durch TGF-beta Rezeptormutanten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Mignon-Denise Paik
aus Herne

2006

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. W. H. Caselmann
2. Gutachter: Professor Dr. med. G. Bauriedel

Tag der Mündlichen Prüfung: 31.12.2005

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor Professor Dr. med. T. Sauerbruch

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom.....	8
1.2	TGF-beta Familie.....	10
1.2.1	TGF-beta Isoformen	10
1.2.2	TGF-beta Wirkung	10
1.2.3	TGF-beta Sekretion und Aktivierung.....	11
1.3	TGF-beta Rezeptoren.....	11
1.3.1	TGF-beta Rezeptor Typ I und Typ II.....	11
1.3.2	TGF-beta Rezeptor Typ III.....	12
1.3.3	Interaktion der Rezeptoren und Regulation der Rezeptoraktivierung.....	13
1.4	Die TGF-beta Rezeptor Substrate: Smad Proteine.....	14
1.4.2	Zytoplasmatische Signaltransduktion durch die Smad Proteine	16
1.4.3	Rückkopplung durch antagonistische Smads und Wechselbeziehungen mit anderen Signaltransduktionswegen	17
1.5	Genexpression unter TGF-beta Kontrolle.....	19
1.6	Biologische Effekte von TGF-beta.....	19
1.6.1	Zell Bewegungen	19
1.6.2	Synthese und Degradation extrazellulärer Matrix.....	20
1.6.3	Immunsuppression	20
1.6.4	Regulation der Zellproliferation	21
1.7	TGF-beta in der Karzinogenese.....	23
1.7.1	TGF-beta Signal als Suppressor der Karzinogenese.....	23
1.7.2	TGF-beta als Promotor der Karzinogenese	26
1.8	TGF-beta in der Hepatokarzinogenese	29
1.9	Konstitutiv aktive und dominant negative TGF-beta Typ I Rezeptormutante	30
1.10	Fragestellung	31

2	Material und Methoden	33
2.1	Material	33
2.1.1	Geräte	33
2.1.2	Verbrauchsmaterial	34
2.1.3	Chemikalien	34
2.1.4	Enzyme und Kits	35
2.1.5	Längenstandards	35
2.1.6	Lösungen, Puffer und Medien	35
2.1.7	Plasmide und Konstrukte	38
2.1.8	Oligodeoxynukleotide	39
2.1.9	Bakterienstamm	41
2.1.10	Humane Zelllinien	41
2.1.11	Humanes Gewebe	41
2.1.12	Antikörper	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	42
2.2.2	Zellbiologische Methoden	49
2.2.3	Statistik	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Wachstumsexperimente	53
3.1.1	Einfluss von exogenem TGF β 1 auf das Wachstum von Wildtyp HuH7	53
3.1.2	Einfluss der transfizierten dominant negativen und konstitutiv aktiven Rezeptormutante des TGF-beta Typ I Rezeptors auf das Wachstumsverhalten von HuH7 Zellen	55
3.2	Untersuchungen zur Expression von TGF-beta Typ I und II Rezeptor in HuH7 Zellen und in klinischen HCC	62
3.2.1	Transkriptionsnachweis der RNA von TGF-beta Typ I Rezeptor in HuH7 Zellen und humanem Lebertumorgewebe mittels rt-PCR	62
3.2.2	Transkriptionsnachweis der RNA von TGF-beta Typ II Rezeptor in HuH7 Zellen und humanem Lebertumorgewebe mittels rt-PCR	63

3.2.3	Translationsnachweis von TGF-beta Typ I und Typ II Rezeptor Protein in HuH7 Zellen mittels Western Blot	64
3.2.4	Translationsnachweis von TGF-beta Typ I und Typ II Rezeptor Protein in Lebertumoren und korrespondierendem peritumoralem Gewebe mittels Western Blot	65
4	Diskussion.....	67
4.1	Diskussion der Methoden	67
4.1.1	Zellkultur	67
4.1.2	Lipofection von HuH7 Zellen.....	68
4.1.3	Western Blot	70
4.2	Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit bereits publizierten Daten..	70
4.2.1	Das verwendete Zellkulturmodell.....	71
4.2.2	Die Ergebnisse des Zellkulturmodells.....	71
4.2.3	Die Evaluierung der experimentellen Daten an klinischem Tumormaterial...	73
4.2.4	Die klinische Relevanz der durchgeführten Untersuchungen	75
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis.....	79
7	Anhang.....	100
8	Danksagung	105

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Das primäre Leberzellkarzinom (hepatozelluläres Karzinom, HCC) geht von den Hepatozyten der Leber aus. Mit mehr als ½ Million Neuerkrankungen weltweit ist das HCC global ein häufiger Tumor. Jedoch bestehen starke regionale Unterschiede (WHO, 2000). Während China als Land mit hoher Inzidenz (mehr als 15 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr) fast 40% der jährlichen Neuerkrankungen stellt, liegt die Inzidenz in Europa bei 4-6 auf 100000 Einwohner (Caselmann, 1994; Munoz et al., 1989; Skolnick et al., 1996). Männer erkranken häufiger an HCC als Frauen (Okuda, 1992). Auch das Erkrankungsalter variiert mit der Region (Beasley et al., 1981; Colombo et al., 1991; Tsukuma et al., 1993).

Diese epidemiologischen Unterschiede erklären sich aus den Risikofaktoren, z.B. der Durchseuchung einer Region mit Hepatitis B Viren (HBV) (Beasley, 1988; Tsukuma et al., 1993; Yu et al., 1994): Jährlich versterben 600000 Patienten an HBV assoziiertem HCC (Szmunes, 1978). In der Tumorigenese interagieren virale Proteine, z.B. HBx, mit Strukturen der Wirtszelle. Davon betroffen sind einzelne Signaltransduktionskaskaden, sowie Mechanismen der Tumor Suppression, der Apoptose und der DNA Reparatur (Caselmann, 1995; Caselmann, 1996; Caselmann et al., 1997; Rabe et al., 2000). Auch die chronische Infektion mit Hepatitis C Virus (HCV) ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für das HCC behaftet (Liang et al., 1994; Yu et al., 1994). Anders als bei HBV, ist das HCV assoziierte HCC allerdings nahezu ausschließlich in Folge einer zirrhotischen Leber zu finden (Brecht, 1997; Fattovich et al., 1997; Tradati et al., 1998). Es wird diskutiert, ob HCV Genotyp 1b ein eigenständiger Risikofaktor für das Leberzellkarzinom ist (Brecht, 1997; Bruno et al., 1997; Silini et al., 1996). Chronische Lebererkrankungen mit Zirrhose unterschiedlicher Ätiologie (Alkoholabusus, HCV, HBV; Hämochromatose) sind prädisponierende Faktoren in der Genese des HCC (Tsukuma et al., 1993). Weitere pathogenetische Faktoren der Hepatokarzinogenese sind Umwelttoxine, wie das Mycotoxin Aflatoxin B1, das Algentoxin Microcystin, das in Brunnenwasser vorkommt sowie der Zigarettenkonsum (Bressac et al., 1991; Tsukuma et al., 1993; Ueno et al., 1996).

Die Diagnosestellung erfolgt in den meisten Fällen in einem späten Stadium, da

Symptome aufgrund der großen funktionalen Reserve der Leber erst spät auftreten (Kew et al., 1971). Kurative Ansätze, wie Leberteileresektion oder –transplantation kommen dann oft nicht mehr in Frage. Lokoregionäre Maßnahmen, wie die transkutane Ethanolinjektion, die transarterielle Embolisation oder die systemische Chemotherapie, haben oft nur palliativen Charakter (Bruix et al., 1998; Livraghi et al., 1998). Unter palliativer Therapie liegt die mediane Überlebenszeit bei etwa 8 Monaten. Die mittlere Lebenserwartung in Abhängigkeit von dem Okuda Stadium beträgt im Okuda Stadium I 13,8 Monate, im Okuda Stadium II 9 Monate und im Okuda Stadium III 1 Monat (Abb. 1) (Rabe, 2001). Aus den limitierten zur Verfügung stehenden Therapieoptionen und der kurzen Überlebenszeit bei Erkrankung, ergibt sich die Notwendigkeit zur weiteren Erforschung der Hepatokarzinogenese und der Tumorprogression und neuartige Therapiemodalitäten zu entwickeln.

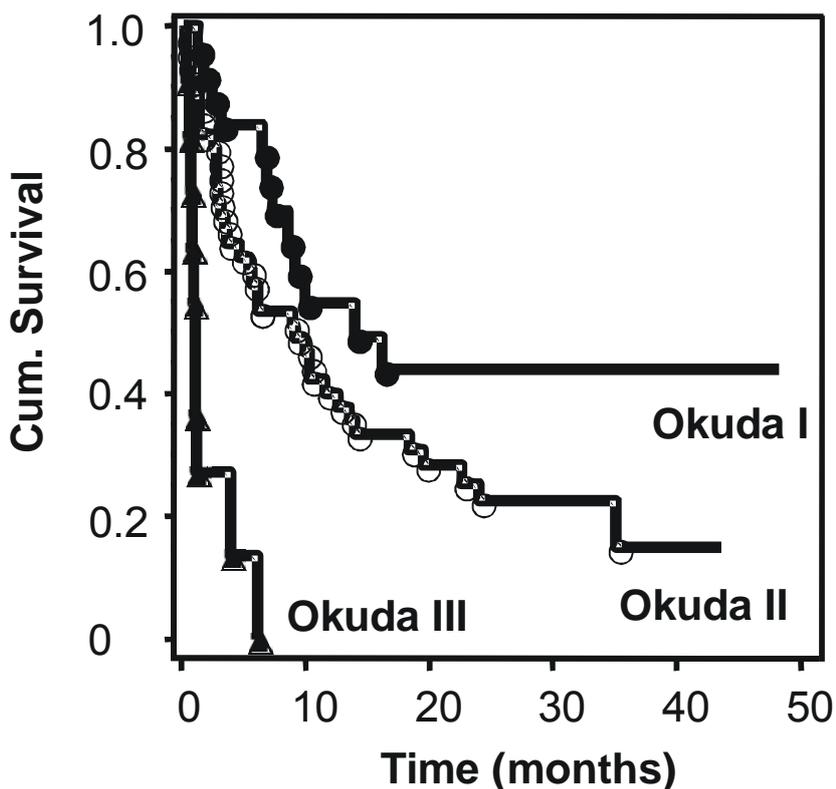


Abb. 1 Überleben nach Diagnose von HCC-Patienten in Abhängigkeit von der klinischen Stadieneinteilung nach Okuda. Bei der Mehrzahl der Patienten wird die Diagnose in den fortgeschrittenen Stadien II (56 % der Patienten) und III (14 % der Patienten) gestellt. Somit ist die Prognose ungünstig (nach Rabe et al. (Rabe, 2001)).

1.2 TGF-beta Familie

Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) wurde 1981 aufgrund seiner Fähigkeit, gesunde Fibroblasten der Niere zum Wachstum zu stimulieren, zum ersten Mal beschrieben (Roberts et al., 1981). Das Zytokin wurde zum Begründer einer ganzen Familie von Wachstumsfaktoren, zu der heute mehr als 40 verschiedene zählen. Alle sind Signalpeptide, die an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellmembran binden. Diese Superfamilie unterteilt sich traditionell in den Prototyp TGF-beta, die Inhibine/Aktivine, die „bone morphogenetic proteins“ (BMP) und die „Müllarian Inhibiting Substance“ (MIS). Allerdings werden immer mehr Subfamilien beschrieben, so dass die Abgrenzungen nicht immer eindeutig scheinen (Wrana, 1998).

1.2.1 TGF-beta Isoformen

TGF-beta selbst liegt in Säugern in drei Isoformen vor: TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3, die ähnliche, aber nicht gleiche Wirkung haben (Cheifetz et al., 1990; Kew et al., 1971; Ohta et al., 1987). Die Isoformen werden zudem in unterschiedlicher Konzentration in den Geweben vorgefunden. So findet sich TGF β 1 vor allem im Knochen (80%), während in der Niere mehr als 50 % als TGF β 2 vorliegt (Marra et al., 1996). Die Isoformen binden mit unterschiedlicher Affinität an die TGF-beta Rezeptoren. So ist die Affinität von TGF-beta Rezeptor II (TGF β RII) 100-mal stärker für TGF β 1 und TGF β 3 als für TGF β 2 (Lin et al., 1992). In *in-vivo* Studien mit TGF-beta Knock-out Mäusen konnten spezifische Funktionen der Isoformen in der Entwicklung nachgewiesen werden (Diebold et al., 1995; Sanford et al., 1997). Die Isoformen sind jedoch untereinander und interspezifisch sehr hoch konserviert, und ihre Wirkung *in-vitro*, bis auf wenige Ausnahmen, so ähnlich, dass auf eine weitere Differenzierung im Verlauf verzichtet wird (Cheifetz et al., 1990; Hartsough et al., 1997).

1.2.2 TGF-beta Wirkung

TGF-beta trägt zur Regulation des Zellwachstums, der Zellzykluskontrolle, Adhäsion, Migration, der Zelldifferenzierung, Angiogenese, Immunreaktion und der Entstehung Extrazellulärer Matrix (ECM) bei (Massague, 1990) (als Übersicht siehe (Roberts, 1990)). In der Leber stimuliert TGF-beta die Aktivierung perisinusoidaler Zellen und induziert das Wachstum normaler Fibroblasten (Bachem et al., 1992). Auf Hepatozyten

wirkt TGF-beta, wie auf alle epitheliale Zellen, als Inhibitor der Proliferation (Russell et al., 1988).

1.2.3 TGF-beta Sekretion und Aktivierung

TGF-beta entsteht zunächst in der Zelle als Homodimer zweier Pro-TGF-beta Moleküle, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind. Die aktive Form wird durch Endoproteinasen von dem Propeptid abgespalten. Nach Abspaltung des Propeptids bleibt dieses als so genanntes „Latency Associated Protein“ (LAP) mit der aktiven Form nicht-kovalent verbunden (Gentry et al., 1988). Zellen *in-vivo*, und Kulturzellen bis auf wenige Ausnahmen (z. B einige Glioblastoma), sezernieren TGF-beta in latenter Form. Die Aktivierung erfolgt extrazellulär über verschiedene Mechanismen. *In-vivo* beinhaltet dies die Freisetzung von TGF-beta aus der ECM durch Serin Proteasen, die Aktivierung von TGF-beta durch Abspaltung des LAP durch Proteinasen (Plasmin, Cathepsin G, Thrombospondin, Integrin) und die negative Regulation der Aktivierung durch Abwerfen der TGF-beta präsentierenden Betaglykane von der Zelloberfläche (Crawford et al., 1998; Munger et al., 1999; Sato et al., 1989). *In-vitro*, sind auch andere biochemische (z.B. extremer pH), und Medikamenten induzierte (z.B. Antiöstrogene, Glucocorticoide) Aktivationswege bekannt (als Übersicht siehe (Taipale et al., 1998)).

1.3 TGF-beta Rezeptoren

TGF-beta und verwandte Rezeptoren signalisieren durch ein transmembranär gelegenes Protein, der so genannten Serin/Threonin Kinase. In SDS-Page Assays mit radiotopem TGFβ zeigten sich für fast alle Zelltypen Banden in Höhe von 55-70 kDa, 75-100 kDa und 250-300 kDa, die der Größe nach als TGF beta Rezeptor Typ I, Typ II und Typ III benannt wurden (zur Übersicht siehe (Derynck et al., 1997)).

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).

1.3.1.2 Die juxtamembranäre zytoplasmatische Seite

Obwohl die juxtamembranäre zytoplasmatische Seite der Rezeptoren keine herausragenden strukturellen Eigenschaften zeigt, so sind Ser213 in TGF β RII und Ser165 in TGF β RI von besonderer Bedeutung. Ser213 in TGF β RII wird von der Rezeptor Kinase Liganden-unabhängig autophosphoryliert und ist für die Signalgebung des Rezeptors notwendig (Luo et al., 1997). Ser165 in TGF β RI hingegen wird Liganden abgänglich durch den TGF beta Rezeptor Typ II phosphoryliert und scheint so die Intensität der Zellantwort zu modulieren (Souchelnytskyi et al., 1996).

1.3.1.3 Die GS Domäne von TGF β RI

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 TGF β RI 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).

1.3.1.4 Die Rezeptor Kinase

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 (Kretzschmar 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).

1.3.2 TGF-beta Rezeptor Typ III

Als TGF beta Typ III Rezeptoren werden Betaglykan und Endoglin bezeichnet, transmembranäre Proteine, die zwar TGF β binden, jedoch selbst keine Signalfunktion

besitzen. Betaglykan scheint eher als Reservoir von TGF β auf der Zelloberfläche zu funktionieren, und präsentiert so das Zytokin dem TGF β RII (Lopez-Casillas et al., 1993). Endoglin weist eine hohe Homologie zu Betaglykan auf, bindet jedoch nur TGF β 1 und TGF β 3, kein TGF β 2. Endoglin wird in einem sehr hohen Maß auf Epithelzellen exprimiert. In Mutationsanalysen des Endoglin-Gens konnte gezeigt werden, dass eine Mutation des Gens zu einer hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie Typ I führt (McAllister et al., 1994).

Rezeptor III kann so als akzessorischer Rezeptor der TGF-beta Signaltransduktion angesehen werden, der die Rezeptoraktivität über das Ligandenangebot regulieren kann (Massague et al., 2000).

1.3.3 Interaktion der Rezeptoren und Regulation der Rezeptoraktivierung

In Abwesenheit eines Liganden, liegen TGF β RI und TGF β RII als unabhängige Homomere auf der Zelloberfläche vor (als Übersicht siehe (ten Dijke et al., 1996)). Bindung eines dimeren TGF β Liganden an TGF β RII führt zum Recruitment des Typ I Rezeptors in einen heterotetrameren Komplex. In diesem Komplex phosphoryliert TGF β RII, welches eine konstitutiv aktive Kinase besitzt, den TGF beta Rezeptor Typ I an Serin und Threonin Residuen der GS Domäne. Es erfolgt eine Konformationsänderung der Tertiärstruktur des Proteins und hierdurch die Freigabe des bis dahin sterisch behinderten katalytischen Zentrums der Kinase von TGF β RI (Massague et al., 2000).

Die Rezeptor Kinase von TGF β RI ist nun frei zur Phosphorylisation des Substrats, der so genannten Smad Proteine (siehe Abb. 2).

Die Aktivierung der Rezeptoren unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen: Der membranverankerte TGF β RIII bindet TGF β und steigert so die Affinität der Bindung an den Rezeptorkomplex (Massague, 1998). Negative Kontrolle wird indirekt über die vermehrte Bindung von TGF β an Proteine wie Aktivin, Nodal oder BMP vermittelt (Massague et al., 2000). Direkte Inhibition der Rezeptorinteraktion erreicht die Bindung von FKBP12 an die GS Domäne, dadurch wird die Liganden-unabhängige Autophosphorylierung sterisch verhindert (Huse et al., 1999). Der Pseudorezeptor BAMBI hingegen bildet inaktive Dimere mit TGF β RI, und blockiert so die Signaltransduktion (Onichtchouk et al., 1999).

aktiviertes TGF-beta

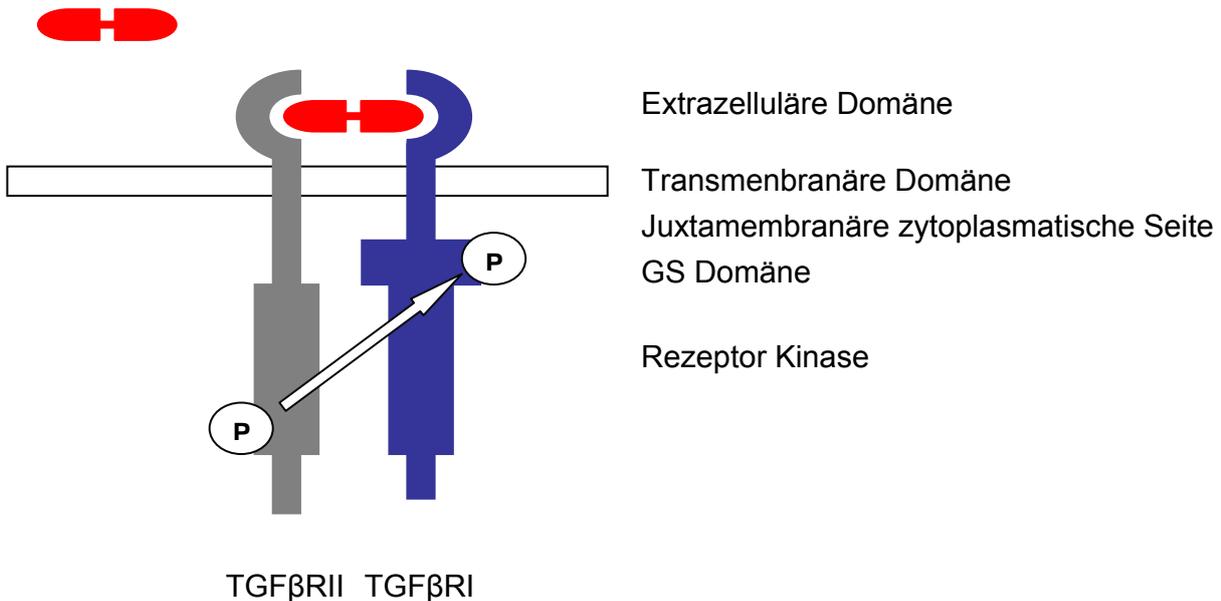


Abb. 2 Die Aktivierung des Signaltransduktionsweges wird durch die Bindung eines TGF-beta Dimers an den TGFβRII initiiert. Es erfolgt die Rekrutierung des TGFβRI in den Komplex und die Transphosphorylierung von TGFβRI in der GS Domäne durch den Typ II Rezeptor.

1.4 Die TGF-beta Rezeptor Substrate: Smad Proteine

In Drosophila wurden 1995 neue zytosplasmatischer 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 zytosplasmatische Signaltransduktionskette downstream der Rezeptorebene dar.

Bis heute wurden 9 dieser Smads in Vertebraten identifiziert, für die zytosplasmatische 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

TGF β RI 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).

Proteine	Vorkommen	Gruppe/Funktion
Smad1	BMP/DPP	R-Smads
Smad5		
Smad9		
Smad2	TGF-beta/Aktivin	
Smad3		
Smad4	TGF-beta Superfamilie	Co-Smad
Smad6	vor allem BMP	Inhibitorische Smads
Smad7	TGF-beta und BMP	

Abb. 3 zeigt eine Übersicht der Smad Proteine. Smad Proteine der zytoplasmatischen Signaltransduktion von TGF β RI und Rezeptor Typ II sind grau hervorgehoben. Smad2 und Smad3 werden an TGF-beta Rezeptor Typ I phosphoryliert und damit aktiviert. Sie werden daher als R-Smads, als Rezeptor regulierte Smads bezeichnet. Smad4 agiert als Co-Smad mit aktivierten R-Smads in allen Signaltransduktionswegen der Superfamilie. Smad7 und Smad6 werden als inhibitorische Smads betrachtet. Smad7 inhibiert sowohl die TGF-beta als auch die BMP Signaltransduktion, Smad6 inhibiert in geringer Konzentration spezifisch die BMP Signaltransduktion, wirkt in höherer Konzentration jedoch auch bei TGF-beta hemmend.

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., 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).

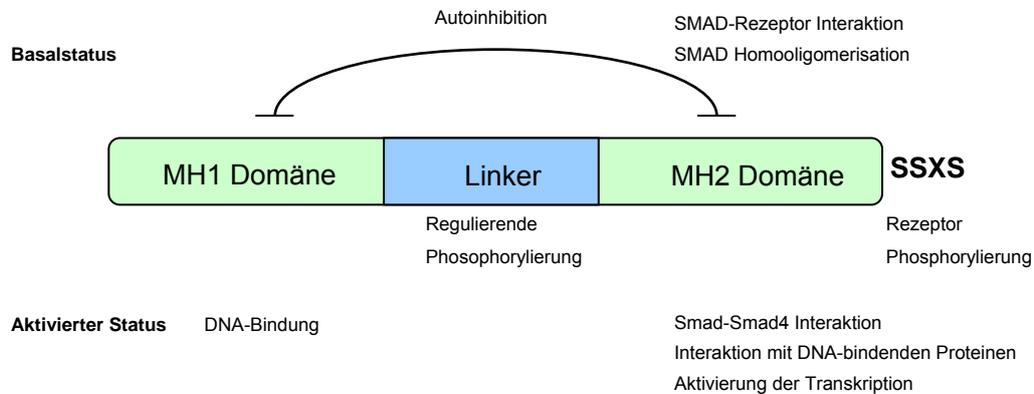


Abb. 4 Smad Domänen und ihre Funktion.

1.4.2 Zytoplasmatische Signaltransduktion durch die Smad Proteine

Die zytoplasmatischen Proteine Smad2/3 und Smad4 verkörpern die Signaltransduktionskaskade von der an der Zelloberfläche angesiedelten Rezeptorebene zum Nukleus. Hierzu müssen die R-Smads zur Rezeptorebene gelangen, hier in der SSXS Region der MH2 Domäne durch den TGF-beta Rezeptor Typ I phosphoryliert werden, um anschließend Aktivator Komplexe mit den Co-Smads zu formieren und in den Nukleus zu translozieren.

Alle diese Schritte werden allerdings durch Cofaktoren moduliert, die sowohl die Aktivität der Signaltransduktion als auch die Spezifität des zu aktivierenden Zielgens beeinflussen.

Wahrscheinlich ist die Rekrutierung der Cofaktoren, der Coaktivatoren oder Corepressoren, ein konzertiertes Zusammenspiel des Smad Aktivator Komplexes, d.h. sowohl R-Smads als auch Smad4 sind daran beteiligt. Allerdings sind Einzelheiten der Mechanismen noch wenig bekannt (Massague et al., 2000).

Faktor	Wirkung
SARA (Smad anchor Überschrift 1 + 12 pt for receptor activation)	Vermittlung der Bindung zwischen dem aktivierten Rezeptor und Smad 2 (3) (Massague et al., 2000) (Tsukazaki et al., 1998)
Map Kinase Phosphorylierungsstelle	Aktivierung des Ras Systems führt über die Map Kinase Phosphorylierungsstelle zur verminderten Akkumulation im Nukleus (Kretzschmar et al., 1997; Kretzschmar et al., 1999)
Cofaktoren: FAST, OAZ (BMP Pathway), Mixer und Milk Transkriptionsfaktoren : AP- 1, TFE3, AML Proteine	Diese Faktoren bestimmen die Spezifität und Affinität der Smad-DNA Bindung über die MH1 Domäne (Shi et al., 1998). Als Übersicht siehe (Massague et al., 2000).
Coaktivatoren: p300/CBP	Kontrolle der Transkription am DNA Template durch Veränderung der nukleosomalen Struktur (Acetyl Transferase Aktivität)
Corepressoren: TGIF, C-Ski, SnoN	Wie Coaktivatoren; Rekrutierung von Histon Deacetylasen (zur Übersicht siehe (Derynck, 1998 #41))
Ubiquitin/Proteasomen	Degradation der Smads und Beendigung der Akkumulation im Nukleus (Lo et al., 1999)

Abb. 5 Übersicht über die wichtigsten Modulationswege der Signaltransduktion

1.4.3 Rückkopplung durch antagonistische Smads und Wechselbeziehungen mit anderen Signaltransduktionswegen

Die antagonistischen Smads (oder inhibitorischen Smads) Smad6 und Smad7, besitzen eine den restlichen Smads vergleichbare MH2 Domäne ohne das beschriebene SSXS Motiv, während die MH1 Domäne deutlich verkürzt erscheint (Hata et al., 1998; Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997; Tsuneizumi et al., 1997). Beide Smads können in hohen Konzentrationen weitgehend unselektiv an verschiedenen Rezeptoren der TGF-beta Superfamilie binden und so um die Phosphorylierung der R-Smads konkurrieren (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997). Es ist nicht sicher, ob physiologische Konzentrationen von Smad6 oder Smad7 eine solche

Inhibition zeigen (Massague, 1998). Von Smad6 ist bekannt, dass es in geringer Konzentration sehr selektiv den BMP Signalweg inhibiert und hier als falsches Co-Smad an aktiviertes Smad1 bindet und funktionslose Aktivorkomplexe bildet (Hata et al., 1998; Imamura et al., 1997; Massague, 1998). Smad7 und Smad6 werden durch Aktivierung des TGF-beta Signalwegs schnell hoch reguliert und Smad7 transloziert in das Zytoplasma (Ishisaki et al., 1998; Itoh et al., 1998; Nakao et al., 1997). Dieses deutet auf einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus hin.

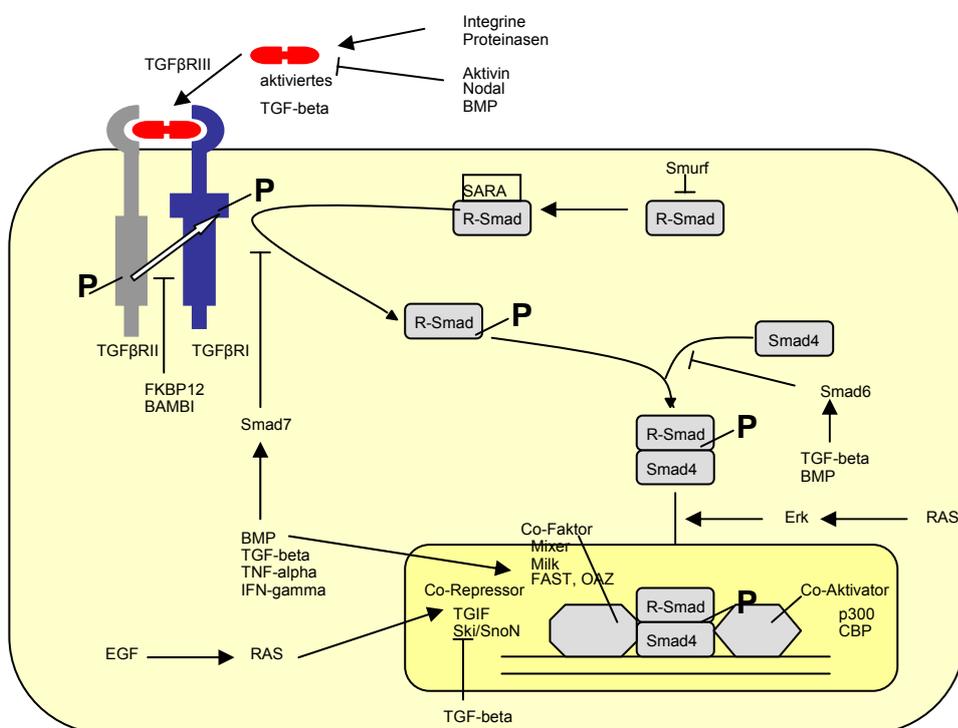


Abb. 6 Durch Bindung von TGF-beta Dimeren an TGF β RII wird TGF β RI in den heterotetrameren Komplex rekrutiert und in der GS Domäne phosphoryliert. Der aktivierte TGF β RI phosphoryliert die Rezeptor regulierten Smads (R-Smads), die mit Smad4 einen Komplex bilden, welcher in den Nucleus wandert. Hier 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.

Die Expression von Smad7 kann darüber hinaus durch negative Regulationsfaktoren des TGF-beta Signaltransduktionswegs hoch reguliert werden. Beispiele hierfür sind die Interferon-gamma Interaktion über Jak 1 Tyrosin-Kinase und den Stat 1 Transkriptionsfaktor, die die Basis für den bekannten antagonistischen Effekt zwischen Interferon-gamma und TGF-beta in Bezug auf die Immunfunktionen der Zelle bilden,

oder die vermehrte Expression von Smad7 über den NFkappaB/RelA Transkriptionsfaktor durch Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine TNFalpha und interleukin-1 β (Bitzer et al., 2000; Ulloa et al., 1999). Dies sind jedoch nur Beispiele für eine mannigfaltige Transmodulation zwischen der TGF-beta Signaltransduktion und anderen Signalkaskaden der Zelle und des gesamten Organismus.

1.5 Genexpression unter TGF-beta Kontrolle

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) (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.

1.6 Biologische Effekte von TGF-beta

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.

1.6.1 Zell Bewegungen

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).

1.6.2 Synthese und Degradation extrazellulärer Matrix

TGF-beta wirkt fördernd auf die Formation extrazellulärer Matrix

- durch die Synthese von embryonalen Matrix Proteinen wie Tenascin, Thrombospondin, Fibronectin und von murenen Matrix Proteinen wie Elastin und Kollagen I (Bassols et al., 1988; Iqnotz 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; Iqnotz 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).

1.6.4 Regulation der Zellproliferation

TGF-beta inhibiert reversibel das Wachstum epithelialer und endothelialer Zellen, sowie weiterer Zelllinien, die bereits angesprochen wurden. Im Einzelnen wirkt TGF-beta sowohl antimittotisch als auch apoptotisch.

1.6.4.1 Antimitotische Wirkung von TGF-beta

Antimitotische Signale werden in der Zelle oft über Inhibition Cyklin-abhängiger Kinasen, den CDKs, vermittelt (Hannon et al., 1994; Reynisdottir et al., 1995). CDKs sind involviert in der Progression der Zelle durch die G1 Phase in die S Phase. In Säugern sind dies die CDK2, die einen Komplex mit CyklinE oder CyklinA bildet, und die CDK4 und CDK6, die mit CyklinD einen Komplex eingehen (Hunter et al., 1994; Sherr, 1994).

Verbindung zur TGF-beta Wirkung und seiner Signaltransduktion bestehen über eine vermehrte Expression der CDK Inhibitoren p15 INK4B und/ oder p21 CIP1 in Abhängigkeit von der Zelle (Datto et al., 1995; Hannon et al., 1994; Reynisdottir et al., 1995). Schon ohne TGF-beta Stimulation liegen p21 CIP1 und ein weiterer verwandter Cyklin Inhibitor p27 KIP1 in Komplexen mit CDK2, CDK4 und CDK6 vor (Reynisdottir et al., 1995).

Unter Aktivierung der TGF-beta Signaltransduktionskaskade kommt es zur Interaktion des Smad Aktivator Komplexes mit Co-Faktoren der Genexpression der CDK Inhibitoren p21 CIP1 und p15 INK4B, was zu einer deutlichen Potenzierung der Transkriptionsaktivität führt (Feng et al., 2000; Pardali et al., 2000).

CDK-Inhibitoren wirken auf zwei Art und Weisen: p21 CIP1 interagiert mit CyklinE/CDK2 Komplexen und inhibiert so die CDK2 Aktivität und die Progression des Zellzyklus (Massague et al., 2000; Reynisdottir et al., 1995). Dagegen kann p15 INK4B sowohl CDK4 und CDK6 direkt inhibieren, als auch mit ihren Komplexen (CyklinD) assoziieren. Im letzteren Fall inaktiviert dies nicht nur die katalytische Aktivität der CDKs, sondern verdrängt gebundenes p21 CIP1 oder p27 KIP1 aus der Bindung an CDK4 oder CDK6. Dies führt über eine einfache stöchiometrische Verschiebung zu einer vermehrten Inhibition von CDK2, welches dann in fast vollem Umfang inhibiert ist, und die Progression des Zellzyklus so unterbindet (Massague et al., 2000; Reynisdottir et al., 1995; Sandhu et al., 1997).

Ein weiterer Mechanismus, der zum Zellzyklus-Arrest durch TGF-beta beiträgt (wieder abhängig vom Zelltyp) ist die Inhibition der Expression von c-Myc, CDK4 und CDC25A, einer Tyrosin-Phosphatase von CDK4 und CDK6 (Coffey et al., 1988; Ewen et al., 1995; Ewen et al., 1993; Iavarone et al., 1997; Iavarone et al., 1999). Es konnte in zahlreichen Arbeiten für verschiedene Zelltypen gezeigt werden, dass eine Überexpression von c-Myc die Zelle resistent gegen die TGF-beta vermittelte Wachstumsinhibition werden lässt, und eine Expression von p15 INK4B und p21 CIP1 nur induziert werden kann, wenn die c-Myc Konzentration der Zelle abfällt (Alexandrow et al., 1995; Claassen et al., 2000; Warner et al., 1999). C-Myc Expression korreliert also mit einer Repression der CDK-Inhibitoren. Andererseits kann die Verminderung der Expression durch TGF-beta vermittelt werden und so die Derepression durch p15 und p21 aufheben (Feng et al., 2000). Eine verminderte Expression von c-Myc soll darüber hinaus für eine verminderte Expression von CDC25A nach TGF-beta Stimulation verantwortlich sein (Galaktionov et al., 1996; Santoni-Rugiu et al., 2000).

1.6.4.2 Apoptose durch TGF-beta

Apoptose kann in die Subphasen Induktion, Signalphase und Exekution aufgeteilt werden. Man geht davon aus, dass in der Signalphase pro- und contra-apoptotische Stimuli sich gegenseitig beeinflussen. TGF-beta induziert Apoptose in Zellkultur von Endometriumzellen, Hepatomazellen, Magenzellen, Leukämiezellen, wirkt jedoch protektiv gegen die Apoptose neuronaler Zellen (Lin et al., 1992; Prehn et al., 1994; Ren et al., 1997; Rotello et al., 1991; Saltzman et al., 1998; Yanagihara et al., 1992). Die einzelnen Schritte sind auf molekularer Ebene jedoch noch immer zum großen Teil unbekannt.

Bekannt ist jedoch die tragende Rolle, die die bcl-2 Familie (zur Übersicht siehe (Buchmann et al., 1999)), deren Expression durch TGF-beta reguliert wird, in der Apoptose spielt. Die Familie besteht aus bcl-2, dem Hauptprotein in der Apoptoseinhibition, und bcl-xL, ebenfalls inhibitorisch, die durch verschiedenes Splicen aus demselben Gen entstehen (Boise et al., 1993; Minn et al., 1996). Auf der anderen Seite stehen Apoptoseinduktoren wie bad, bax, bak und bcl-xS.

Bcl-2 blockiert Zellapoptose und inhibiert diese auch nach Stimulation der Zelle durch Strahlung, Hyperthermie, Deprivation der Wachstumsfaktoren, Glucocorticoiden und Chemotherapeutika in *in-vitro* Modellen (Allsopp et al., 1993; Garcia et al., 1992;

Hockenbery et al., 1990; Miyashita et al., 1993; Nunez et al., 1990; Sentman et al., 1991; Tsujimoto, 1989; Vaux et al., 1988; Vaux et al., 1994; Walton et al., 1993).

TGF-beta unterdrückt die Transkription von bcl-xL in den meisten epithelialen Zelllinien und leitet so die Apoptose ein (Saltzman et al., 1998; Yamamoto et al., 1998; Yanagihara et al., 1992). Die Tatsache, dass Dexamethason, ein bekannter Schutz gegen TGF-beta induzierte Apoptose in Hepatozyten, die Expression von bcl-xL stimuliert, stützt dieses Ergebnis (Yamamoto et al., 1998).

TGF-beta induziert über diesen Mechanismus hinaus oxidativen Stress, der durch Antioxidantien abgefangen werden kann (Ribeiro et al., 1999; Sanchez et al., 1996). Ribeiro et al. zeigten darüber hinaus Daten, dass der TGF-beta induzierte Transkriptionsfaktor TIEG1 zu einer Zunahme reaktiver oxidativer Moleküle führt, die über die Herabsetzung des transmembranen mitochondrialen Gradienten, schließlich zur Öffnung bestimmter Kanäle der mitochondrialen Membran führen, Dies führt schlussendlich zur Freisetzung von Cytochrom C und zur Bildung eines Apoptosomen und zur Inangsetzung der Caspasen Kaskade, die die Zelle aus der Signalphase in die Exekution der Apoptose führt (Ribeiro et al., 1999).

Apoptose Inhibition kann über den MAP Kinase Signalweg, die Phosphoinositol-3'-OH Kinase/Proteinkinase B (PKB/Akt) oder den NFkB vermittelt werden (Baichwal et al., 1997; Chen et al., 1999; Chen et al., 1998; Shih et al., 2000; Tanaka et al., 1996). Es wird vermutet, dass die Protektion gegen TGF-beta induzierte Apoptose eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese spielt.

1.7 TGF-beta in der Karzinogenese

1.7.1 TGF-beta Signal als Suppressor der Karzinogenese

TGF-beta spielt eine komplexe Rolle in der Karzinogenese, die für verschiedene Zelltypen sowohl von dem Kontext als auch von dem Stadium der Karzinogenese abhängig sind. Im Folgenden soll eine Übersicht über die Rolle einzelner Signal Komponenten erzielt werden.

1.7.1.1 Veränderungen der TGF-beta Rezeptor Signalgebung

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 TGF β RII führt (Lu et al., 1996; Markowitz et al., 1995; Myeroff et al., 1995).

TGFBR2 Mutationen kommen jedoch auch in anderen Karzinomen relativ häufig vor. So weiß man, dass bis zu 25% aller Kolonkarzinome inaktivierende Mutationen im TGF β RII 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).

TGFBR1 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 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 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; Yalciner 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 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 Selektionsvorteil 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 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 (Off 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 werden. 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 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 (Czarniecki et al., 1988; Geiser et al., 1993; Letterio et al., 1996).

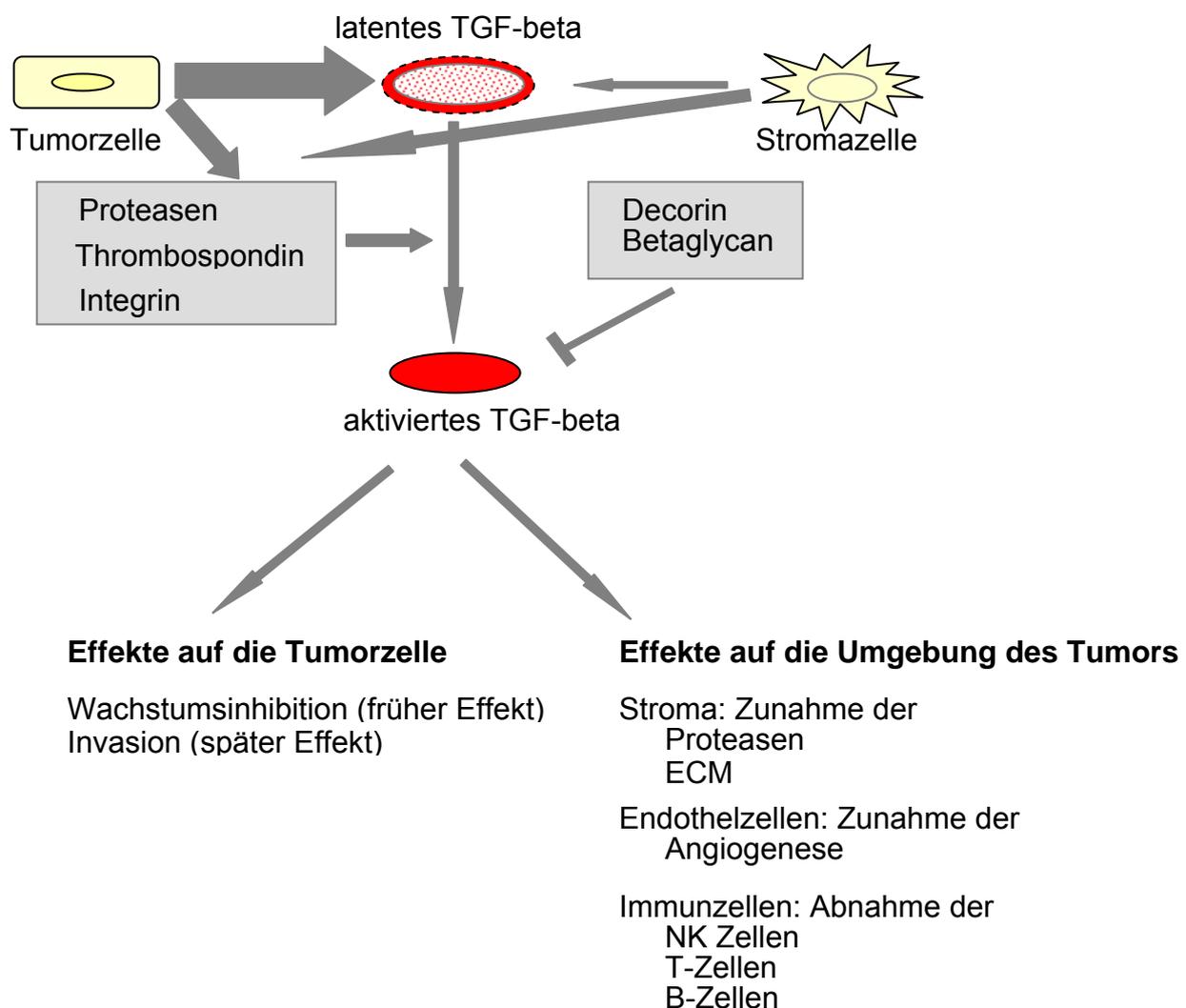


Abb. 7 Transformierte Tumorzellen sezernieren TGF-beta in die Mikroumwelt. Weitere Transformation führt zu einer Resistenz gegen die TGF-beta vermittelte Wachstumshemmung bei gleichzeitiger Zunahme der Invasion und Metastasierung fördernden Elemente in der Mikroumwelt des Tumors. Es entsteht eine Selektionsvorteil der Tumorzelle gegenüber nicht transformierter Epithelzellen.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen: TGF-beta ist ein potenter Suppressor im

Frühstadium der Karzinogenese, da er epitheliale Zellen wachstumsinhibiert. Entkommen die Zellen jedoch dieser Wachstumsinhibition, 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 Tumorformation und Metastasierung.

1.8 TGF-beta in der Hepatokarzinogenese

TGF β wird in der Leber von nicht parenchymatösen Zellen parakrin und autokrin sezerniert. Es stimuliert die Aktivierung perisinusoidaler Zellen und induziert das Wachstum normaler Fibroblasten (Bachem et al., 1992; Roberts et al., 1986). Außerdem fungiert es als potenter Inhibitor hepatozytärer Proliferation (Fausto et al., 1995). Trotzdem werden in Zellen des hepatozellulären Karzinoms signifikante Mengen an mRNA und Protein von TGF β nachgewiesen, während normale Hepatozyten kein TGF β produzieren (Bedossa et al., 1995).

Transformierte Zellen sezernieren in signifikanten Mengen TGF β (Abou-Shady et al., 1999). Die Masse des HCC Tumorknotens korreliert sogar mit der Ausscheidung von TGF β im Urin an HCC erkrankter Patienten, so dass einzelne Publikationen sich mit der Rolle von TGF β im Urin der Patienten als Tumormarker beschäftigen (Tsai et al., 1997). Auch Serum Konzentrationen von TGF β sind bei HCC Erkrankten deutlich erhöht (Shirai et al., 1994).

Die Doppelrolle von TGF β erklärt sich in der Karzinogenese der Leber entsprechend der Rolle von TGF β in der Karzinogenese vieler epithelialer Zellreihen: Resistenz gegenüber der antiproliferativen Wirkung von TGF β verschafft einem Zellklon einen Selektionsvorteil, gleichzeitig wird über TGF β auf die Mikroumwelt der Zelle (denn auch in der Leber fördert TGF β Angiogenese, Invasivität und Immunsuppression) die weitere Expansion des resistenten Zellklons begünstigt (Ito et al., 1995; Maggard et al., 2001). Diese Resistenz konnte in verschiedenen Veröffentlichungen für zahlreiche Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms belegt werden (Buenemann et al., 2001; Inagaki et al., 1993; Matsuzaki et al., 2000).

Wie auch bei anderen Tumorentitäten, ist die molekulare Ätiologie der TGF-beta Resistenz nicht homogen. So werden direkte Störungen der Signaltransduktion auf

Ebene einer gestörten Rezeptor Expression, besonders des Rezeptor Typ II, gefunden (Abou-Shady et al., 1999; Sue et al., 1995; Ueno et al., 2001). Diese kann wiederum quantitativ, wie in Form einer verminderten Protein Expression, wie auch qualitativ, in Form eines funktionslosen Proteins sein (Furuta et al., 1999; Salvucci et al., 1999). Für den Typ I Rezeptor wurde eine gestörte Integration in die Plasmamembran beschrieben (Bedossa et al., 1995). Unterhalb der Rezeptorebene wurde in einigen Fällen eine Mutation von Smad2 und Smad4 beschrieben, die zur Signalabrogation führt (Yakicier et al., 1999).

Auf der anderen Seite kann auch die vermehrte Expression inhibitorischer Smads (6 und 7) zu einer Signalabschwächung oder Erhöhung der Reizschwelle führen (Kawate et al., 2001; Matsuzaki et al., 2000). Selbst die verminderte Präsenz aktiven TGF β durch die verminderte Expression des Mannose 6-Phosphat/Insulin-like Growth Factor-II Rezeptors zur Aktivierung des TGF β Moleküls, kann eine Resistenz vermitteln (Sue et al., 1995). Schließlich ist noch die große Zahl an Querverbindungen zu anderen Signaltransduktionskaskaden, wie der MAPKinase Pathway, und die große Gruppe an Zielproteinen zu erwähnen, die durch TGF β reguliert werden. Beispiel hierfür ist Bcl-2, ein Onkoprotein, das Zellen vor oxidativem Stress schützt (Steinman, 1995). Es führt überexprimiert zu einer Resistenz von HCC Zellen gegenüber TGF β vermittelter Apoptose (Huang et al., 1998).

TGF-beta spielt daher eine herausragende Rolle in der Karzinogenese der Leber. Dabei können Störungen des TGF-beta Signaltransduktionswegs in allen Ebenen auftreten. Es bleibt zu erforschen, welche dieser Störungen in klinischer Häufigkeit relevant sind und ob molekulargenetische Therapieansätze aus diesen Erkenntnissen gewonnen werden können.

1.9 Konstitutiv aktive und dominant negative TGF-beta Typ I Rezeptormutante

In dieser Arbeit sollen HuH7 Zellen als Modell für die TGF-beta Resistenz humaner HCC untersucht werden. Sie ist ein Teil eines umfassenderen Projektes, in dem auch andere Zelllinien und Funktionen untersucht wurden.

Das Ziel der Experimente war es, mittels molekulargenetischer Methoden die Resistenz der Zellen gegenüber TGF-beta zu überwinden, und so möglichst ein Modell für einen

molekulargenetischen Therapieansatz des humanen HCC zu erreichen.

Hierzu wurde eine im Labor vorhandene konstitutiv aktive TGF-beta Rezeptor I Mutante (CA TGF β RI) in die Zelllinie HUH7 gebracht. Diese Mutante besitzt eine mutierte GS Domäne. Dieser Rezeptor ist daher unabhängig von einer TGF-beta Bindung oder von einer Rekrutierung durch den TGF β RII immer aktiviert.

Um zu untersuchen, ob im Umkehrschluss die weitere Verminderung eines funktionierenden Rezeptors zu einem beschleunigten Zellwachstum der TGF-beta resistenten HuH7 Zellen führt, wurde in Vorarbeiten durch Punktmutation und Leserasterverschiebung ein verkürzter Rezeptor hergestellt, dem ein katalytisches Zentrum vollständig fehlt. Hierdurch entsteht ein dominant negativer Rezeptor (DN TGF β RI), der trotz Bindung von TGF-beta und Rekrutierung durch TGF β RII nicht zu einer Smad Phosphorylierung und damit Signaltransduktion führt.

1.10 Fragestellung

In der Literatur ist die Hepatokarzinogenese und die Ätiologie der Läsionen ein kontrovers diskutiertes Thema. In dieser Arbeit soll insbesondere die Rolle der TGF-beta Signaltransduktion in der Hepatokarzinogenese untersucht werden.

Es werden die Transkription und Expression von TGF β RI und RII in 10 humanen HCC mit der im zugehörigen peritumoralen Gewebe verglichen, um mögliche Unterschiede zu zeigen.

Da die Mikrosatelliten Deletion in TGF β RII ebenfalls strittiges Thema ist, soll auch diese Mutation in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden.

Falls diese Mechanismen in den klinischen Proben nachgewiesen werden können, kann ein *in-vitro* Modell zur Abbildung dieser Veränderungen hergestellt werden?

Zusammenfassend ergibt sich also folgende Fragestellung:

1. Spielt eine Veränderung der Rezeptorexpression (TGF β RI oder RII) eine Rolle als Resistenzmechanismus humaner HCC?
2. Spielt die von Furuta et al. für die Mehrzahl der von ihm in Japan untersuchten HCC beschriebenen Punktmutation in einer Poly A Sequenz des TGF β RII in den hier untersuchten klinischen HCC als Resistenzmechanismus eine Rolle (Furuta et al., 1999)?
3. Ist dieses der Fall, wie verhält sich die Rezeptorexpression in Zelllinien des

hepatozellulären Karzinoms, in HuH7 Zellen?

4. Wie verhalten sich diese Zelllinien unter Stimulation mit exogen zugeführtem TGF β 1?
5. Lässt sich das Wachstumsverhalten von HuH7 durch eine dominant negative oder konstitutiv aktive TGF β RI Rezeptormutante beeinflussen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese	Eigenanfertigung	MPI-f.	Biochemie,
	Martinsried		
Autoklav Modell 3870ELV	Tuttnauer, Jerusalem, Israel		
Brutschränke	Forma Scientific, Ohio, USA		
	Heraeus, Zürich, Schweiz		
Electrophoresis Power supply Modell BS 443	Biotech-Fischer, Reiskirchen		
	Heraeus, Hanau		
Gefrierschränke	Bosch, Stuttgart		
	Liebherr, Lienz, Österreich		
Laminarflow	Nunc, Wiesbaden		
Laminar Flow LaminAir HB 2448 K	Heraeus, Hanau		
Mikroskop Leica DM IL	Leica, Wetzlar		
Photometer, UV Mini 1240	Shimadzu, Japan		
Pipetierhilfe	Desaga GmbH, Heidelberg		
Pipetten Pipetman P10, P20, P200, P1000	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich		
Präzisionswaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt		
Sterilbank „LaminAir“	Heraeus, Hanau		
Sterilbank „Laminarflow“	Nunc, Wiesbaden		
Thermocycler	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA		
Wasserbäder	Diverse		
Videoprinter	Mitsubishi, Japan		
Vortex	Ika, USA		
Zählkammer nach Neubauer	Brand		
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau		
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus, Hanau		

Zentrifuge Biofuge 22R Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6-well Zellkulturplatten	Greiner, Solingen
Einfrierröhrchen	Greiner, Solingen
Falconröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Biozym, Oldendorf
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen
Eppendorfreaktionsgefäße	Greiner, Solingen
Nitrocellulose Membran Protran BA	Schleicher und Schüll, Dassel
Röntgenfilm BioMax MR	Kodak GmbH, Stuttgart

2.1.3 Chemikalien

Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Bacto Agar	Difco Lab., Detroit, USA
Bacto Trypton	Difco Lab., Detroit, USA
Bayol	Serva GmbH, Heidelberg
Bromophenolblau	Sigma GmbH, Deisenhofen
Diethylpyrocarbanat (DEPC)	Sigma GmbH, Deisenhofen
DMEM+Glutamax	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	E. Merck, Darmstadt
Ethanol	E. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
FCS	Biochrom KG, Berlin
Geneticin (G418)	PAA Lab. GmbH, Cölbe
Glyzerin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Hefe Extrakt	Difco Lab., Detroit, USA
Lipofectamine	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Magnesiumdichlorid	Fluka AG, Buchs, Schweiz
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka AG, Buchs, Schweiz

Natriumhydroxid	Fluka AG, Buchs, Schweiz
OptiMEM 1+Glutamax	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Penicillin	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Streptomycin	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
TGF-beta 1, human	Roche, Mannheim
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Trypan blue	BDKlontech Laboratories, Hilden

2.1.4 Enzyme und Kits

RNeasy kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder kit	Qiagen, Hilden
One Step rt-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Purification kit Midi	Qiagen, Hilden
RNAasin	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
Klenow-Fragment der DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Proteinaseinhibitor (complete proteinase inhibitor tablets)	Roche, Mannheim
SuperSignal West Pico	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn

2.1.5 Längenstandards

50 bp Leiter	Amersham, Braunschweig
Fragmentgröße in Basenpaaren (bp)	50-1500 in 50 bp Schritten
1 kb Leiter	GibcoBRL, Gaithersburgh, USA
	506, 1018, 1632, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216
Precision Plus Protein Standards	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
„All blue prestained“ Western Blot Standard	250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15; 10 kDa

2.1.6 Lösungen, Puffer und Medien

Phosphate buffered saline (PBS)	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
---------------------------------	------------------------------------------------

	2 Tabletten PBS (Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Natriumphosphat) (Gibco BRL) auf 1000ml ddH ₂ O
50× TAE Puffer für Agarose-Gelelektrophorese	100 ml EDTA 0.5 M 57,1 ml Eisessigsäure ddH ₂ O ad 1000 ml 242g Tris/Acetat pH 8,0 eingestellt mit Eisessigsäure
6× Ladepuffer für Proben der Agarose-Gelelektrophorese	10mM EDTA 50 % Glycerin 2 % Bromphenolblau 0,2 % Xelencyanol
Transformationspuffer (TB)	10mM Hepes 15mM CaCl ₂ 250mM KCl 55mM MnCl ₂ pH=6,7 (mit KOH eingestellt)
DEPC Wasser	1ml Diethyl-Pyrocyanat (DEPC) dd H ₂ O 1000ml
Lysispuffer	25 mM Trisphosphat 2mM CDTA 2mM DTT 10% Glycerol 1% Triton X 100 5M NaOH Nach Ansetzen der Lösung (pH 7,8) wird sie steril filtriert und ist bei -20°C stabil. Proteinaseinhibitor kann bereits vor dem Einfrieren zugesetzt werden.
4x Sammelgelpuffer	0,5M Tris-HCl 0,4 % SDS H ₂ O

	pH 6,8 Der pH-Wert wird mit HCl eintitriert und der Puffer im Kühlschrank gelagert, wo er ca. 2 Monate stabil ist
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS H ₂ O
	pH 8,8 Der pH-Wert wird mit HCl eintitriert und der Puffer im Kühlschrank gelagert, wo er ca. 2 Monate stabil ist
5x Lämmli-Puffer	25mM Tris-Base 0,5 % SDS 7,2 % Glycin H ₂ O Lämmli Puffer wird zur Verwendung zu 1x Puffer mit Wasser verdünnt.
10x TBST-Puffer	100mM Tris HCl 1,5 M NaCl 0,5 Tween 20 H ₂ O TBST Puffer wird vor Verwendung zu 1x Puffer mit Wasser verdünnt.
5x Loading-Puffer Western Blot	1,25 M Tris-HCl 50 mM DTT 30% Glycerin 5% SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau H ₂ O Probenpuffer ist bei -20°C nahezu stabil
5x Transferpuffer	25 mM Tris HCl 192 mM Glycin

	20% Methanol
	H ₂ O
	pH 8,3
	Der Transferpuffer wird im Kühlschrank aufbewahrt und kühl angewendet. Um ein Verdampfen des Alkohols zu vermeiden, wird Methanol erst nach dem Verdünnen des 5x zu 1x Puffers frisch zugegeben.
Blocking-Solution	TBST mit 5% Magermilchpulver
West Pico Luminol	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
LB Medium	10g Trypton
	5g Hefeextrakt
	5g NaCl
	dd H ₂ O ad 1000 ml
	pH 7,0 eingestellt mit 5 M NaOH
	anschließend autoklavieren. LB-Flüssigmedium kann dann nach Abkühlen auf Raumtemperatur bei 4°C zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.1.7 Plasmide und Konstrukte

2.1.7.1 pIRES1neo (Rees et al., 1996, (Rees et al., 1996) Genbank Accession Nummer U89673)

Von der Firma Clontech kommerziell erhältlicher bicystronischer Expressionsvektor, der ein Neomycinresistenzgen, die Neomycin Phosphotransferase, unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert. Des Weiteren enthält dieser Vektor eine "internal ribosome entry site" (IRES) und eine "multiple cloning site" die für den beschriebenen Versuch nicht benutzt wurden.

2.1.7.2 Konstitutiv aktive Mutante des TGF-beta Typ I Rezeptors (Wieser et al., 1995)

Wir erhielten die konstitutiv aktive Mutante des TGF-beta Typ I Rezeptors von Dr. J. Massague, New York, USA. Diese war auch die Basis für die Herstellung einer dominant

negativen Rezeptormutante. Die Methode der Herstellung wird im weiteren Verlauf beschrieben.

2.1.8 Oligodeoxynukleotide

Es wurden Primer verwendet, welche mit Hilfe des Programms Primer3 (http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) entworfen wurden. Die Synthese dieser Primer wurde bei der Firma Gibco BRL (Eggestein, Deutschland) in Auftrag gegeben.

2.1.8.1 Neo-Primer

5'-AGGATCTCCTGTCATCTCACCTT-3'

Quelle: Genbank U89673 entsprechend Basen 2217-2239 des Neomycinresistenzgens

5'-GATACCGTAAAGCACGAGGAAG

Quelle: Genbank U89673, komplementär zu Basen 2635-2656 des Neomycinresistenzgens

Errechnete Größe der entsprechenden Bande: ca. 440 bp

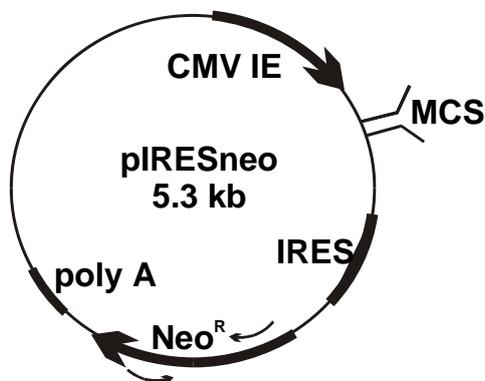


Abb. 8 Primer zum Nachweis der Neomycin Phosphotransferase. Die beiden Primer (kleine Pfeile) begrenzen einen ca. 440 bp großen Abschnitt des Neomycinresistenzgens (NeoR) des pIRESneo Vektors.

2.1.8.2 TGFβRI Primer

5'-TATGATATGACAACGTCAGGTTCTG-3'

Quelle: Genbank NM_004612 (H. sapiens, mRNA für TGFbR1) Basen 620-644

5'-GAGCAAGTTTTATCATTCTCCAC-3'

Quelle: Genbank NM_004612 (H. sapiens, mRNA für TGFbR1) komplementär zu Basen 971-995

Errechnete Größe der entsprechenden Bande: ca. 375 bp.

2.1.8.3 TGF β RII Primer

5'-ACTAGAGACAGTTTGCCATGA-3'

Quelle: Genbank XM 003094 (Homo sapiens, mRNA für TGF β R2) Basen 343-363

5'-ATATTCTTCTGAGAAGATGATG-3'

Quelle: Genbank XM 003094 (Homo sapiens, mRNA für TGF β R2) komplementär zu Basen 496-514

Errechnete Größe der entsprechenden Bande: ca. 170 bp.

Die zwischen diesen beiden Primern liegende Sequenz umfasst u. a. das sog. A₁₀ Segment, eine Aneinanderreihung von 10 Adeninbasen.

2.1.8.4 TGF β RI CA/DN Primer

5'-CAGATCTGGTACCACGCGTATC-3'

Quelle: Genbank AF239249 (pCMV5) Basen 925-946

5'-AGCCCATCTGTCACACAAGTAAAAT-3'

Quelle: Genbank NM_004612 (mRNA für TGF β RI) komplementär zu Basen 210-234

Errechnete Größe der entsprechenden Bande: ca. 288 bp.

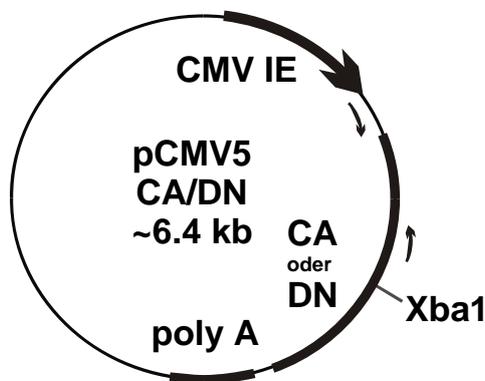


Abb. 9 Primer für die TGF β RI Mutante; ein Primer (↓) liegt auf der Vektorsequenz downstream des Transkriptionsstartes des CMV-Promotors, der zweite Primer (↑) sowohl auf der CA oder DN TGF β RI-Mutante.

Der upstream-Primer bindet hinter dem Transkriptionsstart des CMV-Promotors, die von ihm erkannte Vektorsequenz wird somit sicher transkribiert. Der downstream-Primer erkennt eine Sequenz innerhalb des TGF-beta Typ I Rezeptors. Weil der upstream-Primer eine spezifische Sequenz des pCMV-Vektors erkennt ist sichergestellt, dass nur die Rezeptormutante, nicht aber ein eventuell vorhandener Wildtyp Rezeptor, amplifiziert wird.

2.1.8.5 Beta Aktin

5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'

Quelle: Genbank X00351 (mRNA für humanes β -Aktin) Basen 657-676

5'-GAACTTTGGGGGATGCTCGC-3' (mRNA für β -Aktin) Basen 1359-1368

Quelle: Genbank X00351

Errechnete Größe der entsprechenden Bande: ca. 710 bp.

2.1.9 Bakterienstamm

Für alle Klonierungen wurden Escherichia coli Stamm DH10B verwandt.

2.1.10 Humane Zelllinien

2.1.10.1 HuH-7 (JCRB0403)

2.1.10.2 Hep-G2 (ATCC HB-8065)

2.1.11 Humanes Gewebe

Zur Untersuchung kam anonymisiertes, bei -80°C dauerhaft gelagertes, Gewebe histologisch nachgewiesener HCC sowie korrespondierendes peritumorales Gewebe.

2.1.12 Antikörper

2.1.12.1 TGF β RI

Verwandt wurde TGF β RI (R-20/ sc-399) der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland, ein polyklonaler Kaninchen IgG Antikörper, gerichtet gegen das Carboxy-terminale Ende des TGF β RI von Maus, Ratte und Mensch ohne Kreuzreaktivität zu TGF β RII.

2.1.12.2 TGF β RII

Verwandt wurde TGF β RII (H-567/ sc-1700) der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland, ein polyklonaler Kaninchen IgG Antikörper, gerichtet gegen die volle Länge humanen TGF β RII ohne Kreuzreaktivität zu TGF β RI.

2.1.12.3 HRP-konjugierter Antikörper

Als sekundärer Antikörper wurde ein goat-anti-rabbit horse-raddish-peroxidase Antikörper der Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland verwandt.

2.1.12.4 Western Blot Positivkontrolle TGF β RII

Rekombinantes TGF β RII (sc-4122 WB) der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA und RNA

Mittels UV-Spektrometer: Die Konzentration von DNA, RNA und Oligonukleotiden wurde spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei $\lambda=260\text{nm}$ bestimmt. Eine $OD_{260\text{nm}}=1$ entspricht dabei einer Konzentration von $50\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, $40\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA oder RNA, oder $20\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotid. Gemessen wurde mit Quarzküvetten.

2.2.1.2 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien

Die für die Klonierung zur Verwendung kommenden Escherichia coli DH10B Bakterien wurden auf einer nach Standardverfahren hergestellten LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Einzelkolonien von der Agar-Platte wurden zur längeren Lagerung als so genannte Glycerin-Stocks angesetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen für Hitzeschock

100ml frisches LB-Medium wurden 1/100 mit einer frischen Übernachtskultur des Bakterienstammes DH10B angeimpft und unter Schütteln (250 UpM) bei 37°C inkubiert, bis die Bakterienkultur eine optische Dichte von OD_{600} 0,5-0,7 erreichte. Die Bakterienlösung wurde anschließend 20 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 40ml kaltem Transformationspuffer (TB-Puffer) aufgenommen, anschließend 10 min auf Eis gekühlt und erneut abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde wiederum in 8ml TB-Puffer aufgenommen und mit $280\mu\text{l}$ DMSO versetzt. Diese Lösung wurde 15 min auf Eis gekühlt. Dann wurden nochmals $280\mu\text{l}$ DMSO zugesetzt, die Lösung resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die auf diese Weise kompetent gemachten Bakterien konnten bei -80°C mehrere Monate gelagert werden.

2.2.1.4 Transformation der Bakterien durch Hitzeschock

Durch abrupten Temperaturanstieg (Hitzeschock) wurden Zellwand und Zellmembran der Bakterien reversibel permeabilisiert, was die Aufnahme von Plasmid-DNA ermöglicht. 200µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Plasmid-DNA vermischt und anschließend 30 min auf Eis abgekühlt. Diese Lösung wurde dann ca. 90 sec. bei 42°C inkubiert und sofort wieder für 2 min auf Eis gelegt. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium ohne Ampicillin zugesetzt, worauf eine Inkubation von 45 min im Schüttler bei 37°C erfolgte. Im Anschluss wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 Plasmidpräparation aus Bakterien

Plasmid-DNA aus Bakterien wurde nach einem Ionenaustauschverfahren unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Kits gewonnen (Birnboim et al., 1979; Vogelstein et al., 1979). Das jeweilige Kit wurde entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.2.1.6 Verdau von DNA

Für einen Ansatz wurde 1 U des Enzyms pro µg Substrat DNA und der dazugehörige Puffer in einfacher Konzentration verwendet. Der Ansatz wurde 1-3 h bei 37°C inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch Auftrennung der DNA in einem Agarosegel überprüft.

2.2.1.7 Herstellung einer DN Mutante des TGFβRI

Um eine dominant negative Mutante des TGF beta Rezeptors Typ I (DN TGFβRI) zu erzeugen, wurde der CA TGFβRI, der in dem eukaryontischen Expressionvektor pCMV5 zur Verfügung stand, zunächst mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und Bgl III aus seinem Vektor ausgeschnitten, und mit Xba I an Position 782 geschnitten. Diese Schnittstelle liegt zwischen der GS-Domäne und der Kinase des konstitutiv aktiven Konstrukts. Durch den Verdau mit XbaI entstehen überhängende Enden, die nach Auffüllen mit Klenow Fragment mit den komplementären 4 Basen als glatte Enden religiert werden. Hierdurch entsteht eine Verschiebung des Leserahmens (frameshift-mutation) die zu der Entstehung eines neuen Stop-Codons (TAG) führt. Es wird ein trunkierter TGF-beta Rezeptor TypI ohne Signalfunktion, der DN TGFβRI, erzeugt.

Anschließend wurde der so neu entstandene Rezeptor wieder in pCMV5 eingebracht

und die Identität durch Sequenzierung überprüft.

2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung und Präparation von DNA Fragmenten zur Expressionsvektor Konstruktion erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese, die nach Standardverfahren durchgeführt wurde, d.h. TAE-Agarosegele mit 3µl Ethidiumbromidlösung pro 100ml Agarosegellösung und mit 1XTAE als Laufpuffer.

2.2.1.9 Rt-PCR

2.2.1.9.1 Gewinnung der RNA aus HuH7 Zellen

Die RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) In einem Ionenaustauscherverfahren gewonnen. Den Herstellerempfehlungen folgend wurden zunächst jeweils 4×10^6 Zellen eines HuH7 Zellklons ausgezählt, gewaschen und mittels eines Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffers lysiert. Guanidinisothiocyanat zerstört gleichzeitig RNAsen. Das Lysat wurde mittels Qia-Shredder-Säule homogenisiert. Über die so genannte RNeasy-Säule, einer Silikon-Gel-Membran, die in der Lage ist RNA-Moleküle unter Zusatz von Ethanol ab einer Größe von 200bp zu binden, wurde RNA von kleinen Nukleotiden und anderem Zelldetritus getrennt. Zum Schluss wurde die RNA mit Wasser eluiert.

2.2.1.9.2 Gewinnung der RNA aus Tumor und Peritumorgewebe

Zur Extraktion von RNA aus Tumor- und Peritumorgewebe wurde das TRIzol Reagenz (Promega, Mannheim) nach Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die TRIzol Extraktion beruht auf dem Prinzip der Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al., 1987).

Das tiefgefrorene Tumor- und Peritumorgewebe wurde in flüssigem Stickstoff mit Pistill und Mörser an einer Sterilbank (laminar flow) zerkleinert und 800 µl TRIzol Reagenz wurden zu diesen Gewebestückchen pipetiert. Diese Suspension wurde durch kurzes Vortexen vermischt, mit einer 2 ml Spritze und einer 26 gauge Kanüle zweimal aufgezogen und in ein RNase freies Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 160 µl Chloroform zugegeben und 30 Sekunden durch Vortexen gut vermischt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und $20000 \times g$ während 15 Minuten. Das so erhaltene RNA Pellet wurde anschließend in 70 %igem Ethanol gewaschen, um restliche Salze zu entfernen und dann erneut bei gleichen Bedingungen für 15 Minuten

zentrifugiert. Das gereinigte RNA Pellet wurde getrocknet, in 30 µl RNase-freiem DEPC Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.9.3 rt-PCR

Bei jedem Ansatz wurden folgende Negativkontrollen mitgeführt: ein Reaktionsgefäß ohne RNA, um eine Kontamination der benutzten Reagenzien auszuschließen und eine Probe ohne rt-Schritt (die erst nach dem rt-Schritt bei 94°C in den Thermocycler gestellt wurde), um eine Kontamination durch genomische DNA auszuschließen.

Programmierung des Thermocyclers für den Nachweis der Neomycin Phosphotransferase:

	50°C	2 min	Vorheizen
	50°C	30 min	rt-Reaktion
	94°C	15 min	Denaturierung
35 Zyklen	94°C	1 min	Denaturierung
	65°C	1 min	Annealing
	72°C	1 min	Extension
	72°C	10 min	Extension
	4°C	∞	

Programmierung des Thermocyclers für den Nachweis der Rezeptormutanten:

	50°C	2 min	Vorheizen
	50°C	30 min	rt-Reaktion
	94°C	15 min	Denaturierung
45 Zyklen	94°C	1 min	Denaturierung
	60°C	1 min	Annealing

72°C	1 min	Extension
------	-------	-----------

72°C	10 min	Extension
------	--------	-----------

4°C	∞	
-----	---	--

Programmierung des Thermocyclers für den Nachweis von humanem β -Aktin:

50°C	2 min	Vorheizen
------	-------	-----------

50°C	30 min	rt-Reaktion
------	--------	-------------

94°C	15 min	Denaturierung
------	--------	---------------

35 Zyklen	94°C	1 min	Denaturierung
-----------	------	-------	---------------

58°C	1 min	Annealing
------	-------	-----------

72°C	2 min	Extension
------	-------	-----------

72°C	10 min	Extension
------	--------	-----------

4°C	∞	
-----	---	--

Programmierung des Thermocyclers für den Nachweis des TGF- β Typ I Rezeptors:

50°C	2 min	Vorheizen
------	-------	-----------

50°C	30 min	rt-Reaktion
------	--------	-------------

94°C	15 min	Denaturierung
------	--------	---------------

35 Zyklen	94°C	1 min	Denaturierung
-----------	------	-------	---------------

57°C	1 min	Annealing
------	-------	-----------

72°C	2 min	Extension
------	-------	-----------

72°C	10 min	Extension
------	--------	-----------

4°C	∞	
-----	---	--

Programmierung des Thermocyclers für den Nachweis des TGF- β Typ II Rezeptors:

	50°C	2 min	Vorheizen
	50°C	30 min	rt-Reaktion
	94°C	15 min	Denaturierung
36 Zyklen	94°C	1 min	Denaturierung
	63°C	1 min	Annealing
	72°C	1 min	Extension
	72°C	1 min	Extension
	4°C	∞	

2.2.1.9.4 Aufreinigung aus Ansatz und Sequenzierung

Zum Nachweis der spezifischen Amplifikation der Zielsequenz wurden alle als positiv gewerteten PCR Produkte unter Verwendung eines kommerziellen Sequenzierungsservice (Firma SeqLab Laboratories GmbH (Göttingen)) sequenziert. Elektrophoregramme wurden mit Hilfe des Programms Chromas 2.13 (Technelysium Pty Ltd., Helensvale, Australien) bearbeitet.

2.2.1.10 Western Blot

Der Western-Blot wurde benutzt, um TGF-beta Rezeptoren des Wildtyps I und II in HuH7 und HepG2 Zellen, humanen Tumoren und peritumoralem Gewebe nachzuweisen. Als Positivkontrolle diente im Fall von TGF β RI ein synthetisches Rezeptor Protein. Leider stand eine solche Kontrolle für TGF β RII nicht zur Verfügung. Als Negativkontrolle wurden Proben benutzt, die nur fetales Kälberserum (FCS) enthielten.

2.2.1.10.1 Gewinnung der Proteine

Zur Gewinnung der Proteine aus HuH7 und HepG2 Zellen werden diese nach Trypsinierung in einem Eppendorf-Gefäß 5min bei 200xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in PBS suspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Nach Entfernung des Überstands werden 200 μ l 25 mM Tris-H₃PO₄, 2 mM CDTA, 10-% Dithiothreitol and 1 % Triton X-100-haltiger Lysispuffer hinzugefügt, der unter Schütteln

die Zellen binnen 15min vollständig auflöst und Proteine aus allen Zellkompartimenten und dem Zytosol freisetzt. RNA und DNA werden hierbei ebenfalls zerstört. Die Suspension wird nochmals bei 300xg für 5 min zentrifugiert, danach kann der Überstand mit den Proteinen zur weiteren Verwendung in ein neues Gefäß übernommen werden. Die Lösung ist bei -20°C stabil, und sollte immer auf Eis gehalten werden, weil nur so die weitere Degradation der Proteine durch den Lysispuffer verhindert wird.

Das beschriebene Protokoll wurde auch auf Gewebe angewandt. Ein Gewebekubus von etwa 1-2mm Kantenlänge wurde dafür zuerst mittels Mörser und Pistill pulverisiert und anschließend wie die Zellen in 200µl Lysispuffer aufgenommen. Dann wurde analog dem oben beschriebenen Verfahren für Zellen vorgegangen.

2.2.1.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford and Lowry

Der Proteingehalt wurde unter Verwendung des DC (Detergant Compatible) Protein Essay Kit® von Bio-Rad, (Bio-Rad Laboratories, München) nach Vorgaben des Herstellers bestimmt.

2.2.1.10.3 Western Blot Bedingungen

Es wurde ein Einsatz von 40µg Protein auf 20µl Gesamtvolumen der Probe gewählt, die Auftrennung der Banden erfolgte in einem 4,5%igen Sammelgel bei 90V und im 7,5%igen Trenngel bei 130V. Geblottet wurde im Semi-dry Verfahren bei 25V, 0,4A für 25 min auf eine Nitrocellulose Membran (Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel). Die fertige Membran wurde über Nacht bei +4°C in Blocking-Solution aufbewahrt.

2.2.1.10.4 Nachweis von TGFβRII und RI mittels spezifischer polyklonaler Antikörper

Nach ca. 12h in der Blocking-Solution wurde die Membran zunächst in einer Detergenzhaltigen Lösung (TBST Puffer mit 0,5% Tween 20) 1x10 min auf einer Schaukel gewaschen. Dann wurde der Membran der erste Antikörper zugesetzt. Der Anti-TGFβRI-Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:400 bis 1:600 in PBS und 5% Magermilchpulver gelöst. Für den Anti-TGFβRII Antikörper wurde Konzentration von 1:600 in gleicher Lösung verwandt. 6ml einer Lösung wurden auf die Nitrocellulose aufgebracht, und unter ständigem Schaukeln für 90 min unter Raumtemperatur

inkubiert. Danach wurde der oben beschriebene Waschvorgang sechsmal für 5min wiederholt. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran mit einem Horseradish-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper von Ziegen, der gegen Kaninchen-Proteine gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 (TGF β RI), bzw. 1:2000 (TGF β RII) in TBST angesetzt, und in einem Gesamtvolumen von 6 ml unter ständigem Schaukeln mit der Nitrocellulosemembran inkubiert. Dann erfolgte noch sechsmal ein 5 minütiges Waschen der Membran mit TBST.

Mittels Zusatz von West Pico Supersignal (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) das nach Herstellerangaben verwendet wurde, wurde durch Chemolumineszenz die gesuchten spezifischen Banden von TGF β RI oder TGF β RII nachgewiesen. Die Lumineszenz wurde nach ca. 3 Minuten durch Belichtung eines Röntgenfilms über der Membran in einer Röntgenkassette nachgewiesen. Die verwendeten Belichtungszeiten lagen zwischen 1-60 Minuten.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kulturbedingungen der Zellen

2.2.2.1.1 Medien

DMEM kam als Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 100 μ g/ml Penicillin und 100U/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ zur allgemeinen Zellkultur von HuH7 und HepG2 Zellen zur Verwendung. DMEM enthält alle Bestandteile eines kompletten Mediums und wurde zusätzlich angereichert.

Neomycin-resistenten Zellklonen wurde darüber hinaus Genitacin (G418) in einer Konzentration von 800 μ l/ml als Selektionsmedium zugesetzt.

OptiMEM (Gibco) wurde als serumfreies Medium zur Transfektion verwendet.

2.2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

HuH7 wurden in für die Zellkultur beschichteten Schalen in dem oben beschriebenen DMEM bei 37°C und 5% CO₂ subkonfluent kultiviert.

2.2.2.1.3 Lagerung von Zellen

Zellen, die nicht zu Experimenten herangezogen wurden, wurden in flüssigem Stickstoff in reinem FCS mit 10% DMSO Anteil gelagert.

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer

Die Zellzählung erfolgte in der Neubauer Zählkammer.

2.2.2.3 Wachstumsverhalten von Wildtyp HuH7 Zellen unter Zusatz von exogenem TGF β 1

Um den Einfluss von TGF β 1 auf das Wachstum von Wildtyp (wt) HuH7 und HepG2 Zellen zu untersuchen, wurden jeweils 4×10^5 Zellen auf 6 Loch Platten ausgebracht. Nach 24 h (Tag1) wurden die Kulturen mit PBS gewaschen, und das DMEM Medium durch serumarmes OptiMEM unter Zusatz von 0,2; 2; 10; 20 und 200 μ l TGF β 1 ersetzt. Dabei kam den Herstellerempfehlungen entsprechend in PBS und 1% BSA verdünntes TGF β 1 zur Verwendung. Erneuerung mit identischem Medium erfolgte am 3. Tag.

Am 7. Tag wurden die Zellen mit 500 μ l Trypsin-EDTA abgelöst, die Kulturplatten 2x nachgespült und alle Zellen einer Platte in Eppendorfgefäßen bei 5000xg für 5 min zu einem Pellet zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen in einer definierten Menge Medium resuspendiert. 20 μ l der Suspension wurden 1:1 mit Trypanblau versetzt, und die Zahl vitaler Zellen mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Das Experiment wurde zweifach ausgeführt und die Werte gemittelt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zusatz von TGF β 1 unter sonst identischen Bedingungen.

2.2.2.4 Stabile Transfektion von HuH7 Zellen mittels Lipofectamine

Die Transfektion wurde mit Hilfe von Lipofectamine der Firma GibcoBRL durchgeführt. Die stabile Transfektion der Rezeptorkonstrukte erfolgte zunächst nach den allgemeinen Empfehlungen und Protokollen des Herstellers, wurde jedoch im vorgegebenen Rahmen durch Vorversuche modifiziert, und zur Erlangung bester Transfektionsraten optimiert.

Jeweils $1,8 \times 10^6$ Zellen wurden auf 150 mm Kulturplatten ausgesät, 24 h bebrütet, und vor Transfektion mit OptiMEM gewaschen. Pro Transfektion wurden 40 μ g DNA mit 1,8 ml OptiMEM und in einem zweiten Gefäß 90 μ l Lipofectamine mit 1,8 ml OptiMEM angesetzt. Diese beiden Lösungen wurden dann vermischt, und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 14,4 ml OptiMEM zu jedem Ansatz hinzugefügt. Diese insgesamt 18 ml wurden auf jede gewaschene zu transfizierende Platte ausgebracht und im Brutschrank 5 h inkubiert.

Anschließend wurde die gleiche Menge mit 20% FCS versetztem DMEM hinzugefügt.

24 h nach Beginn der Transfektion erfolgte der erste Mediumwechsel mit DMEM+10%FCS+Penicillin/Streptomycin. 72 h nach Beginn der Transfektion begann die Selektion mit Geneticin. Es wurden 800µl/ml G418 verwendet, diese Konzentration entsprach den in Vorexperimenten ermittelten maximalen Hemmkonzentration von wt HuH7 unter Neomycin. Ein Mediumwechsel mit supplementiertem DMEM und G418 erfolgte alle 2-3 Tage.

Nach ca. 10-14 Tagen ergibt sich ein Bild aus einzelnen Zellnestern. Diese sind Klone erfolgreich transfizierter Zellen, die, wenn sie 2-fache Gesichtsfeldgröße im Mikroskop erreicht hatten, mittels Trypsin vorsichtig einzeln von der Transfektionsplatte abgelöst, und Klon für Klon in separaten Platten aufgezogen wurden.

Im Einzelnen wurde transfiziert: jeweils 36µg pIRESneo und 4µg CA Rezeptorkonstrukt oder DN Rezeptorkonstrukt (9:1), eine mock Transfektion mit 40µg pIRESneo und eine negativ Kontrolle ohne DNA. Alle Versuche wurden 4-fach durchgeführt.

2.2.2.5 Untersuchung des Wachstumsverhalten von konstitutiv aktiv oder dominant negativen Rezeptormutanten stabil transfizierter HuH7 Zellen

Um den Einfluss der stabil transfizierten CA und DN Rezeptormutanten auf die Proliferation von HuH7 Zellen zu testen, wurde das Wachstum der Rezeptormutanten-Klone miteinander und mit der ausschließlich pIRESneo transfizierten HuH7 Zellpopulation verglichen.

Am Tag 1 wurden 5×10^4 Zellen mittels Neubauer Zählkammer ermittelt und auf 6 Loch Kulturplatten mit supplementiertem DMEM und G418 in Kultur genommen. Am 3., 5. und 7. Tag wurden die Zellen wie oben beschrieben von den Platten geerntet, und die Zellzahl bestimmt. Ein Mediumwechsel erfolgte am 3. und 5. Tag. Alle Ansätze wurden dreifach durchgeführt und die Zellzahl als Mittelwert der Ansätze errechnet.

Um die Proliferation der einzelnen Konstrukte miteinander vergleichen zu können, wurde eine Wachstumskinetik erstellt, die der Phase des exponentiellen Wachstums der Zellen zwischen dem 3. und 5. Tag entspricht. Diese lässt sich mathematisch als

$$Z_t = Z_0 e^{\mu t}$$

darstellen (Z_t : Zellzahl am Tag t , Z_0 : initial ausgesäte Zellzahl). Hierdurch gilt für die Wachstumskonstante μ zwischen dem 3. und 5. Tag

$$\mu = [\ln(Z_5) - \ln(Z_3)] / (5 - 3)$$

Dies entspricht der Steigung der logarithmischen Kurve zwischen dem 3. und 5. Tag und ist somit unabhängig von der initialen Zellzahl. Die Wachstumskonstanten wurden für alle Klone ermittelt und die statistische Unterschied mittels des Kruskal-Wallis Tests überprüft.

2.2.3 Statistik

Die Prüfung der statistischen Unterschiede zwischen unterschiedlichen Wachstumskonstanten μ von CA, DN und pIRESneo Klonen von HuH7 Zellen wurde mittels Kruskal-Wallis (Kruskal und Wallis, 1952) Test ermittelt. Anschließend wurde zwischen Kontrollklonen und Rezeptor exprimierenden Klonen mittels U-Test unter Verwendung der Bonferroni-Anpassung verglichen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter $p=0.05$ wurde als signifikant angenommen.

Bei mangelnder Normalverteilung kamen nicht-parametrische Tests zur Anwendung. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsexperimente

3.1.1 Einfluss von exogenem TGF β 1 auf das Wachstum von Wildtyp HuH7

TGF β 1 hat einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von HuH7 Wildtyp-Zellen, wie Abb. 10 zeigt: Schon durch Zugabe von 2 pmol/l TGF β 1 zum Kulturmedium, einer Konzentration, die der physiologischen Serumkonzentration entspricht, ließ sich das zu erwartende exponentielle Wachstum verlangsamen, eine messbare Wachstumshemmung trat auf. Bei Zusatz von 10 pmol/l oder höher, sank die gezählte absolute Zellzahl vitaler Zellen unter den Ausgangswert. Es starben also Zellen ab.

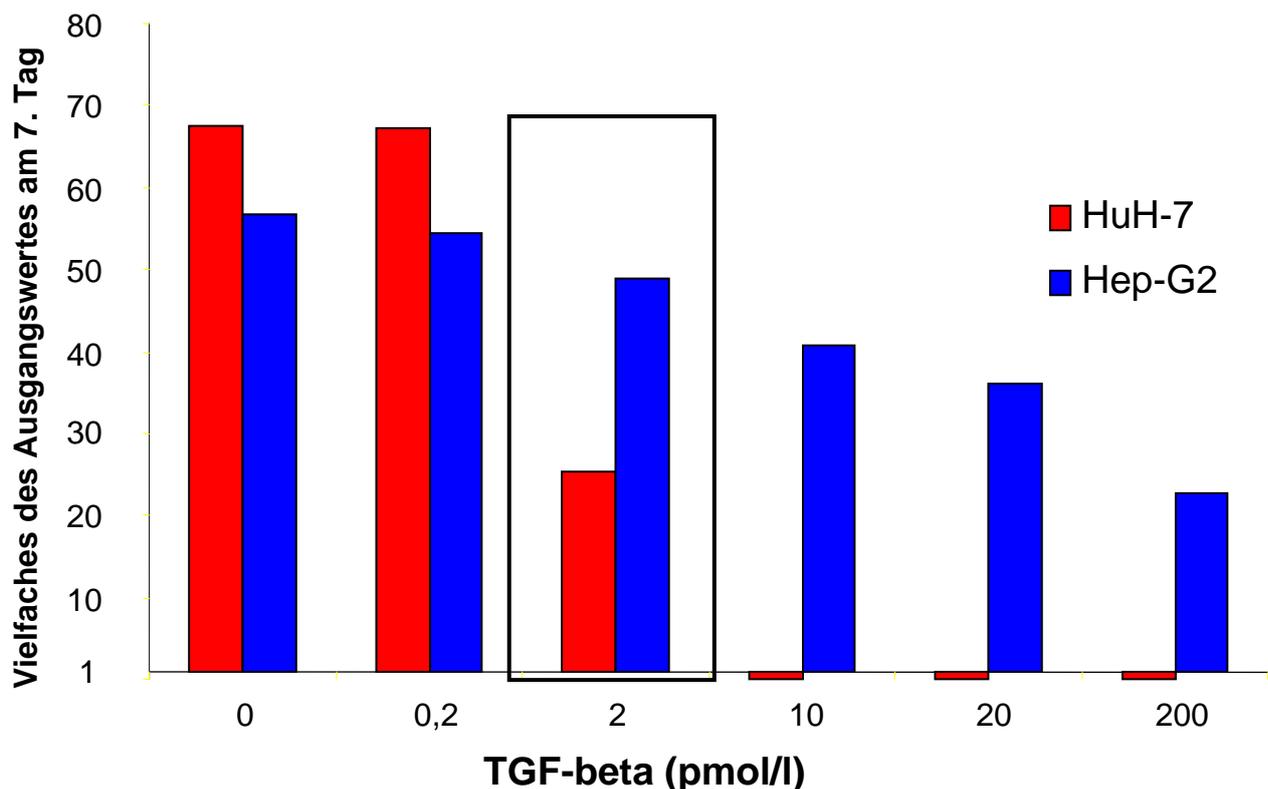
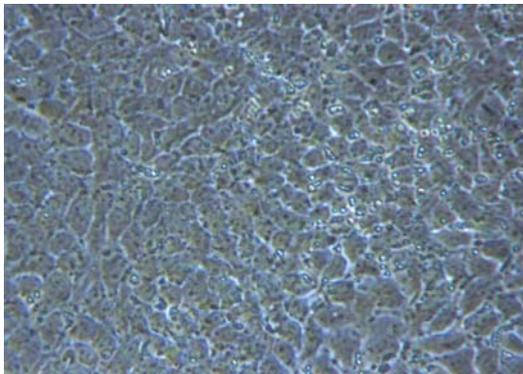


Abb 10 Einfluss von exogenem TGF β 1 auf Wildtyp HuH7 und als Kontrolle verwendete HepG2 Zellen. HuH7 Zellen zeigen unter ansteigenden Konzentrationen eine deutliche Proliferationshemmung durch exogenes TGF β 1, ab 10 pmol/l sterben Zellen ab. HepG2 Zellen zeigen weitgehende TGF β 1 Resistenz. Der Rahmen markiert den klinischen Serum Konzentrationsbereich an HCC erkrankter Patienten.

Im Gegensatz hierzu zeigten die als Kontrolle verwendeten HepG2 Zellen eine weitreichende TGF β 1 Resistenz: Auch unter Steigerung der TGF β 1 Konzentration um das 10 bis 100 fache normaler TGF β Konzentrationen, fand immer noch ein Wachstum

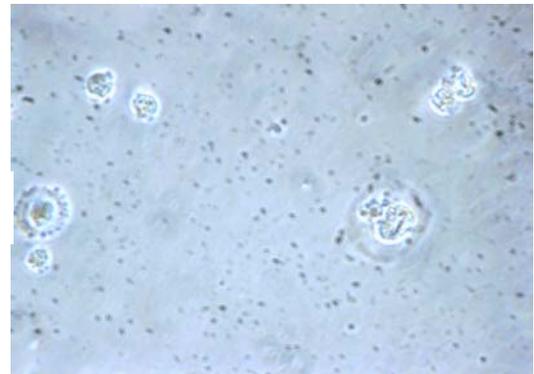
statt, wenn auch konzentrationsabhängig abnehmend.

Das mikroskopische Bild unterstreicht dieses Ergebnis:



0 pmol/l TGFβ1

HuH7

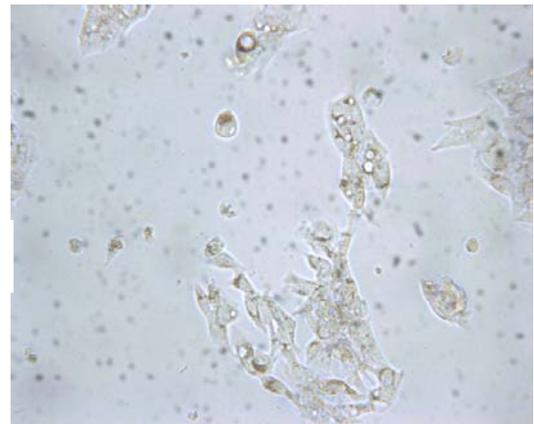


200 pmol/l TGFβ1



0 pmol/l TGFβ1

HepG2



200 pmol/l TGFβ1

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 Zellen zeigen unter maximaler TGFβ 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.

3.1.2 Einfluss der transfizierten dominant negativen und konstitutiv aktiven Rezeptormutante des TGF-beta Typ I Rezeptors auf das Wachstumsverhalten von HuH7 Zellen

3.1.2.1 Nachweis der Neomycin-Resistenz mittels rt-PCR in der Negativkontrolle

Alle als Negativkontrollen der Transfektion dienenden IRES Klone, die ausschließlich den Vektor mit dem Neomycin-Resistenzgen tragen, und die zur Auswertung gekommenen HuH7 Klone der Rezeptormutanten wurden mittels rt-PCR auf die Expression des IRES Gens überprüft. Die erwartete Bande liegt bei 440 bp.

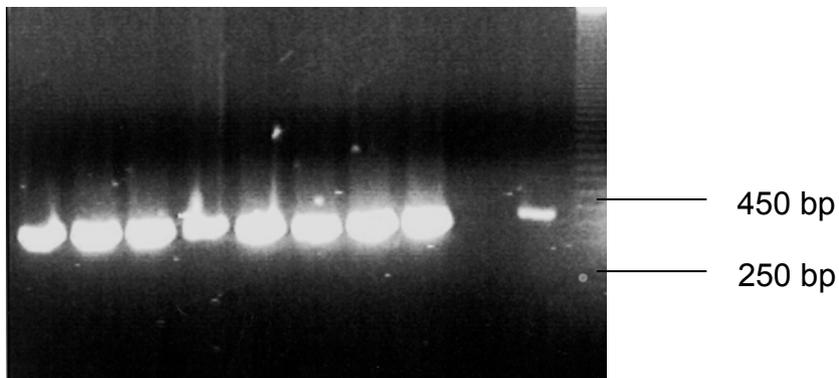


Abb. 12 Transkription des Neomycin-Resistenzgens in HuH7 Zellen. Spur 1-8 IRES transfizierte Klone, Spur 10 negativ Kontrolle der rt-PCR ohne RNA, Spur 11 ohne reverse Transkription, Spur 12 Längenstandart.

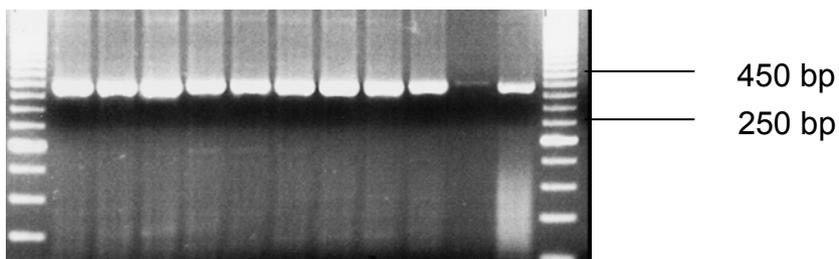


Abb. 13: Transkription des Neomycin Resistenzgens in HuH7 Zellen. Spur 1 DN1, Spur 2 DN5, Spur 3 DN6, Spur 4 DN8, Spur 5 CA3, Spur 6 CA4, Spur 7 CA5, Spur 8 CA 6, Spur 9 CA 9 (nicht ausgewertet), Spur 10 keine RNA, Spur 11 keine RT Reaktion

3.1.2.2 Nachweis der Transkription konstitutiv aktiver und dominant negativer TGF-beta Typ I Rezeptormutanten mittels rt-PCR

Um den Nachweis der Expression spezifisch für das rekombinante Konstrukt gegenüber dem Wildtyp Rezeptor zu gestalten, wurde ein Primer entworfen, der an dem Übergang von pCMV5 zum Insert bindet. Die erwartete Bande liegt bei 268 bp.

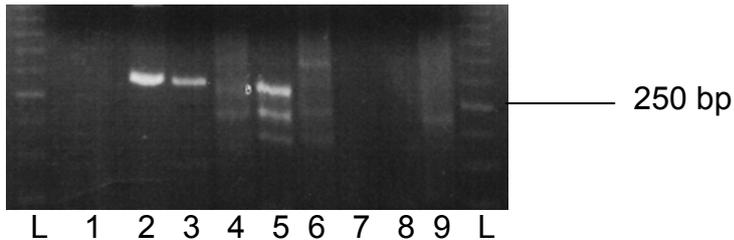


Abb. 14 HuH7 Zellen mit konstitutiv aktivem TGF-beta Typ I Rezeptor: L= Längenstandard, Spur 2 CA3, Spur 3 CA4, Spur 5 CA6, Spur 8 Negativkontrolle ohne RNA, Spur 9 ohne Reverse Transkription.

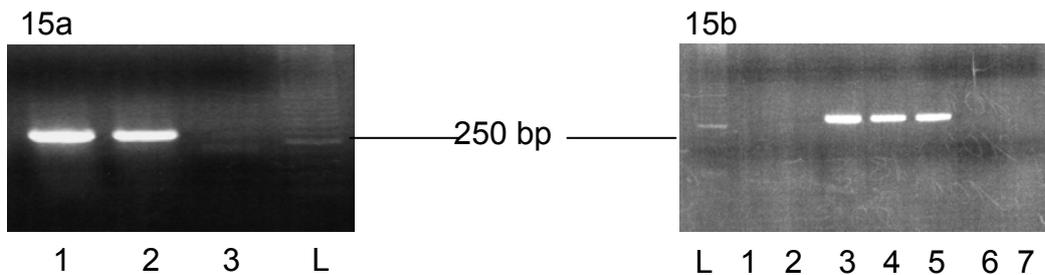


Abb. 15a HuH7 Zellen, konstitutiv aktive und dominant negative TGF-beta Typ I Rezeptor Mutante: Spur 1 CA5, Spur 2 DN5, Spur 3 ohne RNA, L= Längenstandart

Abb. 15b HuH7 Zellen, dominant negative TGF-beta Typ I Rezeptor Mutante: L= Längenstandart, Spur 3 DN1, Spur 4 DN6, Spur 5 DN8, Spur 6 Negativkontrolle ohne RNA, Spur 7 ohne Reverse Transkription.

Alle gezeigten Klone der Rezeptormutanten in HuH7 Zellen wurden sequenziert und die Identität der Transgene bestätigt (siehe auch Abb. 25-32 im Anhang.)

3.1.2.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltes von konstitutiv aktiven und dominant negativen Klonen von HuH7 Zellen in Zellkultur

3.1.2.3.1 Wachstumsverhalten der mit IRES transfizierten Kontrollgruppe von HuH7 Zellen

In Abb.16 sind die zur Kontrolle dienenden IRES Klone von HuH7 Zellen dargestellt. Diese enthalten nur den Vektor pIRESneo mit dem Neomycin-Resistenzgen, nicht aber die TGF-beta Rezeptor Typ I Mutanten, die über pCMV5 exprimiert werden.

Die Zellen wurden am Tag 0 ausplattiert, und am 3., 5. und 7. Tag ausgezählt. Die Abbildung zeigt für jeden Klon den Mittelwert aus dreifacher Bestimmung.

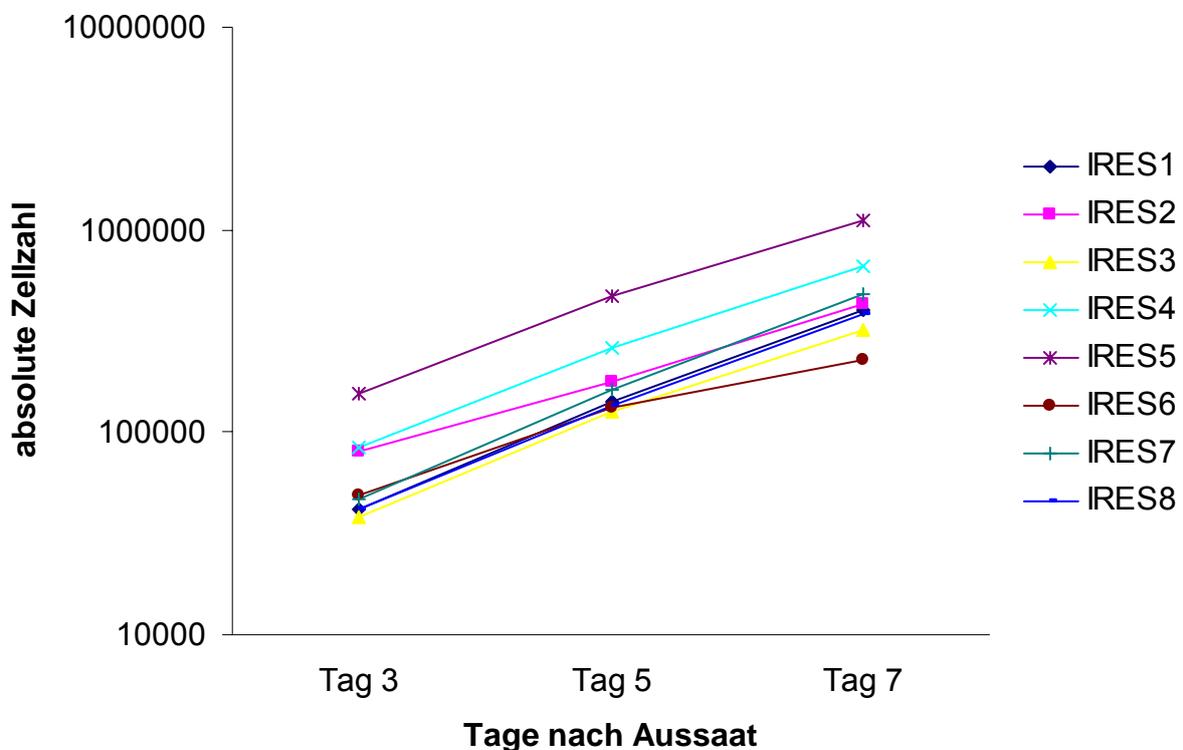


Abb. 16 Logarithmische Wachstumskurven von IRES Klonen, Mittelwerte einer dreifachen Bestimmung. Alle IRES Klone zeigen ein annähernd exponentielles Wachstumsverhalten, bei unterschiedlicher absoluter Zellzahl.

3.1.2.3.2 Wachstumsverhalten der mit CA Mutante transfizierten Klone von HuH7 Zellen

Abb. 17 stellt das Wachstumsverhalten von HuH7 Klonen dar, die mit der konstitutiv aktiven Mutante des TGF-beta Typ I Rezeptors stabil transfiziert wurden. Sie enthalten zudem das Neomycin-Resistenzgen durch Kotransfektion mit pIRESneo.

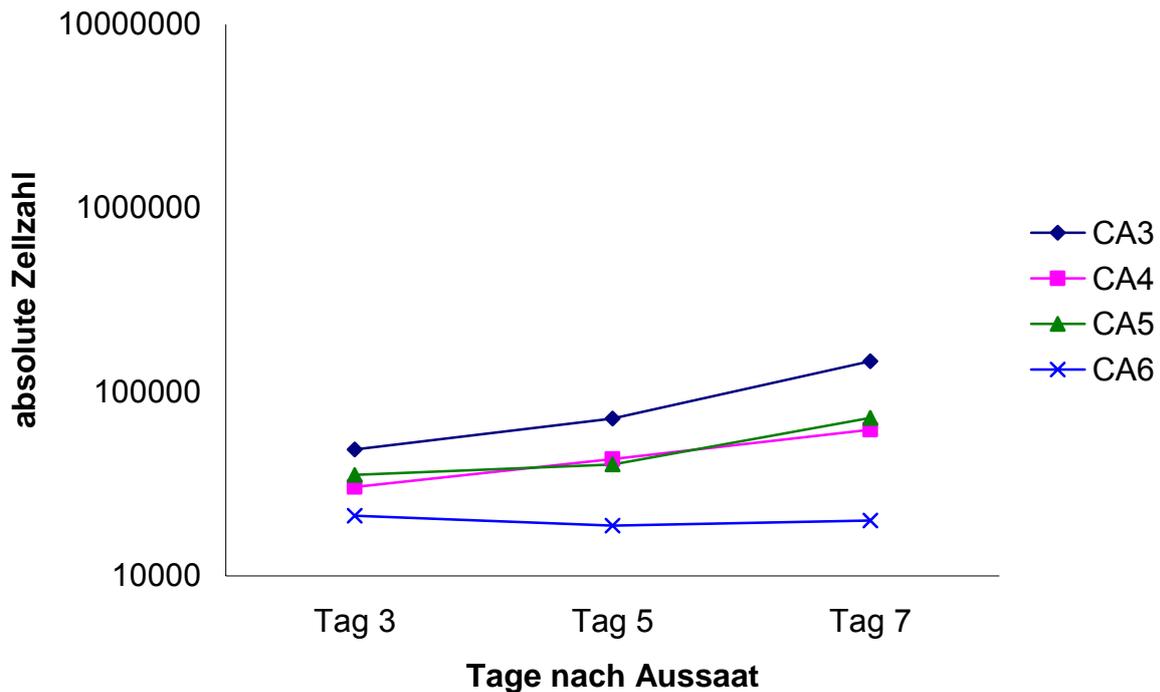


Abb. 17 Logarithmische Wachstumskurven von CA Klonen, Mittelwerte einer dreifachen Bestimmung. Die Wachstumskurven zeigen insgesamt einen weniger steilen Verlauf. Auch in der Zellkultur entstand der Eindruck einer langsameren Proliferation der Zellklone von HuH7 Zellen. Die Abbildung zeigt ebenfalls eine Differenz der absoluten Zellzahl zwischen den Ansätzen.

3.1.2.3.3 Wachstumsverhalten der mit DN Mutante transfizierten Klone von HuH7 Zellen

Abb. 18 zeigt das Wachstumsverhalten von HuH7 Klonen, die den dominant negativen TGF-beta Typ I Rezeptor stabil exprimieren. Auch sie tragen zusätzlich pIRESneo zur Vermittlung der Neomycinresistenz.

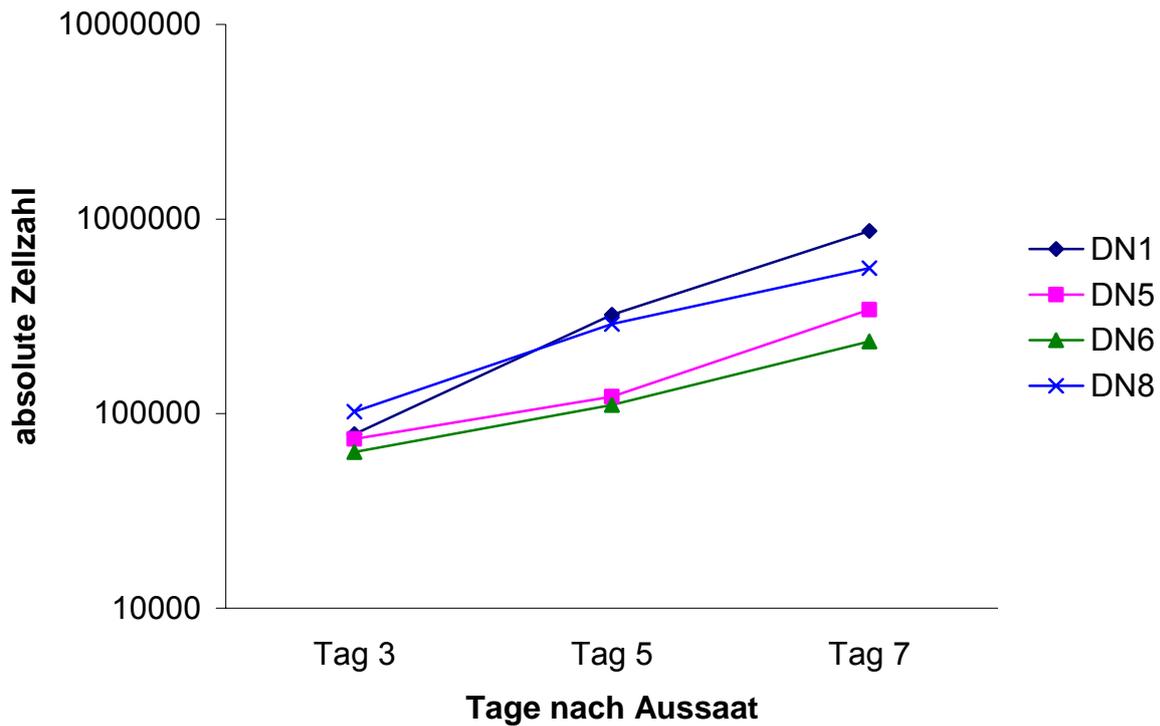


Abb. 18 Logarithmische Wachstumskurven von CA Klonen, Mittelwerte einer dreifachen Bestimmung. Die DN Klone zeigen, ähnlich wie die IRES Klone von HuH7 Zellen, ein annähernd exponentielles Wachstumsverhalten mit vergleichbar steiler Steigung der Kurven.

3.1.2.3.4 Untersuchung der Wachstumskinetik von IRES, CA und DN Klonen von HuH7 Zellen im Vergleich

Um die Wachstumskinetik unabhängig von der absoluten Zellzahl darstellen zu können, wurden für die folgende Abb. 19 die Steigung der einzelnen Kurven als Wachstumskonstante μ (s. 2.2.2.5) aus Abbildungen 16, 17, und 18 zwischen dem 3. und 7. Tag errechnet und in einem Punktdiagramm dargestellt. Balken in den einzelnen Säulen repräsentieren den Median.

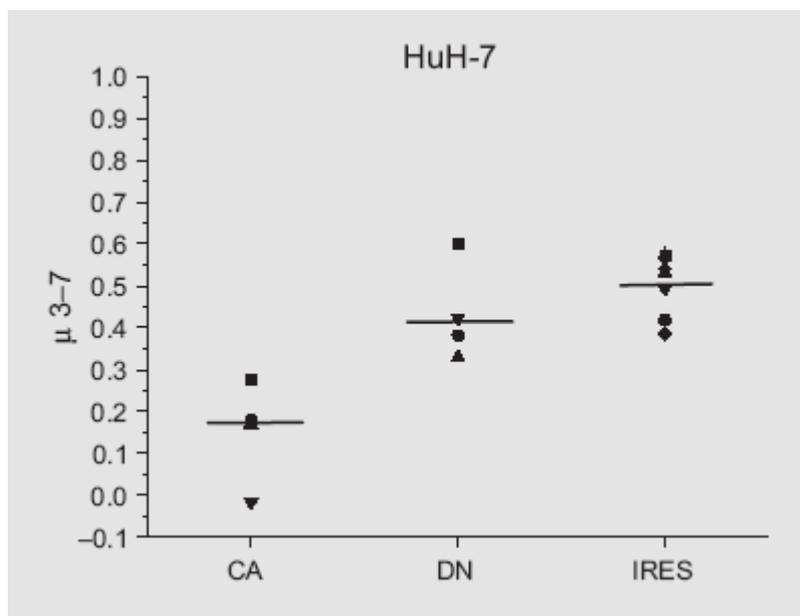


Abb. 19 Wachstumskonstante μ zwischen dem 3. und 7. Tag nach Ausplattierung. Median IRES= 0,52 ; Median CA= 0,18 ; Median DN= 0,40.

Im Vergleich liegen Median von dominant negativ transfizierter und Kontrollgruppe (IRES) der HuH7 Zellen nahe beieinander. Auffällig ist die Abweichung des Medians der CA Klone nach unten im Sinne eines geringeren Wachstums.

3.1.2.3.5 Statistische Auswertung der Wachstumskinetik

In der statistischen Auswertung der Wachstumskinetik mittels Kruskal-Wallis Test ergab sich ein signifikanter Unterschied der Wachstumskinetik zwischen den Klonen ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Bei der individuellen Testung der Wachstumskinetik mit dem U-Test zeigte sich für die Klone der konstitutiv aktiven TGF-beta Rezeptor Typ I Mutante ($n=4$) eine signifikante Wachstumsinhibition gegenüber der Neomycin Kontrolle ($n=6$) ($p = 0,011$). Ein signifikanter Wachstumsunterschied ($p=0,05$) der dominant negativen TGF-beta Rezeptor I Mutante ($n=4$) gegenüber den Kontrollklonen konnte nicht nachgewiesen werden.

Alle Experimente wurden dreifach ausgeführt und ausgewertet.

3.2 Untersuchungen zur Expression von TGF-beta Typ I und II Rezeptor in HuH7 Zellen und in klinischen HCC

Da die stabile Expression einer konstitutiv aktiven Mutante des TGF beta Typ I Rezeptors zu einer statistisch signifikanten Wachstumsinhibition in HuH7 Zellen führte, jedoch nicht in HepG2 Zellen (s. Dissertationsschrift M.J. Berna (Berna, 2001)), wurde die Expression von RNA und Protein sowohl des Typ I als auch des Typ II Rezeptors untersucht. Darüber hinaus sollten Untersuchungen an humanen HCC klären, ob eine TGF beta Resistenz vom Typ der HuH7 Zellen auch in klinischen HCC vorliegt. HuH7 Zellen, zur Kontrolle verwendete HepG2 Zellen und anonymisierte HCC Resektate, die unserem Labor zur Verfügung standen, wurden untersucht und verglichen.

3.2.1 Transkriptionsnachweis der RNA von TGF-beta Typ I Rezeptor in HuH7 Zellen und humanem Lebertumorgewebe mittels rt-PCR

Abbildung 20 zeigt die Expression von TGF-beta Typ I Rezeptor RNA (erwartete Länge 375 bp) in allen 10 Tumorproben (gerade Zahlen). Neben jedem Tumor ist peritumorales Gewebe als Kontrollgruppe (ungerade Zahlen) aufgetragen. HuH7 und HepG2 Zellen wurden in Spur 21 und 22 aufgetragen. Sie zeigen ebenfalls Expression. Spur 23 und 24 tragen Negativkontrollen ohne RNA bzw. ohne reverse Transkription.

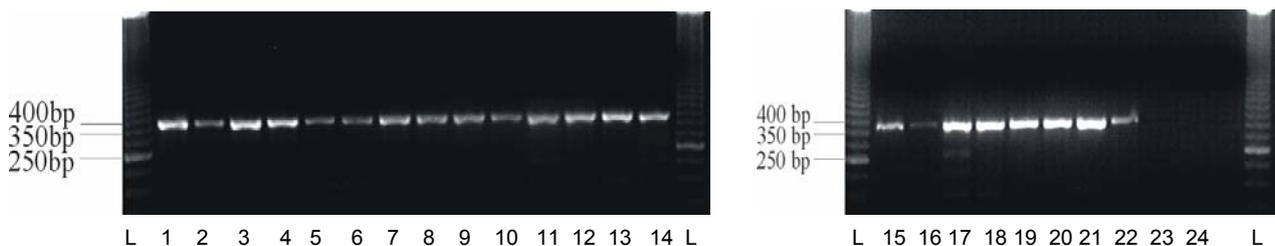


Abb. 20 Nachweis der Transkription von TGF-beta Rezeptor I RNA in 10 Tumor (gerade Zahlen) und korrespondierenden Peritumoren (ungerade Zahlen) (Spur 1-20), HuH7 Zellen (21) und HepG2 Zellen (22). Spur 23: Negativkontrolle ohne RNA, Spur 24: ohne Reverse Transkription. L= Längenstandard.

Die dargestellten DNA Banden liegen in der erwarteten Höhe von 330 bp für das amplifizierte Produkt. Zum sicheren Nachweis der Identität der Bande, wurde das rt-PCR Produkt aus Bahn 17 exemplarisch zusätzlich sequenziert.

Das Sequenzierungsergebnis bestätigt die Identität der gezeigten Banden als Amplifikationsprodukt der TGF-beta Typ I Rezeptor RNA (siehe auch Abb. 33 im

Anhang).

3.2.2 Transkriptionsnachweis der RNA von TGF-beta Typ II Rezeptor in HuH7 Zellen und humanem Lebertumorgewebe mittels rt-PCR

Abbildung 21 zeigt die Expression von TGF beta Typ II Rezeptor RNA (erwartete Länge 170 bp) in allen 10 Tumorproben (gerade Zahlen). Neben jedem Tumor ist peritumorales Gewebe als Kontrolle (ungerade Zahlen) aufgetragen. HuH7 und HepG2 Zellen wurden in Spur 21 und 22 aufgetragen. Sie zeigen ebenfalls Expression. Spur 23 und 24 tragen Negativkontrollen ohne RNA bzw. ohne reverse Transkription.

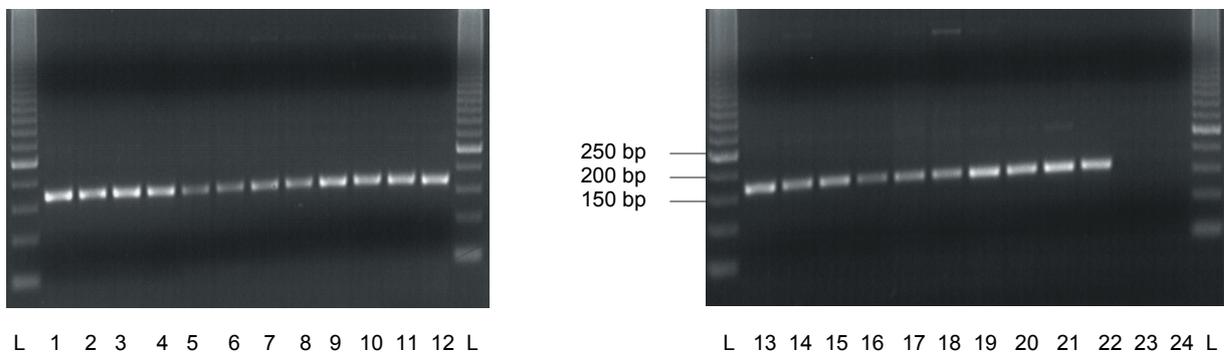


Abb. 21 Nachweis der Transkription von TGF-beta Rezeptor I RNA in 10 Tumor (gerade Zahlen) und korrespondierenden Peritumoren (ungerade Zahlen) aus humanen HCC (Spur 1-20), HuH7 Zellen (21) und HepG2 Zellen (22). Spur 23: Negativkontrolle ohne RNA, Spur 34: ohne Reverse Transkription L= Längenstandart.

Die dargestellten Banden liegen in der erwarteten Höhe von ca. 170 bp. Zur sicheren Identifikation der Bande als Zielprodukt der rt-PCR auf dem Gen von TGF-beta Typ II Rezeptor, erfolgte die Sequenzierung der Bande. Um darüber hinaus jedoch auch eine Rezeptor inaktivierende Punktmutation in einer Mikrosatelliten Region von 10 Adenin als zugrunde liegenden Defekt in dem untersuchten Patientenkollektiv auszuschließen, wurden die Primer um die entsprechende PolyA Sequenz gelegt. Daher erfolgte anschließend die Sequenzierung aller Tumoren, sowie der DNA von HepG2 und HuH7 Zellen. Abbildung 34 im Anhang zeigt exemplarisch die Analyse des fraglichen Mikrosatelliten.

3.2.3 Translationsnachweis von TGF-beta Typ I und Typ II Rezeptor Protein in HuH7 Zellen mittels Western Blot

Abbildung 22 zeigt den Proteinnachweis mit polyklonalem TGF β RI Antikörper, links TGF β RII Antikörper. Die erwarteten Proteinbanden liegen für den TGF beta Typ I Rezeptor bei 55 kDa, für den Typ II Rezeptor bei 70 kDa. Als Negativkontrolle wurde fetales Kälberserum (FCS) mitgeführt.

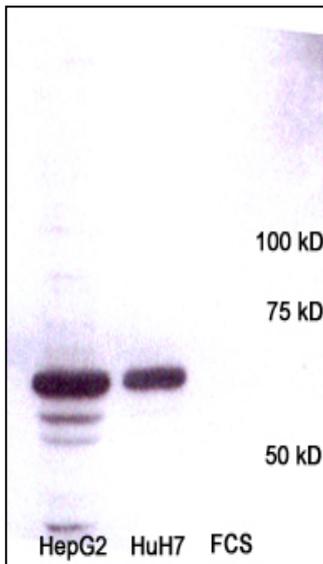


Abb. 22a

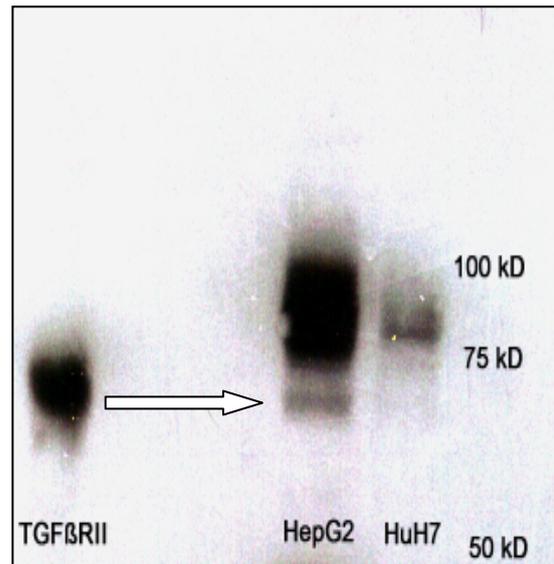


Abb. 22b

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.

HuH7 und zur Kontrolle eingesetzte HepG2 Zellen zeigen eine vergleichbare Proteinexpression für den TGF-beta Rezeptor Typ I. HepG2 Zellen exprimieren auch deutlich Protein des TGF-beta Rezeptor Typ II. Dagegen ist in HuH7 Zellen ein Typ II Rezeptorprotein- im Gegensatz zum vorhandenen Transkriptionsprodukt- nicht nachweisbar. Die Mehrfachbanden der Blots erklären sich aus der polyklonalen Natur beider Antikörper und entsprechen unspezifischen Bindungen.

3.2.4 Translationsnachweis von TGF-beta Typ I und Typ II Rezeptor Protein in Lebertumoren und korrespondierendem peritumoralem Gewebe mittels Western Blot

Mittels Western Blot wurden auch die 10 Tumor/Peritumor Paare aus klinischen humanen HCC untersucht. In Abb.23 exemplarisch jeweils ein Blot zu TGF-beta Typ I und Typ II Rezeptor.

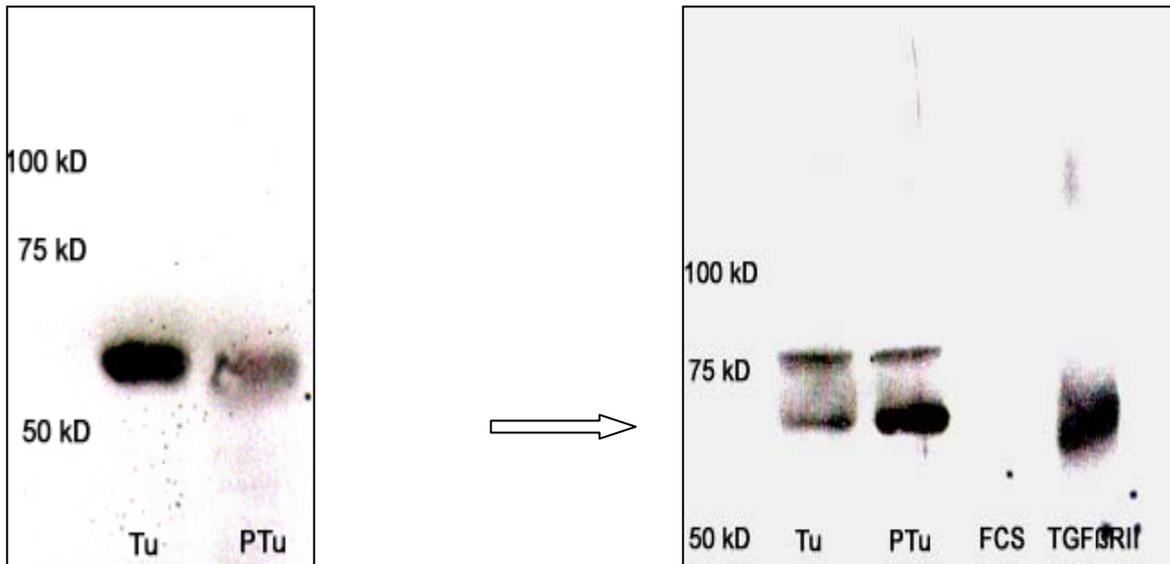


Abb. 23a

Abb. 23b

Abb. 23: Nachweis von TGF-beta Rezeptor Proteinen in 10 klinischen HCC und dem peritumoralen Gewebe. Abb. 23a: Western Blot mit polyklonalem Antikörper gegen TGF-beta Typ I Rezeptor. Von links nach rechts: Die erste Spur zeigt exemplarisch einen Tumor, die zweite das peritumorale Gewebe derselben Leber. Die Proteinbande des Tumorgewebes (Tu) ist etwas stärker ausgeprägt als die Bande im Peritumoralen Gewebe (PTu). Sie liegen in der erwarteten Höhe. Eine rekombinante Positivkontrolle ist nicht erhältlich. Abb. 23b: Western Blot mit polyklonalem Antikörper gegen TGF-beta Rezeptor Typ II. In Spur 1 Tumor, Spur 2 Peritumor. In der dritten Spur wurde FCS als Negativkontrolle mitgeführt. In der letzten Spur eine Positivkontrolle mit TGF-beta Rezeptor II Protein, ein kommerziell erhältliches, gentechnisch synthetisiertes Protein. Der Pfeil weist auf die Höhe der erwarteten Bande. Der Peritumor zeigt eine deutliche Expression (erste Bande von unten) von TGFβRII, im Peritumor ist die entsprechende Bande schwächer ausgeprägt.

Die Bande oberhalb der erwarteten Größe des gesuchten TGF-beta Rezeptors entspricht einer unspezifischen Bindung des Antikörpers und erklärt sich aus der polyklonalen Natur der Antikörper.

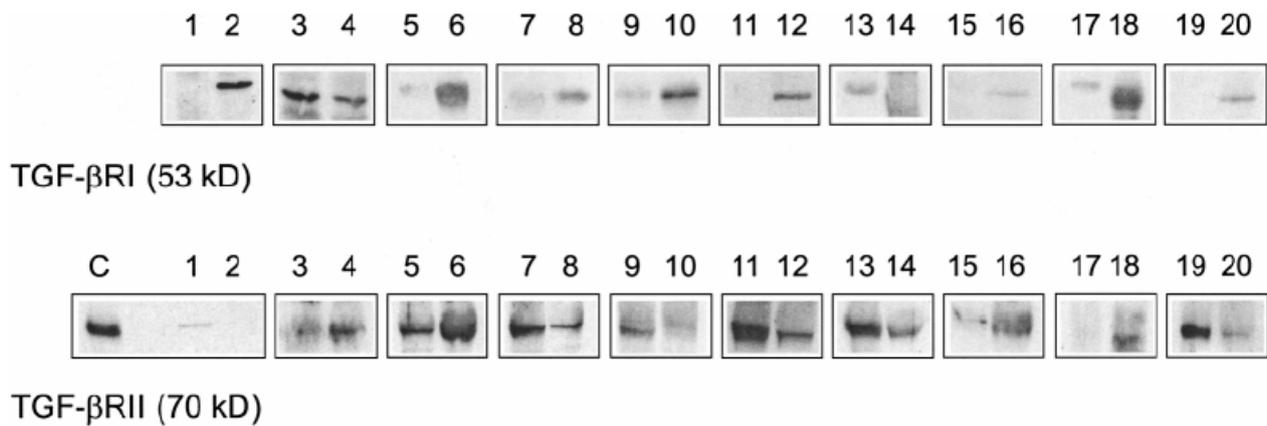


Abb. 24 Western Blot der Protein Extraktionen aus klinischen Tumoren und peritumoralem Gewebe (SDS-Page (10%). Die Abbildung zeigt die 10 Tumor/ Peritumor Paare, gerade Zahlen zeigen die Tumore, ungerade Zahlen das peritumorale Gewebe. Für TGFβRII Protein Assays (70 kD positiv Kontrolle) war die Expression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

In acht von zehn Fällen war die Expression von TGF-beta Rezeptor Typ I Protein im Tumor stärker ausgeprägt als im Peritumoralen Gewebe. TGF-beta Rezeptor Typ II Protein hingegen war in sechs von zehn Fällen stärker im Peritumor als im Tumor exprimiert.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von primären Leberkarzinomzelllinien unter exogenem Einfluss von TGF β , der Einfluss von konstitutiv aktiver und dominant negativer TGF β RI Mutante in HuH7 Zellen und die Expression der TGF-beta Rezeptoren in klinischen HCC auf Protein- und RNA Ebene untersucht. Im Rahmen des gesamten experimentellen Projekts wurden die Wachstumsexperimente auch in HepG2 Zellen durchgeführt, eine weitere Arbeit befasst sich im Verlauf mit der Auswirkung der Rezeptormutanten auf die Invasivität der Zellen.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Zellkultur

Um verwertbare Ergebnisse aus einer Zellkultur zu erzielen, insbesondere wenn wie hier das Wachstumsverhalten von Zellen nach genetischer Veränderung beurteilt werden sollte, mussten alle anderen Kulturbedingungen stabil, und ein Optimum der Kulturbedingungen gehalten werden.

Daher wurden in allen Untersuchungsreihen dieselben Kulturmedien und Zusätze verwandt, insbesondere wurde fetales Kälberserum nur einer Charge genutzt, um eventuelle Qualitätsschwankungen abzufangen.

Darüber hinaus folgte die Pflege der Kultur ebenfalls nach standardisierten Bedingungen. Es musste gewährleistet sein, dass Zellen nicht durch Depletion des Mediums oder konfluentes Wachstum (Kontaktinhibition) aus der logarithmischen Wachstumskurve herausfallen.

Hierzu musste ein regelmäßiger Mediumswechsel und das Vereinzeln und Reduzieren der Zellen im Verhältnis 1:3 etwa alle 3 Tage erfolgen. Hierbei durften die adhärenen Zellen nicht zu lange zur Ablösung trypsiniert werden, und der Vereinzlungsvorgang durch Ziehen durch eine 20G Nadel durfte die Zellen nicht durch Scherung beschädigen.

Frisch aus der Kryokonservierung kommende Zellen eignen sich ebenfalls nicht zu standardisierten Versuchen, sie mussten erst ein bis zwei Passagen in Kultur gehalten werden, um den Stress zu überwinden.

Trotz Standardisierung und phänotypisch gesunder Zellkultur, zeigen die Ergebnisse, dass sich eine vollkommen vergleichbare absolute Zellzahl nicht erreichen ließ. Dies lag nicht an der etablierten Methode der Auszählung mittels Neubauer Zählkammer, diese war zuverlässig reproduzierbar. Vielmehr wuchsen die Zellen nach Zählung unvollständig an. Da dies nicht beeinflussbar war, wurde in der statistischen Auswertung die Basis der absoluten Zellzahl verlassen und stattdessen das Wachstumsverhalten einer Kultur zwischen zwei Messpunkten ausgewertet. Dies wird durch die verwendete Wachstumskonstante μ beschrieben. Alle Experimente wurden mindestens 3-fach durchgeführt.

4.1.2 Lipofection von HuH7 Zellen

Die Transfektion mittels Lipofectamine (Gibco BRL) und die Kotransfektion eines Expressionsvektors zusammen mit einem Neomycin-Phosphotransferase Gen sind etablierte Methoden.

Da bei der Kotransfektion der resistenzermittelnde Vektor mit dem Transgen tragenden Expressionsvektor in einem Verhältnis von 1:10 transfiziert wird, ergibt sich für jeden Neomycin-selektierten Klon eine hohe Wahrscheinlichkeit, auch das Transgen integriert zu haben.

Probleme ergeben sich aber vor allem aus der Tatsache, dass der Ort der Integration des fremden Gens in das Genom der Wirtszelle weder vorhergesehen noch beeinflusst werden kann. Vom Ort der Integration hängt aber unter anderem auch die Intensität der Expression des Transgens ab. Daher können zwei unterschiedliche Klone einer Transfektionsreihe ein unterschiedliches Expressionsverhalten zeigen. Hypothetisch wäre es dann auch möglich, dass bei einem potentiell stark wachstumshemmenden, möglicherweise sogar Apoptose einleitenden Transgen wie dem konstitutiv aktiven Rezeptor, nur schwach exprimierende Klone, oder solche, die nur Neomycin-Phosphotransferase exprimieren, selektiert werden können.

Durch rt-PCR und Sequenzanalysen wurde eine Verfälschung der Ergebnisse durch Überprüfung nicht erfolgreich transgen exprimierender Klone ausgeschlossen. Die oben aufgeführte Hypothese könnte jedoch ein Erklärungsansatz für die schwierige Erzeugung der konstitutiv aktiven Klone sein.

Auf dem Agarose Gel erschien die Intensität der Banden der CA und DN

Rezeptormutanten gleich, da zur Amplifikation der DNA jedoch bis zu 50 Zyklen notwendig waren, ist eine quantitative Aussage der Expression nicht möglich.

4.1.2.1 Rt-PCR

In dieser Arbeit wurde die Amplifikation isolierter RNA zum Nachweis der Transkription sowohl von TGF β RI als auch TGF β RII in Zelllinien, Tumoren und peritumorösem Gewebe genutzt, als auch die Transkription der TGF β RI Mutanten in den Zellklonen nachgewiesen.

Um eine möglichst spezifische Amplifikation eines Gens zu erreichen, sollte der Primer spezifisch zu einer erwählten Startsequenz sein. Je länger hierbei der Primer, umso höher wird seine Spezifität im Hinblick auf das gesamte Genom. Mittels Sequenzierung und Chromas-Analyse lässt sich dann die amplifizierte Sequenz auf Identität und Base um Base auf Übereinstimmung mit der Zielsequenz vergleichen, so dass Punktmutationen oder Leserasterverschiebungen erkennbar werden.

Allerdings kann naturgemäß immer nur der Abschnitt des Genoms, der zwischen zwei gesetzten Primern liegt, überprüft werden. Ob Mutationen außerhalb der amplifizierten Sequenz liegen bleibt ungewiss.

Darüber hinaus trifft die rt-PCR nur eine Aussage über die Transkription eines Gens, ob dieses tatsächlich in ein Protein übersetzt wird, kann so nicht beurteilt werden. Es gibt außerdem RNA Strukturen, die aufgrund eines weiteren Processings verlängerte oder verkürzte Überlebenszeiten als Matrizen aufweisen, auch hierüber kann diese Methode keinen Aufschluss geben. Darüber hinaus wurde in diesen Untersuchungen Gesamt-RNA eingesetzt, nicht nur die zu translatierende RNA.

Während qualitative Aussagen über die amplifizierte Sequenz möglich sind, lässt sich eine quantitative Aussage nur unter bestimmten Bedingungen treffen: Eine Kontrolle, die in bekannter Weise in allen Zellen auf einem stabilen Niveau transkribiert wird, muss als Vergleich mit amplifiziert werden. Hierfür wurde β -Aktin verwendet.

Um eine quantitative Aussage zu treffen, muss außerdem der so genannte Plateau-effekt ausgeschlossen sein. Dieser ist bei weiter Fortschreiten der PCR vor allem durch eine Zunahme der Gesamtzahl an Molekülen bedingt, die die effiziente Anlagerung von Primern und Polymerase behindern. Auch nimmt trotz Hitzestabilität der Polymerase mit der Anzahl der Zyklen die Aktivität der Polymerase ab. Schlussendlich führt ein Verbrauch von einer oder mehreren Reaktionskomponenten zu einer Stagnation der

Amplifikation. Aufgrund dieses Plateaueffekts, der ab etwa 30-50 Zyklen auftreten kann, kommt es also zu einer Angleichung der Amplifikationsmenge unabhängig von der Zahl initial vorhandener Matrizen.

4.1.3 Western Blot

Western Blot diente zum Nachweis des Translationsprodukts der untersuchten RNA.

Um ein möglichst spezifisches Ergebnis zu erhalten, sollten nach Möglichkeit hochspezifische Antikörper verwendet werden, die nur an das gesuchte Protein binden. Auch hier erhöht die Anzahl der erkannten Epitope grundsätzlich die Spezifität des Antikörpers. Polyklonale Antikörper, also spezifische Antikörper aus verschiedenen B-Zell Populationen gegen ein bestimmtes Protein, produzieren hierbei grundsätzlich einen höheren „Background“ als monoklonal gewonnene Antikörper, d.h., Antikörper, die aus einer Hybridom-Zell Population gewonnen werden, also letztlich auf die Antikörper Produktion eines einzelnen B-Lymphozyten zurückgehen. Neben der stärker ausgeprägten spezifischen Bindung zeigen sich häufig jedoch trotzdem eine Reihe unspezifischer Banden.

Setzt man im Western Blot hohe Konzentrationen von primären oder sekundären Antikörpern ein, werden mehr und mehr unspezifische Reaktionen sichtbar, die den Hintergrund erhöhen. Es kommt also darauf an, das Protein mit möglichst geringen Antikörperkonzentrationen nachzuweisen. Dasselbe gilt für die Menge des Chemolumineszenz Reagenz und der Belichtungszeit des Films.

Anders als in der rt-PCR, ist außerdem die Größe eines Proteins stark abhängig von der posttranslationalen Modifikation in der Zelle. Diese kann in verschiedenen Zellen anders ausgeprägt sein, so dass für die gesuchten Proteine in der Literatur Größenangaben mit bis zu 20 kDa Varianz angegeben werden.

Schlussendlich kann der Nachweis aus Gesamtprotein der Zelle im Falle der hier untersuchten Rezeptorproteine nichts über die Funktionalität, oder den erfolgten Transport zur Zelloberfläche aussagen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit bereits publizierten Daten

Viele verschiedene Karzinome sind TGF-beta resistent. Auch das humane HCC weist

eine TGF-beta Resistenz auf, die molekularen Mechanismen der aufgehobenen antiproliferativen TGF-beta Wirkung sind hierbei jedoch noch weitgehend ungeklärt. In der Literatur gibt es zudem viele Hinweise darauf, dass ein Defekt der TGF-beta Signaltransduktionskaskade durch eine fehlerhafte Signalweiterleitung der Rezeptoren zustande kommen könnte (Abou-Shady et al., 1999; Furuta et al., 1999; Sue et al., 1995; Ueno et al., 2001).

4.2.1 Das verwendete Zellkulturmodell

Wenn ein defekter TGF-beta Rezeptor die TGF-beta Resistenz von HCC Zellen vermittelt, dann sollte die Restitution dieser Rezeptorkaskade die Resistenz aufheben können und zur Wachstumsinhibition führen.

Um den Einfluss der Rezeptormutanten auf die TGF-beta Resistenz untersuchen zu können, sind standardisierbare Zellkultur-Experimente notwendig. Dies ist mit primären humanen Tumorzellen kaum oder nur sehr schwer durchzuführen. Daher ist es eine anerkannte Methode, etablierte und gut charakterisierte Zelllinien als Modell eines Tumors einzusetzen. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit und in einer parallel hierzu durchgeführten Untersuchung, HuH7 und HepG2 Zellen für die Experimente benutzt. Bei der Interpretation sollte allerdings der Modellcharakter des Ansatzes bedacht werden, denn die Zelllinien sind individuell aus einem einzigen Tumor isoliert worden, und gewonnene Erkenntnisse können daher nur begrenzt auf eine gesamte Tumorentität übertragen werden.

Ergebnisse sollten deshalb an weiteren Zelllinien und auch an primären Tumorzell-Kulturen überprüft werden.

4.2.2 Die Ergebnisse des Zellkulturmodells

4.2.2.1 Der Einfluss von exogenem TGF β 1 auf das Wachstum von HuH7 Zellen

2000 untersuchten Matsuzaki et al. (Matsuzaki et al., 2000) den Einfluss von exogenem TGF β 1 auf primäre Ratten Hepatozyten, HepG2 und HuH7 Zellen. Hierfür wurde ein [3 H] Thymidin Einbau Assay verwendet und die Zellen am 6. Tag ausgezählt. Verglichen mit den Ratten Hepatozyten wiesen HepG2 Zellen die stärkste Resistenz gegen die antiproliferative Wirkung von TGF β 1 auf. Eine Resistenz von HuH7 Zellen im Vergleich zu Ratten Hepatozyten war deutlich, aber viel schwächer ausgeprägt als in HepG2

Zellen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden HuH7 (und als Kontrolle HepG2) Zellen mit von Matsuzaki et al. (Matsuzaki et al., 2000) vergleichbaren Konzentrationen von TGF β 1 inkubiert und am 7. Tag ausgezählt. Die Ergebnisse sind sehr gut mit den Daten in der Literatur übereinstimmend: HuH7 Zellen zeigen eine Resistenz gegen TGF β 1, denn auch in weit supraphysiologischen Konzentrationsbereichen proliferieren sie immer noch. Bei Konzentrationen ab 10pmol/l kommt es aber zu einem scharfen Abknicken der Kurve. HepG2 Zellen hingegen zeigen eine noch deutlicher ausgeprägtere Resistenz. Die sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der Literatur zeigt, dass die verwendete Technik der Auszählung in der Neubauer Kammer nach Ablösung der Zellen sehr gute Ergebnisse erzielt.

4.2.2.2 Der Einfluss der dominant negativen und konstitutiv aktiven TGF-beta Rezeptor Typ I Mutante auf das Wachstum von HuH7 Zellen

Es liegen keine Publikationen über eine TGF β RI Mutante in HuH7 Zellen und Untersuchungen zum Einfluss einer solchen Mutante auf das Wachstumsverhalten dieser Zelllinie vor.

Der Einfluss dieser Mutanten auf HepG2 Zellen wurde durch Dr. med. M. Berna im Rahmen seiner Dissertation untersucht (Berna, 2001). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Klonierung einer konstitutiv aktiven Rezeptormutante in HepG2 Zellen nicht zu einer Wachstumshemmung führt. Dies führte zu dem Schluss, dass der Defekt in der Signaltransduktionskaskade weiter unterhalb der Rezeptorebene zu finden sein muss.

Wieser et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Klonierung einer konstitutiv aktiven TGF β RI Mutante in R-1b Zellen zu einer antiproliferativen Antwort der Zellen, gemessen in einem Zink induzierten [125 I]Deoxyuridin Assay, führte (Wieser et al., 1995). Eine biologische Antwort der Zellen auf die Signale des mutierten Rezeptors war also gegeben.

In der vorliegenden Arbeit zeigen die Ergebnisse der Wachstumsexperimente, dass HuH7 Zellen eine signifikante Wachstumsinhibition nach Klonierung des konstitutiv aktiven Transgens zeigen. In HepG2 Zellen war eine Wachstumsinhibition hingegen nicht zu erreichen. In einer 2001 erschienenen Arbeit von Buenemann et al. konnte gezeigt werden, dass in Antwort auf eine Stimulation von HepG2 Zellen durch TGF β sowohl Smad4 aktiviert, als auch der Transkriptionsfaktor TIEG1, der Apoptose induzieren

kann, induziert wurde, was auf eine Ursache der Resistenz weit unter der Rezeptorebene hinweist (Buenemann et al., 2001).

Da die Transfektion eines konstitutiv aktiven Rezeptors in HuH7 Zellen zu einer signifikanten Proliferationshemmung führt, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich der Defekt auf Rezeptorebene befindet. Hierzu passen die Ergebnisse des Western Blots, die zeigen konnten, dass die Expression von TGF β RII in HuH7 stark vermindert ist, in HepG2 jedoch nicht. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer zwischenzeitlich veröffentlichten Arbeit von Ueno et al. die ebenfalls eine verminderte Expression von TGF β RII in HuH7 Zellen nachweisen konnten (Ueno et al., 2001).

4.2.3 Die Evaluierung der experimentellen Daten an klinischem Tumormaterial

Da *in-vitro* Versuche einerseits die Wachstumsinhibition durch die verwendete TGF β RI Mutante in HuH7 Zellen bestätigten, andererseits dieses aber vom Ort des Signaldefekts abhängig erscheint, wurden 10 klinische HCC als Tumor und peritumoröses Gewebe aufgearbeitet, und die Expression von TGF β RI und RII auf RNA (rt-PCR) und Protein-Ebene (Western Blot) untersucht.

1995 zeigten Sue et al. in ihrer Untersuchung an 13 HCC Patienten, deren Tumor und Peritumorgewebe miteinander sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene verglichen wurde, eine deutliche Reduktion der TGF β RI und RII RNA und Proteine (Sue et al., 1995). Die verwendeten Methoden –Ribonuclease Protection Assay und Immunhistochemie- machen (semi-)quantitative Aussagen möglich.

1999 kamen Abou-Shady et al. zu dem Ergebnis, dass die Expression (Immunhistochemie) der Rezeptoren in HCC und gesundem Lebergewebe nicht signifikant reduziert sei, die Transkription (Northern Blot) im Vergleich nicht verändert (Abou-Shady et al., 1999). Allerdings wurden hier die HCC Gewebe von 18 Patienten mit einer Kontrollgruppe 18 gesunder Probanden verglichen, was methodisch angreifbar ist. Wenn ein Unterschied durch den Einflussfaktor „HCC“ in einer Untersuchung belegt werden soll, sollten alle anderen Umstände gleich sein. Dies ist nicht der Fall, wenn unterschiedliche Individuen miteinander verglichen werden.

Auch bei Ueno et al. wurde die Expression von TGF β RII in 13 HCC Proben mittels Immunhistochemie und Western Blot untersucht, allerdings auch mit einer

Kontrollgruppe gesunder Probanden verglichen (Ueno et al., 2001). Auch hier konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Furuta et al. führte eine Untersuchung an 96 HCV-induzierten HCC durch (Furuta et al., 1999). Sein Ergebnis beschreibt eine Häufigkeit von 44% für das Vorliegen einer Trunkierung des TGF β RII Proteins durch eine Mikrosatelliten-Instabilität im Bereich einer A10 –Sequenz. Der Verlust eines Adenin in dieser Sequenz führt über eine Leserasterverschiebung zu dem Abbruch der Translation. Das trunkierte Rezeptorprotein ist funktionslos. Untersuchungen durch Saeki et al. bestätigen dieses Ergebnis nicht (Saeki et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls das Lebergewebe klinischer HCC uneinheitlicher Ätiologie untersucht. Die Gewebeproben wurden aus Tumor und unverändertem peritumorösen Gewebe, vergleichbar der Vorgehensweise von Sue et al., gewonnen (Sue et al., 1995). Eine Mikrodissektion wurde, wie auch bei der zitierten Literatur, nicht durchgeführt. Mittels rt-PCR konnte in allen untersuchten Proben die Expression der RNA für TGF β RI und RII nachgewiesen werden. Ein deutlicher Unterschied des Expressionsniveaus trat, anders als in der zitierten Literatur, nicht auf. Allerdings ist die Lightcycler rt-PCR nur zur Semiquantifizierung geeignet. Bis auf Sue et al. vergleicht keine der anderen Untersuchungen Proben ein und desselben Patienten (Sue et al., 1995). Eigene jetzt veröffentlichte Daten bestätigen die hier vorgelegten Ergebnisse mittels real-time PCR (Musch et al., 2005).

Eine Mikrodeletion im Mikrosatelliten des TGF β RII konnte nicht nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Saeki et al., der Furutas Ergebnisse ebenfalls nicht nachvollziehen konnte (Furuta et al., 1999; Saeki et al., 2000). Ein Grund für die außerordentlich hohe Zahl an instabilen Mikrosatelliten Tumoren in der Furuta Gruppe mag die große Homogenität der Ätiologien der in Japan untersuchten Tumore sein (74% Prävalenz von HCV Infektionen in HCC) (Van Rensburg et al., 1985). In Furutas Gruppe wurden 96 Patienten mit HCV Infektion (3 Patienten mit chronischer Hepatitis, 20 mit Leberzirrhose und 73 mit HCC) untersucht. Da die für diese Dissertation untersuchten Proben uneinheitlichen Ätiologie waren, was dem klinischen Patientengut hier entspricht, mag dies eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Die Untersuchung der Expression auf Proteinebene mittels Western Blot zeigte in 80% der Fälle TGF β RI im Tumor stärker exprimiert als im Peritumor, während TGF β RII in

60% der Fälle im Tumor schwächer exprimiert wurde als im Peritumor.

Die Reduktion der TGF β RII Protein Expression ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Sue et al. oder Abou-Shady et al. (Abou-Shady et al., 1999; Sue et al., 1995). Allerdings kann mit Hilfe der hier verwendeten Methode nur eine Aussage über die Expression des Proteins getroffen werden. Proteine müssen nach der Translation von der Zelle prozessiert werden, um an die vorgesehene Stelle zu gelangen. Ohne Immunhistochemie ist der Nachweis, dass die synthetisierten Proteine die Zelloberfläche erreichen, letztendlich nicht möglich. Allerdings haben Ueno et al. beide Methoden, Western Blot und Immunhistochemie kombiniert, und keinen Anhalt dafür gefunden, dass ein Defekt in der Prozessierung der Proteine in HCC vorliegt (Ueno et al., 2001).

In dieser Arbeit wurden die Expressionsniveaus der Rezeptoren in HuH7 und HepG2 Zellen verglichen: Während die Expression der Rezeptoren in HepG2 Zellen unverändert erscheint, zeigen HuH7 Zellen eine deutlich reduzierte Expression von TGF β RII Protein. HuH7 Zellen erscheinen als das Zellkulturmodell, das der Situation klinischer HCC am nächsten kommt.

4.2.4 Die klinische Relevanz der durchgeführten Untersuchungen

Da TGF-beta auch in der Hepatokarzinogenese eine Schlüsselrolle spielt, und darüber hinaus eine Progression der transformierten Zellen zu einem aggressiveren Phänotyp mit einer Proliferations-Resistenz gegen TGF-beta direkt in Verbindung gebracht wird, wäre es wünschenswert, die Wachstumsinhibition durch ein Transgen wie der konstitutiv aktiven TGF β RI Mutante wiederherstellen zu können.

Um die Wirkung der Rezeptormutanten auf die Proliferation der transformierten Hepatozyten unter stabilen Bedingungen und verlässlich reproduzierbar testen zu können, wurde ein Zellkulturmodell mit HuH7 und HepG2 Zellen etabliert, wobei diese Arbeit sich mit HuH7 Zellen beschäftigte. In HuH7 Zellen führte die Klonierung einer konstitutiv aktiven TGF β I Rezeptor-Mutante in die TGF-beta resistenten Zellen zu einer signifikanten Wachstumsinhibition der Zellen, also zu einer Wiederherstellung der TGF-beta Sensibilität. Die Evaluation dieser *in-vitro* Experimente an klinischem Tumormaterial zeigte, dass in HuH7 Zellen die in der Mehrzahl der HCC Tumoren in gleicher Weise die Expression der TGF-beta Typ II Rezeptor-Proteine herabgesetzt ist. Dies macht HuH7 Zellen zu einer adäquaten Näherung für das klinische HCC und die *in-*

in vitro Ergebnisse zu einem wichtigen Ausgangspunkt für weitere *in-vivo* Studien, beispielsweise in einem Mausmodell.

Auch weitere *in-vitro* Studien müssen durchgeführt werden: Gerade neuere Studien geben Anlass zu der Befürchtung, dass in einem späteren Stadium der Karzinogenese eine (partiell) erhaltene TGF-beta Sensibilität der Epithelzellen zu einem invasiveren, aggressiveren Phänotyp führt. Diese Fragen werden zurzeit in Anschlussstudien der Arbeitsgruppe erforscht.

Vergleiche mit HepG2 Zellen und der Literatur zeigen außerdem, dass nicht in allen Fällen der Grund einer TGF-beta Resistenz auf Rezeptorebene zu suchen ist (Buenemann et al., 2001). Der Mechanismus der Resistenz könnte auch auf einer gestörten Signaltransduktion auf Smad Ebene, z.B. durch Deletion eines R-Smads oder Überexpression der inhibitorischen Smads, zu suchen sein. Allerdings wurde für HepG2 Zellen in der Literatur eine funktionierende Signaltransduktionskaskade auf Smad Ebene beschrieben (Sun et al., 1999). Bueneman et al. stellen daher die Hypothese auf, dass ein Ungleichgewicht von Bcl-2 oder Bcl-xL als anti-apoptotische Proteine zu Apoptose Induktoren wie Bax eine Rolle in der fehlenden Apoptose-Induktion durch TGF-beta in Zellen spielen könnten (Buenemann et al., 2001).

Auch haben andere Signaltransduktionswege Einfluss auf die Aktivierung der Smad Proteine. Es wäre denkbar, dass eine Protektion gegen den TGF-beta induzierten Apoptoseweg über den MAP Kinase Signalweg, PBK/akt oder NFkB vermittelt wird (Vergleiche Abs. 1.6.4.2) Die verschiedenen Möglichkeiten der TGF-beta Resistenz müssen also weiter erforscht werden.

Wie eingangs beschrieben, sind die Behandlungsoptionen des hepatozellulären Karzinoms noch immer sehr unbefriedigend. Maligne transformierte Hepatozyten proliferieren unter großen Konzentrationen von TGF-beta und schaffen sich so einen Vorteil gegenüber TGF-beta sensiblen gesunden Hepatozyten. Die Wiederherstellung der Proliferationshemmung von HCC Zellen könnte ein Schlüssel zu einer neuen Form der Behandlung an HCC erkrankter Patienten werden.

5 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist in manchen Regionen eines der häufigsten Karzinome des Menschen. Therapieoptionen und Gesamtüberleben für an HCC erkrankte Patienten sind außerordentlich limitiert. TGF-beta spielt eine Schlüsselrolle in der Hepatokarzinogenese. Obwohl TGF-beta ein Inhibitor epithelialer Proliferation ist, und nachweislich erhöhte Serumkonzentrationen bei an HCC erkrankten Patienten gefunden werden, entkommen karzinomatös transformierte Hepatozyten einer Wachstumsinhibition durch TGF-beta. Dies gibt ihnen einen Proliferationsvorteil gegenüber nicht TGF-beta resistenten Hepatozyten. Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit der experimentellen Beeinflussung und Wiederherstellung der antiproliferativen Wirkung von TGF-beta in HuH7 Zellen, einer humanen HCC Zelllinie, mittels stabiler Transfektion konstitutiv aktiver und dominant negativer TGF-beta Typ I Rezeptormutanten und der Untersuchung der Rezeptorexpression an klinischen HCC. Dazu wurden 10 klinische HCC untersucht. Tumor und peritumoröses Gewebe wurden zum Gewinn von Proteinen und RNA aufgearbeitet. Mittels rt-PCR und Western Blot wurde die Expression der TGF-beta Rezeptoren Typ I und Typ II auf RNA und Proteinebene untersucht und die Tumorproben mit dem gesunden Lebergewebe der gleichen Probe und mit den Ergebnissen von HuH7 und (als Kontrolle) mit HepG2 Zelllinien verglichen. Auf RNA Ebene ließen sich durch rt-PCR keine Unterschiede in den Proben nachweisen. Auch eine Mikrodeletion in einer Mikrosatelliten Sequenz, wie in der Literatur beschrieben, ließ sich in keiner untersuchten Probe nachweisen. Auf Proteinebene ließen sich sowohl in HuH7 Zellen, als auch in 60% der untersuchten Proben eine herabgesetzte Expression von TGFβRII Protein nachweisen. In 80% der Proben war TGFβRI im Tumor stärker exprimiert als im Peritumor.

Zur Etablierung eines *in-vitro* Modells zur Rekonstitution der TGF-beta Funktion wurde zunächst die Resistenz von HuH7 Zellen gegen exogen zugeführtes TGFβ1 in verschiedenen Konzentrationen in Zellkultur gezeigt. Unter gestaffelten Konzentrationen von TGFβ1 wurde das Wachstumsverhalten der Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass erst ab Konzentrationen von 2 pmol eine Proliferationshemmung auftritt, und erst eine noch weitere Steigerung der TGFβ1 Konzentration in Bereiche, die einer 5-fachen der höchsten gemessenen Konzentration *in-vivo* entsprechen, führt zu einer

Einstellung der zellulären Proliferation mit Abnahme der absoluten Zellzahl.

Zur Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von HuH7 wurden diese mit Transgen tragenden Vektoren transfiziert: Eine konstitutiv aktive (CA) oder dominant negative (DN) TGF-beta Typ I Rezeptormutante wurde in pCMV5 eingebracht. Dann wurde der Vektor mit dem entsprechenden Transgen mittels Lipofectamine zusammen mit einem Neomycin-Resistenz tragenden pIRESneo Vektor im Verhältnis 10:1 stabil in HuH7 kotransfiziert und positive Klone mittels Neomycin selektioniert. Alle verwendeten Klone wurden mittels rt-PCR auf die Transkription der Transgene überprüft. Ausschließlich IRES transfizierte Klone dienten als Leerkontrolle. IRES, DN und CA Klone wurden in einem standardisierten Verfahren zwischen dem 3. und 5. Tag des Experiments in ihrer Phase exponentiellen Wachstums untersucht, und die Wachstumskinetiken der drei Gruppen mittels Kruskal-Wallis Test miteinander verglichen. Es ergab sich ein signifikant langsames Wachstum der HuH7 CA Klone gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,011$). Ein signifikanter Unterschied zwischen DN und IRES Klonen konnte nicht nachgewiesen werden.

HuH7 Zellen zeigen eine herabgesetzte Expression von TGF β RII Protein, vergleichbar mit 60% der untersuchten klinischen HCC. In HuH7 Zellen konnte durch Transfektion einer konstitutiv aktiven Typ I Rezeptormutante eine signifikante Wachstumsinhibition erreicht werden, d.h. die TGF-beta Resistenz wurde durchbrochen.

So wurde im Rahmen vorliegender Dissertationsschrift ein Modell für weitere *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen der TGF-beta abhängigen HCC Pathogenese etabliert. Bei Störung der TGF-beta Signaltransduktionskaskade auf Rezeptor Ebene wäre es auch zur Erforschung einer rekonstituierenden Behandlungsmöglichkeit des HCC geeignet.

6 Literaturverzeichnis

Abou-Shady M, Baer HU, Friess H, Berberat P, Zimmermann A, Graber H, Gold LI, Korc M, Buchler MW. Transforming growth factor betas and their signaling receptors in human hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 1999;177(3):209-215.

Alexandrow MG, Kawabata M, Aakre M, Moses HL. Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(8):3239-3243.

Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 1993;73(2):295-307.

Amara FM, Chen FY, Wright JA. Defining a novel cis element in the 3'-untranslated region of mammalian ribonucleotide reductase component R2 mRNA: role in transforming growth factor-beta 1 induced mRNA stabilization. *Nucleic Acids Res* 1995;23(9):1461-1467.

Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 1992;89(1):19-27.

Baichwal VR, Baeuerle PA. Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol* 1997;7(2):R94-96.

Baker JC, Harland RM. A novel mesoderm inducer, *Madr2*, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* 1996;10(15):1880-1889.

Bassols A, Massague J. Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1988;263(6):3039-3045.

Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988;61(10):1942-1956.

Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;2(8256):1129-1133.

Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 1995;21(3):760-766.

Berna M. Experimentelle Beeinflussung der konstitutiven Transforming Growth Factor-beta Rezeptoraktivität in HepG2 Zellen mittels dominant negativer und konstitutiv aktiver Rezeptormutanten. Dissertationsschrift; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn, 2001.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7(6):1513-1523.

Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, Bottinger EP. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* 2000;14(2):187-197.

Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74(4):597-608.

Bottinger EP, Jakubczak JL, Haines DC, Bagnall K, Wakefield LM. Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor beta receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene. *Cancer Res* 1997;57(24):5564-5570.

Brecht C. Hepatitis C virus 1b, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25(3):772-774.

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991;350(6317):429-431.

Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 1999;283(5410):2080-2082.

Bruix J, Llovet JM, Castells A, Montana X, Bru C, Ayuso MC, Vilana R, Rodes J. Transarterial embolization versus symptomatic treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized, controlled trial in a single institution. *Hepatology* 1998;27(6):1578-1583.

Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, Asti M, Rossi S, Larghi A, Cerino A, Podda M, Mondelli MU. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997;25(3):754-758.

Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, White S, Bird CC, Wyllie AH. Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 1996;12(12):2641-2649.

Buchmann A, Willy C, Buenemann CL, Stroh C, Schmiechen A, Schwarz M. Inhibition of transforming growth factor beta1-induced hepatoma cell apoptosis by liver tumor promoters: characterization of primary signaling events and effects on CPP32-like caspase activity. *Cell Death Differ* 1999;6(2):190-200.

Buenemann CL, Willy C, Buchmann A, Schmiechen A, Schwarz M. Transforming growth factor-beta1-induced Smad signaling, cell-cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells.

Carcinogenesis 2001;22(3):447-452.

Caselmann WH. HBV and HDV replication in experimental models: effect of interferon. *Antiviral Res* 1994;24(2-3):121-129.

Caselmann WH. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1995;22(1 Suppl):34-37.

Caselmann WH. Trans-activation of cellular genes by hepatitis B virus proteins: a possible mechanism of hepatocarcinogenesis. *Adv Virus Res* 1996;47:253-302.

Caselmann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 6):1487-1495.

Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med* 1991;324(14):933-940.

Cheifetz S, Andres JL, Massague J. The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J Biol Chem* 1988;263(32):16984-16991.

Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massague J. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 1990;265(33):20533-20538.

Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 1998;282(5394):1714-1717.

Chen RH, Chang MC, Su YH, Tsai YT, Kuo ML. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* 1999;274(33):23013-23019.

Chen RH, Ebner R, Derynck R. Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF-beta activities. *Science* 1993;260(5112):1335-1338.

Chen RH, Su YH, Chuang RL, Chang TY. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene* 1998;17(15):1959-1968.

Chen T, Carter D, Garrigue-Antar L, Reiss M. Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res* 1998;58(21):4805-4810.

Chen T, Triplett J, Dehner B, Hurst B, Colligan B, Pemberton J, Graff JR, Carter JH. Transforming growth factor-beta receptor type I gene is frequently mutated in ovarian

carcinomas. *Cancer Res* 2001;61(12):4679-4682.

Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 1997;389(6646):85-89.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.

Claassen GF, Hann SR. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(17):9498-9503.

Coffey RJ, Jr., Bascom CC, Sipes NJ, Graves-Deal R, Weissman BE, Moses HL. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* 1988;8(8):3088-3093.

Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, Donato MF, Piva A, Di Carlo V, Dioguardi N. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991;325(10):675-680.

Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998;93(7):1159-1170.

Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambone MA, Wind R, Biempica L, Zern MA. In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 1989;108(6):2477-2482.

Czarnecki CW, Chiu HH, Wong GH, McCabe SM, Palladino MA. Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J Immunol* 1988;140(12):4217-4223.

Dai JL, Schutte M, Bansal RK, Wilentz RE, Sugar AY, Kern SE. Transforming growth factor-beta responsiveness in DPC4/SMAD4-null cancer cells. *Mol Carcinog* 1999;26(1):37-43.

Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(12):5545-5549.

Derynck R, Feng XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333(2):F105-150.

Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* 1987;47(3):707-712.

Dickson RB, Kasid A, Huff KK, Bates SE, Knabbe C, Bronzert D, Gelmann EP, Lippman ME. Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 beta-estradiol or v-Ha-ras oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(3):837-841.

Diebold RJ, Eis MJ, Yin M, Ormsby I, Boivin GP, Darrow BJ, Saffitz JE, Doetschman T. Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(26):12215-12219.

Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J* 1987;6(7):1899-1904.

Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996;86(4):543-552.

Ewen ME, Oliver CJ, Sluss HK, Miller SJ, Peeper DS. p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. *Genes Dev* 1995;9(2):204-217.

Ewen ME, Sluss HK, Whitehouse LL, Livingston DM. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 1993;74(6):1009-1020.

Fafeur V, O'Hara B, Bohlen P. A glycosylation-deficient endothelial cell mutant with modified responses to transforming growth factor-beta and other growth inhibitory cytokines: evidence for multiple growth inhibitory signal transduction pathways. *Mol Biol Cell* 1993;4(2):135-144.

Fattovich G, Giustina G, Degos F, Diodati G, Tremolada F, Nevens F, Almasio P, Solinas A, Brouwer JT, Thomas H, Realdi G, Corrocher R, Schalm SW. Effectiveness of interferon alfa on incidence of hepatocellular carcinoma and decompensation in cirrhosis type C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *J Hepatol* 1997;27(1):201-205.

Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995;9(15):1527-1536.

Feng XH, Filvaroff EH, Derynck R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced down-regulation of cyclin A expression requires a functional TGF-beta receptor complex. Characterization of chimeric and truncated type I and type II receptors. *J Biol Chem* 1995;270(41):24237-24245.

Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J* 2000;19(19):5178-5193.

Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, Massague J, Thiagalingam S, Kinzler KW,

Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S. Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition in a Smad4 mutant colon adenoma cell line. *Cancer Res* 2001;61(1):256-260.

Furuta K, Misao S, Takahashi K, Tagaya T, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Yoshioka K, Kakumu S. Gene mutation of transforming growth factor beta1 type II receptor in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81(6):851-853.

Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 1996;382(6591):511-517.

Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992;258(5080):302-304.

Geiser AG, Burmester JK, Webbink R, Roberts AB, Sporn MB. Inhibition of growth by transforming growth factor-beta following fusion of two nonresponsive human carcinoma cell lines. Implication of the type II receptor in growth inhibitory responses. *J Biol Chem* 1992;267(4):2588-2593.

Geiser AG, Letterio JJ, Kulkarni AB, Karlsson S, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF-beta 1 null mouse phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(21):9944-9948.

Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, Marquardt H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 1988;8(10):4162-4168.

Glick AB, Flanders KC, Danielpour D, Yuspa SH, Sporn MB. Retinoic acid induces transforming growth factor-beta 2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regul* 1989;1(1):87-97.

Go C, Li P, Wang XJ. Blocking transforming growth factor beta signaling in transgenic epidermis accelerates chemical carcinogenesis: a mechanism associated with increased angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59(12):2861-2868.

Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58(23):5329-5332.

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271(5247):350-353.

Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994;371(6494):257-261.

Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells.

Pharmacol Ther 1997;75(1):21-41.

Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 1998;12(2):186-197.

Hata A, Lo RS, Wotton D, Lagna G, Massague J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 1997;388(6637):82-87.

Hata A, Shi Y, Massague J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 1998;4(6):257-262.

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr., Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 1997;89(7):1165-1173.

Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem* 1989;264(1):380-388.

Heino J, Massague J. Transforming growth factor-beta switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J Biol Chem* 1989;264(36):21806-21811.

Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J* 1999;18(5):1345-1356.

Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348(6299):334-336.

Horwitz DA, Gray JD, Ohtsuka K, Hirokawa M, Takahashi T. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-beta and implications for autoimmunity. *Immunol Today* 1997;18(11):538-542.

Huang YL, Chou CK. Bcl-2 blocks apoptotic signal of transforming growth factor-beta in human hepatoma cells. *J Biomed Sci* 1998;5(3):185-191.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994;79(4):573-582.

Huse M, Chen YG, Massague J, Kuriyan J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 1999;96(3):425-436.

Iavarone A, Massague J. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature*

1997;387(6631):417-422.

Iavarone A, Massague J. E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 1999;19(1):916-922.

Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M. Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene* 2000;19(36):4134-4145.

Ignotz RA, Endo T, Massague J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1987;262(14):6443-6446.

Ignotz RA, Massague J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell* 1987;51(2):189-197.

Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 1997;389(6651):622-626.

Inagaki M, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF, Carr BI. Growth inhibition by transforming growth factor beta (TGF-beta) type I is restored in TGF-beta-resistant hepatoma cells after expression of TGF-beta receptor type II cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(11):5359-5363.

Ishisaki A, Yamato K, Nakao A, Nonaka K, Ohguchi M, ten Dijke P, Nishihara T. Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem* 1998;273(38):24293-24296.

Ito N, Kawata S, Tamura S, Shirai Y, Kiso S, Tsushima H, Matsuzawa Y. Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 1995;89(1):45-48.

Itoh S, Landstrom M, Hermansson A, Itoh F, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P. Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* 1998;273(44):29195-29201.

Izumoto S, Arita N, Ohnishi T, Hiraga S, Taki T, Tomita N, Ohue M, Hayakawa T. Microsatellite instability and mutated type II transforming growth factor-beta receptor gene in gliomas. *Cancer Lett* 1997;112(2):251-256.

Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995;11(4):415-421.

Kawate S, Ohwada S, Hamada K, Koyama T, Takenoshita S, Morishita Y, Hagiwara K. Mutational analysis of the Smad6 and Smad7 genes in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2001;8(1):49-52.

Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 1986;137(12):3855-3860.

Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986;163(5):1037-1050.

Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM. TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 1990;61(2):267-278.

Kew MC, Dos Santos HA, Sherlock S. Diagnosis of primary cancer of the liver. *Br Med J* 1971;4(784):408-411.

Kim J, Johnson K, Chen HJ, Carroll S, Laughon A. Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* 1997;388(6639):304-308.

Kim SJ, Im YH, Markowitz SD, Bang YJ. Molecular mechanisms of inactivation of TGF-beta receptors during carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11(1-2):159-168.

Kim TK, Mo EK, Yoo CG, Lee CT, Han SK, Shim YS, Kim YW. Alteration of cell growth and morphology by overexpression of transforming growth factor beta type II receptor in human lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer* 2001;31(2-3):181-191.

Kleeff J, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Truong P, Buchler MW, Falb D, Korc M. The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* 1999;18(39):5363-5372.

Koli K, Keski-Oja J. Vitamin D3 and calcipotriol enhance the secretion of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in cultured murine keratinocytes. *Growth Factors* 1993;8(2):153-163.

Koli K, Lohi J, Hautanen A, Keski-Oja J. Enhancement of vitronectin expression in human HepG2 hepatoma cells by transforming growth factor-beta 1. *Eur J Biochem* 1991;199(2):337-345.

Kramer IM, Koornneef I, de Laat SW, van den Eijnden-van Raaij AJ. TGF-beta 1 induces phosphorylation of the cyclic AMP responsive element binding protein in ML-CCl64 cells. *Embo J* 1991;10(5):1083-1089.

Kretschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 1997;389(6651):618-622.

Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. A mechanism of repression of

TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 1999;13(7):804-816.

Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997;11(8):984-995.

Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997;11(8):984-995.

Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 1996;383(6603):832-836.

Laiho M, Saksela O, Andreasen PA, Keski-Oja J. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 1986;103(6 Pt 1):2403-2410.

Larsson J, Goumans MJ, Sjostrand LJ, van Rooijen MA, Ward D, Leveen P, Xu X, ten Dijke P, Mummery CL, Karlsson S. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *Embo J* 2001;20(7):1663-1673.

Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Dang H, Kong L, Nakabayashi T, Mackall CL, Gress RE, Roberts AB. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J Clin Invest* 1996;98(9):2109-2119.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998;16:137-161.

Li L, Hu JS, Olson EN. Different members of the jun proto-oncogene family exhibit distinct patterns of expression in response to type beta transforming growth factor. *J Biol Chem* 1990;265(3):1556-1562.

Liang YR, Wu MY, Lin Y. [The expression of hepatitis C antigen in hepatitis and liver cancer tissues]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1994;74(8):476-477, 518.

Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992;68(4):775-785.

Lin JK, Chou CK. In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 1992;52(2):385-388.

Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, Massague J. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 1996;381(6583):620-623.

Liu F, Poupponnot C, Massague J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* 1997;11(23):3157-3167.

Livraghi T, Benedini V, Lazzaroni S, Meloni F, Torzilli G, Vettori C. Long term results of single session percutaneous ethanol injection in patients with large hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1998;83(1):48-57.

Lo RS, Massague J. Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nat Cell Biol* 1999;1(8):472-478.

Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993;73(7):1435-1444.

Lu SL, Zhang WC, Akiyama Y, Nomizu T, Yuasa Y. Genomic structure of the transforming growth factor beta type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res* 1996;56(20):4595-4598.

Luo K, Lodish HF. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *Embo J* 1997;16(8):1970-1981.

Luttges J, Galehdari H, Brocker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, Kloppel G, Schmiegel W, Hahn SA. Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 2001;158(5):1677-1683.

Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 1996;87(7):1215-1224.

Maggard M, Meng L, Ke B, Allen R, Devgan L, Imagawa DK. Antisense TGF-beta2 immunotherapy for hepatocellular carcinoma: treatment in a rat tumor model. *Ann Surg Oncol* 2001;8(1):32-37.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268(5215):1336-1338.

Marra F, Bonewald LF, Park-Snyder S, Park IS, Woodruff KA, Abboud HE. Characterization and regulation of the latent transforming growth factor-beta complex secreted by vascular pericytes. *J Cell Physiol* 1996;166(3):537-546.

Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.

Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791.

Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103(2):295-309.

-
- Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000;14(6):627-644.
- Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 1991;65(6):973-982.
- Matsuzaki K, Date M, Furukawa F, Tahashi Y, Matsushita M, Sakitani K, Yamashiki N, Seki T, Saito H, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K. Autocrine stimulatory mechanism by transforming growth factor beta in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000;60(5):1394-1402.
- Matsuzaki K, Date M, Furukawa F, Tahashi Y, Matsushita M, Sugano Y, Yamashiki N, Nakagawa T, Seki T, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K. Regulatory mechanisms for transforming growth factor beta as an autocrine inhibitor in human hepatocellular carcinoma: implications for roles of smads in its growth. *Hepatology* 2000;32(2):218-227.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994;8(4):345-351.
- Minn AJ, Boise LH, Thompson CB. Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J Biol Chem* 1996;271(11):6306-6312.
- Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81(1):151-157.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999;96(3):319-328.
- Munoz N, Bosch X. Epidemiology of Hepatocellular carcinoma. In: Okuda K, Ishak K, editors. *Neoplasms of the Liver*. Tokyo: Springer; 1989. p. 3.
- Musch A, Rabe C, Paik MD, Berna MJ, Schmitz V, Hoffmann P, Nischalke HD, Sauerbruch T, Caselmann WH. Altered expression of TGF-beta receptors in hepatocellular carcinoma - effects of a constitutively active TGF-beta type I receptor mutant. *Digestion* 2005;71(2):78-91.
- Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Orth K, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K, et al. A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1995;55(23):5545-5547.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 1997;389(6651):631-635.

Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990;144(9):3602-3610.

Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 1998;8(23):1243-1252.

Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev* 1996;10(19):2462-2477.

Ohta M, Greenberger JS, Anklesaria P, Bassols A, Massague J. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 1987;329(6139):539-541.

Ohtaki N, Yamaguchi A, Goi T, Fukaya T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K, Urano T. Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in colorectal cancers and relationship to metastasis. *Int J Oncol* 2001;18(2):265-270.

Okuda K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 1992;15(5):948-963.

Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999;401(6752):480-485.

Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 1996;179(1):297-302.

Oursler MJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1993;133(5):2187-2196.

Pardali K, Kurisaki A, Moren A, ten Dijke P, Kardassis D, Moustakas A. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 2000;275(38):29244-29256.

Parekh T, Saxena B, Reibman J, Cronstein BN, Gold LI. Neutrophil chemotaxis in response to TGF-beta isoforms (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3) is mediated by fibronectin. *J Immunol* 1994;152(5):2456-2466.

Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *Embo J* 1988;7(10):2977-2982.

Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P. Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(4):1105-1108.

Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K.

Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269(9):6271-6274.

Pertovaara L, Sistonen L, Bos TJ, Vogt PK, Keski-Oja J, Alitalo K. Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor beta stimulation. *Mol Cell Biol* 1989;9(3):1255-1262.

Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW, Moses HL. Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(10):3758-3762.

Pietenpol JA, Stein RW, Moran E, Yaciuk P, Schlegel R, Lyons RM, Pittelkow MR, Munger K, Howley PM, Moses HL. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell* 1990;61(5):777-785.

Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ, Balmain A. Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ* 1998;9(5):393-404.

Prehn JH, Bindokas VP, Marcuccilli CJ, Krajewski S, Reed JC, Miller RJ. Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(26):12599-12603.

Prunier C, Mazars A, Noe V, Bruyneel E, Mareel M, Gespach C, Atfi A. Evidence that Smad2 is a tumor suppressor implicated in the control of cellular invasion. *J Biol Chem* 1999;274(33):22919-22922.

Rabe C, Caselmann WH. Interaction of Hepatitis B virus with cellular processes in liver carcinogenesis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000;37(5):407-429.

Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroentero* 2001;7(2):208-215.

Rafferty LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 1995;139(1):241-254.

Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 1987;79(4):1285-1288.

Rees S, Coote J, Stables J, Goodson S, Harris S, Lee MG. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques* 1996;20(1):102-104, 106, 108-110.

Reiss M. TGF-beta and cancer. *Microbes Infect* 1999;1(15):1327-1347.

Ren RF, Hawver DB, Kim RS, Flanders KC. Transforming growth factor-beta protects human hNT cells from degeneration induced by beta-amyloid peptide: involvement of the TGF-beta type II receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;48(2):315-322.

Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 1995;9(15):1831-1845.

Ribeiro A, Bronk SF, Roberts PJ, Urrutia R, Gores GJ. The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology* 1999;30(6):1490-1497.

Riccio A, Pedone PV, Lund LR, Olesen T, Olsen HS, Andreasen PA. Transforming growth factor beta 1-responsive element: closely associated binding sites for USF and CCAAT-binding transcription factor-nuclear factor I in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene. *Mol Cell Biol* 1992;12(4):1846-1855.

Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(9):5339-5343.

Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(6):3494-3498.

Roberts AB, Sporn MB. Peptide growth factors and their receptors. Springer Verlag, Heidelberg; 1998. Vol. 1 and 2.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(12):4167-4171.

Rotello RJ, Lieberman RC, Purchio AF, Gerschenson LE. Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor beta 1 in cultured uterine epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(8):3412-3415.

Russell WE, Coffey RJ, Jr., Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(14):5126-5130.

Saeki A, Tamura S, Ito N, Kiso S, Matsuda Y, Yabuuchi I, Kawata S, Matsuzawa Y. Lack of frameshift mutations at coding mononucleotide repeats in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Cancer* 2000;88(5):1025-1029.

Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. The expression

of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999;86(8):1455-1462.

Saltzman A, Munro R, Searfoss G, Franks C, Jaye M, Ivashchenko Y. Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-XL downregulation. *Exp Cell Res* 1998;242(1):244-254.

Salvucci M, Lemoine A, Saffroy R, Azoulay D, Lepere B, Gaillard S, Bismuth H, Reynes M, Debuire B. Microsatellite instability in European hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999;18(1):181-187.

Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1996;271(13):7416-7422.

Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7):2572-2576.

Sandhu C, Garbe J, Bhattacharya N, Daksis J, Pan CH, Yaswen P, Koh J, Slingerland JM, Stampfer MR. Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1997;17(5):2458-2467.

Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997;124(13):2659-2670.

Santoni-Rugiu E, Falck J, Mailand N, Bartek J, Lukas J. Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol* 2000;20(10):3497-3509.

Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 1989;109(1):309-315.

Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(2):790-794.

Schiemann WP, Pfeifer WM, Levi E, Kadin ME, Lodish HF. A deletion in the gene for transforming growth factor beta type I receptor abolishes growth regulation by transforming growth factor beta in a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*

1999;94(8):2854-2861.

Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttes J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(17):9624-9629.

Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1995;139(3):1347-1358.

Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67(5):879-888.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79(4):551-555.

Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 1998;94(5):585-594.

Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275(33):25858-25864.

Shirai Y, Kawata S, Tamura S, Ito N, Tsushima H, Takaishi K, Kiso S, Matsuzawa Y. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer* 1994;73(9):2275-2279.

Silini E, Bottelli R, Asti M, Bruno S, Candusso ME, Brambilla S, Bono F, Iamoni G, Tinelli C, Mondelli MU, Ideo G. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a case-control study. *Gastroenterology* 1996;111(1):199-205.

Skolnick AA, Mark D. AMA's Science Reporters Conference focuses on contraception and prevention of premature birth. *Jama* 1996;276(19):1538-1540.

Solem M, Rawson C, Lindburg K, Barnes D. Transforming growth factor beta regulates cystatin C in serum-free mouse embryo (SFME) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172(2):945-951.

Souchelnytskyi S, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *Embo J* 1996;15(22):6231-6240.

Stearns ME, Garcia FU, Fudge K, Rhim J, Wang M. Role of interleukin 10 and transforming growth factor beta1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Cancer Res* 1999;5(3):711-720.

Steinman HM. The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J Biol Chem* 1995;270(8):3487-3490.

Sue SR, Chari RS, Kong FM, Mills JJ, Fine RL, Jirtle RL, Meyers WC. Transforming growth factor-beta receptors and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 1995;222(2):171-178.

Sun L, Wu G, Willson JK, Zborowska E, Yang J, Rajkarunanayake I, Wang J, Gentry LE, Wang XF, Brattain MG. Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 1994;269(42):26449-26455.

Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(22):12442-12447.

Szmuness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog Med Virol* 1978;24:40-69.

Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 1998;75:87-134.

Takagi Y, Koumura H, Futamura M, Aoki S, Ymaguchi K, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S. Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer* 1998;78(9):1152-1155.

Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998;92(5):645-656.

Tanaka S, Wands JR. Insulin receptor substrate 1 overexpression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor beta1-induced apoptosis. *Cancer Res* 1996;56(15):3391-3394.

Tang B, de Castro K, Barnes HE, Parks WT, Stewart L, Bottinger EP, Danielpour D, Wakefield LM. Loss of responsiveness to transforming growth factor beta induces malignant transformation of nontumorigenic rat prostate epithelial cells. *Cancer Res* 1999;59(19):4834-4842.

ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8(2):139-145.

Thiery JP, Chopin D. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18(1):31-42.

Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth

factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1486-1490.

Tradati F, Colombo M, Mannucci PM, Rumi MG, De Fazio C, Gamba G, Ciavarella N, Rocino A, Morfini M, Scaraggi A, Taioli E. A prospective multicenter study of hepatocellular carcinoma in Italian hemophiliacs with chronic hepatitis C. The Study Group of the Association of Italian Hemophilia Centers. *Blood* 1998;91(4):1173-1177.

Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, Yang ML, Ho MS, Chang WY, Hsieh MY, Lin ZY, Tsai JH. Elevated urinary transforming growth factor-beta1 level as a tumour marker and predictor of poor survival in cirrhotic hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1997;76(2):244-250.

Tsujimoto Y. Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 1989;4(11):1331-1336.

Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 1998;95(6):779-791.

Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993;328(25):1797-1801.

Tsuneizumi K, Nakayama T, Kamoshida Y, Kornberg TB, Christian JL, Tabata T. Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature* 1997;389(6651):627-631.

Turco A, Coppa A, Aloe S, Baccheschi G, Morrone S, Zupi G, Colletta G. Overexpression of transforming growth factor beta-type II receptor reduces tumorigenicity and metastatic potential of K-ras-transformed thyroid cells. *Int J Cancer* 1999;80(1):85-91.

Ueki N, Nakazato M, Ohkawa T, Ikeda T, Amuro Y, Hada T, Higashino K. Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim Biophys Acta* 1992;1137(2):189-196.

Ueno T, Hashimoto O, Kimura R, Torimura T, Kawaguchi T, Nakamura T, Sakata R, Koga H, Sata M. Relation of type II transforming growth factor-beta receptor to hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2001;18(1):49-55.

Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen GC, Chen G, Yu SZ. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996;17(6):1317-1321.

Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 1999;397(6721):710-713.

Van Rensburg SJ, Cook-Mozaffari P, Van Schalkwyk DJ, Van der Watt JJ, Vincent TJ, Purchase IF. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br J Cancer* 1985;51(5):713-726.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335(6189):440-442.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994;76(5):777-779.

Venkatasubbarao K, Ahmed MM, Mohiuddin M, Swiderski C, Lee E, Gower WR, Jr., Salhab KF, McGrath P, Strodel W, Freeman JW. Differential expression of transforming growth factor beta receptors in human pancreatic adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2000;20(1A):43-51.

Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(2):615-619.

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(16):5788-5792.

Wallick SC, Figari IS, Morris RE, Levinson AD, Palladino MA. Immunoregulatory role of transforming growth factor beta (TGF-beta) in development of killer cells: comparison of active and latent TGF-beta 1. *J Exp Med* 1990;172(6):1777-1784.

Walton MI, Whysong D, O'Connor PM, Hockenbery D, Korsmeyer SJ, Kohn KW. Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;53(8):1853-1861.

Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y, Takenoshita S. Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60(16):4507-4512.

Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Willson JK, et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995;270(37):22044-22049.

Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massague J. Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol Cell Biol* 1999;19(9):5913-5922.

WHO. World Health Report. In; 2000; Geneva; 2000.

Wieser R, Attisano L, Wrana JL, Massague J. Signaling activity of transforming growth

factor beta type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region. *Mol Cell Biol* 1993;13(12):7239-7247.

Wieser R, Wrana JL, Massague J. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *Embo J* 1995;14(10):2199-2208.

Wrana JL. TGF-beta receptors and signalling mechanisms. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24(2-3):120-130.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;370(6488):341-347.

Xu X, Brodie SG, Yang X, Im YH, Parks WT, Chen L, Zhou YX, Weinstein M, Kim SJ, Deng CX. Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene* 2000;19(15):1868-1874.

Yakicier MC, Irmak MB, Romano A, Kew M, Ozturk M. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999;18(34):4879-4883.

Yamamoto M, Fukuda K, Miura N, Suzuki R, Kido T, Komatsu Y. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology* 1998;27(4):959-966.

Yanagihara K, Tsumuraya M. Transforming growth factor beta 1 induces apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1992;52(14):4042-4045.

Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 1999;103(2):197-206.

Yu MW, Chen CJ. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994;17(2):71-91.

Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14(2):163-176.

Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* 1996;383(6596):168-172.

7 Anhang

TRANS	CAGATCTGGTACCACGCGTATC GATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	Basenpaare
DN1	GATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	1-60
TRANS	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	Basenpaare
DN1	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	61-120
TRANS	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCCGCTCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	Basenpaare
DN1	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCCGCTCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	121-180
TRANS	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCTGCCGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTT	Basenpaare
DN1	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCTGCCGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTT	181-240
TRANS	CTGCCACCTCTGTACAAAAGACA ATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTC	Basenpaare
DN1	CTGCCACCTCTGTACAAAANACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTA	241-288

Abb. 25 TGF-beta Rezeptor Typ I, dominant negativ, Klon 1. Vergleich der analysierten Sequenz (Klon) mit der erwarteten Sequenz (Trans). Die Sequenzen sind zu 98,9% identisch (Primer grau unterlegt)

TRANS	CAGATCTGGTACCACGCGTATC GATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	Basenpaare
DN5	CCGANAAAGCTTGATATCGANATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	1-60
TRANS	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	Basenpaare
DN5	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	61-120
TRANS	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCCGCTCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	Basenpaare
DN5	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCCGCTCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	121-180
TRANS	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCTGCCGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTT	Basenpaare
DN5	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCTGCTGCTGNCGGCGACGNCGNTACAACATTNNTNCNA	181-240
TRANS	CTGCCACCTCTGTACAAAAGACA ATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTC	Basenpaare
DN5	CNCNNNACAAAAAANAATACTNCTNCTACAAANNACNACTACCAN	240-288

Abb. 26 TGF-beta Rezeptor Typ I, dominant negativ, Klon 5. Vergleich der analysierten Sequenz (Klon) mit der erwarteten Sequenz (Trans). Die Sequenzen sind zu 71,2% identisch (Primer grau unterlegt).

TRANS	CAGATCTGGTACCACGCGTATC GATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	Basenpaare
DN6	NNNCNNCAGANTNTACTNNTNTGANCATANTGGGCNAGACACGAGCGANN	1-60
TRANS	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	Basenpaare

DN6	ACGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	61-120
TRANS	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	Basenpaare
DN6	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	121-180
TRANS	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCTCCCGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTT	Basenpaare
DN6	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCTNCTCCCGGCGACGACGGNANAACATTNTTT	181-240
TRANS	CTGCCACCTCTGTACAAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTC	Basenpaare
DN6	CTNCCNCNTTTCAANAAAAANANTNNTACTTNNANAANAGATGGACTA	241-288

Abb. 27 TGF-beta Rezeptor Typ I, dominant negativ, Klon 6. Vergleich der analysierten Sequenz (Klon) mit der erwarteten Sequenz (Trans). Die Sequenzen sind zu 77,4% identisch (Primer grau unterlegt).

TRANS	CAGATCTGGTACCACGCGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	Basenpaare
DN8	CGATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	1-60
TRANS	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	Basenpaare
DN8	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	61-120
TRANS	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	Basenpaare
DN8	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	121-180
TRANS	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCTCCCGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTT	Basenpaare
DN8	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGNGTGCTCCCGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTT	181-240
TRANS	CTGCCACCTCTGTACAAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTC	Basenpaare
DN8	CTGCCACCTCTGTACAAAANACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTA	241-288

Abb. 28: TGF-beta Rezeptor Typ I, dominant negativ, Klon 8. Vergleich der analysierten Sequenz (Klon) mit der erwarteten Sequenz (Trans). Die Sequenzen sind zu 98,9% identisch (Primer grau unterlegt).

TRANS	CAGATCTGGTACCACGCGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	Basenpaare
CA3	CCCCAANTTNNNNNNNNNANANTNTANTTNTGTGACATATNGGCNANACCGATCGAN	1-60
TRANS	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	Basenpaare
CA3	NCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGCGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	61-120
TRANS	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	Basenpaare
CA3	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	121-180
TRANS	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCTCCCGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTT	Basenpaare

der erwarteten Sequenz (Trans). Die Sequenzen sind zu 98,3% identisch (Primer grau unterlegt).

TRANS	CAGATCTGGTACCACGCGTATC GATAAGCTTGATATCGAATTCGGTTGCTGTCGGGCGAG	Basenpaare
CA6	CNAAAGNAAAGGAAGNAGNNNNNAGATTTTACTTGTGTGACANATGGGCTAGACNGAGGGNCT	1-60
TRANS	GCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCAGCGGCGGGCCGGGCCGGGCCACAGGCGGTGG	Basenpaare
CA6	NCGAGGTTTGCTGGTTTNAGGCACNGNGCNCNCCNAGGCCNGNCCGGTCCACAGGCGGAGG	61-120
TRANS	CGGCGGGACCATGGAGGCGGCCGCTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	Basenpaare
CA6	CGGNNGGACCATGGAGGCGGCGGTCNCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT	121-180
TRANS	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCTGCTCCCGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTT	Basenpaare
CA6	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGNGCTGCTNCTCCCGGCGNCGACGNTANNACATTNTTT	181-240
TRANS	CTGCCACCTCTGTACAAAAGACA ATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTC	Basenpaare
CA6	CTNCCNCNTNTCAANAAANAANANTTTTACTTNTANAANAGATNGACTA	241-288

Abb. 32 TGF-beta Rezeptor Typ I, konstitutiv aktiv, Klon 5. Vergleich der analysierten Sequenz (Klon) mit der erwarteten Sequenz (Trans). Die Sequenzen sind zu 69,4% identisch (Primer grau unterlegt).

TGFβRI 17	GCTCAGGTTTACCATTGCTTGTTTACAGAGAACAATTGCGAGAACTATTGTGTTACAAGAAA GCTCAGGTTT-CCATTGCTTGTTTACAGAGAACAATTGCGAGAACTATTGTGTTACAAGAAA	Basenpaare 1-60
TGFβRI 17	GCATTGGCAAAGGTCGATTTGGAGAAGTTTGGAGAGGAAAGTGGCGGGGAGAAGAAGTTG GCATTGGCAAAGGTCGATTTGGAGAAGTTTGGAGAGGAAAGTGGCGGGGAGAAGAAGTTG	Basenpaare 61-120
TGFβRI 17	CTGTTAAGATATTCTCCTCTAGAGAAGAACGTTTCGTGGTTCCGTGAGGCAGAGATTTATC CTGTTAAGATATTCTCCTCTAGAGAAGAACGTTTCGTGGTTCCGTGAGGCAGAGATTTATC	Basenpaare 121-180
TGFβRI 17	AAACTGTAATGTTACGTCATGAAAACATCCTGGGATTTATAGCAGCAGACAATAAAGACA AAACTGTAATGTTACGTCATGAAAACATCCTGGGATTTATAGCAGCAGACAATAAAGACA	Basenpaare 181-240
TGFβRI 17	ATGGTACTTGGACTCAGCTCTGGTTGGTGTGAGATTATCATGAGCATGGATCCCTTTTTG ATGGTACTTGGACTCAGCTCTGGTTGGTGTGAGATTATCATGAGCATGGATCCCTTTTTG	Basenpaare 241-300
TGFβRI 17	ATTACTTAAACAGATACACAGTTACTGTGGA ATTACTTAAACAGATACACAGTTACTGTGGA	Basenpaare 301-331

Abb. 33 TGF beta Rezeptor Typ I, Transkriptionsnachweis des wt-Rezeptors in HuH7 Zellen, HepG2 Zellen und humanem Lebertumor, bzw. peritumoralem Gewebe. Sequenzierungsergebnis aus Bande Nr. 17.

8 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Wolfgang H. Caselmann. Seine fachliche Unterstützung und sein persönlicher Einsatz für meine Promotionsarbeit haben diese Dissertation möglich gemacht.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christian Rabe, der diese Arbeit betreute und mir mit technischem Rat und praktischer Einarbeitung in die Molekularbiologie zur Seite stand.

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Dr. med. Marc Berna für die gute und anregende Zusammenarbeit und an Frau Dr. rer. nat. Annemarie Musch für die entgegengebrachte Freundschaft, die innerhalb einer Arbeitsgruppe nicht selbstverständlich ist.

Herrn Dr. med. Bin Chen möchte ich für die Kooperation bei der Gewinnung der RNA aus klinischen Tumoren danken.

Für die gute Zusammenarbeit und die fachlichen Hilfestellungen möchte ich insbesondere Frau Dr. rer. nat. Petra Hanke und Herrn Diplom Biologen Per Hoffmann danken, sowie Frau Dr. rer. nat. Esther Raskopf für die Einarbeitung in die Proteinchemie.

Bedanken möchte ich mich auch für die Hilfsbereitschaft der Labore Professor Dr. med. U. Spengler und hier insbesondere Frau Dr. med. Birgit Terjung, sowie dem Labor Professor Dr. med. I. Schmidt-Wolf, die für viele Experimente ihre Geräte zur Verfügung stellten.

Schließlich geht mein Dank auch an jeden Mitarbeiter und Doktoranden des Labors "MolTher" für die außergewöhnlich gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, die ich in diesen 3 Jahren erfahren durfte.