

Biologische Charakterisierung der Rezeptoren für Transforming Growth Faktor- β

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Dipl. Biol. Diana Rotzer

aus

Donauwörth

Würzburg 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Walter Sebald

Gutachter: Dr. Gert Pflugfelder

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhalt

I. EINLEITUNG	1
I.1. TGF-β UND DIE TGF-β SUPERFAMILIE	2
<i>I.1.1. TGF-β vermittelte Aktivitäten</i>	2
<i>I.1.2. Mitglieder der TGF-β Superfamilie</i>	3
<i>I.1.2. Prozessierung der Liganden</i>	3
<i>I.1.3. Zellzykluskontrolle durch TGF-β</i>	3
I.2. REZEPTOREN DER TGF-β SUPERFAMILIE	4
<i>I.2.1. Struktur, Aufbau und Funktion der Rezeptoren</i>	4
<i>I.2.2. Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung</i>	5
<i>I.2.3. Rezeptorassoziierte Moleküle</i>	7
<i>I.2.4. Wechselwirkung der Rezeptoren mit TAK1 und TAB1</i>	9
<i>I.2.5. Dominant negative Wirkungsweise von verkürzten TGF-β Typ II Rezeptoren (Δcyt-Mutanten)</i>	10
I.3. DIE SMAD-PROTEINE	12
<i>I.3.1. Signaltransduktion durch Smad-Proteine</i>	12
<i>I.3.2. Strukturelle Merkmale der Smads</i>	14
<i>I.3.3. Smad-interagierende Proteine</i>	16
I.3.3.1. SARA, ein Smad/Rezeptor Anker-Protein	16
I.3.3.2. Smurf-Proteine	16
<i>I.3.4. DNA-Bindungspartner der Smads</i>	17
<i>I.3.5. Transkriptionelle Co-Faktoren der Smad-Proteine</i>	19
I.3.5.1. Co-Aktivatoren	19
I.3.5.2. Co-Repressoren	19
<i>I.3.6. Smad-vermittelter Rezeptor ‚cross-talk‘</i>	20
A. Biologische Charakterisierung des TGF-β Typ II-B Rezeptors:	
A.I. EINLEITUNG	23
A.I.1. DIE DREI TGF- β ISOFORMEN UND IHRE KNOCKOUTS	23
A.I.2. REZEPTORVARIABILITÄT UND SIGNALMODULATION	25
A.I.3. DIE TGF- β TYP I REZEPTOREN: ALKS (ACTIVIN RECEPTOR LIKE KINASES)	27
A.I.4. BEDEUTUNG DER TYP III REZEPTOREN FÜR DIE TGF- β SIGNALÜBERTRAGUNG	29
<i>A.I.4.1. Typ III Rezeptoren für die TGF-β Bindung: Betaglykan und Endoglin</i>	29
<i>A.I.4.2. Bedeutung des TβRIII für die TGF-β2 Bindung</i>	32
A.I.5. ISOLIERUNG DES TGF- β TYP II-B REZEPTORS	32

A.II. ERGEBNISSE	35
A.II.1. IDENTIFIZIERUNG EINER ALTERNATIV GESPLEISSTEN VARIANTE DES TGF- β TYP II REZEPTORS – T β RII-B	35
A.II.2. ISOLATION DER T β RII-B cDNA UND HERSTELLUNG VON T β RII-B- EXPRESSIONSPLOSMIDEN	36
A.II.3. AUFKLÄRUNG DER EXON-INTRON STRUKTUR DES <i>tβRII-b</i> GENS	38
A.II.4. STUDIEN ZUM ISOFORMSPEZIFISCHEN BINDUNGSVERHALTEN VON T β RII-B	39
A.II.5. STUDIEN ZUR BILDUNG VON OLIGOMEREN KOMPLEXEN MIT T β RII-B	41
A.II.5.1. <i>Interaktion des TβRII-B mit dem TGF-β Typ I Rezeptor (TβRI)</i>	41
A.II.5.2. <i>Interaktion des TβRII-B mit dem TGF-β Typ III Rezeptor (TβRIII)</i>	41
A.II.5.3. <i>Interaktion des TβRII-B mit dem TGF-β Typ II Rezeptor</i>	44
A.II.6. CHARAKTERISIERUNG DER TGF- β 2 BINDUNG AN T β RII-B	45
A.II.6.1. <i>Herstellung von TβRII-B Mutanten</i>	45
A.II.6.2. <i>Bindung von TGF-β2 an TβRII-B-Insert-Mutanten</i>	46
A.II.6.3. <i>Versuch zur Beteiligung der Insert-Sequenz an der Ligandenbindung</i>	47
A.II.7. STUDIEN ZUR GEWEBESPEZIFISCHEN EXPRESSION VON T β RII-B	49
A.II.8. STUDIEN ZUR SIGNALÜBERTRAGUNG DURCH T β RII-B	53
A.II.8.1. <i>TβRII-B Signalübertragung in DR-26 Zellen</i>	53
A.II.8.2. <i>Typ III Rezeptor unabhängige TβRII-B-Signalübertragung</i>	54
A.II.9. STUDIEN ZU INTERAKTION UND SIGNALTRANSDUKTION VON T β RII-B UND TYP I REZEPTOREN DER TGF- β SUPERFAMILIE, DEN ALKS (ACTIVIN RECEPTOR-LIKE KINASES)	58
A.II.9.1. <i>Bindungsstudie zur Interaktion von TβRII-B mit Alks</i>	58
A.II.9.2. <i>Untersuchungen zur Signalübertragung via TβRII-B/Alk-Komplexe</i>	59
A.II.9.3. <i>Untersuchungen zum pSBE-luc-Reportergenkonstrukt</i>	62
A.II.10. UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DOMINANT NEGATIVER TGF- β TYP II REZEPTOREN (Δ CYT-MUTANTEN)	64
A.II.10.1. <i>Herstellung der Δcyt-Konstrukte</i>	64
A.II.10.2. <i>Proteinexpression von wildtypischen und trunkierten TGF-β Typ II Rezeptoren</i>	65
A.II.10.3. <i>Expression von TβRII-B-Δcyt-HA an der Zelloberfläche und ligandenabhängige Oligomerisierung</i>	67
A.II.10.4. <i>Reportergen Messungen zur dominant negativen Wirkung von TβRII-Δcyt und TβRII-B-Δcyt-HA</i>	68

A.III. DISKUSSION	70
A.III.1. KLONIERUNG VON T β RII-B UND ALTERNATIVES SPLEISSEN	70
A.III.2. LIGANDENBINDUNG UND KOMPLEXBILDUNG	71
A.III.2.1. <i>Ligandenbindungsmodus von TβRII-B</i>	71
A.III.2.2. <i>Oligomerisierungsverhalten von TβRII-B</i>	73
A.III.3. ANALYSE DER TGF- β 2 BINDUNG AN T β RII-B	74
A.III.3.1. <i>Alternative Ligandenbindungsstellen am Typ II-B Rezeptor ?</i>	74
A.III.3.2. <i>Erkenntnisgewinnung durch Strukturanalyse ?</i>	76
A.III.4. Bedeutung der T β RII-B Expression in Knochengeweben	78
A.III.4.1. <i>Spezifische Oberflächenexpression von TβRII-B</i>	78
A.III.4.2. <i>Die Rolle von TGF-β im Knochen</i>	80
A.III.5. SIGNALÜBERTRAGUNG VIA T β RII-B	83
A.III.6. INTERAKTION VON T β RII-B MIT TYP I REZEPTOREN DER TGF- β FAMILIE	85
A.III.7. SPEZIFITÄT DOMINANT NEGATIVER TYP II REZEPTOR MUTANTEN	88
B. Charakterisierung von Mutationen in der Signalpeptidsequenz des TGF-β Typ I Rezeptors in B-Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie:	
B.I. EINLEITUNG	91
B.I.1. DIE ROLLE VON TGF- β BEI ENTSTEHUNG UND WACHSTUM VON TUMOREN	91
B.I.1.1. <i>Autokrine Wirkung von TGF-β</i>	91
B.I.1.2. <i>Parakrine Wirkung von TGF-β</i>	92
B.I.1.3. <i>Tumorprogression durch selektive Signalübertragung</i>	92
B.I.2. INAKTIVIERUNG VON KOMPONENTEN DER TGF- β SIGNALKASKADE WÄHREND DER TUMORGENESE	93
B.I.2.1. Defekte der TGF- β Rezeptoren bei der Tumorentstehung	93
B.I.2.2. Defekte der Smad-Proteine bei der Tumorentstehung	95
B.I.3. CHRONISCHE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE (B-CLL)	97
B.I.3.1. <i>Charakteristische Merkmale der Erkrankung</i>	97
B.I.3.2. <i>Verlust von funktionalem TβRI an der Zelloberfläche von TGF-β resistenten B-Zellen bei chronischer lymphatischer Leukämie</i>	98

B.II. ERGEBNISSE	99
B.II.1. KOLONIERUNG VON TSSRI UND T β RII cDNAs MITTELS RT-PCR UND DEREN SEQUENZIERUNG	99
B.II.2. HERSTELLUNG DES EUKARYOTISCHEN T β RI/A8 EXPRESSIONSPASMIDES	100
B.II.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION UND TRANSPORT VON T β RI/A8	101
B.II.4. REPORTERGENSTUDIEN ZUR UNTERSUCHUNG DER SIGNAL-ÜBERTRAGUNGSAKTIVITÄT VON T β RI/A8	103
B.III. DISKUSSION	106
IV. MATERIAL UND METHODEN	113
IV.1. ABKÜRZUNGEN	113
IV.2. ARBEITSMATERIALIEN	115
IV.2.1. Geräte	115
IV.2.2. Chemikalien und Reagenzien	116
IV.2.3. Zellkulturmaterial	116
IV.2.4. Zytokine	117
IV.2.5. Oligonukleotide	117
IV.2.6. Enzyme	117
IV.2.7. Antikörper	117
IV.2.8. Expressionsvektoren und Bakterienstämme	119
IV.2.9. Zelllinien	120
IV.3. LÖSUNGEN UND PUFFER	121
IV.4. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	123
IV.4.1. Kultivierung von Bakterien	123
IV.4.2. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	123
IV.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	124
IV.5.1. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	124
IV.5.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	125
IV.5.3. Restriktionsverdau von DNA	125
IV.5.4. Ligation von DNA-Fragmenten	126
IV.5.5. Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	126
IV.5.6. Agarose-Gelelektrophorese	126
IV.5.7. DNA-Größenstandard	127
IV.5.8. Reverse Transkription (RT)	127
IV.5.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	128
IV.5.10. Sequenzierung	129

IV.6. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	130
<i>IV.6.1. Zellkultur</i>	130
<i>IV.6.2. Zellzahlbestimmung</i>	130
<i>IV.6.3. Transfektionsmethoden</i>	130
<i>IV.6.4. β-Galactosidase-Test</i>	131
IV.7. PROTEINCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN	132
<i>IV.7.1. Jodierung von TGF-β</i>	132
<i>IV.7.2. Chemische Quervernetzung von [125I]-TGFβ (Crosslinking)</i>	132
<i>IV.7.3. Zellyse</i>	133
<i>IV.7.4. Immunpräzipitation von Proteinen</i>	133
<i>IV.7.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	134
<i>IV.7.6. Western-Blot</i>	135
<i>IV.7.7. Proteingrößenstandard</i>	136
<i>IV.7.8. In vivo Markierung von Zellen mit [35S]-Cystein/Methionin</i>	137
<i>IV.7.9. Biotinylierung von Oberflächenproteinen</i>	137
<i>IV.7.10. Reportergen-Assay</i>	138
V. ANHANG	140
VI. LITERATUR	142
VII. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	163
SCHRIFTENVERZEICHNIS	167
LEBENS LAUF	168
DANKSAGUNG	169
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	170

I. Einleitung

Jeder vielzellige Organismus bedarf der Kommunikation zwischen einzelnen Zellen und dem Gesamtorganismus. Nur so kann Entwicklung, Wachstum, Reizverarbeitung und Bewegung koordiniert erfolgen. Als Informationsüberträger steuern Nerven, Hormone und Wachstumsfaktoren einzelne Zellen oder Gewebe und kontrollieren motorische, sekretorische, proliferative und migratorische Prozesse. Darüber hinaus vermitteln auch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte Informationen, die Funktion und Schicksal von Zellen beeinflussen.

Diese Signale, die von außen an die Zielzellen gelangen, führen meist zur Aktivierung eines spezifischen Programms, welches durch den Zelltyp festgelegt ist. Dies können reversible, schnelle Reaktionen sein, wie z.B. bei motorischen oder sekretorischen Zellen. Im Falle von Wachstums- und Entwicklungsprozessen wird dagegen meist ein genetisch festgelegtes Programm aktiviert, das zu Proliferation oder Differenzierung führt. Dies wird durch ein Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und Zielgenen im Zellkern erreicht, welches schließlich zu DNA-Synthese und Zellteilung oder aber zur Expression differenzierungsspezifischer Proteine führt.

Zytokine und deren intrazelluläre Signaltransduktion spielen hierbei eine wichtige Rolle. Es handelt sich hierbei um eine Gruppe kleiner segregierte Proteine, die zwar strukturelle Unterschiede zeigen, aber wegen ihrer vergleichbaren physiologischen Wirkungen zusammengefaßt werden können. Zur Gruppe der Zytokine zählen u.a. Interleukine (IL), Interferone (IFN), Chemokine, Kolonie-stimulierende-Faktoren (CSF), Tumor-Nekrose Faktoren (TNF) und die transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF).

Die Familie der TGF- β Zytokine ist Mittelpunkt dieser Arbeit und soll bezüglich ihrer Wirkungsweise und Signaltransduktion im Folgenden genau beschrieben werden.

I.1. TGF- β und die TGF- β Superfamilie

I.1.1. TGF- β vermittelte Aktivitäten

Bei Transforming growth factor- β (TGF- β) handelt es sich um ein Zytokin, das eine Vielzahl biologischer Funktionen reguliert. TGF- β wurde ursprünglich als ein Faktor identifiziert, der das Wachstum von Fibroblasten in Kultur unterstützt [1]. Es wurde jedoch bald klar, daß dieses Peptid nicht nur Zellwachstum fördert, sondern auch inhibiert, je nachdem um welchen Zelltyp es sich handelt und welche zusätzlichen Wachstumsfaktoren anwesend sind [2] [3]. TGF- β zeigt auch Aktivität im Hinblick auf die Modulation von zellulären Differenzierungsprozessen in vitro und in vivo. Die Modifikation der Zellmigration, sowie 'Homing' und Lokalisation von Zellen während der Entwicklung werden ebenfalls beeinflusst. Diese Prozesse werden zum Teil von komplexen adhäsiven Interaktionen zwischen zellulären Rezeptoren und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), deren Produktion wiederum von TGF- β angeregt wird, kontrolliert. Auch bei der Induktion apoptotischer Reaktionen spielt TGF- β eine Rolle [3].

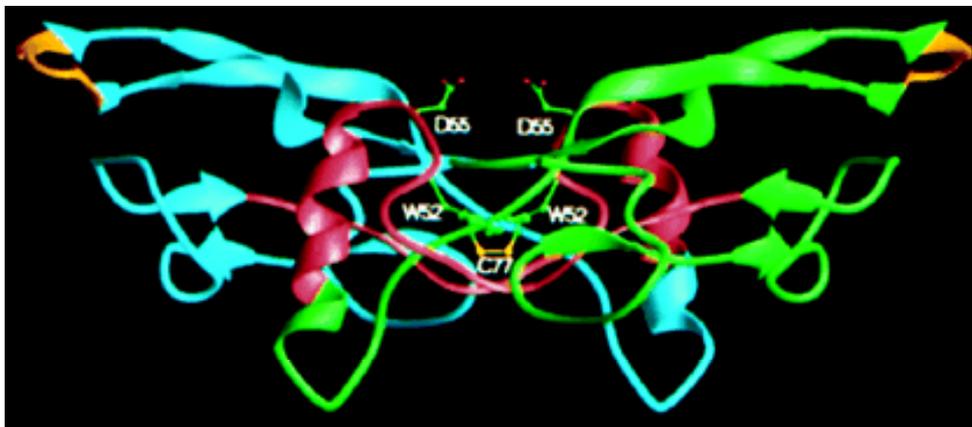


Abb.1 Von der NMR-Struktur des humanen TGF- β 1 abgeleitetes Ribbon-Diagramm (Protein-Datenbank Eintrag 1KLC). In grün und blau sind die beiden TGF- β Monomere dargestellt, die verbindende Disulfidbrücke in der Mitte ist gelb markiert. Die Abbildung wurde aus Huang et al. entnommen [4].

I.1.2. Mitglieder der TGF- β Superfamilie

Die TGF- β Superfamilie umfaßt neben den TGF- β Isoformen insgesamt über 30 Proteine, die strukturell ähnliche, aber dennoch funktional unterschiedliche Wachstumsfaktoren repräsentieren und eine Vielzahl zellulärer Verhaltensweisen regulieren. Zu nennen sind hier u.a. die BMPs (bone morphogenetic proteins), Dpp (decapentaplegic), die GDFs (growth/differentiation factors), GDNF (glial derived growth factor), Aktivine und Inhibine, AMH (anti muellerian hormone) und Nodal [5] [6]. Diese Moleküle treten in der Regel als ca. 25 kDa große Dimere auf, die durch eine einzelne Disulfidbrücke zwischen den Monomeren stabilisiert sind. Die Monomere besitzen eine cysteinreiche Knotenstruktur, die ihnen extreme Kompaktheit verleiht (vgl. Abb.1) [7] [8].

I.1.2. Prozessierung der Liganden

TGF- β wird, wie auch die anderen Mitglieder der Superfamilie, von verschiedensten Zellen in Form eines inaktiven Vorstufen-Proteins synthetisiert. Hierbei ist ein sog. LAP (latency associated peptide), ein aus 278 AS bestehendes Propeptid, mit dem eigentlichen bioaktiven TGF- β Peptid assoziiert. LAP hält TGF- β in einer latenten, inaktiven Form, die nicht an Membranmoleküle oder Rezeptoren binden kann. Der latente TGF- β Komplex beinhaltet außerdem eine dritte Komponente, ein großes Glycoprotein, das als LTBP (latent TGF- β binding protein) bezeichnet wird und über Disulfidbrücken mit dem LAP verbunden ist. LTBP wird für die Latenz des TGF- β Komplexes nicht benötigt, spielt aber bei Sekretions- und Aktivierungsprozessen eine wichtige Rolle. LTBP assoziiert sehr stark mit der extrazellulären Matrix und vermittelt somit eine Speicherung von latentem TGF- β in derselben. Latentes TGF- β wird in vitro mittels Säure, Alkali, Hitze oder Proteolyse aktiviert, an physiologischen Aktivierungsmechanismen sind vermutlich Plasmin oder Thrombospondin beteiligt [9] [10].

I.1.3. Zellzykluskontrolle durch TGF- β

Trotz der Vielseitigkeit von TGF- β ist seine wachstumshemmende Wirkung die kennzeichnendste. Hierbei verursacht TGF- β einen Arrest in der späten G1 Phase des Zellzyklus. Ein Fortschreiten des Zellzyklus ist von Reaktionen sog. Cyclin-abhängiger Kinasen (cdks = cyclin dependent kinases) begleitet. Diese werden durch Cyclin-Bindung aktiviert und können durch cdk-Inhibitoren, wie p15 und p16, in ihrer

Funktion blockiert werden. Spezielle Cyclin-Kinasen, tragen zur Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (pRb) bei. In hypo-phosphoryliertem Zustand bindet pRb bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie z.B. E2F, wodurch die Expression bestimmter Gene verhindert wird. Eine Phosphorylierung von pRb mittels cdk's in der G1 Phase führt zur Freisetzung dieser Transkriptionsfaktoren und somit zur Expression von Genen, welche in der darauffolgenden S-Phase des Zellzyklus von großer Wichtigkeit sind [11] [12].

TGF- β führt einen Zellzyklus-Arrest herbei, indem es bestimmte cdk's der G1 Phase inaktiviert und somit die Phosphorylierung von pRb verhindert. TGF- β induziert hierbei die verstärkte Expression der cdk-Inhibitoren p15 und p16 und fördert gleichzeitig eine intensivere Bindung dieser Proteine an ihre entsprechenden Ziel-cdk's. Außerdem kommt es zu TGF- β vermittelter Repression von *c-myc* und verschiedenen *cyclin* Genen. Die resultierende Dephosphorylierung von pRb führt wiederum zu Inhibierung der pRB-gebundenen Transkriptionsfaktoren und verhindert somit eine entsprechende Genexpression [13] [14].

I.2. Rezeptoren der TGF- β Superfamilie

I.2.1. Struktur, Aufbau und Funktion der Rezeptoren

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie binden zum Zweck der Signalübertragung an zwei verschiedene aber verwandte membran-gebundene Serin/Threonin Kinase Rezeptoren (Typ I und Typ II Rezeptoren). Diese Typ I und Typ II Rezeptoren sind Glykoproteine und ungefähr 55-65 kDa bzw. 70-80 kDa groß. Beide bestehen aus einer relativ zur Größe des Liganden kleinen cysteinreichen extrazellulären Domäne, einer einzelnen transmembranen Region und einem cytoplasmatischen Teil, der die Ser/Thr-Kinase-Domäne beinhaltet [15].

Alle Typ I Rezeptoren der TGF- β Superfamilie besitzen, im Unterschied zu den Typ II Rezeptoren, eine stark konservierte, 30 AS lange, Glycin/Serin-reiche Sequenz innerhalb der juxtamembranen Region, die als GS-Box bezeichnet wird. Ligandeninduzierte Phosphorylierung der Serin- und Threonin-Reste dieser Region wird für eine Aktivierung der Signalübertragung benötigt. Unmittelbar nach der GS-Box befindet sich bei allen Typ I Rezeptoren ein Leucin/Prolin Motiv, welches die Bindungsstelle für das Immunophilin FKBP12 (FK506 binding protein) darstellt [16]

[17] [18]. Die Mutation eines einzelnen Threonins zu Glutamin (T204D) im Bereich zwischen G/S-Box und Kinase Domäne führt zu konstitutiver Aktivierung der Kinasen. Derartige Mutanten liefern somit wichtige Werkzeuge für die Untersuchung der TGF- β Signaltransduktion, da sie in der Lage sind Signale des Ligand/Rezeptor Komplexes vorzutauschen auch wenn weder Ligand noch Typ II Rezeptor anwesend sind [19] [20].

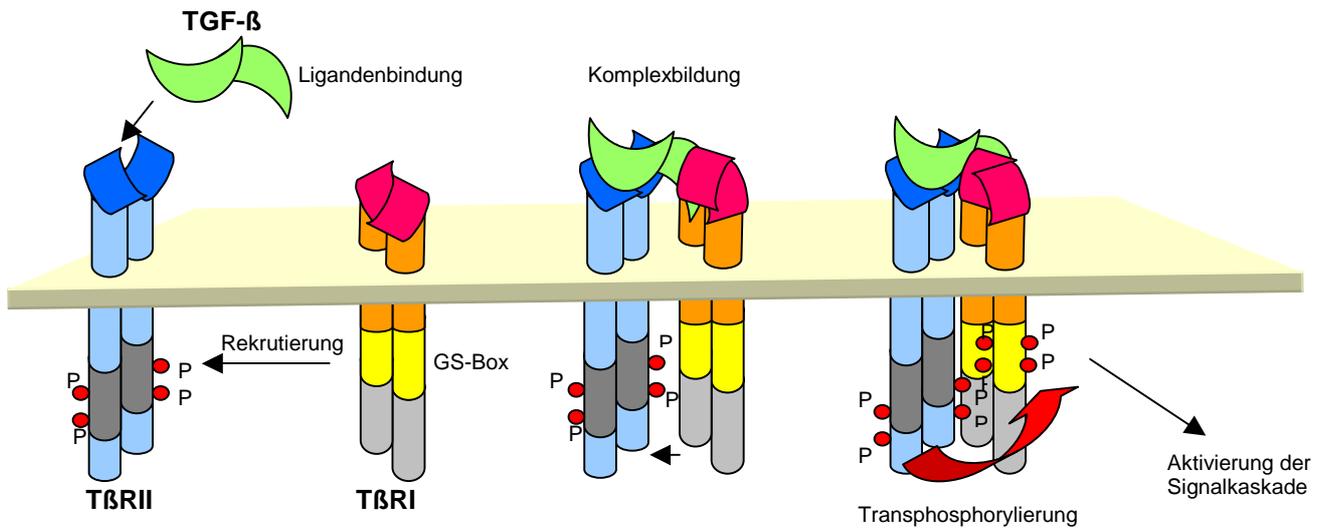
Die Kinase-Domäne der Typ I Rezeptoren dient zur Phosphorylierung ihrer Substrate, der Smad-Proteine, während die Typ II Rezeptoren sich selbst und Typ I Rezeptoren phosphorylieren und dies vorzugsweise an Serin- und Threonin-Resten [21] [22] [23]. Eine interessante Region innerhalb der Kinase-Domäne der Typ I Rezeptoren ist der sog. ‚L45-Loop‘, der für die Substraterkennung von großer Wichtigkeit ist und spezifische TGF- β Signalübertragung ermöglicht [24]. Typ II Rezeptoren weisen im Gegensatz zu Typ I Rezeptoren am distalen Ende der Kinase-Domänen C-terminale, Serin/Threonin-reiche Extensionen variabler Länge auf [21] [25].

Die unterschiedlichen Typ I und II Rezeptoren für die TGF- β Superfamilie sind im einzelnen an anderer Stelle aufgeführt und genau beschrieben (s. A.I.2.+3.). Für die Signalübertragung der TGF- β Isoformen stehen präferenziell zwei Rezeptoren zur Verfügung, welche im Folgenden als T β RII (=Typ II Rezeptor) und T β RI (=Typ I Rezeptor, Alk 5) bezeichnet werden. Außerdem ist speziell für die Bindung der TGF- β Isoformen ein weiterer Rezeptortyp, der Typ III Rezeptor (T β RIII), von Bedeutung. Die Rolle des T β RIII wird in Kapitel A.I.4. genau beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird außerdem ein weiterer Typ II Rezeptor, T β RII-B, beschrieben. Einführende Bemerkungen hierzu finden sich ebenfalls im Kapitel A.I.

I.2.2. Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Beide Rezeptortypen liegen an der Zelloberfläche als Homo-Oligomere vor, die nach Ligandenbindung miteinander einen stabilen heteromeren Komplex bilden [15] [16]. Innerhalb dieses sog. Signalrezeptor-Komplexes, wird der Typ I Rezeptor vom Typ II Rezeptor, der selbst autophosphoryliert vorliegt, an der GS-Box phosphoryliert und somit aktiviert. Der aktivierte Typ I Rezeptor ist nun in der Lage cytoplasmatische Substratmoleküle zu binden und zu phosphorylieren, wodurch die Signalübertragung in Richtung Nukleus vorangetrieben wird (s. Abb.2A) [25] [26].

A. sequenzieller Bindungsmodus:



B. kooperativer Bindungsmodus:

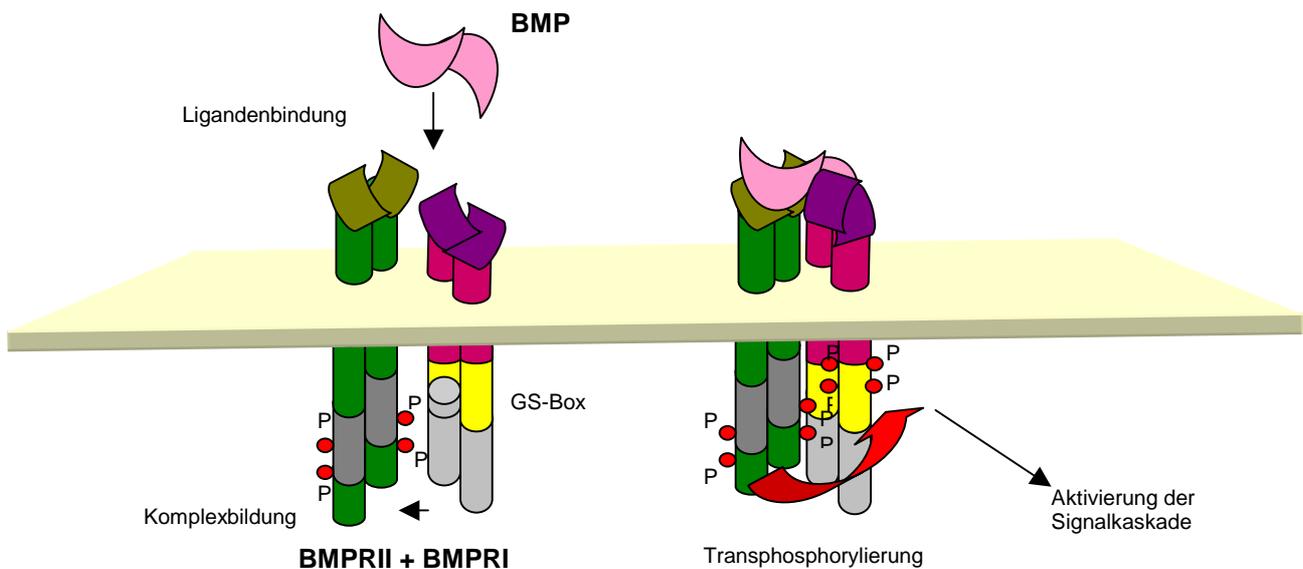


Abb.2A+B (A) Schematische Darstellung der sequenziellen Ligandenbindung und der TGF- β Rezeptoraktivierung. Nach Ligandenbindung an T β RII-Homooligomere werden T β RI-Homooligomere in einen heterotetrameren Komplex rekrutiert. Nachdem beide Rezeptortypen mit dem Liganden interagiert haben, wird das T β RI Homodimer von dem T β RII Homooligomer an den GS-Boxen transphosphoryliert. Das somit aktivierte Typ I Rezeptor Homooligomer ist nun in der Lage Substratmoleküle zu phosphorylieren. (B) Darstellung der kooperativen Bindungsart, wie sie teilweise bei der Bindung von BMPs an die entsprechenden Rezeptoren auftritt.

Innerhalb der TGF- β Superfamilie werden zwei unterschiedliche Arten der Ligandenbindung an die Signalrezeptor-Komplexe beobachtet. V.a. für TGF- β , Aktivin und AMH ist die sequenzielle Art der Bindung charakteristisch, bei der ein Komplex aus Ligand und Typ II Rezeptor den Typ I Rezeptor rekrutiert. In diesem Fall ist der Typ II Rezeptor der hochaffine, ligandenbindende Rezeptor, während der Typ I Rezeptor mit dem freien Liganden nur nieder-affin interagieren kann und diesen primär in gebundener Form erkennt [27] [28].

Bei der BMP-Bindung sind die Typ I Rezeptoren die eigentlichen akzessorischen Rezeptoren und in der Lage alleine und hochaffin mit den Liganden zu interagieren. Neben einem sequentiellen Bindungsmodus tritt hier auch eine kooperative Art der Bindung über präformierte heterooligomere Signal-Komplexe aus Typ I und Typ II Rezeptoren auf [29] [30]. Ein kooperativer Bindungsmodus wurde auch für die Bindung der TGF- β 2 Isoform an ihre Rezeptoren vermutet [31]. Beide Bindungsarten sind in Abb.2A+B schematisch dargestellt.

I.2.3. Rezeptorassoziierte Moleküle

Eine Reihe zytoplasmatischer Proteine ist in der Lage mit den Kinase Domänen der Typ I und II Rezeptoren der TGF- β Superfamilie zu interagieren und dadurch deren Signalübertragungskapazität zu regulieren oder zu manipulieren (s. Abb.3).

FKBP12 ist ein Immunophilin und bekannt Rapamycin und FK506 zu binden. Es interagiert mit den Typ I Rezeptoren der TGF- β Superfamilie über ein FK506-ähnliches Leucin/Prolin Motiv oberhalb der Kinase-Domänen [17]. FKBP12 verhindert die Phosphorylierung des Typ I Rezeptors durch den Typ II Rezeptor, indem es die Typ I Rezeptor Phosphorylierungsstellen innerhalb der GS-Box bedeckt und dadurch zusätzlich die inaktive Konformation des Typ I Rezeptors stabilisiert. Durch die Bindung von FKBP12 wird eine ligandenunabhängige Aktivierung der Rezeptorkomplexe verhindert und somit eine ‚undichte Stelle‘ bei der Signalübertragung verschlossen. Nach Ligandenbindung kommt es zu Konformationsänderungen im Rezeptorkomplex, FKBP12 dissoziiert vom Typ I Rezeptor und eine Transphosphorylierung wird möglich [18].

Bei **BAMBI** (BMP and activin membrane bound inhibitor) handelt es sich um ein transmembranes Protein, dessen extrazelluläre Domäne große Ähnlichkeit zum TGF- β Typ I Rezeptor aufweist. Dieser Pseudorezeptor kann in ligandeninduzierte

Komplexe zusammen mit Typ I Rezeptoren eingebaut werden, behindert dabei aber die Signalübertragung durch die Bildung nicht aktivierbarer Typ I Rezeptor Heterodimere. BAMBI ist in der Lage Aktivin und BMP Signale zu inhibieren. Aufgrund der relativ gut übereinstimmenden Expressionsmuster von BMP und BAMBI, kann von einer BMP-regulierten BAMBI Expression ausgegangen werden. BAMBI stellt in seiner Funktionsweise also einen ‚negativen feedback Mechanismus‘ dar [32]. Es wurde festgestellt, daß die Expression von BAMBI in tumorigenen Geweben verringert ist. Die regulatorische Funktion von BAMBI ist also vermutlich während der Tumorgenese nicht zu unterschätzen [33].

TRIP-1 (TGF- β receptor interacting protein 1) ist ein Protein, das fünf WD-Domänen beinhaltet, die für die Ausbildung von Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sind. Das Protein bindet an T β RII und wird von diesem phosphoryliert. Diese Reaktion ist ligandenunabhängig und benötigt eine funktionierende T β RII-Kinase [34]. Durch Überexpression von TRIP-1 werden transkriptionelle Antworten, die von den sog. Smads, ‚downstream‘ Molekülen der TGF- β Signalkaskade, abhängig sind, inhibiert (s. I.3.). Die eigentliche Smad-Aktivierung ist jedoch unbeeinflusst [35].

Ein weiteres WD-Domänen enthaltendes Protein ist **STRAP** (serine/threonine kinase receptor-associated protein), das ligandenunabhängig sowohl mit Typ I als auch mit Typ II Rezeptoren interagieren kann [36]. STRAP bewirkt vermutlich durch Rekrutierung des inhibitorischen Smads, Smad7, in synergistischer Weise eine Inhibierung TGF- β vermittelter transkriptioneller Aktivierung [37].

Die **B α** Untereinheit der Protein-Phosphatase 2A enthält ebenfalls WD-Motive. Es wurde gezeigt, daß B α mit dem TGF- β Typ I Rezeptor interagiert und dadurch phosphoryliert wird. TGF- β vermittelte antiproliferative Effekte werden in Anwesenheit von B α potenziert [38].

TRAP-1 (T β RI associated protein-1) ist ein weiteres Typ I Rezeptor assoziierendes Protein. Es erkennt spezifisch die aktivierte Form des Rezeptors und verringert in überexprimiertem Zustand das TGF- β Signalübertragungspotential. Die präzise funktionale Bedeutung von TRAP-1 für den TGF- β Signalweg ist allerdings noch weitgehend unklar [39].

Für die **Farnesyltransferase α** (FT α) konnte ebenfalls eine Interaktion mit Aktivin und TGF- β Typ I Rezeptoren gezeigt werden, die in einer Phosphorylierung resultiert. Ob diese Interaktion jedoch für die TGF- β Signalübertragung von Bedeutung ist sei dahingestellt [40] [41].

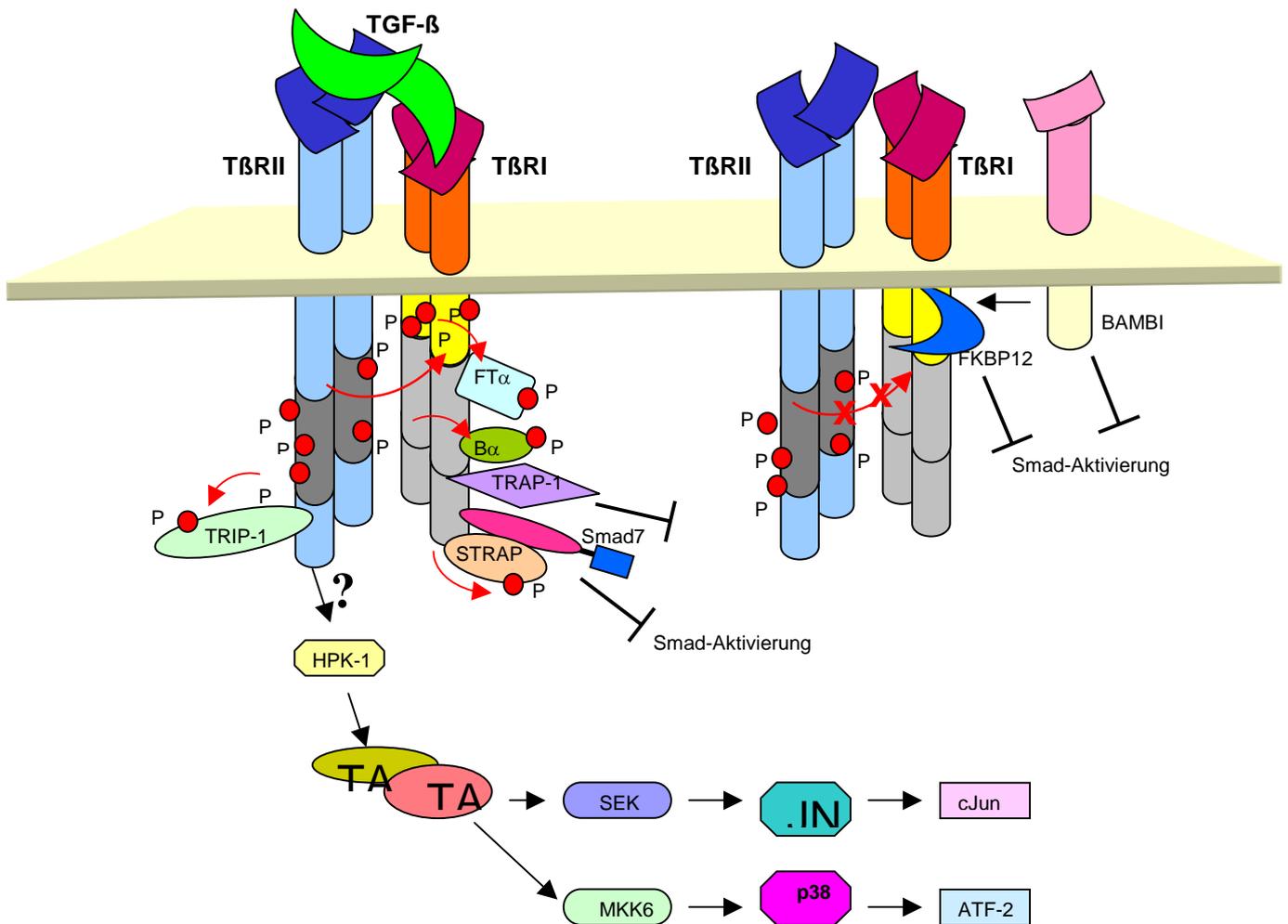


Abb.3 TGF- β Rezeptoren mit assoziierten Proteinen, die in Punkt I.2.3. beschrieben werden. FKBP12 verhindert eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung und Signalübertragung (rechtes Bild). Durch Interaktion von T β RI mit BAMBI wird die Transphosphorylierung des T β RI durch den Typ II Rezeptor verhindert (rechtes Bild). Phosphorylierung und Transphosphorylierung sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Außerdem ist die Signalweiterleitung über TAB/TAK schematisch dargestellt. HPK-1 ist ein Bindeglied zwischen T β RII und TAB/TAK. Die Art der Interaktion und Aktivierung von HPK-1 ist noch ungeklärt (?). Über die Aktivierung von SEK (stress-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase) bzw. MKK-6 (mitogen-activated protein kinase) kommt es zur Phosphorylierung von JNK-1 und p38. Diese aktivierten Streß-Kinasen wandern in der Kern um dort mit entsprechenden Transkriptionsfaktoren. cJun und ATF-2 die Genexpression zu regulieren.

I.2.4. Wechselwirkung der Rezeptoren mit TAK1 und TAB1

Immer mehr deutet darauf hin, daß TGF- β und BMP in der Lage sind auch verschiedene MAPK Signalwege, v.a. die MKK4-JNK und MKK3-p38 Signalwege, zu aktivieren. Die Antworten und Kinetiken unterscheiden sich je nach Zelltyp [42] [43] [44]. Die Verbindung zwischen den Rezeptoren und diesen Pathways ist nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise spielt die mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase TAK1 (TGF- β activated kinase 1), die direkt auf MKK Enzyme wirkt

und entweder JNK oder p38 aktiviert, hierbei eine Rolle. Die Kopplung von TAK an die Rezeptoren läßt noch Fragen offen. Für den Fall der TGF- β vermittelten JNK Aktivierung z.B. wird eine weitere Verbindung von TAK1 zu einer anderen ‚upstream‘ Kinase HPK1 (haematopoetic progenitor kinase 1) diskutiert [45]. TAK1 tritt in Assoziation mit aktivierend wirkenden Bindeproteinen TAB1 (TAK binding protein-1) auf. Die Kooperation von TAK1 und TAB1 ist durchaus relevant, da eine verstärkende Wirkung auf die transkriptionelle TAK1 Wirkung durch TAB1 beobachtet wird [46]. TAK1 ist ein multifunktionaler Mediator der auch in andere Signalwege, involviert ist [47]. Bei der TGF- β induzierten Aktivierung von JNK oder p38 kommt es über aktivierte AP-1 Komplexe oder ATF2 zur Genexpression [44] [48]. Die schematische Darstellung der Signalweiterleitung über TAK/TAB ist in Abb.3 miteinbezogen.

I.2.5. Dominant negative Wirkungsweise von verkürzten TGF- β Typ II Rezeptoren (Δ cyt-Mutanten)

Signalwege können auf verschiedenen Stufen negativ reguliert werden. Für die Blockierung einer Genfunktion auf Proteinebene bietet sich die Expression von mutanten Signalproteinen an, die in der Lage sind ihre wildtypischen Pendants zu inhibieren. Die daraus resultierende spezifische Ausschaltung von Genfunktionen wird als ‚dominant negativ‘ bezeichnet, da sich der entsprechende Phänotyp auch in Anwesenheit des wildtypischen Gens manifestiert [49].

Die Überexpression von dominant negativen Genmutanten zur funktionalen Inaktivierung bestimmter Proteine birgt gegenüber sog. Nullmutationen eine Vielzahl von Vorteilen. Beispielsweise kann die Funktion eines Gens ganz gezielt in spezifischen Zellen und ausgewählten Organen mit Hilfe von entsprechenden transkriptionellen Kontrollelementen untersucht werden. Außerdem wird durch die Inhibierung auf Proteinebene eine mögliche embryonale Lethalität, die häufig bei Nullmutationen auftritt, umgangen [50].

Dieses System der Protein-Inhibierung bietet sich auch für die Untersuchung der TGF- β Signaltransduktion an. TGF- β ist in fast allen Geweben des Körpers verbreitet und hat demnach eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen. Hierbei ist die spezifische Wirkung von TGF- β abhängig vom Zelltyp, vom Differenzierungsgrad der Zelle und von der Zusammensetzung der zellulären Umgebung, wie z.B. der extrazellulären Matrix, sowie vom Vorhandensein anderer Zytokine [51]. Die

Möglichkeit mit dominant negativen Proteinen die Wirkung von TGF- β lokal und gewebespezifisch zu unterbinden, ist daher von großer Bedeutung. Um eine vollständige Ausschaltung des TGF- β Signals zu erreichen, ist es sinnvoll die ‚erste Instanz‘, die Rezeptoren, effektiv zu blockieren. Ein beliebtes Zielprotein ist daher der TGF- β Typ II Rezeptor. Ein Gen Knockout des Typ II Rezeptors führt zu embryonaler Lethalität, lässt daher keine postnatalen Untersuchungen am Tier zu und liefert somit für viele Fragestellungen keine Lösung [52].

Alternativ wurde und wird daher häufig eine verkürzte (trunkierte) Form des Typ II Rezeptors, die aufgrund des Fehlens der cytoplasmatischen Serin/Threonin Kinase Domäne dominant negativ wirkt, verwendet. Dieser Rezeptormutante (T β RII- Δ cyt) enthält die komplette extrazelluläre und transmembrane Domäne, wird somit an der Zelloberfläche exprimiert, ist in der Lage TGF- β zu binden und kann sowohl mit wildtypischem T β RII als auch mit T β RI Komplexe bilden (s. Abb.4) [53] [54]. Die spezifische Interaktion zwischen trunkiertem und wildtypischen T β RII, die bereits intrazellulär und ligandenunabhängig stattfinden kann, führt vermutlich zu vermehrter Degradierung oder zu weniger effektivem Oberflächentransport des Rezeptorkomplexes [55] [53]. Ob der geringe Teil dieser heterooligomeren Komplexe, der an der Zelloberfläche vorhanden ist, Signalaktivität besitzt, ist nicht bekannt. Homooligomere trunkierte Rezeptoren, die mit T β RI ligandeninduzierte Komplexe an der Oberfläche bilden, sind aufgrund der fehlenden Kinase-Domäne nicht in der Lage ein Signal zu propagieren [54]. Aufgrund dieser Inhibierung auf Rezeptorebene, können, im Gegensatz zu einzelnen Liganden-Knockouts alle drei TGF- β Isoformen ausgeschaltet werden. Außerdem können somit unerwünschte systemische Effekte, wie die Entstehung von Entzündungen, die beispielsweise in der TGF- β 1 Nullmaus auftreten, vermieden werden [56].

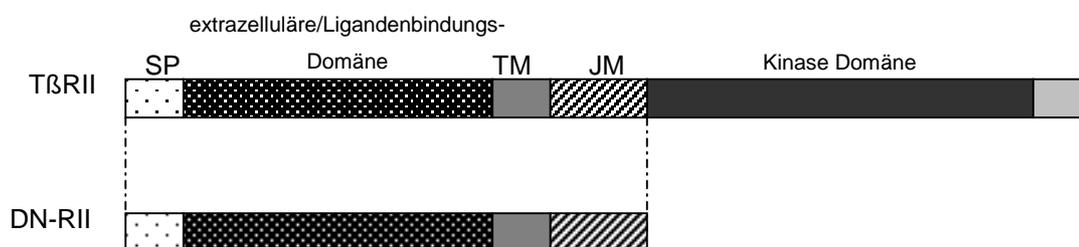


Abb.4 Schematische Darstellung eines ‚full-length‘ und eines trunkierten TGF- β Typ II Rezeptors.

I.3. Die Smad-Proteine

I.3.1. Signaltransduktion durch Smad-Proteine

Die signalübertragenden Komponenten der TGF- β Signaltransduktion werden von den sog. Smads repräsentiert. Hierbei handelt es sich um cytoplasmatische Proteine, die von Typ I Rezeptoren phosphoryliert werden, somit Rezeptorsignale empfangen und spezifisch als Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression einwirken. Nach der Entdeckung der Mad-Proteine in *Drosophila*, sowie der sma-Proteine in *Caenorhabditis elegans* konnten die Mad-homologen Smads auch in Vertebraten identifiziert werden [57] [58] [59] [60] [26]. Ein Schema der TGF- β Signaltransduktion über Smad-Proteine ist in Abb.7 am Ende dieses Kapitels dargestellt.

Die Gruppe der Smads wird basierend auf Struktur und Funktion in drei verschiedene Subklassen unterteilt (s. Abb.5). Rezeptor-regulierte Smads (R-Smads) besitzen ein C-terminales SSXS Motiv, an dem sie von den Kinasen der Typ I Rezeptoren phosphoryliert werden. R-Smads sind direktes Substrat der Rezeptorkinasen, und somit für die Spezifizierung der resultierenden biologischen Antwort ausschlaggebend. So werden Smad2 und 3 von TGF- β und Aktivin, sowie von Nodal und GDF-8 (Myostatin) aktiviert, während Smad1, 5 und 8 von den Rezeptoren der BMPs und einigen GDFs, sowie den Rezeptoren für AMH phosphoryliert werden [6].

Die aktivierten R-Smads formen Komplexe mit einer zweiten Klasse von Smad-Proteinen, den sog. Co-Smads. In Säugern konnte bisher nur ein Vertreter dieser Klasse, Smad4, identifiziert werden, während in *Xenopus* eine weitere Co-Smad Variante, Smad4 β (Smad 10) existiert [61] [62]. Smad4 (DPC4 = deleted in pancreatic cancer) wurde ursprünglich als Tumorsuppressorgen identifiziert, da es in einer beträchtlichen Zahl von Tumoren, v.a. Pankreas Karzinomen, mutiert oder deletiert vorliegt. Smad4 ist in seiner Rolle als Co-Smad sowohl Bestandteil der BMP als auch der TGF β Signaltransduktionskaskade. Smad4 besitzt kein SSXS Motiv, wird demzufolge nicht von Rezeptoren phosphoryliert und zeigt selbst keine aktivierende Funktion [63]. Durch die Zusammenführung verschiedener Signale an einem Knotenpunkt (Smad4) wird möglicherweise das Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren der TGF- β Familie moduliert, indem die relative Stärke eines Signals durch Kompetition um einen begrenzten Smad4-Pool kontrolliert wird [64].

Nach Interaktion von R-Smads mit Co-Smads wandern diese Komplexe in den Zellkern um dort die Genexpression zu regulieren. Im Nukleus wird der R-Smad/Co-Smad Komplex durch direkte Interaktionen der R-Smads mit verschiedenen DNA-Bindungspartnern an spezifische Promotor Elemente rekrutiert. Dieser Transkriptions-Aktivierungskomplex wird zusätzlich durch Bindung der Smad-Moleküle an benachbarte DNA-Elemente stabilisiert. Sowohl die R-Smads als auch die Co-Smads können an DNA binden. Optimale Bindung wird durch die 5 bp lange Sequenz CAGAC erreicht. Derartige Smad-Bindungselemente (SBEs) sind in einfacher oder mehrfacher Ausführung in den meisten TGF- β , Aktivin oder BMP responsiven Genen vorhanden [65] [66]. Durch Rekrutierung von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren können Smads den Transkriptionsprozeß sowohl positiv als auch negativ regulieren. Dieser hier beschriebene Signaltransduktionsweg via Smads ist erstaunlich gut zwischen verschiedenen Organismen konserviert [63].

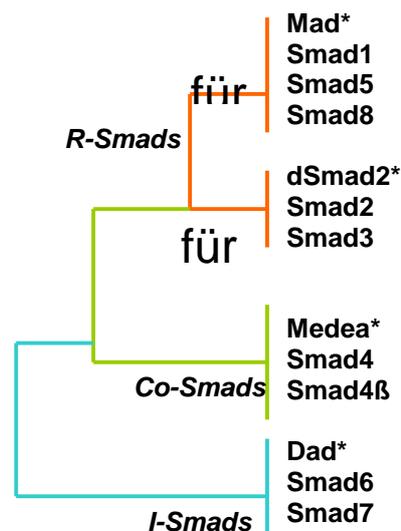


Abb.5 Schematische Übersichtsdarstellung der Smad-Familie. Neben den im Text erwähnten Smads sind hier zusätzlich die Drosopila-Homologen (*) aufgeführt.

Neben diesen positiv agierenden Smads, wirkt eine dritte Gruppe von Smad-Proteinen, die sog inhibitorischen Smads (I-Smads) Smad6 und Smad7, antagonistisch auf die Signalübertragung. Smad6 inhibiert präferentiell die BMP Signalübertragung, Smad7 hingegen kann sowohl die TGF- β als auch die BMP Signaltransduktion behindern. Wie Smad4 weisen die I-Smads kein SSXS Phosphorylierungs-Motiv auf. I-Smads sind trotz relativ großer struktureller

Divergenzen in der Lage mit den Rezeptorkomplexen zu interagieren und so Kontakt und Phosphorylierung der R-Smads an den Rezeptoren zu verhindern. Smad6, in geringen Dosen exprimiert, bedient sich einer weiteren Art der Inhibierung, indem es mit Smad4 um die Bindung an das Rezeptor-aktivierte R-Smad kompetiert, was zur Bildung von inaktiven R-Smad-Smad6 Komplexen führt [67]. Interessanterweise wird die Transkription von I-Smads durch TGF- β vermittelte Signale induziert, wodurch in einem negativen ‚feedback-Mechanismus‘ das Signalübertragungspotential der Smads reguliert wird [26] [68] [67] [69]. Die Expression von Smad7 kann außerdem über Signalwege, die die TGF- β Signaltransduktion negativ regulieren, induziert bzw. gesteigert werden, wie es beispielsweise für den IFN- γ /STAT Signalweg gezeigt werden konnte [70].

I.3.2. Strukturelle Merkmale der Smads

Innerhalb der Proteinstruktur der Smads kann im Allgemeinen eine N-terminale Domäne (MH-1) von einer C-terminalen Domäne (MH-2) unterschieden werden. Diese Domänen, die keine intrinsischen enzymatischen Aktivitäten besitzen, kontrollieren Protein-Protein oder Protein-DNA Interaktionen. Beide Domänen sind innerhalb der Smad-Familie stark konserviert und durch eine Prolin-reiche Linkersequenz miteinander verbunden.

Die MH-1 Domäne ist für die DNA-Bindungsaktivität von Bedeutung und wird außerdem für die Ausbildung von Protein-Protein Interaktionen mit einer Reihe von DNA-bindenden Proteinen benötigt. Im basalen Stadium inhibiert die MH-1 Domäne transkriptionelle und biologische Aktivitäten der MH-2 Domäne durch physikalische Interaktion mit dieser. Die MH-1 Domäne ist kompakt globulär gefaltet und besteht aus vier α -Helices, sechs kurzen β -Strängen und fünf Loop-Regionen. Die DNA-Bindung wird durch eine zusätzliche β -Haarnadel-Struktur, welche die DNA in der tiefen Furche berührt, ermöglicht. In der Struktur von Smad 2 wurde eine Insertion identifiziert, die eine DNA-Bindung der MH-1-Domäne verhindert [71] [72]. Smad 2 unterscheidet sich somit funktional von Smad 3. Weiterhin wurde in der MH-1 Domäne von Smad3 ein Kern-Lokalisations-Signal (NLS) identifiziert. Dieses konservierte Motiv (Lys-Lys Leu-Lys-Lys) bestimmt vermutlich die ligandeninduzierte Kern-Translokation aller R-Smads [73].

Im Gegensatz zur MH-1 Domäne bindet die MH-2 Domäne keine DNA, besitzt jedoch effektorische Funktionen. Außerdem wird die Bindung an eine Reihe von Proteinen,

wie Typ I Rezeptoren, SARA (s. unten) und verschiedene nukleare Proteine durch die MH-2 Domäne ermöglicht. Interaktionen zwischen MH-2 Domänen unterstützen die Homo- und Heterooligomerisierung der Smads aller drei Unterfamilien. Die Struktur dieser Domäne weist fünf α -Helices, drei Schleifen und ein β -Faltblatt auf. Die Struktur der Smad-Domänen ist in Abb.6 dargestellt [74] [75] [76] [77].

Kleine strukturelle Elemente an den Oberflächen der Typ I Rezeptoren und der R-Smads bestimmen die Spezifität der Rezeptor-Smad Interaktion. Diese Elemente sind der ‚L45 Loop‘ innerhalb der Typ I Rezeptor Kinase Domäne und der ‚L3 Loop‘ in der MH-2 Domäne der R-Smads [24] [78]. Wenige Aminosäurereste in den Bereichen der beiden Loops sind innerhalb bestimmter Rezeptor- und Smad-Subtypen konserviert. Ein Austausch dieser AS-Reste zwischen Rezeptoren oder Smads reicht aus, um die Spezifität der TGF- β und BMP Signalkaskaden zu verändern [79].

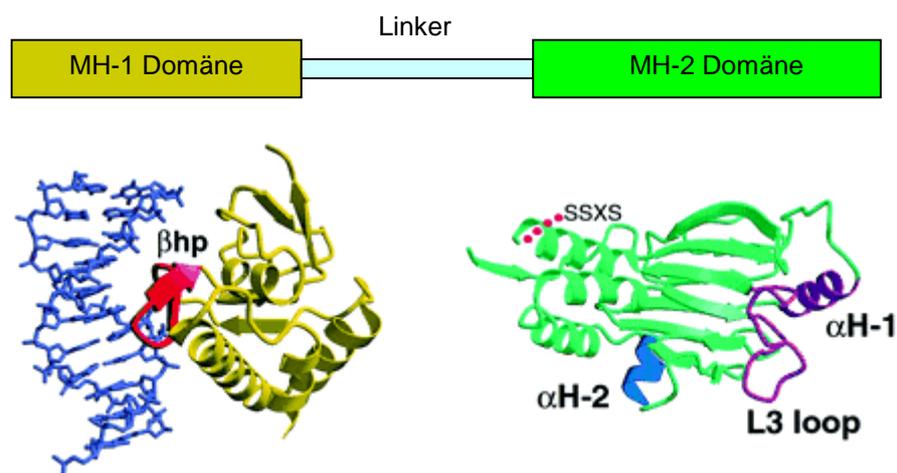


Abb.6 Dreidimensionale Struktur der Smad-Domänen. Links ist die Smad3 MH-1 Domäne gebunden an ein DNA-Fragment (blau) dargestellt. Die für die DNA-Bindung essentielle β -Haarnadel Struktur (β hp) ist farbig markiert. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Smad2 MH-2 Domäne mit SSXS-Motiv. Für die spezifische Interaktion der Smads mit den Typ I Rezeptoren ist der L3-Loop und eine benachbarte Helix-Struktur (α H-1) von Bedeutung. Beides ist farbig hervorgehoben, sowie eine weitere Helix-Struktur (α H-2), die die Interaktion mit FAST-1 vermittelt. Die Strukturen wurden aus Shi et al., (1998) und Wu et al., (2000) übernommen [75] [76].

I.3.3. Smad-interagierende Proteine

I.3.3.1. SARA, ein Smad/Rezeptor Anker-Protein:

Der erste Schritt bei der intrazellulären TGF- β Signalübertragung ist die Interaktion der R-Smads mit dem Rezeptorkomplex. SARA (Smad anchor for receptor activation) konnte als ein Faktor identifiziert werden, der bei diesem Prozeß eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Dieses Protein ist in der Lage mit Smad2/3 zu interagieren und durch Co-Lokalisation den Zugang der R-Smads an die aktiveren TGF- β Rezeptoren zu ermöglichen. SARA enthält eine zentrale FYVE-Domäne, eine Zink-Finger-artige Struktur, die Phosphatidylinositol-3-phosphat bindet und dadurch eine Interaktion mit Membranen ermöglicht [80]. Normalerweise ist SARA in punktuellen Clustern innerhalb der Zelle zu finden. Die FYVE Domäne wird, wie sich in Deletionsstudien bestätigte, benötigt um SARA in dieser subzellulären Lokalisation zu halten.

SARA enthält weiterhin eine SBD (Smad Bindungs Domäne), die mit der MH-2 Domäne von Smad2 und 3, jedoch nicht Smad1, interagiert. Durch diese Verbindung wird auch die subzelluläre Verteilung der Smads, die in die gleichen punktuellen Cluster rekrutiert werden, kontrolliert. In diesen SARA-enthaltenden subzellulären Regionen werden auch die TGF- β Rezeptoren co-lokalisiert vorgefunden. SARA ist in der Lage sowohl mit TGF- β Rezeptorkomplexen als auch mit Smad2/3 zu assoziieren. Die Aktivierung der TGF- β Signalkaskade und die nachfolgende Phosphorylierung der Smads führt zur Dissoziation des SARA/Smad Komplexes. SARA rekrutiert also Smad-Proteine zum einen an Membranen, zum andern in Kompartimente der Zelle, in denen die aktivierten Rezeptorkinasen lokalisiert sind und erleichtert bzw. kontrolliert somit die Rezeptor-vermittelte Smad-Aktivierung [81].

I.3.3.2. Smurf-Proteine:

Selektive Degradierung vieler kurzlebiger Proteine wird in eukaryotischen Zellen durch das Ubiquitin System vermittelt. Diese Art des Proteinabbaus ist für die Kontrolle zahlreicher zellulärer Prozesse, u.a. der Signaltransduktion, von Bedeutung. Es werden hierbei Proteine durch kovalente Ligation an Ubiquitin, ein kleines hoch-konserviertes Protein (76 AS), für den Abbau markiert. Die Ubiquitin-Protein Ligation benötigt die sequenziell aufeinanderfolgende Aktion dreier Enzyme: Für die Aktivierung von Ubiquitin in einem ATP-abhängigen Schritt, wird das sog. E1

Enzym benötigt. Hierauf folgt die Bindung von aktiviertem Ubiquitin an ein ebenfalls aktiviertes Trägerprotein E2. In einem dritten Schritt, der von einer Ubiquitin-Ligase, E3, katalysiert wird, wird Ubiquitin über C-terminale AS-Reste mit dem Substrat-Protein verbunden, welches anschließend durch den 26S Proteasomen-Komplex degradiert wird. In der Regel existieren neben einem einzigen E1-Enzym verschiedene Arten von E2-Proteinen und multiple Familien von E3-Ligasen. Für die Selektivität der Ubiquitin-Protein Ligation sind v.a. die E3-Enzyme verantwortlich, die in der Lage sind spezifische Proteinsubstrate über distinkte Erkennungssignale in die Ubiquitin-Maschinerie zu rekrutieren und zu binden [82].

Als Smad-spezifische E3 Ubiquitin Ligasen konnten die Smurf-Proteine (Smad ubiquitination regulatory factor) identifiziert werden [83] [84]. Smurf-1 enthält eine sog. HECT-Domäne (Homologous to E6-AP C-Terminus), eine aus ca. 350 AS bestehende, konservierte C-terminale Domäne, die typisch für eine Gruppe der E3 Enzyme ist. Außerdem konnte eine WW-Domäne identifiziert werden, die Protein-Protein Interaktionen durch Bindung an ein PY-Motiv (Prolin-reiche Sequenz mit einem Tyrosinrest) ermöglicht. In den Smads befindet sich dieses Motiv (PPXY) in der nicht konservierten Linker Region. Die WW-Domäne von Smurf-1 erkennt daher selektiv Smad1 und Smad5, Smurf-2 ist für Smad2 oder Smad3 zuständig. Die Interaktion von Smurfs mit den Smads führt also zu Ubiquitinierung und Degradation, wodurch die Konzentration der Smads in der Zelle verringert wird. Die Smad Bindung und Degradation durch die Smurfs erfolgt unabhängig von einer Aktivierung durch Liganden und findet daher vor Rezeptorbindung und Smad Phosphorylierung statt [77].

Smurfs blockieren somit die Smad Funktionen wodurch die Signalübertragung effizient gehemmt wird. Ubiquitin vermittelte Proteolyse spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Smad-Aktivität. Gezielter Proteinabbau findet nicht nur im Zytoplasma mit inaktiven Smads statt, sondern auch im Zellkern werden phosphorylierte Smads durch den Ubiquitin-Proteasomen Weg degradiert [85].

I.3.4. DNA-Bindungspartner der Smads

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie zeigen sehr spezifische Effekte in unterschiedlichsten Zelltypen und erreichen dies u.a. durch die Interaktion der Smads mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Durch Assoziation mit diesen Proteinen

wird eine Bindung der Smads an entsprechende SBEs arrangiert und dies in optimaler Distanz zu den eigenen DNA-Bindungsstellen.

FAST-1 ist als sog. ‚forkhead‘ Transkriptionsfaktor bekannt und seine Fähigkeit an AREs (Aktivin-Response Element) zu binden und somit Aktivin-induzierte Antworten zu verstärken wurde ursprünglich in *Xenopus* beschrieben [86]. Die Säuger-Homologen FAST-1 bzw. FAST-2 werden v.a. mit der Aktivierung von Mesoderm-spezifisierenden Genen in Verbindung gebracht. Regionen innerhalb der Smad2/3 MH-2 Domänen vermitteln die Interaktion von FAST-Proteinen mit Smad2-Smad4 oder Smad3-Smad4 Komplexen, die in der Aktivierung von sog. ‚homeobox Genen‘ resultiert [79] [87] [88] 1998; [89]. Eine Verbindung von FAST-1/2 BMP-aktivierten Smad Komplexen konnte nicht gezeigt werden. Für den BMP-Signalweg wurde statt dessen **OAZ** als DNA-bindender Co-Faktor identifiziert. OAZ interagiert mit aktivierten Smad1-4 Komplexen und erlaubt ebenfalls die Erkennung und Aktivierung von ‚homeobox Genen‘ [90]. FAST und OAZ Proteine besitzen keine Transaktivierungsdomänen, aufgrund dessen die im Komplex eingebundenen Smad-Moleküle für die eigentliche Transaktivierung verantwortlich sein müssen [91].

Es konnten auch andere Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls Smad-Proteine an diverse Promotoren rekrutieren, aber im Gegensatz zu FAST und OAZ selbständig aktivierend wirken, ausgemacht werden. Zu nennen ist hier beispielsweise der **TFE3** Transkriptionsfaktor, der an eine E-box Sequenz im TGF- β -responsiven Element des *Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1)* Gens bindet und so den Zutritt von Smad3-Smad4 Komplexen an entsprechende SBEs ermöglicht [92] [93].

Auch **AP-1** (Jun-Fos) und **ATF-2** werden als potentielle synergistisch wirkende Partner für Smad-Proteine diskutiert [94] [48].

Weiterhin ist die Familie der **AML**-Proteine (PEPB2s) zu erwähnen, die als Polyomavirus-Verstärker-Proteine bekannt sind und mit den MH-2 Domänen der Smads interagieren können [95].

Erwähnt sei hier auch die synergistische Aktivierung von Zielgenen durch das Zusammenspiel von Smad3 und dem Vitamin-D Rezeptor, was beispielhaft die Wichtigkeit von Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren für sog. ‚cross-talks‘ zwischen verschiedenen extrazellulären Stimuli darstellt [96].

I.3.5. Transkriptionelle Co-Faktoren der Smad-Proteine

Ein aktivierter Smad Komplex assoziiert im Nukleus mit einer Reihe von transkriptionellen Co-Aktivatoren, sowie Co-Repressoren. Einige seien hier kurz erwähnt:

I.3.5.1. Co-Aktivatoren:

Der transkriptionelle Co-Aktivator **p300** wurde ursprünglich als ein adenovirales E1A Bindeprotein identifiziert, ist dem CREB Bindungsprotein (CBP) sehr ähnlich und beinhaltet eine Histon-Acetyltransferase (HAT) Domäne. Durch Acetylierung von Core-Histonen wird die nukleosomale Struktur der DNA gelockert und Transkriptionsfaktoren der Zugang zur eigentlichen Transkriptionsmaschinerie ermöglicht. R-Smads binden über ihre C-terminale MH-2 Domäne direkt an p300/CBP. Die Interaktion von p300/CBP mit den Smad-Proteinen führt zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen [97] [98] [99] [100] [101]. P300 und CBP sind große Proteine mit separaten Regionen zur Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Durch gleichzeitige Bindung mehrerer Proteine wird eine Kooperation von Smads mit anderen DNA-bindenden Proteinen ermöglicht. P300/CBP fungiert als eine Art Brückenmolekül bei der Komplexbildung von zwei einander nicht bindenden Faktoren. Es wird somit ein Zusammenspiel verschiedener Stimuli auf der Ebene der Genexpression ermöglicht. Diese Funktion von p300/CBP wurde beispielsweise in einer über LIF und BMP-2 induzierten Genaktivierung über STAT3 und Smad1 nachgewiesen [102] [103].

I.3.5.2. Co-Repressoren:

Das Homeodomänen-Protein **TGIF** interagiert in TGF- β abhängiger Form mit den MH-2 Domänen von Smad2 und 3. TGIF bindet direkt an Histon-Deacetylasen (HDACs) und rekrutiert somit diese Enzyme an endogene Smad2-Smad4 Komplexe. Durch diese Verbindung mit einem aktivierten Smad-Komplex wird TGIF an Smad-responsive DNA-Elemente transportiert und es kommt zur Unterdrückung einer TGF- β vermittelten Genexpression. Eine Limitierung der Smad-aktivierten Genexpression wird hier also durch die TGF- β induzierte Assoziation von Smads mit diesem Co-Repressor reguliert [104]. Aufgrund von Deletions-Studien und phänotypischen Untersuchungen wird eine Beteiligung von TGIF v.a. an der Repression von Nodal vermittelten Genantworten vermutet [91].

Ski wurde ursprünglich als das Produkt eines retroviralen Oncogens (*v-ski*) identifiziert, welches Transformation von Fibroblasten in Hühnchen Embryos und Muskel-Hypertrophie in Mäusen hervorruft [105]. Das zelluläre Gegenstück, c-Ski, und das verwandte **SnoN** Protein haben die Funktion transkriptioneller Co-Repressoren, die über ein Adaptorprotein Histon-Deacetylasen (HDACs) rekrutieren und Interaktion mit transkriptionellen Aktivatoren verhindern können. C-Ski und SnoN interagieren mit Smad3 und Smad4 und agieren somit als Co-Repressoren für den Smad2/3 Signalweg. Sie werden dabei in den Smad-DNA-Bindungskomplex incorporiert um die Smad-abhängige Genaktivierung abzuschalten [106] [107] [108]. Die Interaktion von Smads mit Ski und SnoN wird, im Gegensatz zur Interaktion von Smads und TGIF, auch unter basalen Bedingungen beobachtet und verschwindet während den ersten Stunden der TGF- β Stimulation [109]. Dieser Effekt wird möglicherweise über eine TGF- β induzierte Degradation durch Proteasomen vermittelt. Ein erneutes Ansteigen der SnoN Expression führt zum Abbruch der Smad vermittelten Transaktivierung. Ligandenunabhängige Genexpression wird also durch die Anwesenheit von Ski und SnoN gering gehalten, während die ligandeninduzierte Expression durch diese Faktoren in einem negativen ‚feedback-Mechanismus‘ reguliert wird [110].

I.3.6. Smad-vermittelter Rezeptor ‚cross-talk‘

Die Beteiligung der Smad-Proteine an Interaktionen zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen (‚cross-talks‘), wie dem TGF- β , dem Tyrosin-Kinase und dem Jak/Stat Signalweg, wird seit längerem beobachtet und diskutiert. Beispielsweise konnte gezeigt werden, daß Smad1 innerhalb der Linker-Region an einigen PXPS Motiven, die als Konsensus-Sequenzen der MAP Kinasen bekannt sind, phosphoryliert werden kann. Hierbei resultiert Behandlung von Zellen mit EGF oder HGF in Smad1 Phosphorylierung durch Erk-Kinasen, wodurch eine Kern-Translokation des Smad1-Smad4 Komplexes verhindert wird [111].

Jedoch sind auch Beispiele für ein synergistisches Zusammenspiel dieser beiden Signalübertragungswege bekannt. So wurde gezeigt, daß HGF und EGF Smad-abhängige Genexpression induzieren und Smad2 über MAP-Kinasen phosphoryliert wird [112]. Ebenso wurde eine Beteiligung des SAPK/JNK Signalwegs bei Smad-abhängigen Transkriptionseignissen festgestellt. Hierbei wird Smad2 von MEKK-1 phosphoryliert [113].

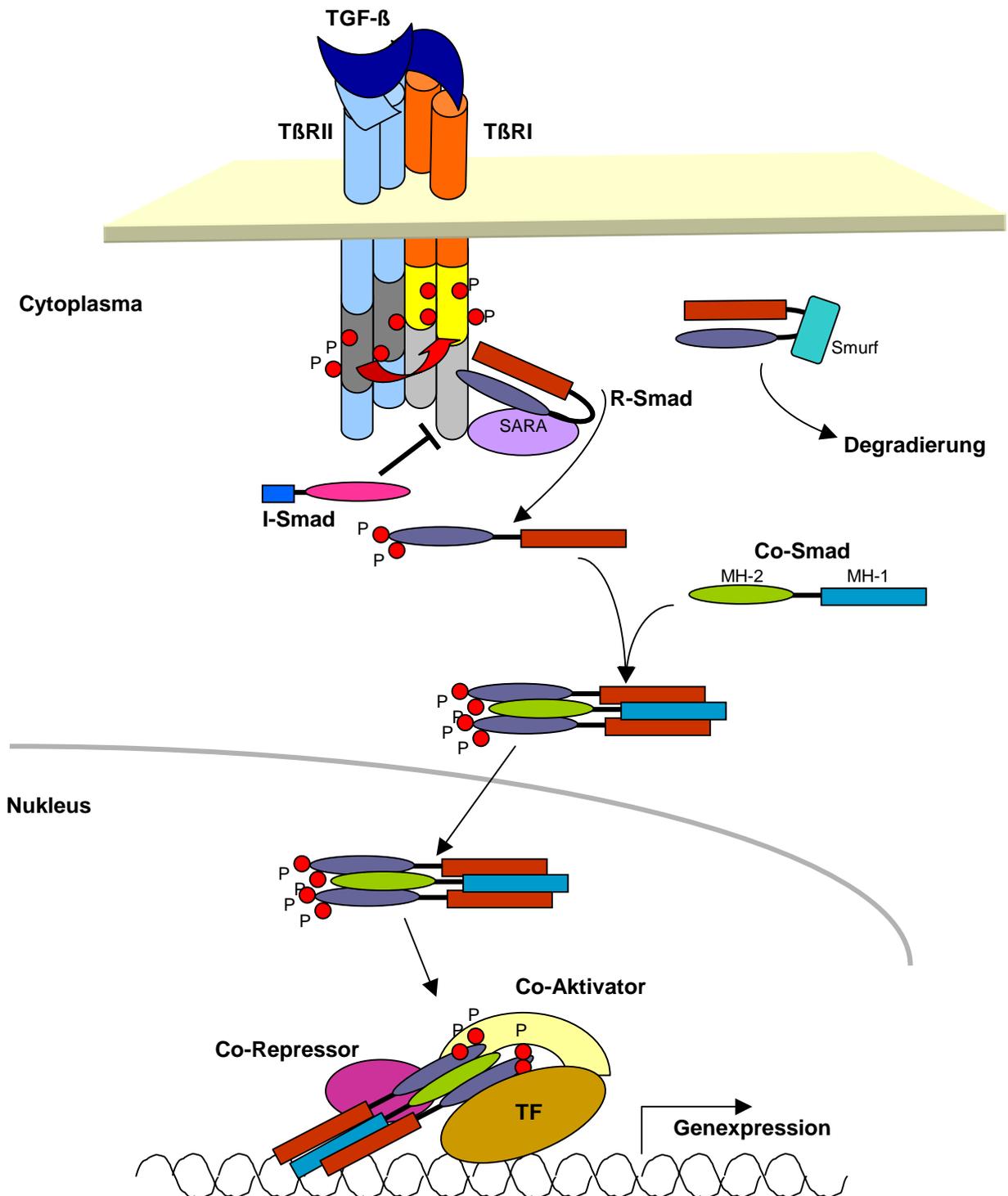


Abb.7 Schematische Darstellung der TGF- β Signaltransduktion via Smads. Dieses System beinhaltet die membranständigen Rezeptor-Kinasen, die phosphoryliert und transphosphoryliert vorliegen und deren Substrate, die R-Smads, die nach Phosphorylierung und Interaktion mit einem Co-Smad in den Nukleus transloziert werden. Der DNA-bindende Transkriptionskomplex wird aus einem Smad-Komplex, weiteren Transkriptionsfaktoren (TF), Co-Repressoren und/oder Co-Aktivatoren gebildet. Die Signalübertragung wird durch inhibitorische Smads (I-Smads), Smad-Degradierung via Smurf-Proteine und Smad-Rekrutierung mittels SARA kontrolliert und reguliert.

Ein Zusammenspiel von Signalwegen wird auch über eine regulierte Expression der inhibitorischen Smads möglich. Eine Induktion der Smad7 Expression konnte beispielsweise über EGF und IFN γ aktivierte Signaltransduktion erzielt werden [114] [70].

Smad-Proteine können also scheinbar als Sensoren dienen, die synergistische oder gegensätzliche Signale der unterschiedlichen Rezeptorfamilien aufnehmen und durch die Aktivierung ausgewählter Zielgene diesen Signal-Input reflektieren.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Projekte beschrieben, die sich zum einen mit einer alternativen Spleißform des Typ II Rezeptors, zum anderen mit der Rolle der TGF- β Rezeptoren bei der Tumorgenese beschäftigten. Trotz ähnlicher Grundthematik, sind die Projekte sehr unterschiedlich, sie sind in sich abgeschlossen und es gibt keine Überschneidungen. Aus diesem Grund werden im Folgenden beide Arbeiten (als **A** und **B**) getrennt voneinander in Einleitung, Ergebnissen und Diskussion beschrieben.

Projekt **A** befaßt sich mit der Typ III Rezeptor-unabhängigen TGF- β 2 Signalübertragung über T β RII-B, einem alternativ gespleißten TGF- β Typ II Rezeptor. In Projekt **B** wurde der Zusammenhang von Mutationen im TGF- β Typ I Rezeptor und der TGF- β Resistenz von B-Zellen bei chronischer lymphatischer Leukämie erarbeitet.

A. Biologische Charakterisierung des TGF- β Typ II-B Rezeptors

A.I. Einleitung

A.I.1. Die drei TGF- β Isoformen und ihre Knockouts

Drei TGF- β Isoformen, TGF- β 1, - β 2 und - β 3, wurden in Säugern identifiziert. Diese drei Isoformen sind sehr homolog bezüglich ihrer Sequenz und zeigen überlappende aber auch distinkte räumliche und zeitliche Expression. Eine starke embryonale Expression der TGF- β s in Bereichen, welche morphogenetischen Veränderungen unterliegen, v.a. epithelial-mesenchymalen Interaktionen, läßt auf eine entscheidende Rolle dieser Proteine während der embryonalen Entwicklung schließen [115] [116]. Jedoch oder deshalb sind die Phänotypen der drei TGF- β Knockouts sehr unterschiedlich, sehr spezifisch und überschneiden sich kaum.

TGF- β 1 Null-Mäuse leiden beispielsweise unter einer autoimmun-artigen Entzündungskrankheit. Ungefähr 20 Tage nach der Geburt zeigen die Mäuse ein akutes Schwächesyndrom, welches zum Tode führt. Auffällig ist hierbei v.a. das Auftreten nekrotischer Gewebe in einzelnen Organen, sowie ein Eindringen entzündlicher Zellen in vielerlei Organe, im besonderen in Herz und Magen [117].

TGF- β 1 ist ein potenter Regulator des Immunsystems und wirkt generell immunsuppressiv. Trotzdem werden neben hemmenden auch eine Reihe von immunstimulierenden Mechanismen durch TGF- β 1 unterstützt. Eine TGF- β 1 Defizienz stört möglicherweise das Gleichgewicht eines normal funktionierenden Immunsystems, was dessen unregulierte Aktivität zur Folge hat und fatal für den Organismus sein kann [118] [119]. Erstaunlicherweise zeigen TGF- β 1 $-/-$ Mäuse keine offensichtlichen Entwicklungs-Defekte, was ganz im Gegensatz zu den beiden anderen TGF- β Knockouts steht. Bei dieser Feststellung darf jedoch die hohe Rate an embryonaler Sterblichkeit (ca. 50%) bei der Generierung von TGF- β 1 $-/-$ Mäusen nicht außer Acht gelassen werden. Hierbei sterben die Embryonen 10 Tage nach der Befruchtung aufgrund hämatopoetischer und vasculogenetischer Defekte des Dottersacks [117] [56] [120] [121] [122] [123].

TGF- β 2 spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung einer Vielzahl von Geweben und Organen, wie zum Beispiel dem Skelett, dem Herzen, der Lunge, der Augen und Ohren, sowie der Organe des Urogenitaltraktes. TGF- β 2 Knockout-Mäuse sterben vor oder direkt nach der Geburt an schweren Entwicklungsfehlern. Vermutlich ist v.a. das Auftreten von schweren Herzdefekten ausschlaggebend für die pränatale Sterblichkeit von 2/3 der β 2-Null-Mäuse. Eine hinzukommende Lungeninsuffizienz führt wahrscheinlich zum Sterben des verbleibenden Drittels nach der Geburt. Defekte bei der Skelettentwicklung betreffen v.a. die craniofaciale Chondrogenese, aber auch Anomalien der Gliedmaßen, Rippen und der Wirbelsäule sind häufig zu beobachten. Das Ausschalten eines einzigen Genortes, kann hier also sowohl axiale als auch appendikuläre Mißbildungen des Skelettes zur Folge haben. Die Art der Knochenmißbildungen gibt Hinweise darauf, daß TGF- β 2 v.a. für skeletale Induktion, Wachstum und Patterning wichtig ist [124].

Mäuse, die kein TGF- β 3 exprimieren sterben in der Regel ca. 20 h nach der Geburt und zeigen sehr konsistente phänotypische Merkmale. Eine zurückgebliebene Entwicklung des Lungensystems und defekte Palatogenese sind typisch. Im Gegensatz zu anderen Knockout-Mutanten mit offenem Gaumen, weisen TGF- β 3-/- Mäuse keine weiteren craniofacialen Abnormalitäten auf. TGF- β 3 spielt demnach eine essentielle Rolle bei der normalen Morphogenese des Gaumens und der Lunge [125] , 1995; [126].

Obwohl die TGF- β Knockouts sich phänotypisch teilweise gleichen, liegen den entsprechenden Auffälligkeiten dennoch unterschiedliche Ursachen und Mechanismen zu Grunde. Beispielsweise entwickeln sowohl TGF- β 2 als auch TGF- β 3 Knockout-Mäuse postnatale Defekte der zuführenden Luftwege der Lunge. Im Fall von TGF- β 3 resultiert dies aus morphogenetischen Defizienzen und Fehlern bei der Differenzierung der respiratorischen Epithelzellen, Phänomene, die in TGF- β 2 defizienten Lungen nicht auftreten [125] [124].

Das Merkmal eine offenen Palatums findet sich ebenfalls bei beiden Knockout-Typen, TGF- β 2-/- und TGF- β 3-/. Auch hier weisen die Entwicklungsprozesse, die zur Ausprägung des Merkmals führen, keine Ähnlichkeiten auf. In der Abwesenheit von TGF- β 2 können sich die Gaumen-Segel nicht aufrichten, in der TGF- β 3 Mutante hingegen schon, wobei hier eine Verbindung der Gaumen Segel aufgrund schlechter

Adhäsion der Epithelien nicht möglich ist. TGF- β 2-/- Gaumen sind immer extensiv betroffen, während TGF- β 3-/- Gaumen in ihrem Schweregrad variieren können [126] [124]. Daraus geht hervor, daß die Phänotypen der drei TGF- β Knockouts sehr distinkt sind und eine große Zahl von Funktionen beeinträchtigen, was aber nicht durch die anderen Mitglieder der TGF- β Genfamilie kompensiert werden kann.

Die Knockout-Phänotypen der beiden TGF- β Rezeptoren, T β RII und Alk 5, ähneln sich sehr. Es kommt ca. 10 – 10,5 Tage nach der Befruchtung zum Absterben der Embryonen aufgrund von vaskulogenetischen Defekten des Dottersacks, die zu starker Anämie im Embryo führen [52] [127]. Diese frühe embryonale Lethalität läßt keine Schlüsse hinsichtlich isoformspezifischer Wirkungsweise der TGF- β Isoformen zu. Es kann kein Aufschluß darüber gewonnen werden, ob ein vollständiges Ausschalten Smad-vermittelter TGF- β Antworten dem Ausschalten der TGF- β Isoformen gleich kommt.

A.I.2. Rezeptorvariabilität und Signalmodulation

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Gen-Knockouts der TGF- β Isoformen können zum Teil durch die relativ distinkten Expressionsmuster der Polypeptide während der Embryonalentwicklung erklärt werden [Heine, 1987 #139]. Außerdem muß beachtet werden, daß die Funktionen der TGF- β Isoformen immer von der jeweiligen Zelle, auf die sie wirken, abhängig sind. Extra- und intrazelluläre Vernetzungen und ‚cross-talks‘ beeinflussen die zelluläre Genantwort und somit phänotypische Ausprägungen in großem Maße.

Variabilität innerhalb eines Signalwegs, die zu vielfältiger Genexpression führt, kann durch Modulation der Rezeptorkomplexe oder durch Beeinflussung anderer signalweiterleitender Komponenten erreicht werden. Bei der Signalübertragung kann man sich vorstellen, daß ein aktivierter Smad Komplex im Nukleus mit einer Reihe von Partnerproteinen zusammentrifft, die spezifisch in einem bestimmten Zelltyp und unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden. Diese Partner bestimmen an welche DNA-Sequenz der Smad-Komplex binden wird, welche Co-Aktivatoren und – Repressoren rekrutiert werden, mit welchen anderen Transkriptionsfaktoren interagiert wird und in welchem zeitlichen Rahmen dies abläuft. Die Genantwort als

solches wird also durch die Kombination von Smad-Partnern und regulatorischen Proteinen, die in einer bestimmten Zelle zu gegebener Zeit vorhanden sind, bestimmt [91].

Jedoch muß auch bereits bei der Ligand-Rezeptor-Interaktion vorgegeben werden, welche Richtung der Signalweiterleitung eingeschlagen wird. Durch unterschiedliche Rezeptoren, Rezeptorkombinationen und -konstellationen, sowie durch verschiedene Bindungsmodi von Ligand-Rezeptor-Komplexen kann hier eine gewisse Bandbreite an Möglichkeiten der Signalweiterleitung geschaffen werden.

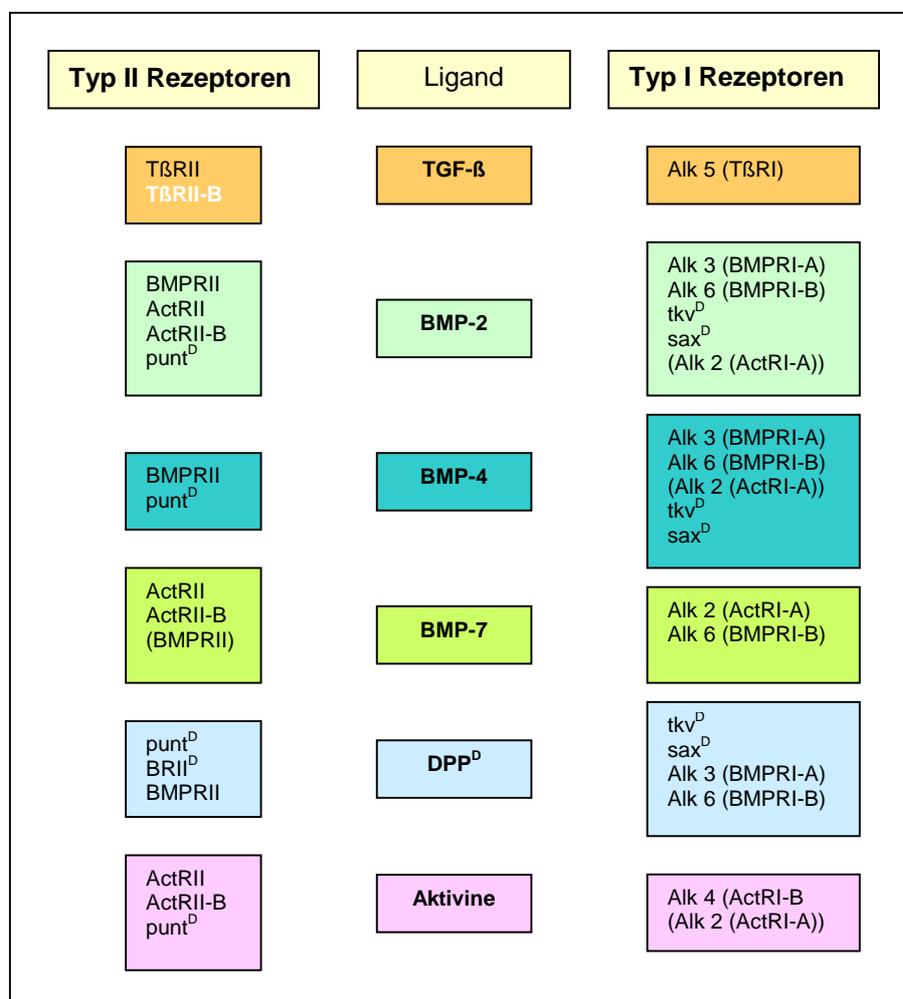


Abb.8. Mitglieder der TGF-β Superfamilie und ihre bindenden Rezeptoren. Der in dieser Arbeit beschriebene TGF-β Typ II-B Rezeptor ist bereits in die Grafik miteinbezogen und in weiß hervorgehoben [128]. Die mit ^(D) gekennzeichneten Proteine werden nur in Drosophila gefunden. Für eingeklammerte Rezeptoren konnte nur geringfügige Interaktion mit den entspr. Liganden beobachtet werden [16] [15] [129] [130] [131] [30] [132] [133] [134] [135] [136] [137] [138] [139] [140] [141] [142].

Im Fall der TGF- β Isoformen war bisher nur ein Rezeptorpaar zur Signalübertragung bekannt (T β RII und Alk5). Im Gegensatz dazu werden Activin Signale, sowie Nodal Signale durch den Typ II Rezeptor, ActRII sowie durch vier unterschiedliche Spleißvarianten des ActRII-B übertragen, und als Typ I Rezeptoren dienen Alk 2 und Alk 4 (ActRI-A und ActRI-B) [143] [144]. Für die Signalübertragung der BMP-Proteine stehen vier Typ II Rezeptoren, BMPRII (lange und kurze Form = SF und LF), ActRII und ActRII-B, sowie drei Typ I Rezeptoren, Alk 3, Alk 6 (BMPRI-A, BMPRI-B) und Alk 2 zu Verfügung [143] [130] [135] [133] [145] [142]. Auch das BMP-2 homologe Drosophila-Protein DPP hat neben einem Typ II Rezeptor (Punt) zwei verschiedene Typ I Rezeptoren, Thick veins (Tkv) und Saxophone (Sax) [138] [137] [140]. Weiterhin existieren heterogene Spleißvarianten des Typ II Rezeptors für AMH (anti-Müllerian-Hormone), AMHRII [146]. In Abb.8 sind einige dieser möglichen Ligand/Rezeptor-Kombinationen aufgeführt. Obwohl auch den eben genannten Mitgliedern der TGF- β Superfamilie nur eine relativ geringe Zahl signalübertragender Rezeptoren gegenüber steht (für über 15 BMP Proteine sind nur insgesamt 7 Rezeptoren bekannt), ist deren Rezeptor-Repertoire im Vergleich zu den TGF- β s erheblich größer (vgl. Abb.8.). Diese sehr eingeschränkte Rezeptorauswahl im Fall von TGF- β war Ausgangspunkt des in dieser Arbeit beschriebenen Projektes. Das Vorhandensein von TGF- β Rezeptorvarianten schien relativ wahrscheinlich, auch aufgrund des häufigen Auftretens von alternativen Spleißformen der Rezeptoren anderer Familienmitglieder (z.B. ActRII-B; BMPRII-SF, Tkv/Sax, AMHRII) [143] [147] [137]. Daher wurde mit Hilfe von RT-PCR versucht, Varianten des *t β rII* Gens aufzuspüren und somit die Existenz weiterer TGF- β Rezeptoren nachzuweisen.

A.I.3. Die TGF- β Typ I Rezeptoren: Alks (Activin receptor like kinases)

Da in den im Ergebnisteil des hier beschriebenen Projekts einige Versuche mit den verschiedenen Typ I Rezeptoren der TGF- β Familie durchgeführt wurden, soll an dieser Stelle genau auf die Gruppe der Typ I Ser/Thr-Kinasen eingegangen werden.

Typ I Rezeptor Kinasen werden durch Transphosphorylierung von den konstitutiv aktiven Typ II Rezeptoren aktiviert, agieren also ‚downstream‘ von diesen und sind demnach die eigentlichen Signal-weiterleitenden Rezeptoren. Variabilität und

Spezifität der intrazellulären Signale, die von den verschiedenen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie induziert werden, werden v.a. durch die verschiedenen Typ I Rezeptoren bestimmt. Hierbei wurde der sog. ‚L45 Loop‘, der in den Kinase-Domänen der Typ I Rezeptoren lokalisiert ist, als die Region identifiziert, die die Spezifität der Signalweiterleitung vermittelt [24] [148].

Acht verschiedene Typ I Rezeptoren, die auch Alks (Activin receptor like kinases) genannt werden, wurden bisher für die TGF- β Superfamilie in Vertebraten isoliert [149] [27] [16] [136] [150] [151]. Aufgrund von Ähnlichkeiten innerhalb der Kinase-Domänen und/oder der Signalübertragung können diese Typ I Rezeptoren in drei Gruppen eingeteilt werden. Hierbei bilden Alk 5, Alk 4 und Alk 7 eine Gruppe, Alk 3 und Alk 6 eine weitere, die dritte Gruppe besteht aus Alk 1 und Alk 2 [152].

Alk 1 bindet TGF- β 1 und Aktivine in Anwesenheit der jeweiligen Typ II Rezeptoren und ist in der Lage in Endothelzellen TGF- β Signale via Smad1/5 zu übertragen. Diesem Typ I Rezeptor wird aufgrund der starken Expression in Blutgefäßen eine Bedeutung bei deren Formation zugesprochen. Außerdem wurden Mutationen im *alk 1* Gen mit Typ II HHT (hereditary hemorrhagic telangiectasia), einer autosomal dominant vererbten Krankheit mit multisystemischer Dysplasie der Blutgefäße, in Verbindung gebracht [153].

Die beiden Typ I Rezeptoren **Alk 2** und **Alk 4** werden aufgrund ihrer Fähigkeit, in Kombination mit den Aktivin Typ II Rezeptoren an Aktivin binden zu können, auch als ActRI-A und ActRI-B bezeichnet. Alk 2 interagiert in Anwesenheit von BMPRII auch mit BMP-2, BMP-4 und präferenziell mit BMP-7, und kann daher als ein weiterer BMP Typ I Rezeptor angesehen werden [154]. Auf die Transduktion von BMP-artigen Signalen mittels Alk 2 weist die Induktion ventralisierender Marker-Gene nach Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von Alk 2 hin [155] [156] [157]. Weiterhin konnte eine Alk 2 vermittelte Phosphorylierung von Smad 1/5/8 nachgewiesen werden, was ebenfalls für die ‚BMP-Orientierung‘ dieses Rezeptors spricht [158] [154]. Alk 2 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Signalen des Anti-Müllerian-Hormons (AMH oder MIS). Die Expression von Alk 2 in AMH Zielgeweben, sowie die Erhöhung der AMH Signalantwort durch Alk 2 beweist, daß dieser Ligand über Alk 2 und den BMP Signalübertragungsweg wirkt [159]. Alk 2 unterscheidet sich somit deutlich von Alk 4, der neben Aktivin auch Nodal Signale vermittelt und in beiden Fällen den Smad2/3 Signalweg einschlägt [160] [144].

Alk 5 ist Typ I Rezeptor für die drei TGF- β Isoformen, wird auch als T β RI bezeichnet und leitet Signale via Smad2/3 weiter [16]. Die klassischen Typ I Rezeptoren der BMPs sind **Alk 3** und **Alk 6**, die dementsprechend als BMPRI-A und BMPRI-B bezeichnet werden. Eine Interaktionen mit dem BMPRII ist ebenso möglich wie eine Komplexbildung mit den Aktivin Typ II Rezeptoren [133] [143] [161] [135] Das BMP Signal wird über Alk 3 und Alk 6 auf den Smad1/5/8 Signalweg übertragen.

Die Signalübertragungsfähigkeiten von **Alk 7**, einem sog. ‚orphan‘ Typ I Rezeptor, der v.a. im zentralen Nervensystem exprimiert wird, sind unbekannt [150]. Vermutlich spielt dieser Typ I Rezeptor bei der Proliferation und Morphogenese von Neuronen eine Rolle [162]. Alk 7 ist zwar in der Lage Komplexe mit den TGF- β und Aktivin Typ II Rezeptoren zu bilden, eine Ligandenbindung ist jedoch nicht nachweisbar [163]. In konstitutiv aktiver Form aktiviert Alk 7 Smad2/3, und induziert die Expression TGF- β responsiver Gene, wie Smad7, c-fos und PAI-1. Außerdem kann neben einem antiproliferativen Effekt eine Morphologieveränderung der Zellen festgestellt werden [162] [164]. Intrazellulär bestehen große Homologien zu Alk 5 und Alk 4 (~78%), extrazellulär unterscheidet sich Alk 7 jedoch stark von den anderen Typ I Rezeptoren [163].

Ein weiteres Mitglied der Alk-Gruppe, **z-Alk 8**, wurde bisher nur im Zebrafisch gefunden. Die Ser/Thr Kinase Domäne dieses Rezeptors ist den anderen Alks sehr ähnlich, wobei sich die extrazelluläre Domäne stark unterscheidet und daher auf andere Ligandenbindungsaktivitäten schließen läßt [151].

In Drosophila sind Thick veins (**tkv**) und Saxophone (**sax**) als DPP Typ I Rezeptoren bekannt. Tkv ähnelt am meisten Alk 3, während Sax Alk 1 und Alk 2 etwas näher steht [165]. **ATR-1** ist ein Drosophila Typ I Rezeptor, welcher Alk 5 und Alk 4 ähnelt. ATR-1 kann humanes Aktivin binden, aber der eigentliche Ligand ist noch nicht bekannt [166].

Aufgrund der Vielzahl und Vielseitigkeit der Typ I Rezeptoren der TGF- β Superfamilie wird durch unterschiedliches Zusammenspiel mit Typ II Rezeptoren und/oder Liganden eine große Signalvariabilität produziert. Im Hinblick auf den hier beschriebenen ‚neuen‘ TGF- β Rezeptor ist dieser Gesichtspunkt von großem Interesse.

A.I.4. Bedeutung der Typ III Rezeptoren für die TGF- β Signalübertragung

A.I.4.1. Typ III Rezeptoren für die TGF- β Bindung: Betaglykan und Endoglin

Die ursprüngliche Suche nach TGF- β Bindeproteinen führte zur Identifizierung unterschiedlicher Rezeptorklassen, die bezüglich ihres Molekulargewichts in Typ I, Typ II und Typ III Rezeptoren eingeteilt wurden [167]. Die Gruppe der Typ III Rezeptoren bilden Betaglykan und Endoglin, wobei in der Literatur nur ersteres als TGF- β Typ III Rezeptor, T β RIII, bezeichnet wird [168] [169] [170]. Beide Proteine besitzen keine Funktion bei der Signalübertragung, sind aber in der Lage die Ligandenbindung an die Typ I und II Rezeptoren zu regulieren. Betaglykan und Endoglin zeigen eine hohe Sequenzhomologie ihrer kurzen, serin-reichen, zytolasmatischen Domänen [171] [172].

Betaglykan (T β RIII) ist ein membranständiges Proteoglykan, das TGF- β über sein Core-Protein binden kann. Die Glukosaminglykanketten des Betaglykans sind eine Mischung aus Heparansulfat und Chondroitinsulfat und für die Zelloberflächen-Expression sowie die TGF- β Bindung unbedeutend [173]. Die zytolasmatische Domäne des Rezeptors ist kurz (43 AS), beinhaltet kein Signalübertragungsmotiv und über die eigentliche Funktion ist relativ wenig bekannt [168] [171]. Erst kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, daß die zytolasmatische Domäne des T β RIII spezifisch mit dem autophosphorylierten Typ II Rezeptor interagiert. Es kommt zu einer Phosphorylierung des T β RIII durch den Typ II Rezeptor, und die daraus resultierende Dissoziation des T β RIII vom T β RII/T β RI Komplex ist unerlässlich für die TGF- β Signalübertragung. Es wurde auch offensichtlich, daß die zytolasmatische Domäne des T β RIII sowohl speziell bei der Bindung von TGF- β 2 an T β RIII und T β RII, als auch bei der TGF- β 2 Signalübertragung eine essentielle Rolle spielt [174]. Aufgrund von hochaffinen Bindungsstellen für TGF- β im extrazellulären Bereich des Proteins können alle drei TGF- β Isoformen mit Betaglykan interagieren, wodurch ein Binden der TGF- β s an den Typ II Rezeptor ermöglicht bzw. erleichtert wird. Dies ist eine Eigenschaft, die speziell für TGF- β 2 von Bedeutung ist, da es dadurch in seiner Wirkungseffizienz den anderen Isoformen angepaßt wird (vgl. A.I.4.2.). Die Interaktion zwischen Rezeptoren und Ligand kommt durch die Bildung eines ternären

Komplexes aus T β RII/Betaglykan/TGF- β zustande (s. Abb.9.) [175] [176] [177]. T β RIII ist also in der Lage die Liganden an der Zelloberfläche aufzukonzentrieren und den signalübertragenden Rezeptoren zu präsentieren. Zusätzlich spricht die Fähigkeit des Betaglykans die drei TGF- β Isoformen in ihrer Potenz aneinander anzugleichen für seine Stabilisierungsfunktion. Hierbei werden die Liganden in einer Konformation erhalten, die möglicherweise für eine Rezeptorbindung optimal ist [152]. Eine antagonistische Funktion von T β RIII zeigt sich in einer Reihe von Zelllinien, die neben Membran-verankertem auch sog. lösliches Betaglykan exprimieren und ins Medium abgeben. Diese lösliche Form des Betaglykans bindet TGF- β noch effizienter, ist somit in der Lage dies bereits im Medium zu binden und somit eine Interaktion mit den Membran-Rezeptoren zu verhindern [178] [179].

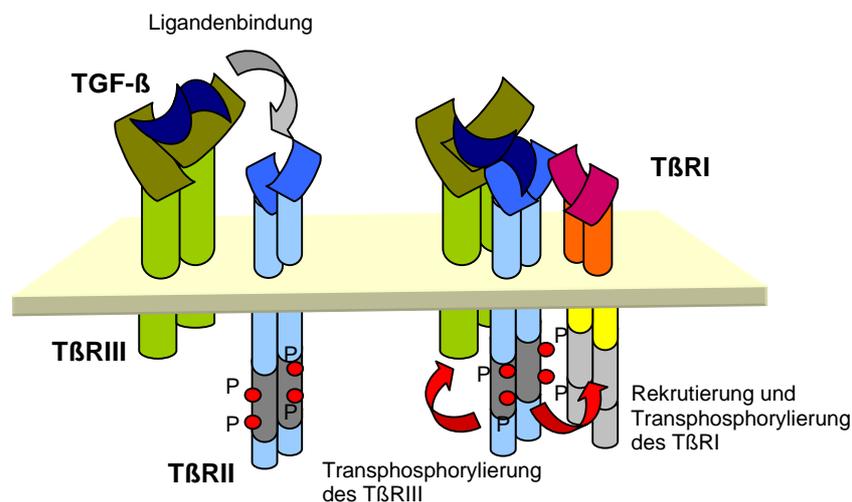


Abb.9. Ligandenbindung mit Hilfe von T β RIII. T β RIII ist in der Lage TGF- β Liganden hochaffin zu binden und diese für eine Bindung an T β RII zu präsentieren. Es bildet sich zunächst ein ternärer Komplex aus. Nach Rekrutierung des Typ I Rezeptors kommt es zu Transphosphorylierungs-Reaktionen an T β RI und T β RIII. Die Phosphorylierung des T β RIII hat dessen Dissoziation vom Rezeptor-Komplex zur Folge [172].

Endoglin ist ein homodimeres transmembranes Glykoprotein, das in großen Mengen in Endothelzellen und in geringeren Mengen in Monozyten und anderen Zelltypen exprimiert wird. Endoglin bindet TGF- β 1 und TGF- β 3 mit hoher Affinität, jedoch kein TGF- β 2. Außerdem interagiert es mit Activin A, BMP-2 und BMP-7, benötigt aber in jedem Fall passende Typ I und Typ II Rezeptoren für eine effiziente Assoziation [180]. Die Rolle des Endoglins bei der Modulation der TGF- β Signalübertragung unterscheidet sich von der des Betaglykans und ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Endoglin ist im Allgemeinen v.a. bei der Angiogenese von Bedeutung und stellt einen potenten Marker für Neovaskularisierung dar [181]. Ectopische Expression von Endoglin in Monozyten führt zu einer Aufhebung der TGF- β vermittelten Wachstumsinhibierung und zu Verringerung der Fibronectin-Synthese [182]. Weiterhin bilden Mutationen in den Genen für Endoglin und Alk 1, einem putativen TGF- β Typ I Rezeptor in Endothelzellen, die Basis einer vaskulären Krankheit (hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT)). Dies weist auf ein gemeinsames Agieren von Endoglin und Alk 1 im gleichen Signaltransduktionweg hin, wobei Endoglin die Ligandenbindung ermöglichen könnte [183] [184].

A.I.4.2. Bedeutung des T β RIII für die TGF- β 2 Bindung

Nicht nur Bindung eines Liganden an unterschiedliche Rezeptoren führt zu Variabilität des Signals (vgl. A.I.2.), sondern auch die Konstellation des Rezeptorkomplexes, die Art der Bindung und damit der Rezeptoraktivierung. Auch ein Mitwirken von Adapterproteinen und Co-Rezeptoren, wie z.B. T β RIII, kann für die Qualität der Ligand/Rezeptor-Interaktion entscheidend sein.

Diesbezügliche Unterschiede zeigen sich beispielsweise anhand der verschiedenen Affinitäten des T β RII gegenüber den TGF Isoformen, woraus resultiert, daß TGF- β 1 und - β 3, nicht jedoch TGF- β 2 vom Typ II Rezeptor gebunden werden [185] [186], [187] [31]. T β RIII ist daher aufgrund seiner Fähigkeiten TGF- β hochaffin zu binden, mit T β RII zu oligomerisieren und gleichzeitig den Liganden für eine Bindung an den Signalkomplex zu präsentieren, v.a. für eine TGF- β 2 Bindung an T β RII essentiell, was bereits mehrfach bestätigt wurde [176] [188] [189] [190]. Durch das Vorhandensein von T β RIII wird eine TGF- β 2 Antwort, die in ihrer Potenz mit TGF- β 1 vergleichbar ist, ermöglicht. Dennoch kommt auch im Fall von TGF- β 1 und - β 3 eine Interaktion mit T β RIII zustande, wenn dieser Rezeptor in einer Zelle präsent ist [176] [177]. Es bleibt offen, inwieweit die unterschiedlichen Bindungsmodi von TGF- β 1/- β 3 und TGF- β 2 die Entstehung verschiedenartiger zellulärer Antworten beeinflussen. Vermutet wird, daß Faktoren, wie Affinitäten und Präsenz des T β RIII, auf die Komposition und Aktivität des T β RII-T β RI Komplexes verändernd wirken, und somit die Signalübertragung spezifiziert wird.

A.I.5. Isolierung des TGF- β Typ II-B Rezeptors

In der vorliegenden Arbeit wird ein zusätzlicher TGF- β Typ II Rezeptor, T β RII-B, beschrieben, der mit Hilfe von RT-PCR aus Hep3B Zellen isoliert wurde und somit das Repertoire an verfügbaren TGF- β Rezeptoren vergrößert. Hierbei handelt es sich um eine alternativ gespleißte Variante des T β RII, die eine Insertion von 26 Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Polypeptids aufweist.

Die Isolierung von T β RII-B wurde bereits vor einigen Jahren von drei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben:

Nikawa isolierte T β RII-B aus einer humanen cDNA Bank unter Verwendung einer *Saccharomyces cerevisiae* Mutante. Diese Hefemutante zeigt einen Expressionsdefekt des Inositol-1-Phosphat Synthase Gens und benötigt demnach exogenes Inositol um wachsen zu können. Der cDNA-Screen sollte dazu beitragen, Mechanismen, die einer Inositol-regulierten Genexpression zu Grunde liegen, besser verstehen zu können. Außerdem sollte die Frage nach der Existenz vergleichbarer Signaltransduktionsmechanismen in Hefe- und Säugerzellen beantwortet werden. In Inositol-freiem Medium wurden also Klone selektioniert, die cDNAs von Faktoren enthielten, welche eine Expression der Inositol-1-Phosphat Synthase ermöglichten und somit den eigentlichen Defekt suppressierten. Zu den ‚Suppressoren‘ gehörte neben T β RII-B, die Protein-Phosphatase 2A sowie ein Protein der 14-3-3 Proteinfamilie. Diese Proteine sind als Regulatoren von Signaltransduktionswegen und Protein-Kinasen bekannt. Um die Rolle von T β RII-B in diesem System einschätzen zu können, wurden eine Kinase-Mutante, sowie trunkierte Rezeptorkonstrukte hergestellt. Nachdem weder ein Kinasedefekt noch ein Oligomerisierungsdefekt des T β RII-B negativ auf das Wachstum der Hefemutante wirkte, wurde ein transdominanter Effekt von T β RII-B angenommen. Weiterhin wurde ein Mitwirken der Protein-Phosphatase 2A und des 14-3-3 Proteins bei der TGF- β Signaltransduktion diskutiert [191].

Suzuki et al., konnten den murinen TGF- β Typ II-B Rezeptor aus einer Gehirn cDNA-Bank gewinnen. Auch der murine T β RII-B unterscheidet sich vom T β RII durch eine Insertion von 25 AS an homologer Stelle. Die Gruppe machte Untersuchungen zum Expressionsmuster beider Typ II Rezeptoren sowie zur Ligandenbindung [192].

Hirai und Fujita isolierten die T β RII-B cDNA aus humanen vaskulären Endothelzellen mittels RT-PCR und führten einige wenige Experimente zur

Untersuchung von Ligandenbindung und Signalübertragungseigenschaften von T β RII-B durch [129]. Einige Daten und Hypothesen konnten in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt und fortgeführt werden, riefen jedoch auch zahlreiche Widersprüche hervor, auf die im Diskussionsteil noch detailliert eingegangen wird.

Die Wahrscheinlichkeit, daß dieser 'neue' Rezeptor die TGF- β Isoformen im Vergleich zu T β RII mit anderer Präferenz bindet und möglicherweise auch die TGF- β vermittelten Signale anders überträgt, ist hoch. Derartige Vermutungen wurden auch in den oben genannten Veröffentlichungen angestellt. Das Thema wurde jedoch in der Vergangenheit ungenügend wahrgenommen und bearbeitet, erzielte Resultate wurden falsch interpretiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der TGF- β Typ II-B Rezeptor nun genauer charakterisiert und dessen Rolle neu definiert. Es konnte gezeigt werden, daß T β RII-B, anders als T β RII, den Liganden TGF- β 2 direkt, sprich ohne Mithilfe eines adaptierenden Rezeptors, wie z.B. T β RIII, binden kann. T β RII-B zeigt ein restriktiveres Expressionsmuster, findet sich z.B. vermehrt in Knochen-verwandten Zellen, also in einem Gewebe, in welchem die TGF- β 2 Isoform die vorherrschende ist. Die eingeschränkte Präsenz und die im Vergleich zu T β RII höhere Affinität gegenüber TGF- β 2 weisen auf eine spezielle Bedeutung des T β RII-B für diese TGF- β Isoform hin. Möglicherweise ist ein über T β RII-B vermitteltes TGF- β 2 Signal spezifisch und führt zu Effekten, die sich von anderweitig produzierten TGF- β 2 Antworten unterscheiden.

A.II. Ergebnisse

Obwohl die drei TGF- β Isoformen, TGF- β 1, -2 und -3, äußerst homologe Proteine sind, stößt man bei der Betrachtung ihrer in vivo Funktionen auf vielerlei Differenzen. Die Spezifität der einzelnen TGF- β Isoformen wird vermutlich durch unterschiedliche Rezeptor-Ligand-Interaktionen und/oder durch die Verwendung alternativer Signalrezeptoren oder Signalwege hervorgerufen. Dies ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Im Folgenden wird eine Variante des TGF- β Typ II Rezeptors, T β RII-B, beschrieben und funktional charakterisiert. Dieser alternativ gespleißte Typ II Rezeptor ermöglicht im Vergleich zu T β RII eine andere Art der TGF- β 2 Bindung an den Rezeptorkomplex und spielt daher eine wichtige Rolle bei der TGF- β Isoform-spezifischen Signalübertragung.

A.II.1. Identifizierung einer alternativ gespleißten Variante des TGF- β Typ II Rezeptors – T β RII-B

Aufgrund der geringen strukturellen Unterschiede der drei TGF- β Isoformen wurde von deren Fähigkeit, an potentiell ähnliche Rezeptoren zu binden, ausgegangen. Daher wurden RT-PCR Experimente unter Verwendung von Primern, die die vermutete Ligandenbindungsstelle des TGF- β Typ II Rezeptors umspannen, durchgeführt. Nach Amplifikation der cDNA der humanen Hepatoma Zelllinie Hep3B mit den Primern P1 und P5 (Sequenz s. Anhang) wurde neben dem zu erwartenden 458 bp großen PCR-Produkt für T β RII eine zusätzliche Bande im Agarose-Gel sichtbar. Diese Doppelbande trat bei Verwendung sowohl von gesamt RNA als auch von mRNA auf, sowie bei RT-PCR an RNA aus Primärzellen (humane periphere Blut-Lymphozyten, PBL), ein wichtiges Kriterium um einen Zellkultur-Effekt ausschließen zu können (s. Abb.10).

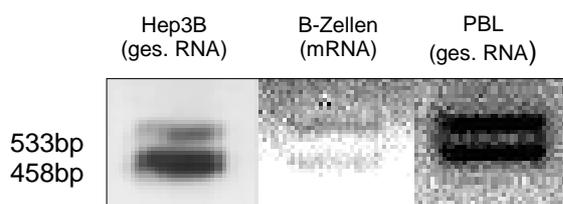


Abb.10 RT-PCR-Fragmente aus unterschiedlichen RNA-Präparationen und Zellarten. Die PCR wurde mit der Primerkombination P1/P5 durchgeführt. Es wurde RNA aus Hep3B Zellen, aus humanen primären B-Zellen und humanen peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) verwendet.

Das größere der beiden PCR-Produkte der Hep3B cDNA wurde isoliert, aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, daß es sich bei diesem PCR-Produkt um ein Fragment des T β RII-B handelt, einer alternativ gespleißten Variante des TGF- β Typ II Rezeptors [191] [129]. Alternatives Spleißen führt hierbei zu einer Insertion von 75 bp zwischen den Nukleotiden 94 und 95 und somit zum Austausch von Valin 32 gegen eine Sequenz von 26 Aminosäuren im N-terminalen Bereich des reifen Rezeptors. Diese Insert-Sequenz enthält zwei Cysteinreste sowie eine potentielle N-Glykosylierungsstelle. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der N-Termini der beiden Rezeptoren, T β RII und T β RII-B, sind in Abb.11 vergleichend dargestellt.

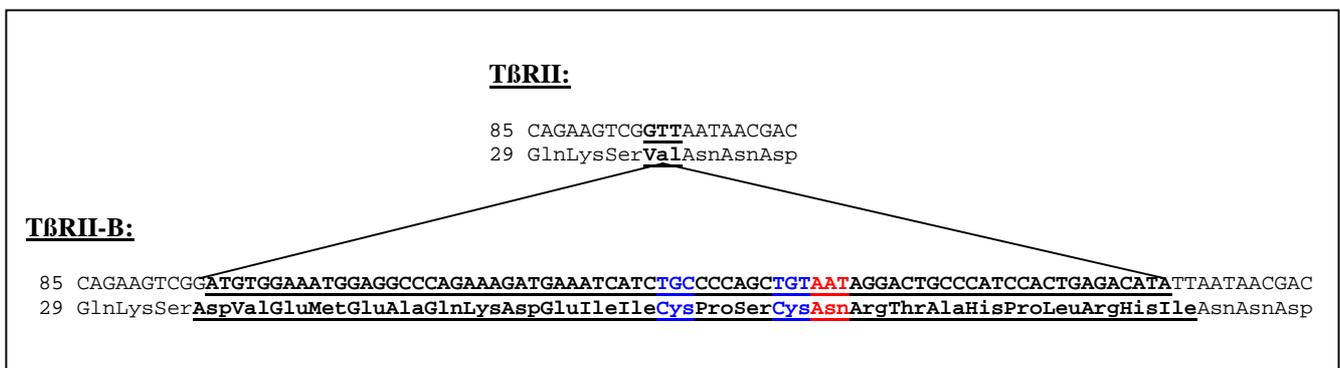


Abb.11 T β RII-B ist eine alternativ gespleißte Form von T β RII. Die Aminosäuresequenz des T β RII-B enthält im Vergleich zu T β RII eine Insertion von 26 AS, wodurch Valin32 des T β RII ersetzt wird. Die Insertsequenz des T β RII-B ist unterstrichen, die enthaltenen Cysteinreste und die potentielle N-Glykosylierungsstelle sind markiert.

A.II.2. Isolation der T β RII-B cDNA und Herstellung von T β RII-B-Expressionsplasmiden

Um ein T β RII-B-Expressionskonstrukt herzustellen wurde RT-PCR an Hep3B cDNA mit der Primerkombination HH-P1/P10 (Sequenzen s. Anhang) durchgeführt. Durch die Verwendung von HH-P1 wurde eine Hind III Schnittstelle vor dem Startcodon der T β RII-B cDNA eingeführt. Das PCR-Produkt wurde über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, wodurch es möglich war die T β RII-B cDNA von der T β RII cDNA zu trennen. Nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen Hind III und Bgl II konnte das so erhaltene T β RII-B-Fragment in das analog geschnittenen T β RII-pcDNA1-

Expressionskonstrukt einligiert werden. Die Klonierungsstrategie für das T β RII-B Konstrukt ist in Abb.12 schematisch dargestellt.

Für weiterführende Versuche war es wichtig Epitope (HA, myc, flag) zur Antikörpererkennung an den Rezeptor N- bzw. C-terminal anzufügen. Diese spezifischen DNA-Sequenzen wurden durch rekombinante PCR unter Einhaltung des Leserasters eingeführt. Zur Durchführung mußten Primer (sense und antisense) kreiert werden, welche neben der Rezeptor-cDNA-Sequenz auch die Nt-Sequenz des einzuführenden Epitops enthalten. Die so hergestellten T β RII-B-Fragmente wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Korrelierende ‚wt-Fragmente‘ des T β RII-B Konstrukts in pcDNA1 konnten anschließend durch die ‚Epitop-haltigen‘ Fragmente ausgetauscht werden. Die Richtigkeit der Rezeptorkonstrukte wurde durch Sequenzierung verifiziert. N-terminal wurden die Epitope, HA und myc, direkt nach der Signalpeptid-Spaltstelle, nach AS 26, eingeführt, C-terminal wurde ein flag-Epitop vor das eigentliche Stopcodon gesetzt. Die Lokalisation der Epitope ist in Abb.12 angedeutet.

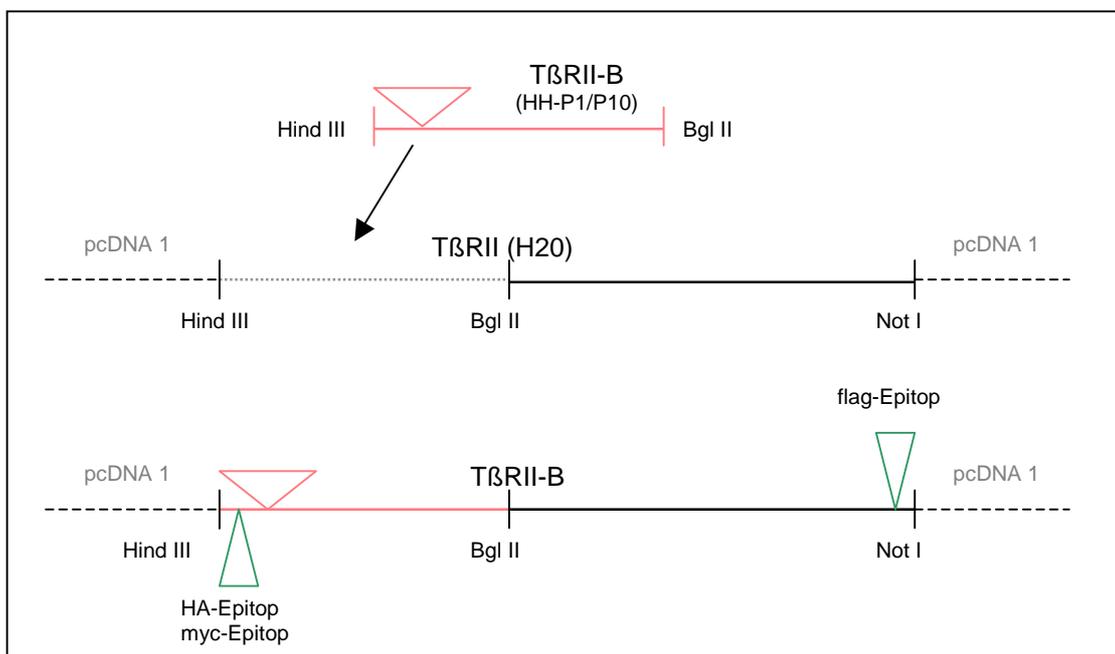


Abb.12 Klonierungsstrategie von T β RII-B in pcDNA1. Die Lokalisation der später eingefügten Epitope ist angegeben.

A.II.3. Aufklärung der Exon-Intron Struktur des *tβrll-b* Gens

Informationen über genaue Größe und Sequenz der *tβrll*-Gen-Introns liegen laut Genom Datenbanken (NCBI) nur unvollständig vor. Eindeutig ist jedoch die Lokalisation von Intron 1 des *tβrll* Gens exakt an der gleichen Stelle der Insertion im TβRII-B Polypeptid. Es kann daher postuliert werden, daß das TβRII-B-Insert einen Teil dieser Intron 1 Sequenz repräsentiert und durch alternatives Spleißen zu einem zusätzlichen Exon im *tβrll-b* Gen wird. Um dies zu verifizieren und somit die Exon-Intron Struktur des *tβrll-b* Gens genauer zu analysieren wurde PCR an genomischer DNA aus humanem Plazenta-Gewebe durchgeführt. Hierbei wurden Insert-spezifische Primer (Pins und Prev; Sequenz s. Anhang) in Kombination mit Primern, die Sequenzen knapp außerhalb der Insertregion umspannen (P0 und P3; s. Anhang), verwendet. Für die PCR-Reaktionen wurden jeweils 0,5 ng genomische DNA eingesetzt. Das Ergebnis dieser genomischen PCR ist in Abb.4a dargestellt, die verwendeten Primerkombinationen sind angegeben.

Das PCR-Produkt P0/Prev hat eine Größe von ca. 710 bp (Abb.13, Spalte 1), die Kombination der Primer Pins/P3 ergibt ein ca. 650 bp großes Fragment (Abb.13, Spalte 2). Folgerichtig wird unter Verwendung der beiden Insert-umspannenden Primer P0/P3 ein Fragment mit einer Größe von ca. 1360 bp amplifiziert, das dem vollständigen Intron 1 in etwa entsprechen sollte (Abb.13, Spalte 3).

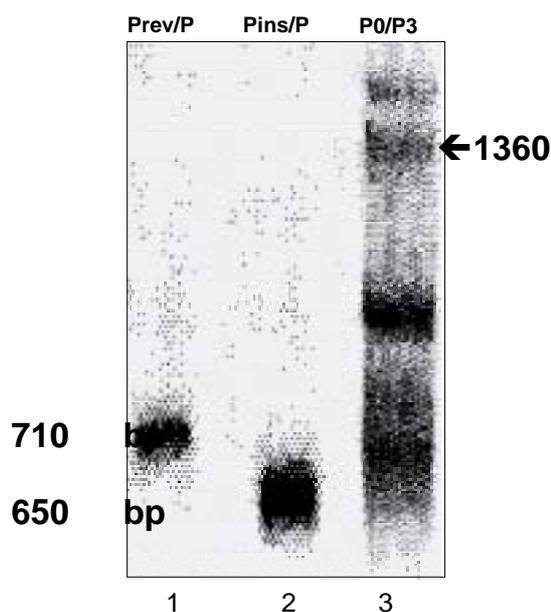


Abb.13 Agarose-Gel mit Produkten aus genomischer PCR. In Spalten 1 und 2 wurden insert-spezifische Primer mit Primern außerhalb dieser Sequenz kombiniert. In Spalte 3 wurden Insert-umspannende Primer verwendet. Die Vielzahl unspezifischer Banden in Spalte 3 ist Folge von nicht optimal gewählten PCR-Bedingungen.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es möglich das T β RII-B-Insert als ein zusätzliches Exon, Exon 1A, innerhalb von Intron 1 des *t β rII-b* Gens zu identifizieren und lokalisieren. Abb.14 zeigt eine schematische Darstellung des alternativen Spleißens im *t β rII* Intron 1, was zu einem zusätzlichen Exon (Exon 1 = Insert) im *t β rII-b* Gen führt.

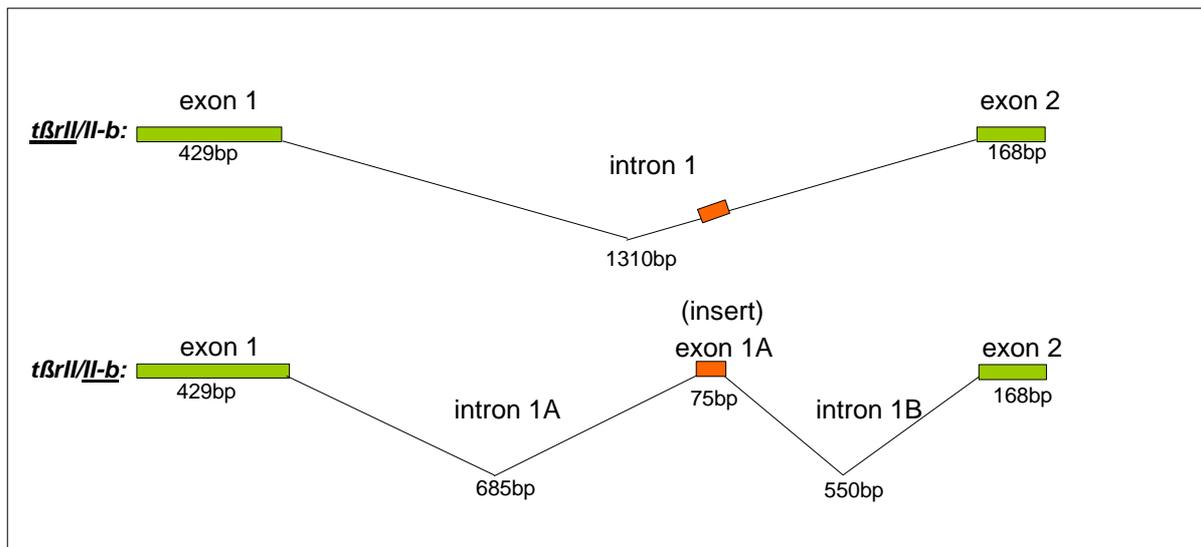


Abb.14 Schematische Darstellung der Exon-Intron Struktur der *t β rII/t β rII-b* Gene.

A.II.4. Studien zum isoformspezifischen Bindungsverhalten von T β RII-B

Um die Bindung der verschiedenen TGF- β Isoformen, TGF- β 1, - β 2, - β 3, an den TGF- β Typ II-B Rezeptor zu untersuchen wurden Bindungs- und Crosslinking-Experimente mit radioaktiv markiertem Liganden durchgeführt. Hierfür wurden die drei verschiedenen TGF- β Isoformen mit [125 I] markiert und COS-7 Zellen entweder mit T β RII oder mit T β RII-B cDNA unter Verwendung der DEAE-Dextran Methode transient transfiziert. Nach Inkubation der transfizierten Zellen mit den radioaktiv markierten TGF- β Isoformen und anschließender chemischer Quervernetzung, wurden die Rezeptoren aus den Zellysaten immunpräzipitiert. Es wurde hierfür das α CRII Antiserum verwendet, welches ein Peptid am C-terminalen Ende beider Rezeptortypen erkennt (s. Material und Methoden IV.2.7.). Die Immunpräzipitate wurden über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und die getrockneten Gele für mehrere Tage auf einem Phosphoimmager exponiert. Die erhaltenen radioaktiven Signale sind in Abb.15 dargestellt und entsprechen einem Rezeptor-Monomer mit

gebundenem Liganden-Monomer. Der aufgrund des T β RII-B-Inserts vorhandene Größenunterschied zwischen den beiden Rezeptortypen wird durch den leichten ‚Shift‘ des T β RII-B-Signals offensichtlich.

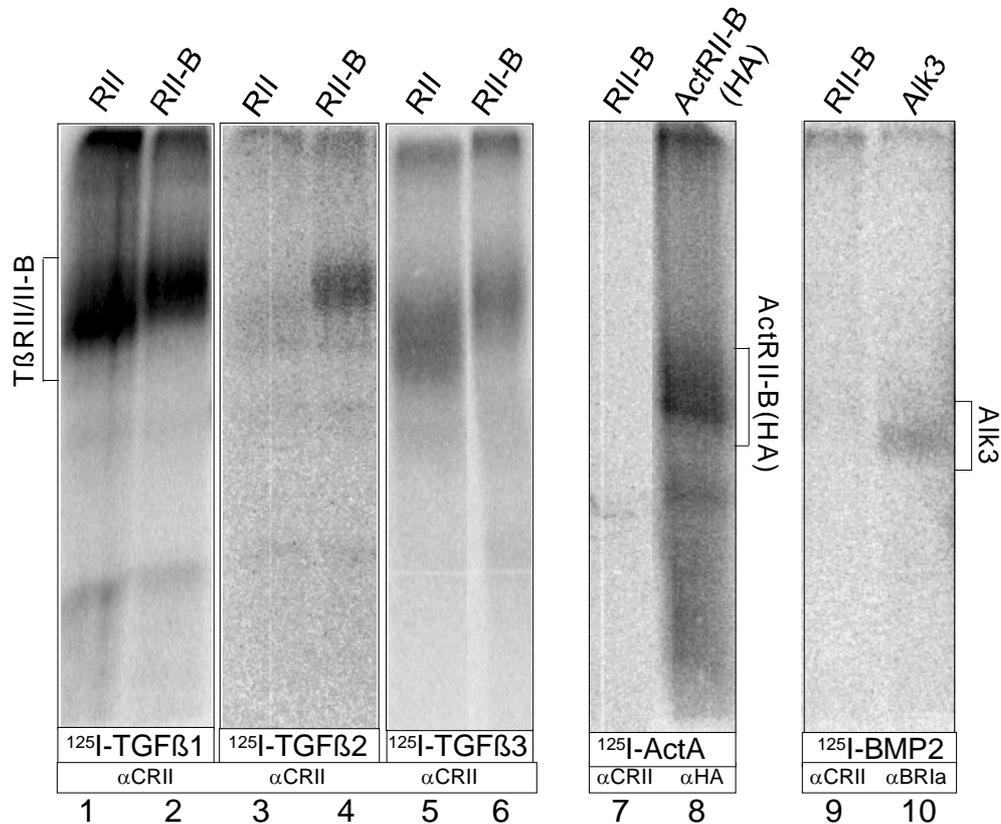


Abb.15 Alle drei TGF- β Isoformen binden an T β RII-B. Im Gegensatz zu T β RII bindet T β RII-B einzeln exprimiert die TGF- β 2 Isoform (Spalten 3 und 4). COS-7 wurden mit den aufgeführten Rezeptor cDNAs transfiziert. Das Bindungsexperiment wurde mit [125 I] markierten TGF- β Isoformen, BMP-2 sowie Activin A durchgeführt. Für die Immunpräzipitation der TGF- β Rezeptoren wurde α CRII verwendet, im Fall von ActRII-B(HA) wurde der α HA Antikörper (vgl. IV.2.7.) eingesetzt, zur Präzipitation von Alk3, α BR1a, ein Rezeptor-spezifisches Antiserum (vgl. IV.2.7.).

Beide Rezeptorformen binden die TGF- β Isoformen TGF- β 1 und TGF- β 3 in gleicher Weise (Abb.15, Spalten 1, 2, 5 und 6). TGF- β 2 kann jedoch von T β RII alleine nicht gebunden werden. Im Gegensatz dazu ist T β RII-B in der Lage mit dieser Isoform zu interagieren (Abb.15, Spalten 3 und 4), was auf unterschiedliche Bindungseigenschaften von TGF- β 2 schließen lässt. Ob eine generell hohe Affinität von T β RII-B auch gegenüber anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie, wie z.B. BMP-2 und Activin A, besteht, wurde auf die gleiche experimentelle Art bestimmt. Hierfür wurden T β RII-B transfizierte COS-7 Zellen mit [125 I]-markiertem BMP-2 bzw.

[¹²⁵I]-Activin A behandelt. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die mit den für diese Liganden entsprechenden Bindungsrezeptoren, Activin Typ II-B Rezeptor (ActRII-B) und BMP Typ IA Rezeptor (Alk3), transfiziert wurden. Abb.15 zeigt, daß sowohl jodiertes Activin A als auch BMP-2 an ihre hochaffinen Rezeptoren binden (Abb.15, Spalten 8 und 10), jedoch nicht an T β RII-B (Abb.15, Spalten 7 und 9).

A.II.5. Studien zur Bildung von oligomeren Komplexen mit T β RII-B

Die Bildung heterooligomerer Komplexe der TGF- β Rezeptoren nach Ligandenzugabe wurde bereits vielfach beschrieben [15] [22] [193] [194] [195]. Unter Verwendung der Bindungs- und Crosslinking-Methode konnte die Fähigkeit des TGF- β Typ II-B Rezeptors mit anderen bekannten TGF- β Rezeptoren Komplexe zu bilden effizient untersucht werden.

A.II.5.1. Interaktion des T β RII-B mit dem TGF- β Typ I Rezeptor (T β RI)

COS-7 Zellen wurden hierfür transient mit verschiedenen Rezeptorkombinationen transfiziert und mit den radioaktiv markierten TGF- β Isoformen inkubiert. In den Immunpräzipitationen wurde wiederum das α CRII Antiserum verwendet. In Abb.16A sind die Komplex-Formationen aus T β RII bzw. T β RII-B und dem TGF- β Typ I Rezeptor (T β RI) dargestellt. Die im Gel höher laufenden radioaktiven Signale entsprechen den Typ II Rezeptoren, die tiefer laufenden Banden, dem Typ I Rezeptor. Das Auftreten radioaktiver Signale beider Rezeptortypen (T β RII/II-B und T β RI) beweist eine ligandeninduzierte Komplexbildung der Rezeptoren. Aus Spuren 2, 4 und 6 ist zu lesen, daß T β RII-B mit T β RI in Anwesenheit aller drei TGF- β Isoformen interagiert. Das gleiche trifft für T β RII zu (Abb.16A, Spalten 1, 3 und 5), eine Feststellung, die bereits vielfach bewiesen wurde [15] [167].

A.II.5.2. Interaktion des T β RII-B mit dem TGF- β Typ III Rezeptor (T β RIII)

Versuch mit transient transfizierten COS-7 Zellen

Erkenntnisse zur Komplexbildung zwischen Typ II und Typ III Rezeptoren gehen aus Abb.16B hervor. In diesem Experiment wurden COS-7 Zellen mit Kombinationen aus T β RII bzw. T β RII-B und T β RIII cDNAs transfiziert. Die am oberen Rand des Gels laufenden radioaktiven Signale entsprechen dem TGF- β Typ III Rezeptor, die weiter

unten auftretenden Banden den Typ II Rezeptoren. Bei T β RIII handelt es sich um ein Proteoglykan, dessen Core-Protein in unglykosyliertem Zustand ca. 100 kDa groß ist, das aber in glykosylierter Form sehr heterogene Migrationseigenschaften (zw. 280 und 330 kDa) aufweist, weshalb hier ein 7,5% SDS Gel verwendet wurde [196] [173]. Beide Typ II Rezeptoren interagieren mit T β RIII in der Anwesenheit von TGF- β 1 (Abb.16B, Spuren 1 und 2) und TGF- β 2 (Abb.16B, Spuren 5 und 6). T β RII bindet TGF- β 2 nur in Anwesenheit des Typ III Rezeptors, nicht in Abwesenheit eines assoziierenden Rezeptors (Abb.16B, Spuren 3 und 5). Die Bindung von TGF- β 2 an T β RII-B ist im Gegensatz dazu, nicht von der Formation eines Rezeptorkomplexes abhängig (Abb.16B, Spuren 4 und 6).

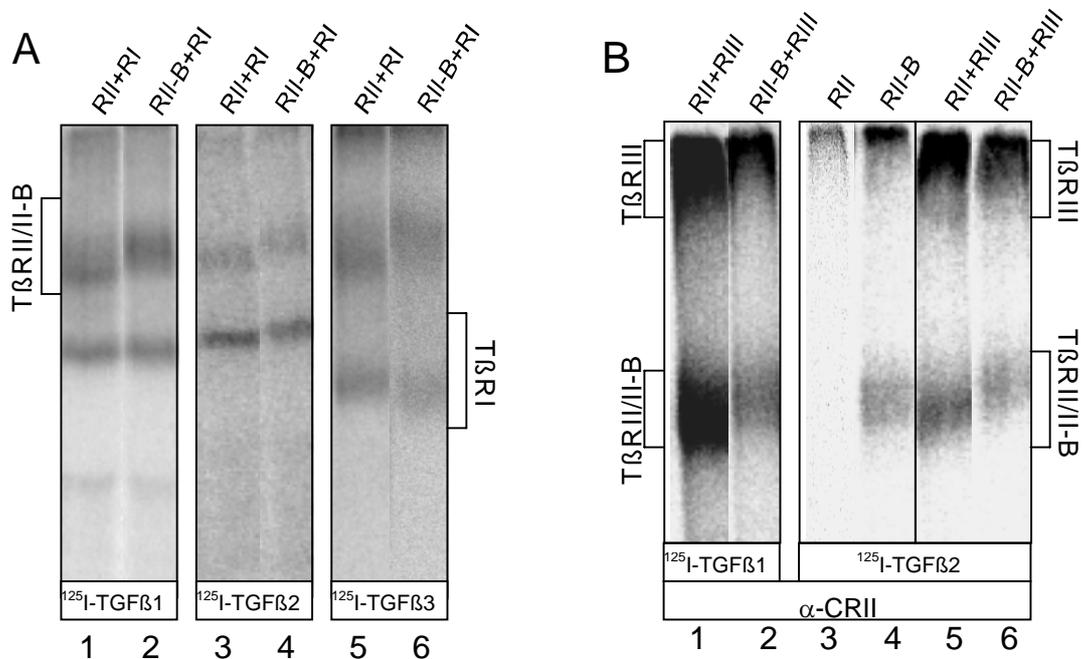


Abb.16A+B Eigenschaften von T β RII-B bei Bindung und Komplexbildung mit co-exprimierten T β RI und T β RIII. (A) Rezeptorkomplexe aus T β RII und T β RI bzw. T β RII-B und T β RI wurden nach Bindung und Crosslinking mit [^{125}I]-TGF- β 1, - β 2 und - β 3 detektiert. Die für die Transfektion verwendeten Rezeptorkonstrukte sind über jeder Spalte angegeben. (B) Rezeptorkomplexe aus T β RII und T β RIII bzw. T β RII-B und T β RIII wurden nach Bindung und Crosslinking mit [^{125}I]-TGF- β 1 und - β 2 detektiert. Rezeptorkonstrukte sind wiederum angegeben.

Versuch mit endogen exprimierten Rezeptoren in Mv1Lu und R1b/L17 Zellen:

Die Beobachtung, daß T β RIII für eine TGF- β 2 Bindung an T β RII unerlässlich ist, wird anhand eines Bindungs- und Crosslinking-Experiments mit endogen exprimierten TGF- β Rezeptoren nochmals verdeutlicht. Mv1Lu und R1b/L17 Zellen wurden mit [125 I]-TGF- β 2 inkubiert, die Oberflächenrezeptoren chemisch vernetzt und mit Antikörpern gegen T β RI (α RI), T β RII (α CRII) und T β RII-B (α RII-B) immunpräzipitiert (vgl. IV.2.7.). Die R1b/L17 Zelllinie ist ein Subklon der Mv1Lu-Zelllinie mit der Besonderheit keinen TGF- β Typ I Rezeptor zu exprimieren [197].

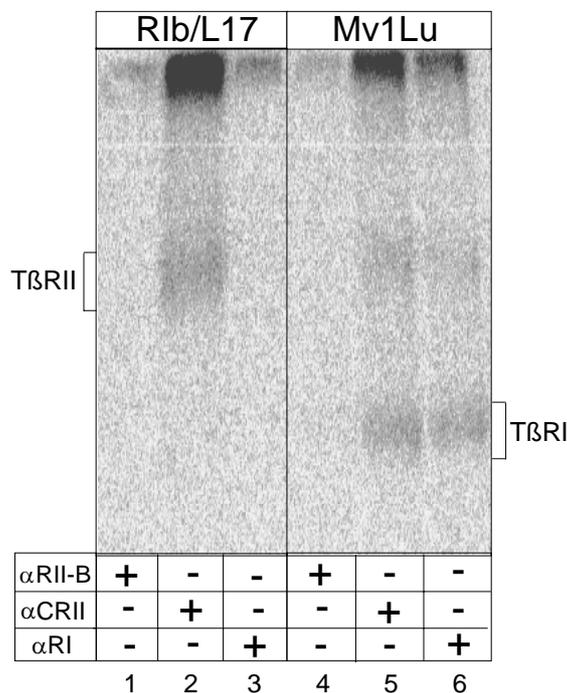


Abb.17 Bindung von [125 I]-TGF- β 2 an TGF- β Rezeptoren an der Zelloberfläche von Mv1Lu und R1b/L17 Zellen. Immunpräzipitationen wurde unter Verwendung der angegebenen spezifischen Antikörper vorgenommen. Die Bindung von TGF- β 2 an T β RII in R1b/L17 Zellen kommt durch Komplexbildung mit T β RIII zustande.

Abb.17 verdeutlicht die Bindung der endogen in diesen Zelllinien exprimierten TGF- β Rezeptoren an [125 I]-TGF- β 2. T β RI wird in Mv1Lu Zellen exprimiert und bildet ligandeninduziert einen Komplex mit T β RII. Dies zeigt sich durch die beiden radioaktiven Signale, welche den beiden Rezeptortypen zugeordnet werden können (Abb.17, Spalte 6). Die Verwendung des α CRII liefert das gleiche Expressionsmuster bezüglich T β RII und T β RI (Abb.17, Spalte 5). Im Gegensatz dazu finden sich bei Lysaten aus R1b/L17 Zellen keine Signale für T β RI (Abb.17, Spalten 2 und 3). Eine Expression von T β RII-B konnte in keiner der beiden Zelllinien detektiert werden (Abb.17, Spalten 1 und 4). Trotz Fehlen des TGF- β Typ I Rezeptors kommt es in R1b/L17 Zellen zu einer Bindung von [125 I]-TGF- β 2 an T β RII (Abb.17, Spalte 2). Diese Bindung resultiert daher eindeutig von einer Komplexbildung mit T β RIII. Eine

T β RII/T β RIII Oligomerisierung ist somit für eine TGF- β 2 Bindung an T β RII essentiell, und dies v.a. in Zellen, die keinen endogenen TGF- β Typ II-B Rezeptor exprimieren.

A.II.5.3. Interaktion des T β RII-B mit dem TGF- β Typ II Rezeptor

Um zu untersuchen ob eine Interaktion der beiden TGF- β Typ II Rezeptoren stattfindet und welche Bindungseigenschaften ein derartiger Komplex aufweist, wurde ein weiteres Bindungs- und Crosslinking-Experiment durchgeführt. In COS-7 Zellen wurden die beiden Rezeptortypen co-exprimiert, wobei ein HA-getagtes Konstrukt des T β RII (RII-HA) verwendet wurde. Dies gewährleistete eine spezifische Erkennung der beiden Rezeptoren. T β RII-B konnte spezifisch durch den α hRII-B Antikörper (vgl. IV.2.7.) und T β RII-HA aufgrund des HA-Epitops durch α HA detektiert werden. Nach Binden und Quervernetzen der [125 I] markierten Liganden TGF- β 1 oder TGF- β 2 wurde eine Doppel-Immunpräzipitation (IP1 und IP2) durchgeführt. Die Präzipitate wurden hierbei durch Erhöhung der SDS-Konzentration vom ersten Antikörper getrennt und anschließend mit einem zweiten Antikörper versetzt. Auf diese Weise ist es möglich Komplexe zweier Proteine nachzuweisen, deren radioaktive Signale sich aufgrund ähnlicher Molekülgröße nicht oder nur schlecht voneinander unterscheiden lassen.

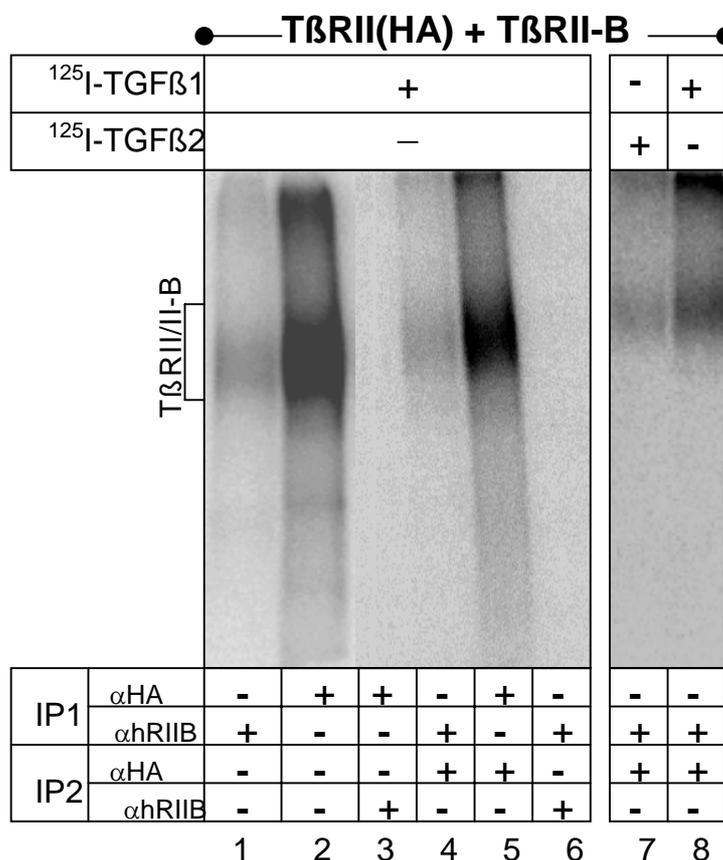


Abb.18 Ligandeninduzierte Typ II/II-B Heterooligomere können an der Zelloberfläche von COS-7 Zellen mit Hilfe von Doppel-Immunpräzipitationen detektiert werden (Spalten 4, 7 und 8). HA-Epitop getagte T β RII cDNA wurde mit ungetagter T β RII-B cDNA co-transfiziert. Die verwendeten Liganden, sowie die Antikörperkombinationen sind angegeben.

Heterooligomere Komplexe aus T β RII und T β RII-B ließen sich sowohl mit TGF- β 1 als auch mit TGF- β 2 als Liganden nachweisen (Abb.18, Spalten 4, 7 und 8). Hierbei wurde α hRIIB in der ersten Immunpräzipitation (IP1) verwendet, α HA in der zweiten (IP2). Mit der umgekehrten Antikörperkombination war es nicht möglich ein Signal zu detektieren (Abb.18, Spalte 3). Möglicherweise ist α hRIIB unter Bedingungen, wie sie in der zweiten Immunpräzipitation verwendet wurden, nicht funktionsfähig. Darauf deutet auch der vergebliche Versuch T β RII-B nachzuweisen, indem α hRIIB in beiden Immunpräzipitationen eingesetzt wurde (Abb.18, Spalte 6). Im Gegensatz dazu war ein Nachweis von T β RII-HA unter Verwendung von α HA in beiden Immunpräzipitationen erfolgreich (Abb.18, Spalte 5). Auch in Spalten 1 und 2 ist der einzelne Nachweis der beiden Rezeptortypen mit den entsprechenden Antikörpern dargestellt. Auf eine zweite Immunpräzipitation wurde hier verzichtet.

Die Bindung des T β RII/T β RII-B Heterooligomers an [125 I]-TGF- β 2 zeigte deutlich, daß eine einzelne T β RII-B Rezeptorkette für eine TGF- β 2 Interaktion mit dem Heterooligomer ausreicht.

A.II.6. Charakterisierung der TGF- β 2 Bindung an T β RII-B

A.II.6.1. Herstellung von T β RII-B Mutanten

Der TGF- β Typ II-B Rezeptor enthält in seiner Insert-Sequenz zwei zusätzliche Cysteinreste an Position 44 und 47 (vgl. Abb.11.). Diese Cysteine ermöglichen unter Umständen die Bildung zusätzlicher oder alternativer Disulfid-Brückenbindungen, welche für die erhöhte Affinität des Rezeptors gegenüber seinen Liganden und v.a. TGF- β 2 verantwortlich sein können. Weiterhin fällt innerhalb der Insert-Sequenz die zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstelle an Asparagin 48 ins Auge (vgl. Abb.11.). Glykosylierung dieser Stelle könnte ebenfalls das Bindungsverhalten von T β RII-B bezüglich TGF- β 2 beeinflussen. Um die Frage nach dem Zusammenhang zwischen den erwähnten Aminosäureresten und dem T β RII-B Bindungspotential beantworten zu können, wurden mittels PCR-Mutagenese T β RII-B-Konstrukte hergestellt, in denen diese AS-Reste einzeln oder in Kombination mutiert vorliegen. Zu diesem Zweck wurden Primer kreiert, mit deren Hilfe die zu mutierenden Cysteine sowie der Asparaginrest durch Alanine ersetzt werden konnten. Die damit hergestellten PCR-Produkte konnten anschließend durch rekombinante PCR

verlängert werden. Nach Restriktionsverdau mit Hind III und Bgl II war es möglich die komplementäre Sequenz im wt-T β RII-B Konstrukt durch das mutierte Fragment zu ersetzen. Es wurden folgende Mutanten hergestellt und durch Sequenzierung verifiziert: T β RII-B^{C44A}, T β RII-B^{C47A}, T β RII-B^{C44AC47A}, T β RII-B^{N48A}. Abb.19 zeigt schematisch die Vorgehensweise.

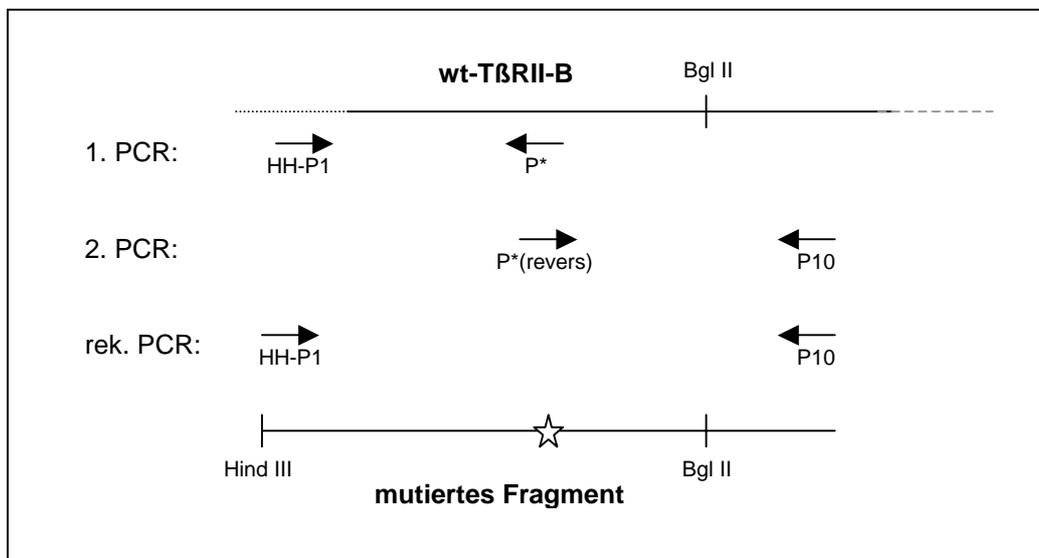


Abb.19 Schema zur PCR-Mutagenese. Zwei komplementäre Primer, welche die erwünschte Mutation einführen sollen (P* und P*revers), werden in zwei unabhängigen PCR Reaktionen eingesetzt. Die erhaltenen Fragmente werden anschließend als Matrize in einer rekombinanten PCR verwendet. Das PCR-Produkt enthält die erwünschte Mutation (*) und kann, entsprechend geschnitten, in dafür vorgesehene Vektoren eingebracht werden.

A.II.6.2. Bindung von TGF- β 2 an T β RII-B-Insert-Mutanten

Alle hergestellten Konstrukte sowie das wt-T β RII-B Konstrukt wurden in COS-7 Zellen exprimiert und bezüglich ihrer TGF- β 2 Bindungseigenschaften getestet. Zu diesem Zweck wurde ein Bindungs- und Crosslinking-Experiment mit [¹²⁵I]-TGF- β 2 durchgeführt. Die Rezeptoren wurden mit Hilfe des α CRII Antikörpers immunpräzipitiert. Abb.20 zeigt die radioaktiven Signale der verschiedenen T β RII-B Mutanten nach TGF- β 2 Bindung. Es geht daraus hervor, daß die Cysteine, sowohl einzeln (Abb.20, Spalte 2 und 3) als auch in Kombination (Abb.20, Spalte 4), sowie die potentielle N-Glykosylierungsstelle (Abb.20, Spalte 5), keinen entscheidenden Einfluß auf die Fähigkeit TGF- β 2 zu binden haben. Eine Interaktion von Rezeptor und Ligand bleibt nicht aus. Diese Art des Experiments läßt keine Schlüsse bezüglich

der Qualität einer Bindung zu. Daher weisen kleine Unterschiede in den Signalstärken nicht auf Differenzen der Bindungsintensitäten hin.

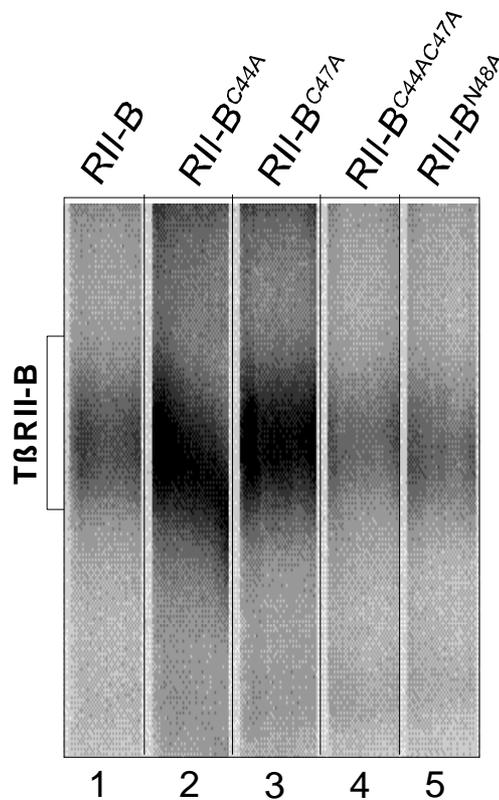


Abb.20 Weder die Bildung alternativer Disulfidbrücken, noch zusätzliche N-Glykosylierung beeinflussen die Bindung von TGF- β 2 an T β RII-B. COS-7 Zellen wurden mit wt-T β RII-B, sowie mit T β RII-B Mutanten, wie über jeder Spalte angegeben, transfiziert. Bindung und Crosslinking wurden mit [125 I]-TGF- β 2, Immunpräzipitationen mit α CRII durchgeführt. Dieses Experiment wurde von M. Roth, Biozentrum Würzburg, vorgenommen.

A.II.6.3. Versuch zur Beteiligung der Insert-Sequenz an der Ligandenbindung

Wie bereits beschrieben wurde ein N-terminal HA-getagtes T β RII-B Konstrukt hergestellt. Das HA-Epitop wurde nur fünf Aminosäuren vor der T β RII-B Insert-Sequenz, direkt nach der Spaltstelle des Signalpeptids, eingebracht. Um die Funktionalität des Konstruktes und die Zugänglichkeit des HA-Epitops zu testen wurde ein Bindungs- und Crosslinking-Experiment in COS-7 Zellen durchgeführt. Diese wurden mit T β RII-B-HA und T β RII-HA Konstrukten transfiziert und nach Binden an [125 I]-TGF- β 1 mit dem Liganden chemisch vernetzt. Immunpräzipitationen wurden mit α HA, α CRII und im Fall von T β RII-B-HA auch mit α hRIIB, einem T β RII-B spezifischen Antikörper, dessen Epitop Teil der Insert-Sequenz ist, durchgeführt.

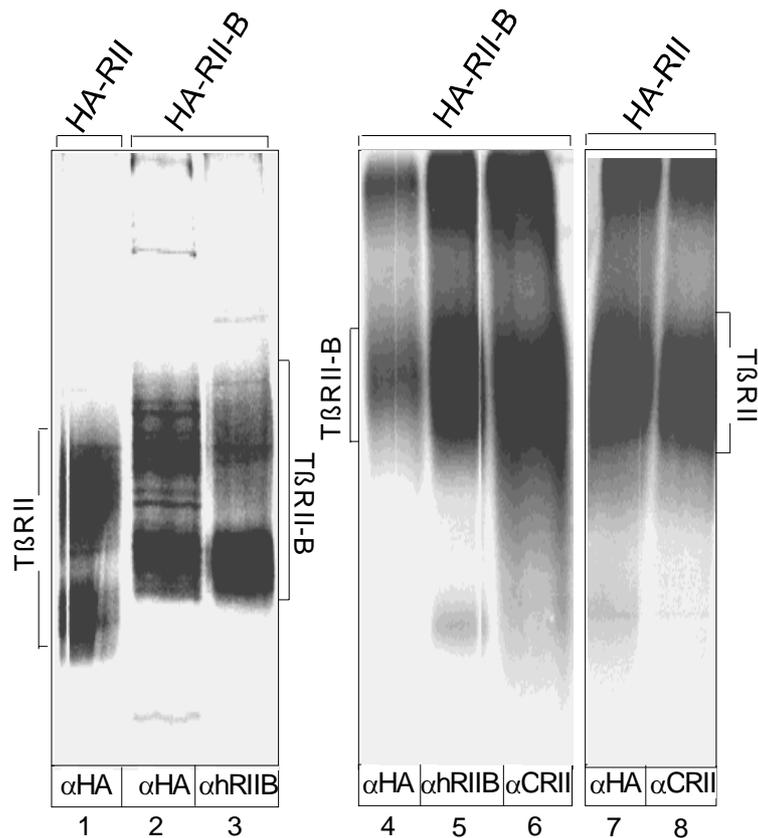


Abb.21 N-terminal eingefügte Epitope geben Hinweise auf eine Beteiligung der T β RII-B-Insert-Sequenz an der Ligandenbindung. COS-7 Zellen wurden mit HA-getagten Rezeptorkonstrukten transfiziert und die Zellysate mit den angegebenen Antikörpern versetzt. Spalten 1 – 3 entstammen einem [35 S] *in vivo* Markierungsexperiment. Spalten 4 bis 8 einem Bindungs- und Crosslinking-Versuch mit [125 I]-TGF- β 1.

Wie erwartet, trat eine Bindung der Rezeptoren an TGF- β 1 auf. Das Einbringen des HA-Epitops inhibierte demnach die Fähigkeit zur Ligandenbindung des T β RII-B-HA nicht (Abb.21, Spuren 4 – 6). Jedoch scheint gebundenes TGF- β 1 die Zugänglichkeit des HA-Epitops des T β RII-B zu beeinträchtigen. Dies zeigt sich am schwachen radioaktiven Signal in Spur 4, das auf eine ineffizientere Präzipitation des Rezeptors hinweist. Im T β RII-HA Konstrukt ist das HA-Epitop ebenfalls direkt nach der Signalpeptid-Spaltstelle lokalisiert. Im Gegensatz zu T β RII-B-HA liefern hier jedoch beide Antikörper, α HA und α CRII, gleich starke Signale. (Abb.21, Spalte 7 und 8). Um den Einfluß der Ligandenbindung auf die Zugänglichkeit des HA-Epitops besser einschätzen zu können, wurden T β RII-B-HA und T β RII-HA wiederum in COS-7 Zellen exprimiert und anschließend *in vivo* mit [35 S]-Cystein/Methionin markiert. Bei dieser Methode entsteht ein radioaktives Signal durch den Rezeptor selbst und nicht

aufgrund einer Bindung an einen radioaktiv markierten Liganden. Die Rezeptoren wurden mit α HA, bzw. T β RII-B-HA auch mit α hRIIB, aus den Zellysaten immunpräzipitiert. Das HA-Epitop des T β RII-B-HA ist für den α HA Antikörper in gleichem Maße wie das Insert-Epitop für den α hRIIB Antikörper zugänglich (Abb.21, Spalten 2 und 3). Es lassen sich auch keine Unterschiede bezüglich der Signalstärke zwischen den beiden Typ II Rezeptorkonstrukten (Abb.21, Spalten 1 und 2) erkennen. Liegt also keine Ligandenbindung vor, so ist das HA-Epitop des T β RII-B-HA optimal zugänglich. Eine Interaktion mit TGF- β 1 führt zu einer Verringerung dieser Zugänglichkeit. Dies steht im Gegensatz zu T β RII-HA und legt daher die Vermutung nahe, daß die Insert-Sequenz des T β RII-B an der Bindung der TGF- β Isoformen beteiligt sein muß und sich demnach die Bindungstaschen der beiden Typ II Rezeptoren voneinander unterscheiden.

A.II.7. Studien zur gewebespezifischen Expression von T β RII-B

Die Expression des TGF- β Typ II-B Rezeptors sollte auf RNA und Proteinebene in Zelllinien aus verschiedenen Geweben untersucht werden. Es wurden aus diesem Grund RT-PCR und Bindungsexperimente durchgeführt.

Für die RT-PCR-Analyse wurde cDNA aus humanen Osteosarkoma Zellen (U2OS), humanen fötalen Osteoblasten (hFOB), aus verschiedenen murinen mesenchymalen Vorläuferzelllinien (MC3T3, C3H10T1/2), einer humanen Hepatomazelllinie (Hep3B), humanen Neuroblastoma Zellen (IMR32), Lungenepithel Zellen vom Nerz (Mv1Lu) und Ratten Myoblasten (L6) präpariert. Außerdem wurden humane C2C12 Myoblasten zu diesem Experiment herangezogen. Diese Zelllinie ist in der Lage bei Verringerung des Serumanteils im Medium (0,2 - 2% FCS) zu Myotuben und bei gleichzeitiger Stimulation mit BMP-2 (40 nM) zu Osteoblasten zu differenzieren [198]. Die Zellen wurden demzufolge entsprechend behandelt und die cDNA aus undifferenzierten und differenzierten Zellen verwendet.

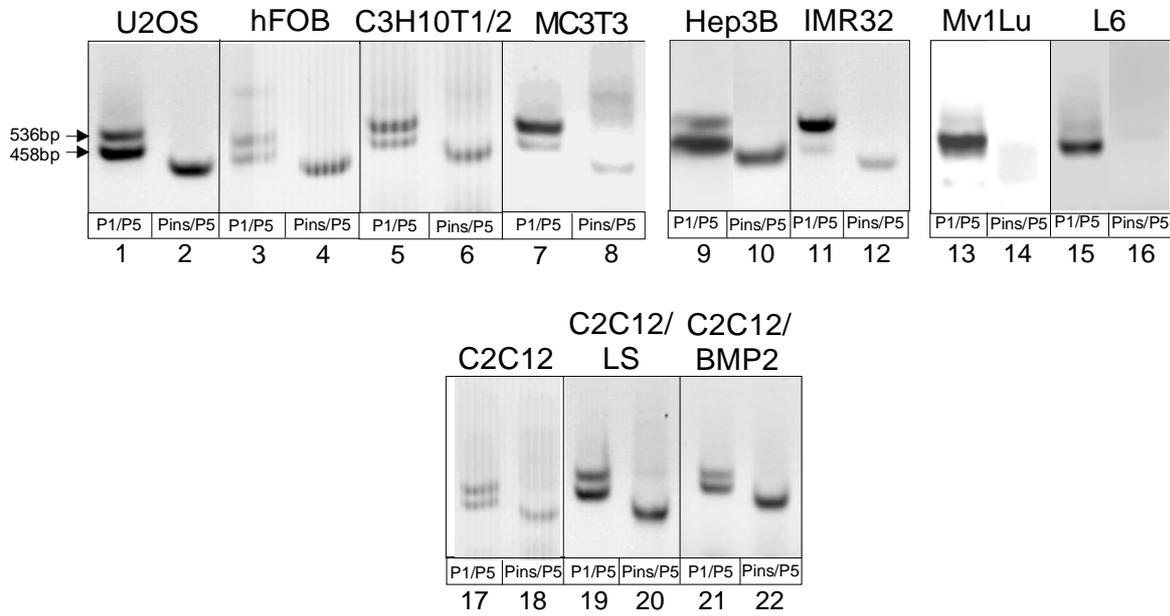
In den darauffolgenden PCR-Reaktionen wurde die Primerkombination P1/P5, mit der sowohl T β RII als auch T β RII-B Fragmente amplifiziert werden, und die Kombination aus Pins, einem T β RII-B spezifischen Primer, und P5, verwendet (Primersequenzen s. Anhang). Das Auftreten einer Doppelbande nach Reaktion mit P1/P5 und einer einzelnen Bande bei Reaktion mit Pins/P5 sind Beweis für das

Vorhandensein von T β RII-B mRNA in der jeweiligen Zelllinie. Die Ergebnisse der RT-PCR Analyse sind in Abb.22A dargestellt.

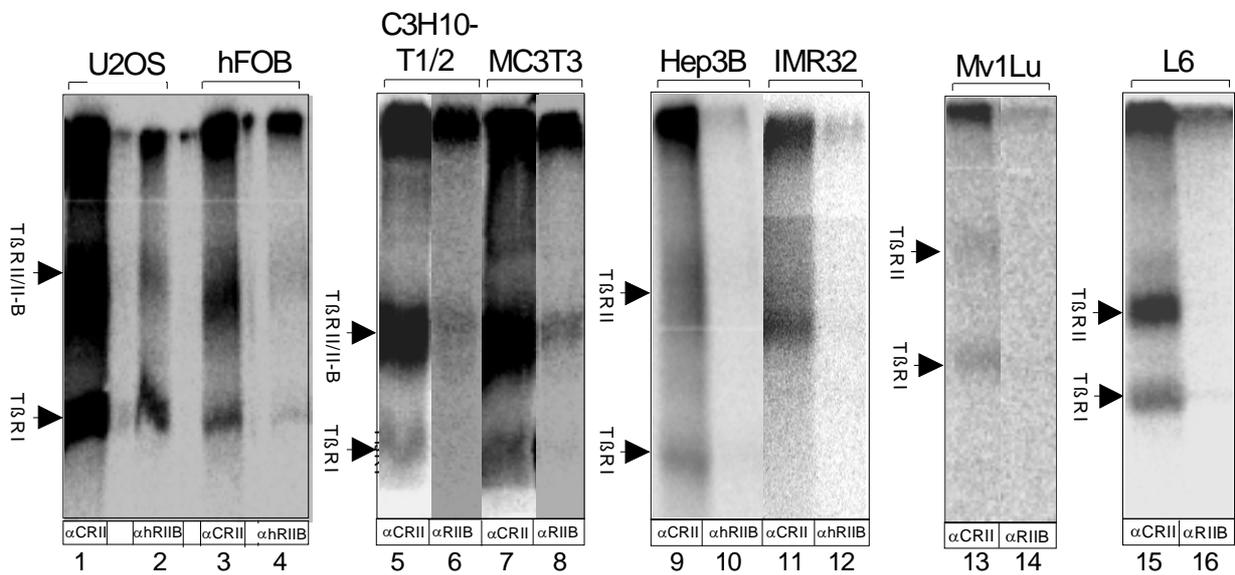
Endogene Expression von T β RII und T β RII-B an der Zelloberfläche der oben genannten Zellen wurde mit Hilfe von Bindungs- und Crosslinking-Experimenten mit [¹²⁵I]-TGF- β 1 nachgewiesen. Hierbei wurden die Zellysate entweder mit dem α CRII Antikörper oder mit dem Antikörper spezifisch für den humanen T β RII-B, α hRIIB, bzw. mit α RIIB, einem Antikörper, der auch die murine Form des T β RII-B erkennt (vgl. IV.2.7.), versetzt. In Abb.22B sind die Ergebnisse der Bindungsstudien mit Ausnahme der Daten zu den C2C12-Zell-Experimenten zusammengefaßt. Teil c der Abbildung verdeutlicht die Oberflächenexpression der Typ II Rezeptoren in C2C12 Zellen sowohl in undifferenziertem als auch in differenziertem Zustand.

Bei der Betrachtung der Daten fällt auf, daß drei verschiedenen Szenarien der T β RII-B Expression vorherrschen. Zum einen tritt kein alternatives Spleißen und somit auch keine T β RII-B Expression in Mv1Lu und L6 Zellen auf (Abb.22.A und B, jew. Spalten 13 – 16). Zum anderen wird die mRNA zwar alternativ gespleißt, es kommt jedoch zu keiner detektierbaren Expression des T β RII-B an der Zelloberfläche von Hep3B und IMR32 Zellen (Abb.22A und B, jew. Spalten 9 – 12). In der dritten Variante, in U2OS, in hFOB, in MC3T3, C3H10T1/2 und C2C12 Zellen, kommt es sowohl zu alternativem Spleißen als auch zu T β RII-B Expression (Abb.22A und B, jew. Spalten 1 – 8; Abb.22C, Spalten 4 – 6). Während T β RII fast ubiquitär exprimiert wird, zeigt T β RII-B ein spezifischeres Expressionsmuster und scheint v.a. in knochenverwandten Zelllinien, wie in Osteoblasten und mesenchymalen Vorläuferzellen, vertreten zu sein. In C2C12 Vorläuferzellen werden beide Typ II Rezeptoren, T β RII und T β RII-B, exprimiert, diese Expression wird jedoch während der Differenzierung zu Myoblasten, und noch stärker während der Differenzierung zu Osteoblasten, hochreguliert.

A



B



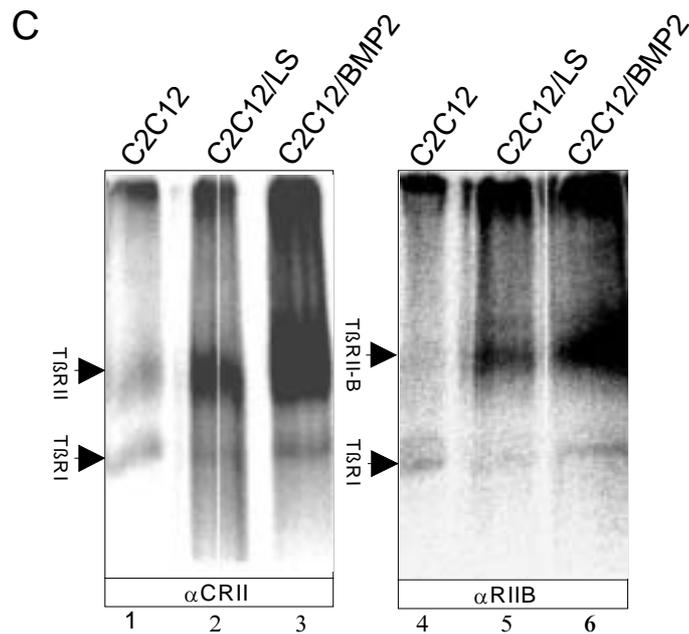


Abb.22.A+B+C Expression von TβRII-B in Zellen verschiedener Gewebe. (A) RT-PCR Analyse von TβRII-B mRNA in verschiedenen Zelllinien. Die PCR-Produkte entstanden mit den Primerkombinationen P1/P5 (ungerade Spaltennummern) und Pins/P5 (gerade Spaltennummern). Das mit P1/P5 erhaltene 536 bp große Fragment entspricht TβRII-B, die 458 bp große Bande TβRII. Mit Pins/P5 wurde ein TβRII-B Fragment amplifiziert. C2C12 Zellen wurden undifferenziert (Spalten 17 und 18), nach Differenzierung mit geringem Serumanteil (low serum = LS) (Spalten 19 und 20) und nach Stimulation mit 40 nM BMP-2 (Spalten 21 und 22) verwendet. (B) Endogene Expression von TβRII und TβRII-B an der Zelloberfläche verschiedener Zelllinien wurde mittels Affinitätsmarkierung mit [¹²⁵I]-TGF-β1 detektiert. IPs wurden mit den angegebenen Antikörper durchgeführt. (C) Nachweis der TGF-β Typ II Rezeptor Expression in undifferenzierten und differenzierten C2C12 Zellen nach Affinitätsmarkierung mit [¹²⁵I]-TGF-β1. Es kommt zu Hochregulierung der Expression von TβRII-B bei osteoblastärer Differenzierung.

A.II.8. Studien zur Signalübertragung durch T β RII-B

A.II.8.1. T β RII-B Signalübertragung in DR-26 Zellen

Die Fähigkeit des TGF- β Typ II-B Rezeptors TGF- β vermittelte Signale zu übertragen, wurde in einem Reportergenexperiment in DR-26 Zellen untersucht. Diese Zelllinie ist ein Subklon der Mv1Lu Zelllinie, der aufgrund einer Mutation im *t β rII* Gen keine TGF- β Typ II Rezeptoren exprimiert [197] [15]. TGF- β vermittelte Luziferase-Expression kann in dieser Zelllinie also nur durch Einbringen eines funktionalen TGF- β Typ II Rezeptors wiederhergestellt werden. Aus diesem Grund ist sie ideal um TGF- β induzierte Signalübertragung über T β RII-B zu testen.

Als Reportergen wurde das p3TP-luc Konstrukt verwendet, das neben drei TPA-responsiven Elementen eine verkürzte Form des Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 Promotors enthält und spezifisch auf Smad2/3 vermittelte TGF- β und Aktivin Signale reagiert (s. IV.7.10.). Das pRL-TK Konstrukt (Promega) wird als Referenzplasmid co-transfiziert. Hierbei ist dem Renilla-Luziferasegen ein konstitutiv aktiver Thymidin-Kinase-Promotor vorangeschaltet.

DR-26 Zellen wurden unter Verwendung von Lipofectamin (Life Technologies) mit 2 μ g T β RII-B bzw. T β RII cDNA zusammen mit 1 μ g p3TP-luc Reportergenkonstrukt und 0,3 μ g pRL-TK Referenzplasmid transfiziert. Nach Stimulation mit jew. 200 pM TGF- β 1 und TGF- β 2 wurden die Luziferaseaktivitäten der Zellysate mit Hilfe des Dualen-Luciferase-Assay-Systems (Promega) in einem Luminometer bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden in Relation zu den einzelnen pRL-TK Werten gesetzt um somit die Transfektionseffizienz miteinzubeziehen.

Abb.23 zeigt, daß die Sensitivität von DR-26 Zellen gegenüber TGF- β durch das Einbringen beider Rezeptortypen wiederhergestellt wurde. T β RII-B ist in gleichem Maße wie T β RII in der Lage TGF- β vermittelte Signale zu übertragen. Es konnten nur leichte Unterschiede bei der Signalübertragung der beiden TGF- β Isoformen in DR-26 Zellen festgestellt werden. Zu bemerken ist hier, daß die TGF- β 2 Antwort in T β RII-transfizierten Zellen auf die starke Expression des TGF- β Typ III Rezeptors in DR-26 Zellen zurückzuführen ist (vgl. Abb.24).

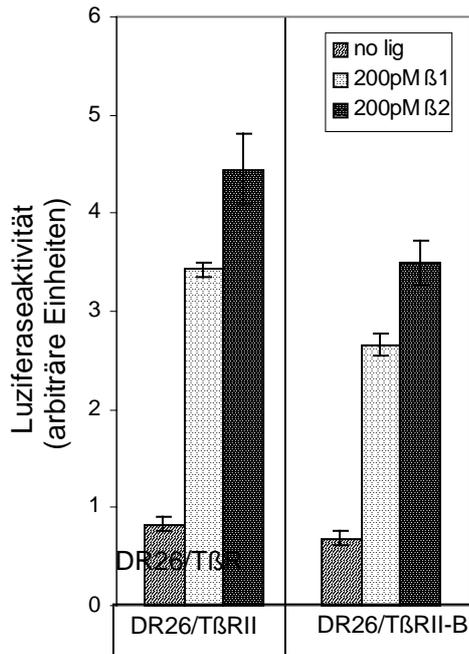


Abb.23 T β RII-B ist ein funktionaler TGF- β Signalübertragungsrezeptor. DR-26 Zellen wurden mit T β RII (Spalte 1) und alternativ mit T β RII-B cDNA (Spalte 2) transfiziert. Es wurde das p3TP-luc Reportergen in Kombination mit dem pRL-TK Referenzplasmid verwendet. Die Stimulation erfolgte mit 200pM TGF- β 1 (gepunktete Balken) bzw. TGF- β 2 (schwarze Balken). Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) dreier unabhängiger Experimente.

A.II.8.2. Typ III Rezeptor unabhängige T β RII-B-Signalübertragung

Im Folgenden wurden das TGF- β Signalübertragungspotential des endogen exprimierten TGF- β Typ II-B Rezeptors untersucht. Hierfür bot sich an, die ligandeninduzierte Phosphorylierung von Smad2, einem TGF- β spezifischen Smad, das durch den aktivierten TGF- β Typ I Rezeptor phosphoryliert wird, zu überprüfen [199] [200]. Für dieses Experiment wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet, die sich in der Komposition ihrer TGF- β Rezeptoren unterscheiden. Die humane Osteosarkoma Zelllinie U2OS exprimiert T β RI, T β RII und T β RII-B (s. Abb.22B, Spuren 1 und 2), jedoch keinen Typ III Rezeptor (Abb.24, Spalte 4). Die Ratten Myoblastenlinie L6 exprimiert T β RI und T β RII, ebenfalls keinen Typ III Rezeptor sowie keinen T β RII-B (s. Abb.22B, Spuren 15 und 16 und Abb.24, Spalte 2) [168] [176]. Das Fehlen einer Expression des TGF- β Typ III Rezeptors in den genannten Zelllinien wurde in einem Bindungs- und Crosslinking-Experiment mit [125 I]-TGF- β 1 nachgewiesen. Zur Detektion von T β RIII wurde in den Immunpräzipitationen der α RIII Antikörper verwendet. Zur Proteinauftrennung wurde ein 7,5% SDS-Gel benutzt. DR-26 Zellen, epitheliale Zellen, die T β RIII exprimieren, wurden als Positivkontrolle eingesetzt (Abb.24, Spalte 5) [201].

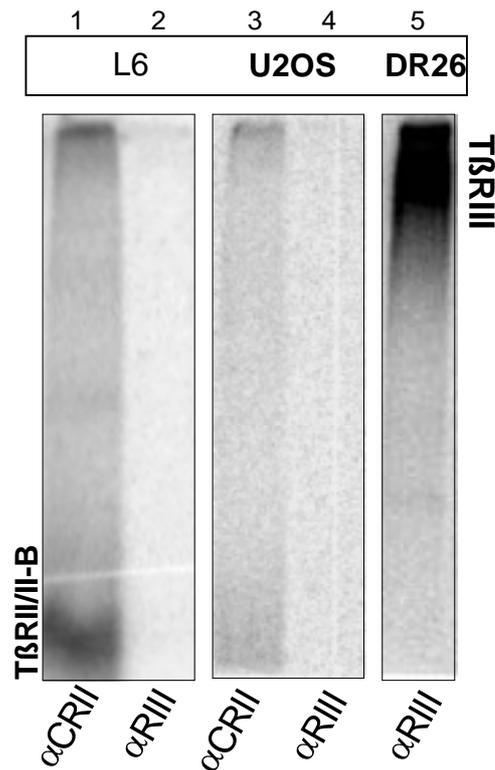


Abb.24 Fehlende Typ III Rezeptor Expression in U2OS und L6 Zellen. Oberflächenrezeptoren wurden mit [¹²⁵I]-TGF-β1 markiert und mit den angegebenen Antikörpern präzipitiert.

Zum Nachweis der Smad2-Phosphorylierung wurden beide Zelllinien entweder mit 200pM TGF-β1 oder TGF-β2 30 Minuten lang stimuliert. Die Zellysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in einem darauffolgenden Western-Blot mit einem α-P-Smad2 Antikörper (vgl. IV.2.7.) analysiert, der spezifisch die phosphorylierte Form von Smad2 erkennt [202]. Um sicher zu gehen, daß die Taschen der SDS-Gele mit gleichen Proteinmengen beladen wurden, wurde die Western-Blot Membran gestriipt und erneut mit einem αSmad2 Antiserum (vgl. IV.2.7.), das Smad2 auch in unphosphoryliertem Zustand erkennt, inkubiert (Abb.25, untere Reihe).

In L6 Zellen liegt Smad2 nach Stimulation mit TGF-β1 phosphoryliert vor (Abb.25, Spalte 5), während der Phosphorylierungsgrad nach Behandlung mit TGF-β2 deutlich geringer ist (Abb.25, Spalte 6). In U2OS Zellen hingegen wird Smad2 durch TGF-β2 in gleichem Maße wie durch TGF-β1 Stimulation phosphoryliert (Abb.25, Spalten 2 und 3). TβRIII bindet alle drei TGF-β Isoformen mit hoher Affinität und ist v.a. für eine Bindung von TGF-β2 an den Signalkomplex essentiell [168] [188] [189]. Die TGF-β2 vermittelte Reaktion in U2OS Zellen ist jedoch unabhängig von der Anwesenheit des Typ III Rezeptors. Die TGF-β2 vermittelte Smad2-Phosphorylierung ist vermutlich auf die zusätzliche endogene Expression des TβRII-B in dieser Zelllinie zurückzuführen.

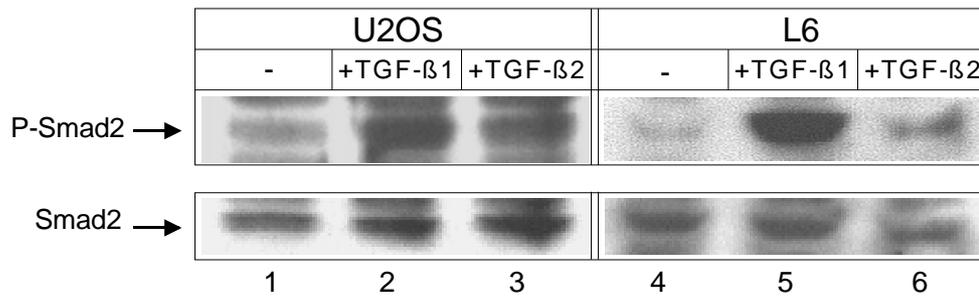


Abb.25 T β RII-B transduziert TGF- β 2 Signale über Smad2 unabhängig von einer T β RIII Expression. U2OS und L6 Zellen wurden mit jew. 200 pM TGF- β 1 oder TGF- β 2 stimuliert. Die phosphorylierte Form von Smad2 wurde mit Hilfe eines α -P-Smad2 Antikörpers detektiert. Zur Ladungskontrolle wurde ein α -Smad2 Antiserum verwendet (untere Reihe). Dieses Experiment wurde von M. Lutz, Biozentrum Würzburg, durchgeführt.

In einem Reporterexperiment mit U2OS Zellen konnten die Smad2-Phosphorylierungs-Daten bestätigt werden. U2OS Zellen wurden hierfür unter Verwendung von Lipofectamin (Life Technologies) mit dem TGF- β -sensitiven Reporterplasmid p3TP-luc in Kombination mit pRL-TK als Referenz transfiziert. Die Zellen wurden mit 200 pM TGF- β 1 bzw. TGF- β 2 für 18 – 24 h stimuliert. Abb.26 veranschaulicht die Ergebnisse der Luziferase-Messung. Durch Stimulation mit beiden TGF- β Isoformen wurde Luziferase-Expression induziert.

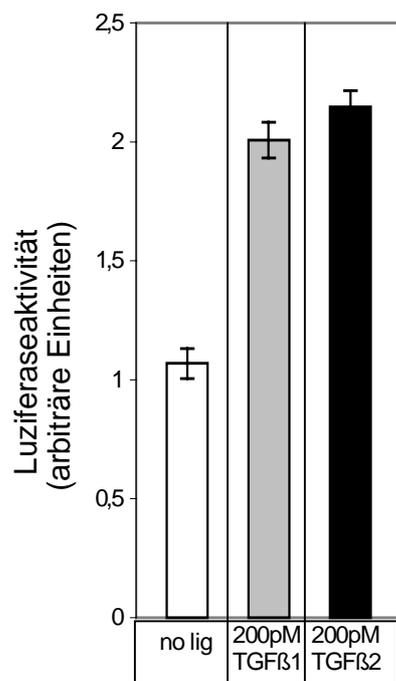


Abb.26 U2OS Zellen wurden mit p3TP-luc und pRL-TK als Referenz transfiziert. Die Stimulation erfolgte mit 200pM TGF- β 1 bzw. TGF- β 2. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten.

In einem weiteren Reporterexperiment sollten L6 Zellen bezüglich ihrer Responsivität gegenüber TGF- β 1 und - β 2 untersucht werden. Die Zellen wurden mit dem Reporter gen p3TP-luc und dem Referenzplasmid pRL-TK über Lipofectamin transfiziert. In drei weiteren Ansätzen wurde jeweils eine Rezeptor-cDNA (T β RII, T β RII-B oder T β RIII) co-transfiziert. Die Stimulation wurde mit 200 pM und 500 pM TGF- β 1 (weiße und hellgraue Säulen) bzw. TGF- β 2 (graue und schwarze Säulen) durchgeführt.

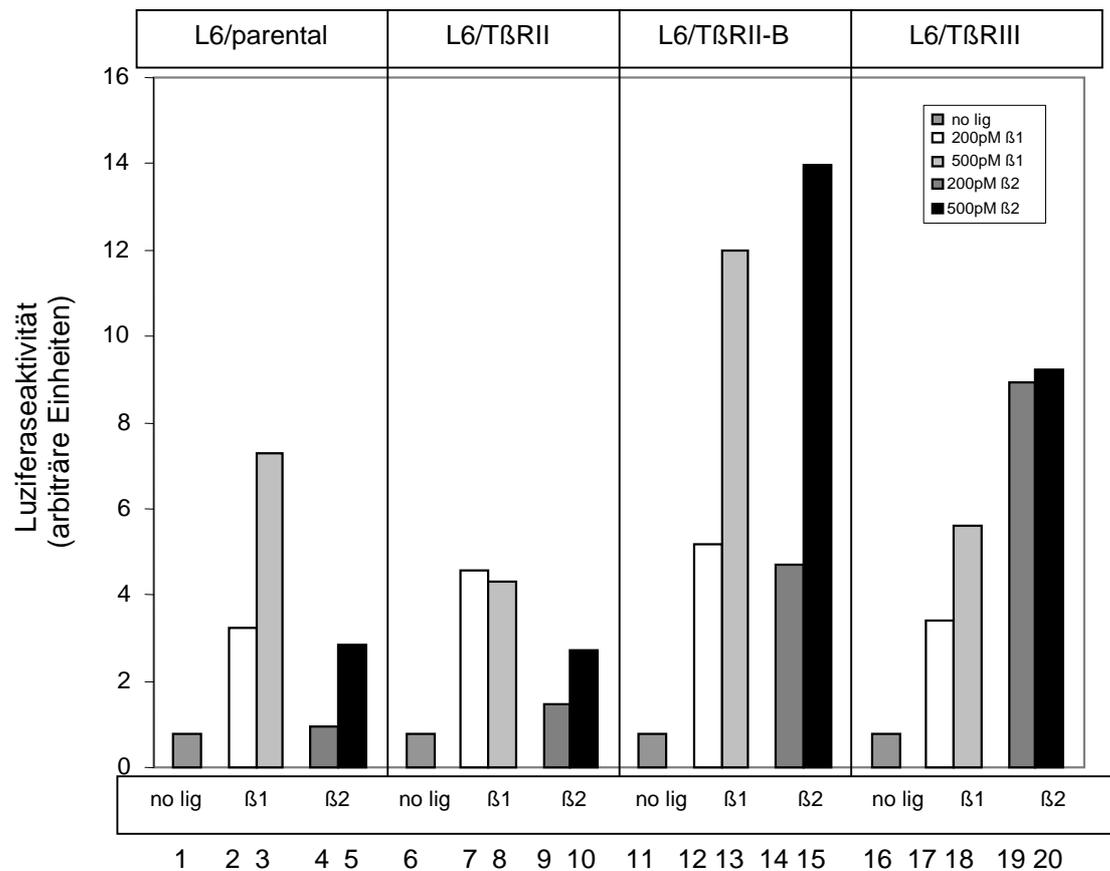


Abb.27 L6 Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptorkonstrukten, sowie mit p3TP-luc als auch pRL-TK transfiziert. Zur Stimulation wurden jew. 200 pM (weiße und dunkelgraue Säulen) und 500 pM (hellgraue und schwarze Säulen) TGF- β 1 bzw. TGF- β 2 verwendet. Die Daten wurden bezüglich pRL-TK-Aktivität relativiert und repräsentieren ein Mittel aus drei unabhängigen Experimenten.

Die parentale L6 Zelllinie ist responsiv gegenüber der TGF- β 1 Isoform (Abb.27, Säulen, 2 und 3), aber zeigt nur geringe Induktion der Luziferaseaktivität bei Stimulation mit TGF- β 2 (Abb.27, Säulen 4 und 5). Transfektion von T β RII cDNA in diese Zellen führte zu keinem Anstieg der Responsivität gegenüber TGF- β 2 (Abb.27, Säulen 7 bis 10). Dies deutet darauf hin, daß die Anwesenheit von T β RII und T β RI an der Zelloberfläche nicht ausreicht um den Liganden TGF- β 2 zu binden. Durch Einbringen von T β RIII konnte die Zelllinie sensitiv für TGF- β 2 gemacht werden, was sich in einem starken Anstieg der Luziferaseaktivität nach Stimulation sowohl mit 200 pM als auch mit 500 pM Ligand offenbarte (Abb.27, Säulen 19 und 20). Besonders interessant ist die Feststellung, daß zusätzliche Expression von T β RII-B in parentalen Zellen ebenfalls einen Anstieg der TGF- β 2 vermittelten Luziferase-Expression bewirkte (Abb.27, Säulen 14 und 15). Diese Ergebnisse zeigen, daß eine T β RIII-unabhängige TGF- β 2-Signalübertragung mittels T β RII-B stattfindet.

A.II.9. Studien zu Interaktion und Signaltransduktion von T β RII-B und Typ I Rezeptoren der TGF- β Superfamilie, den Alks (activin receptor-like kinases)

Der TGF- β Typ II Rezeptor interagiert nach Ligandenbindung mit T β RI (Alk 5), um diesen zu aktivieren und eine Signalweiterleitung zu ermöglichen [22]. Es sollte nun hinterfragt werden, ob T β RII-B, genauso wie T β RII, ausschließlich bzw. vorzugsweise mit Alk 5 reagiert, oder ob der alternativ gespleißte Rezeptor in der Lage ist auch mit anderen Typ I Rezeptoren (Alk 1 – 7) zu interagieren und eine Signalweiterleitung zu praktizieren.

A.II.9.1. Bindungsstudie zur Interaktion von T β RII-B mit Alks

Anhand von Bindungs- und Crosslinking-Experimenten mit [125 I]-TGF- β 1 bzw. [125 I]-TGF- β 2 sollte das Vorhandensein von Interaktionen zwischen den verschiedenen Alks und T β RII-B untersucht werden. Hierfür wurden die Typ I Rezeptorkonstrukte in Kombination mit T β RII-B in COS-7 Zellen exprimiert und anschließend mit α CRII bzw. α HA (zur Erkennung der HA-getagten Alk-Konstrukte) immunpräzipitiert. Besteht eine ligandeninduzierte Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren, so kann der gesamte Rezeptorkomplex durch beide Antikörper präzipitiert und auf dem

SDS-Gel sichtbar gemacht werden. In Abb. 28 sind nur die Ergebnisse dargestellt, die mit Alk 1-HA bzw. Alk 4-HA Konstrukten in Kombination mit T β RII-B erhalten wurden. Die Daten aus Versuchen mit den übrigen Alks sind hier aufgrund schlechter Qualität der Gele nicht aufgeführt. Der Alk 5/T β RII-B Komplex diente als Positivkontrolle. Aus Abb.28 geht hervor, daß sowohl Alk 1 als auch Alk 4 unabhängig von der gebundenen TGF- β Isoform mit T β RII-B interagieren. Gleiches wurde bei Verwendung der übrigen Alk-Konstrukte beobachtet (hier nicht gezeigt). Es scheint demnach eine generelle Affinität zwischen T β RII-B und Typ I Rezeptoren der TGF- β Superfamilie zu bestehen.

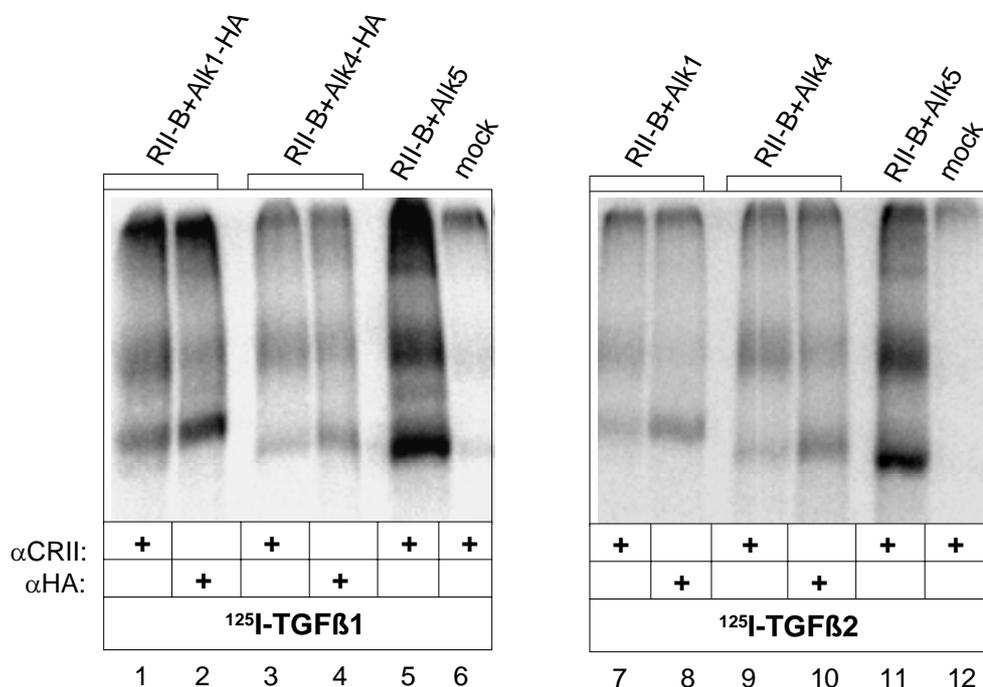


Abb.28 Bindungs- und Crosslinking-Experiment zum Nachweis von Interaktionen von T β RII-B mit Alk 1 bzw. Alk 4. Die Rezeptoren wurden in angegebenen Kombinationen in COS-7 Zellen exprimiert. Als Liganden wurden [^{125}I]-TGF- β 1 und [^{125}I]-TGF- β 2 verwendet. Die eingesetzten Antikörper sind angegeben.

A.II.9.2. Untersuchungen zur Signalübertragung via T β RII-B/Alk-Komplexe

Es wurden Reporterstudien in R1b/L17 Zellen vorgenommen, bei denen die verschiedenen Typ I Rezeptoren (Alk 1 – 7) in An- und Abwesenheit von T β RII-B exprimiert wurden. Wie bereits erwähnt, verfügen R1b/L17 Zellen über keinen funktionalen TGF- β Typ I Rezeptor [197], exprimieren zwar T β RII, aber wie Mv1Lu

Zellen, keinen T β RII-B. Bekanntlich kann durch Transfektion von T β RI (Alk 5) die TGF- β Responsivität von R1b/L17 Zellen wiederhergestellt werden. Nachdem T β RII nur über Alk 5 agiert, sollte die Überexpression eines anderen Typ I Rezeptors keine TGF- β vermittelte Genantwort in R1b/L17 Zellen induzieren. Könnte jedoch T β RII-B einen dieser Typ I Rezeptoren TGF- β -abhängig aktivieren, so sollte Luziferaseaktivität meßbar sein wenn beide Rezeptoren in R1b/L17 Zellen exprimiert werden. Um dies zu untersuchen wurde die transkriptionelle Aktivierung der Reportergenplasmide p3TP-luc (Abb.29A) [15] und pSBE-luc (Abb.29B) [65] nach Stimulation mit 240 pM TGF- β 1 oder TGF- β 2 bestimmt. Beim pSBE-luc Reporterkonstrukt sind dem Luziferasegen vier Smad-Bindungs-Elemente (SBEs) vorangeschaltet, an die sich sowohl TGF- β - also auch BMP-aktivierte Smad-Komplexe anlagern können.

Im Fall von p3TP-luc führte nur die Expression von Alk 5 zur Induktion des Reportergens (Abb.29A, Spalten 9 und 10). Dies war unabhängig von einer Co-expression des T β RII-B, die lediglich einen Anstieg des ligandenunabhängigen Signals zur Folge hatte (Abb.29A, Spalte 10). Zu erwähnen ist weiterhin eine geringe Geninduktion nach Stimulation mit TGF- β 1 bei Co-expression von T β RII-B und Alk 4, dem Aktivin Typ I-B Rezeptor (Abb.29A, Spalte 8). Aus diesen Daten geht hervor, daß die T β RII-B-Signalübertragung auf den Smad2/3 Signalweg vornehmlich durch die Aktivierung von Alk 5 zustande kommt.

Das Reportergen pSBE-luc, das neben Smad2/3 auch über Smad1/5/8 aktiviert werden kann, wurde ebenfalls in erster Linie durch die Expression von Alk 5 über Smad2/3 induziert (Abb.29B, Spalten 9 und 10). Zusätzliche Expression von T β RII-B führte ebenfalls zur Erhöhung des ligandenunabhängigen Signals hatte jedoch sonst keinen Einfluß auf die Signalstärken (Abb.29B, Spalte 10). Transfektion von Alk 1, Alk 3 (BMP Typ I-A Rezeptor) und Alk 6 (BMP Typ I-B Rezeptor) produzierte ligandenunabhängige Genexpression, welche durch die Stimulation mit TGF- β 1 oder TGF- β 2 nicht oder nur leicht beeinflusst wurde. Diese Signale wurden durch die Überexpression des T β RII-B kaum verändert (Abb.29B, Spalten 1, 2, 5, 6, 11 und 12). Bemerkenswert ist die hohe ligandenunabhängige Induktion der Luziferaseaktivität bei Expression von Alk 4 (Abb.29B, Spalten 7 und 8). Eine Signalübertragung via Alk 2 (Aktivin Typ I-A Rezeptor) und Alk 7 blieb vollständig aus (Abb.29B, Spalten 3, 4, 13 und 14).

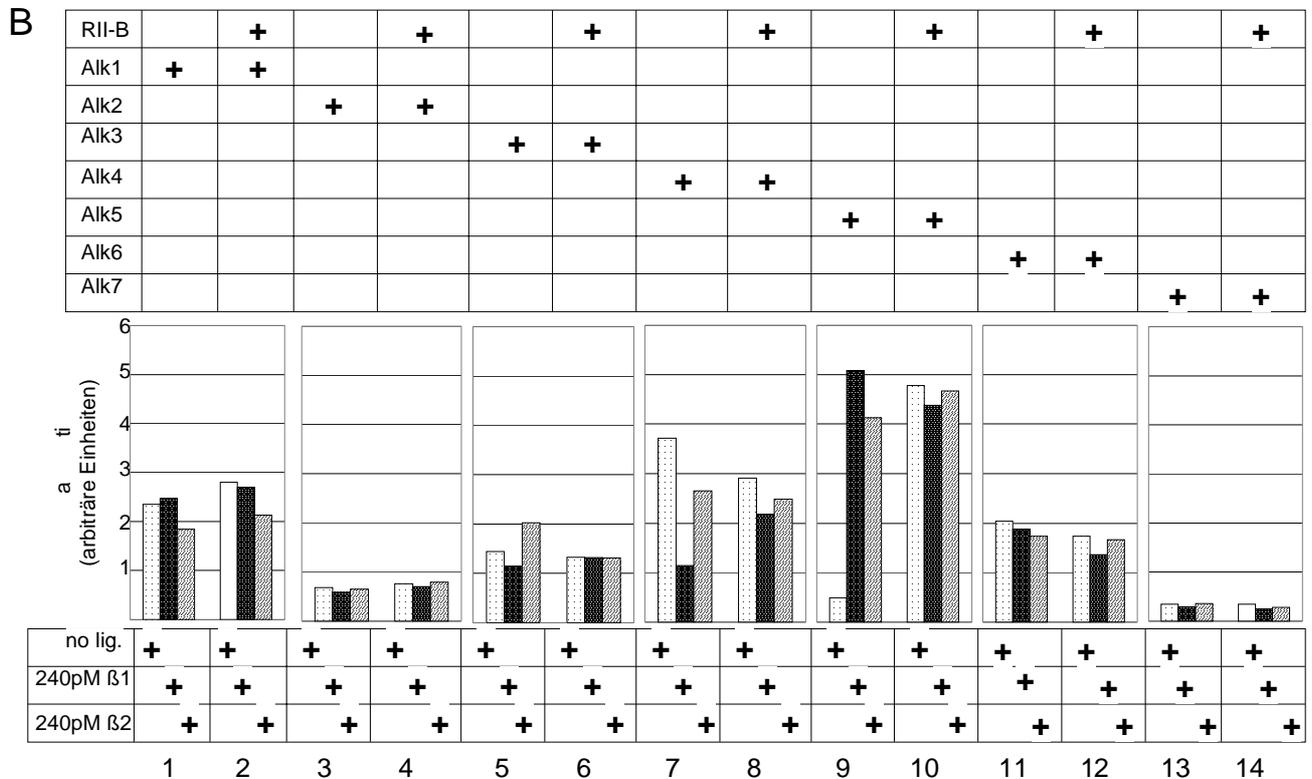
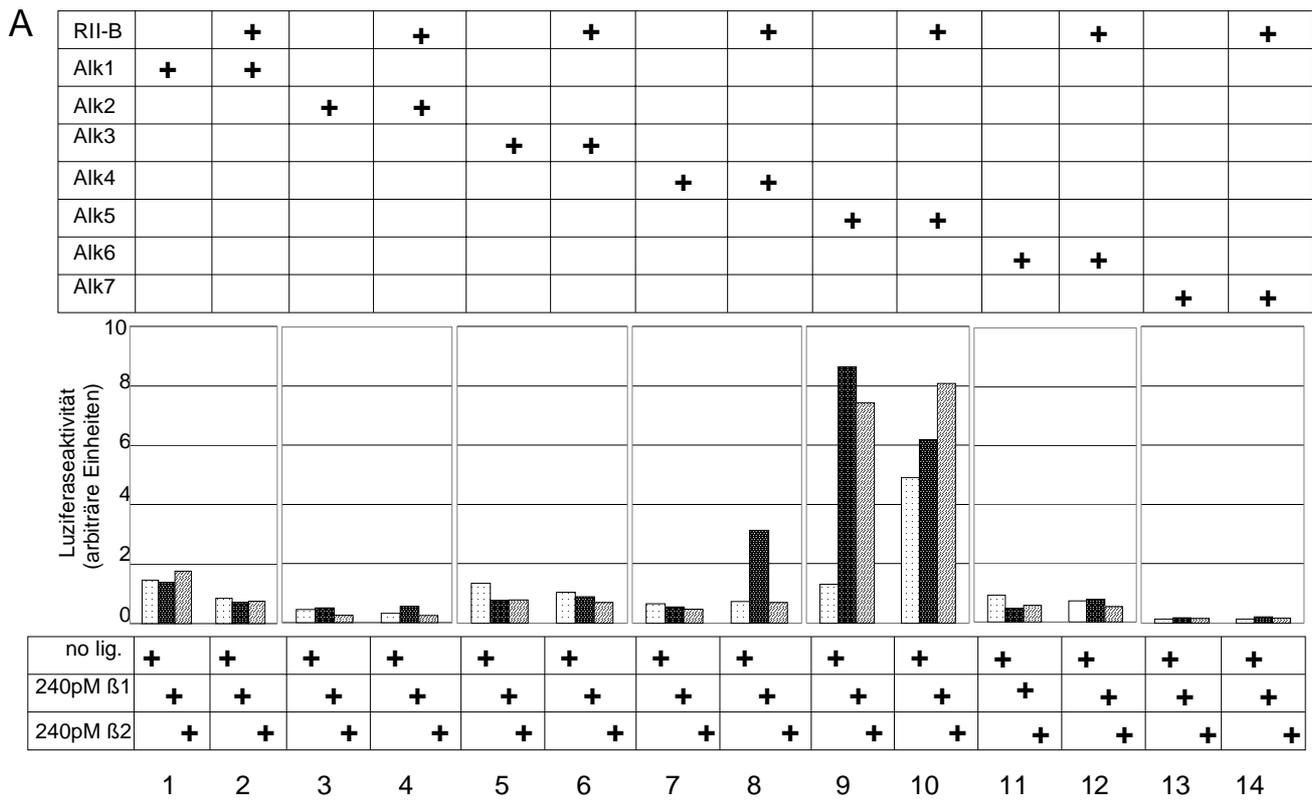


Abb.29A+B Reporterexperimente in R1b/L17 Zellen zur T β RII-B Signalweiterleitung über die verschiedenen Alks. (A) Messung der Induktion des p3TP-luc Reportergens. (B) Messung der Induktion des pSBE-luc Reportergens. Es ist angegeben welche DNA transfiziert und mit welchen Liganden stimuliert wurde.

A.II.9.3. Untersuchungen zum pSBE-luc-Reporterengenkonstrukt

Wie bereits erwähnt wird das pSBE-luc Reportergen durch Transfektion unterschiedlicher Alks, wie z.B. Alk 1, Alk 3, Alk 4 und Alk 6, ligandenunabhängig induziert (vgl. Abb.29B). Diese Induktion wird durch Zugabe von TGF- β nur geringfügig verändert, in den meisten Fällen verringert. Aufgrund dieser Beobachtung stellte man sich die Frage, ob das verwendete pSBE-luc Konstrukt möglicherweise ‚kryptische‘, durch anderweitige Transkriptionsfaktoren aktivierbare Promotorregionen beinhaltet, die eine Expression des Luziferasegens unabhängig vom Smad-Pathway initiieren können [203]. In einem derartigen Fall, würde ein Fehlen der SBE₄-Region im Konstrukt die beobachteten Luziferase-Signale nicht beeinflussen, da diese über Bindung anderer Faktoren an entsprechende DNA-Sequenzen induziert würden. Um dies zu überprüfen wurde die Smad-Bindungsstelle (SBE₄) aus dem pSBE-luc Reporterkonstrukt durch Restriktionsverdau mit den Enzymen Xho I und Bgl II entfernt. Die entstandenen Schnittstellen wurde mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt und anschließend religiert. Die Richtigkeit des Plasmids der hergestellten Reportergen-Variante, pSBE-luc(-), wurde durch Sequenzierung überprüft.

PSBE-luc(-) wurde dann in verschiedenen Reportergenexperimenten, die in Abb.30 aufgeführt sind, eingesetzt. Zum einen wurde die TGF- β responsive Zelllinie Mv1Lu mit den Reportergenkonstrukten pSBE-luc bzw. pSBE-luc(-) in Kombination mit pRL-TK über Lipofectamin transfiziert (Abb.30, Grafik A). Stimuliert wurde sowohl mit TGF- β 1 als auch TGF- β 2. In weiteren Ansätzen wurden R1b/L17 Zellen verwendet. Diese wurden neben den angegebenen Reportergenen jeweils mit Alk 5, Alk 4 und Alk 6 co-transfiziert (Abb.30, Grafik B, C und D). Die Messungen der Luziferaseaktivitäten im Fall von transfiziertem pSBE-luc sind mit den Ergebnissen in Abb.29B vergleichbar. Transfektion von pSBE-luc(-) hingegen führt in R1b/l17 Zellen zu fast vollständiger Reduktion des Luziferase-Signals, unabhängig von Alk-Expression und TGF- β Stimulation. Im Fall von Mv1Lu Zellen sinkt die Luziferaseaktivität auf die Stufe unstimulierter Zellen. Aufgrund des Ausbleibens der Luziferase-Expression bei Verwendung der pSBE-luc(-) Variante, ist die beobachtete ligandenunabhängige Luziferase-Expression bei Alk 4 oder Alk 6 Transfektion in R1b/L17 Zellen nicht auf ‚kryptische‘ Bindungsstellen im Reportergenplasmid zurückzuführen, sondern entsteht über eine Aktivierung der SBE₄-Region des Luziferase-Konstruktes.

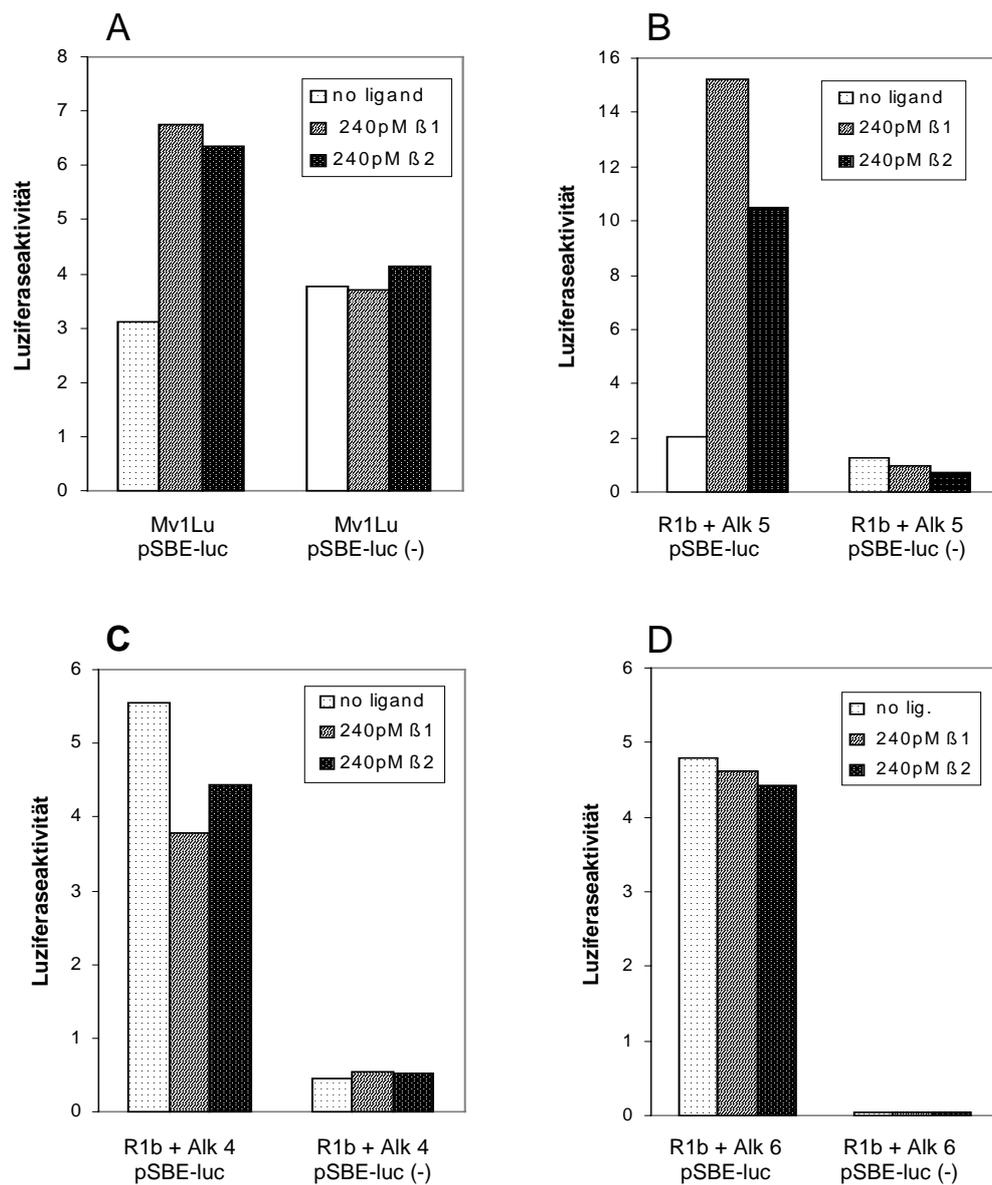


Abb.30 Luziferase-Messungen zur Induzierbarkeit des pSBE-luc Reportergens. Es wurden Mv1Lu Zellen (Grafik A), sowie R1b/L17 Zellen (Grafiken B-D) verwendet. Für die Transfektion eingesetzte DNAs und verwendete Liganden sind den Beschriftungen zu entnehmen. Die Luziferaseaktivitäten sind in arbiträren Einheiten angegeben.

A.II.10. Untersuchungen zur Spezifität dominant negativer TGF- β Typ II Rezeptoren (Δ cyt-Mutanten)

Zur Inhibierung von Genfunktionen auf Proteinebene werden häufig Proteinmutanten eingesetzt, die auf ihr wildtypisches Gegenstück dominant negativ wirken. Im Hinblick auf den TGF- β Typ II-B Rezeptor stellt sich die Frage, ob die verkürzte Form des TGF- β Typ II Rezeptors (T β RII- Δ cyt), deren dominant negative Wirkungsweise gegenüber T β RII gezeigt ist, auch mit dieser alternativ gespleißten Rezeptorvariante interagiert und sie in ihrer Funktion inhibiert. Falls dies nicht so ist, wären bisherige T β RII- Δ cyt Experimente in Frage zu stellen, da dann nicht von einer vollständigen bzw. gleichwertigen Unterdrückung der TGF- β Signale ausgegangen werden kann.

Die Spezifität von T β RII- Δ cyt sowie von T β RII-B- Δ cyt, einem analog trunkierten T β RII-B Rezeptors, ist im Hinblick auf ihre wildtypischen Interaktionspartner von großem Interesse, da so eventuell Untersuchungen zur spezifischen T β RII- bzw. T β RII-B-vermittelten Signalübertragung und Genexpression durchführbar werden. Wenn durch Überexpression von T β RII-B- Δ cyt ein spezifisches Ausschalten des TGF- β Typ II-B Rezeptors in einzelnen Geweben möglich wäre, könnten anhand von phänotypischen Auswirkungen, Rückschlüsse auf die spezifische Funktion dieses Rezeptors in einem bestimmten Gewebe gezogen werden. Ebenfalls von Interesse ist in diesem Zusammenhang die Isoformspezifität des Typ II-B Rezeptors, da möglicherweise durch Inhibierung von T β RII-B ein Wirken von TGF- β 2 unterbunden werden kann. Dies könnte beispielsweise für Zellen, die keinen TGF- β Typ III Rezeptor exprimieren, von Bedeutung sein (z.B. U2OS-Zellen).

A.II.10.1. Herstellung der Δ cyt-Konstrukte

Die trunkierten Rezeptorkonstrukte wurden mit Hilfe von PCR-Mutagenese hergestellt. Hierfür wurden Typ II Rezeptor spezifische Primer hergestellt: DC-1 führt ein Stopcodon anstelle von Ser199 ein, DC-2 ist der entsprechend reverse Primer zu DC-1, DC-3 führt eine BamH1 Schnittstelle ein, um das PCR-Produkt anschließend mit Restriktionsenzymen behandeln zu können. Außerdem wurde der HH-P1 Primer verwendet, welcher vor der Start-AS eine HindIII Schnittstelle einbringt (Primersequenzen siehe Anhang). Als Templates wurden die T β RII-B-HA sowie T β RII-HA Konstrukte (beide in pcDNA1) verwendet, welche über extrazelluläre HA-Epitope verfügen. Es wurden nun PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen

HH-P1/DC-1 sowie DC-2/DC-3 durchgeführt, die Produkte eluiert und in Kombination als Matrize für die folgenden rekombinanten PCRs eingesetzt. Die so erhaltenen Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen Hind III und BamH I verdaut und in den analog geschnittenen Expressionsvektor pcDNA3.1 einligiert. Nach Transformation von DH5 α Bakterien mit den Ligationsansätzen, wurden die gewachsenen Klone mittels analytischer PCR nach Positiven durchsucht. Die Plasmid-DNAs wurden präpariert und die Richtigkeit der Konstrukte mittels Sequenzierung überprüft. Die Vorgehensweise bei der PCR-Mutagenese ist in Abb. 31 schematisch dargestellt.

Die klonierten Δ -cyt-Mutanten von T β RII und T β RII-B, die beide ein HA-Epitop im extrazellulären Bereich (zwischen AS 26 und 27) tragen, konnten für die folgenden Versuche eingesetzt werden.

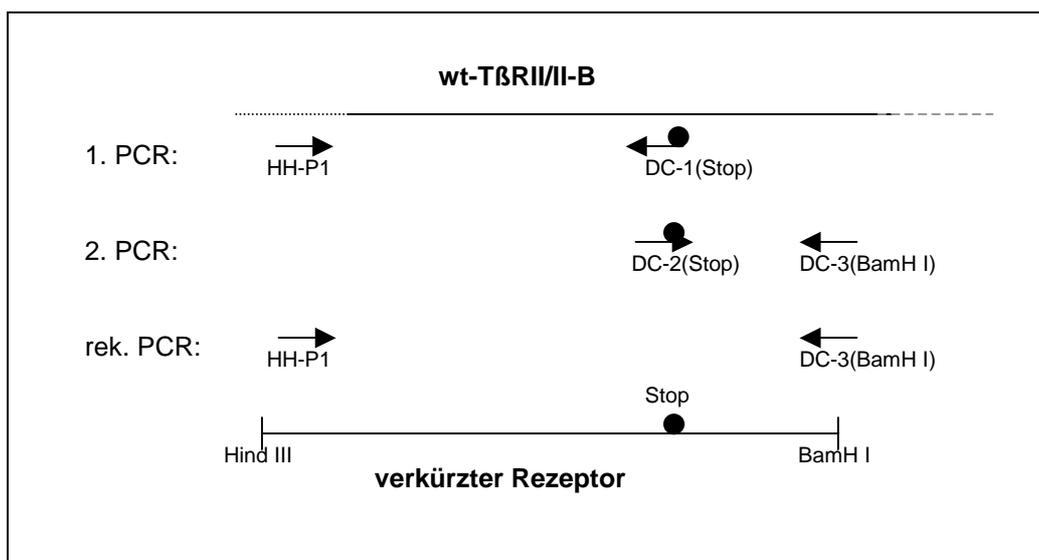


Abb.31 Schema zur Herstellung verkürzter Rezeptorkonstrukte. Durch rekombinante PCR wird nach der juxtamembranen Domäne der Typ II Rezeptoren ein Stopcodon eingeführt, was zu einem verkürzten Polypeptid führt. Durch Primer werden außerdem zusätzliche Schnittstellen eingeführt, um eine anschließende Subklonierung in Expressionsplasmide zu ermöglichen.

A.II.10.2. Proteinexpression von wildtypischen und trunkierten TGF- β Typ II Rezeptoren

Um die Expression der T β RII/-RII-B Δ -cyt-HA Konstrukte, sowie der wt-Rezeptoren (T β RII-HA und T β RII-B-HA) zu testen, wurden COS-7 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. Die wt-

Rezeptoren konnten mit α CRII (erkennt Peptid im zytoplasmatischen Bereich) immunpräzipitiert werden. Für T β RII-B- Δ cyt-HA wurde der Typ II-B spezifische Antikörper α hRII-B verwendet, während T β RII- Δ cyt-HA nur mit α HA detektiert werden konnte. Die Expression aller vier Konstrukte konnte im anschließenden Western-Blot mit α HA nachgewiesen werden (Abb.32, Spalten 2-5).

Im Gleichen experimentellen Ansatz wurde versucht, eine ligandenunabhängige Oligomerisierung der wt-Rezeptoren mit den trunkierten Mutanten zu detektieren. COS-7 Zellen wurden hierfür mit Rezeptorkombinationen wie in Abb.32, Spalten 6-8 angegeben, transfiziert und die wt-Rezeptoren mit α CRII immunpräzipitiert. Im anschließenden Western-Blot mit α HA sollten neben den wt-Rezeptoren die co-präzipitierten trunkierten Rezeptoren sichtbar gemacht werden. Jedoch erscheinen neben den Signalen für die wt-Rezeptoren keine die den Δ -cyt-Mutanten entsprechen. Ein Nachweis der Oligomerisierung scheint in einem derartigen Versuchsansatz nicht möglich.

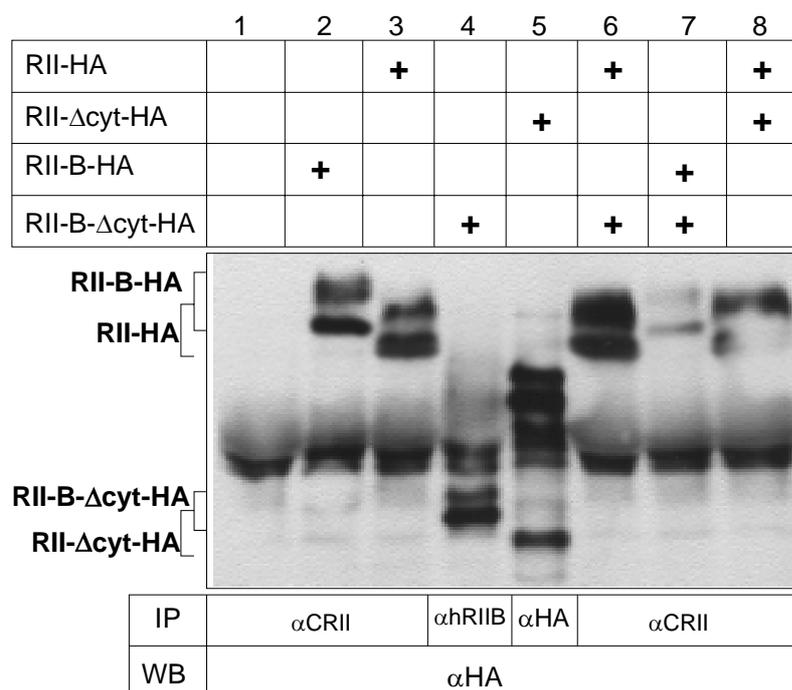


Abb.32 In WB-Experimenten mit vorangegangener Immunpräzipitation konnte die Expression der wt-Rezeptoren sowie der Δ -cyt Mutanten in COS-7 Zellen nachgewiesen werden. Oligomerisierung von ‚full-length‘ Rezeptoren und verkürzten Rezeptoren konnte nicht gezeigt werden.

A.II.10.3. Expression von T β RII-B- Δ cyt-HA an der Zelloberfläche und ligandenabhängige Oligomerisierung

Zur Detektion des T β RII-B- Δ cyt-HA an der Oberfläche wurde ein Bindungs- und Crosslinking-Experiment mit [125 I]-TGF- β 1 durchgeführt. Außerdem sollte so die Fähigkeit zur Ligandenbindung überprüft werden. COS-7 Zellen wurden hierfür mit T β RII-B- Δ cyt-HA (Abb.33, Spalte 1), sowie zur Kontrolle mit T β RII-B-HA (Abb.33, Spalte 2), transfiziert. Das Labelling erfolgte mit 360 pM [125 I]-TGF- β 1, die Immunpräzipitation mit dem Typ II-B spezifischen Antikörper α hRII-B. Die Proteine wurden anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennt und konnten autoradiographisch sichtbar gemacht werden. Es konnte so gezeigt werden, daß sowohl T β RII-B- Δ cyt-HA als auch T β RII-B-HA an der Zelloberfläche exprimiert werden und in der Lage sind den Liganden TGF- β 1 zu binden.

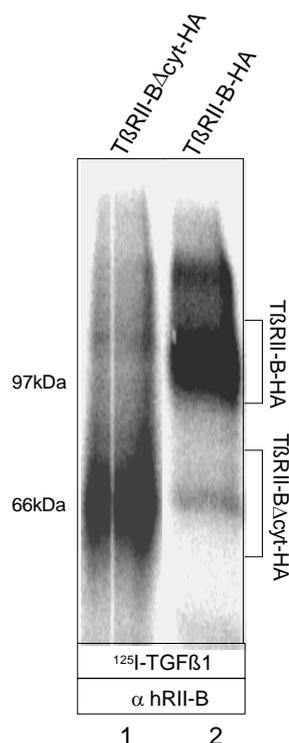


Abb.33 Bindungs- und Crosslinking-Experiment zum Nachweis der Oberflächenexpression von T β RII-B Δ cyt-HA in COS-7 Zellen.

In einem weiteren Ansatz wurden T β RII-B-HA und T β RII-B- Δ cyt-HA co-transfiziert (Abb.34) um eine ligandeninduzierte Komplexbildung der Rezeptoren nachzuweisen. Die Immunpräzipitation wurde sowohl mit α HA als auch mit α CRII durchgeführt. Durch Verwendung von α CRII war es möglich beide Rezeptoren im Komplex nachzuweisen (Abb.34, Spalte 2), α HA lieferte nur ein Signal, das der trunkierten

Form des Rezeptors entsprach (Abb.34, Spalte 1). Daraus ist zu schließen, daß T β RII-B und T β RII-B- Δ cyt nur durch Zugabe von TGF- β 1 einen nachweislichen Komplex bilden.

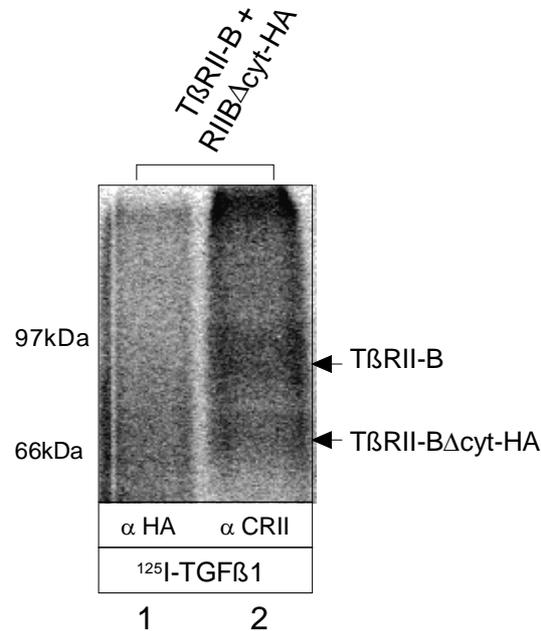


Abb.34 Nachweis der Komplexbildung aus T β RII-B und T β RII-B- Δ cyt-HA an der Zelloberfläche. Hierfür wurde ein Bindungs- und Crosslinking Experiment an COS-7 Zellen durchgeführt.

A.II.10.4. Reportergergen Messungen zur dominant negativen Wirkung von T β RII- Δ cyt und T β RII-B- Δ cyt-HA

Zur Untersuchung der inhibitorischen Aktivität der trunkierten Rezeptoren wurden Luciferase-Reportergergen-Experimente durchgeführt. DR-26 Zellen wurden hierbei mit dem p3TP-luc Reportergergen, sowie dem pRL-TK Referenzplasmid transfiziert. Zusätzlich wurden die Typ II Rezeptoren (T β RII und T β RII-B) alleine oder zusammen mit den trunkierten Konstrukten in die Zellen eingebracht (vgl. Abb.35). Nach Stimulation der Zellen mit 240 pM TGF- β 1 bzw. TGF- β 2, wurde deren Luziferase-Expression gemessen. TGF- β Typ II Rezeptoren sind in der Lage TGF- β Responsivität in DR-26 Zellen wiederherzustellen (Abb.35, Spalten 2 und 6). Ein Rückgang der Luziferaseaktivität bei Co-Transfektion von T β RII- Δ cyt-HA (Abb.35, Spalten 3 und 7) oder T β RII-B- Δ cyt-HA (Abb.35, Spalten 4 und 8) weist auf den dominant negativen Effekt dieser Konstrukte hin. Auffällig ist das Auftreten stimulationsunabhängiger Luziferase-Expression bei Transfektion der Typ II

Rezeptoren (Abb.35, Spalten 2 und 6), was vermutlich auch einen Überexpressionseffekt und/oder auf vermehrtes Vorhandensein von TGF- β im Medium zurückzuführen ist. Aufgrund der Reduktion dieser Luziferase-Signale bei Co-Transfektion der Δ -cyt-Mutanten (vgl. Abb.35, Spalten 2, 3, 4, 6, 7 und 8, weiße Säulen) wird hier indirekt der Nachweis für eine ligandenunabhängige Komplexbildung von ‚full-length‘ und verkürzten Rezeptoren erbracht.

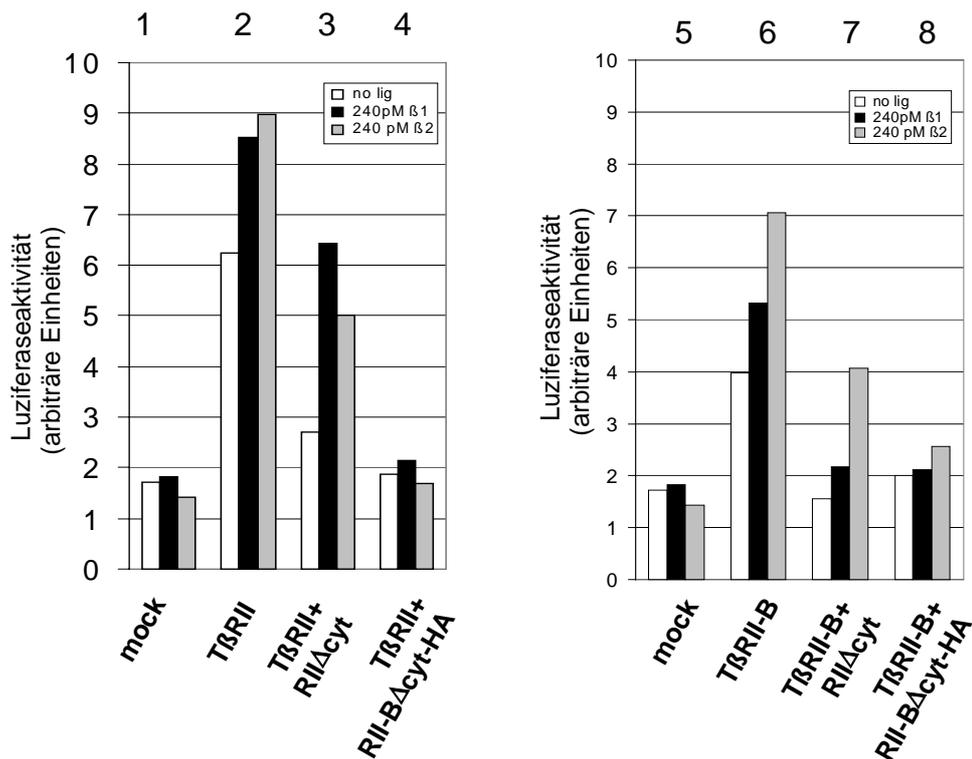


Abb.35 Reportergerananalyse zur dominant negativen Wirkungsweise der Δ -cyt Mutanten der Typ II Rezeptoren in DR-26 Zellen. Die Daten wurden bezüglich der pRL-TK Aktivität relativiert und repräsentieren ein Mittel aus drei unabhängigen Experimenten.

A.III. Diskussion

A.III.1. Klonierung von T β RII-B und alternatives Spleißen

Bei der Durchführung von RT-PCR Reaktionen zur Untersuchung des TGF- β Typ II Rezeptors in verschiedenen Zelllinien wurde mit einer bestimmten Primerkombination (P1/P5) neben dem erwarteten Produkt ein zusätzliches, größeres Produkt amplifiziert (s. Abb.10). Nach Aufreinigung und Sequenzierung konnte es als cDNA des TGF- β Typ II-B Rezeptors identifiziert werden. Die beiden Rezeptor-Typen (T β RII und T β RII-B) unterscheiden sich in einer Insertion von 75 bp bzw. 25 AS im extrazellulären Bereich des Proteins (s. Abb.11). Durch weiterführende Sequenzierungen der vollständigen Rezeptor-cDNA konnten keine Verkürzungen oder anderweitigen Sequenzunterschiede zwischen den beiden Typ II Rezeptoren festgestellt werden (Daten werden hier nicht gezeigt), woraus hervorgeht, daß es sich bei T β RII-B um eine gespleißte Form des *t β rII* Gens handeln muß. Wären im Laufe der Evolution durch Genduplikation zwei unterschiedliche Gene entstanden, so müßten sich durch Auftreten spontaner Mutationen die Gensequenzen an mehreren Stellen unterscheiden. Die Sequenz von T β RII-B wurde bereits 1994 von drei unterschiedlichen Arbeitsgruppen in Mensch und Maus beschrieben (s. A.I.5.). Alle drei vermuteten, daß die Entstehung des T β RII-B auf alternatives Spleißen zurückzuführen ist [191] [129] [192]. Die Hypothese vom alternativen Spleißen bestärkte sich außerdem bei Betrachtung der Exon-Intron-Struktur des *t β rII* Gens sowie durch PCR an genomischer DNA (s. A.II.3.). Die T β RII-B-spezifische Insert-Sequenz konnte als Bestandteil der Intron-1-Sequenz im *t β rII* Gen identifiziert werden. Im Fall von T β RII wird das vollständige Intron 1, und somit auch die II-B-Insert-Sequenz aus der RNA geschnitten. Alternatives Spleißen wird möglich, wenn die II-B-Insert-Grenzen als neue Spleiß-Donor und –Akzeptor Stellen erkannt werden. Die Insert-Sequenz wird somit zu einem weiteren kleinen Exon, welches das Intron 1 in zwei Teile teilt (Intron IA und Intron IB) und in der mRNA erhalten bleibt (s. Abb.14). Ob für diesen alternativen Spleißvorgang spezielle Faktoren vorhanden sein müssen und ob die Existenz dieser Spleißfaktoren für das Auftreten alternativer Spleißformen limitierend ist, ist noch ungeklärt.

A.III.2. Ligandenbindung und Komplexbildung

A.III.2.1. Ligandenbindungsmodus von T β RII-B

Die drei in Säugern identifizierten TGF- β Isoformen zeigen auffallend große Sequenzhomologien, unterscheiden sich jedoch stark in ihren *in vivo* Funktionen wie sich anhand der einzelnen Gen-Knockout-Phänotypen erkennen läßt (s. A.I.1.). Es muß also ein gewisser evolutionärer Druck bestanden haben, durch den einerseits Differenzen entwickelt und gleichzeitig Ähnlichkeiten aufrecht erhalten wurden. Unterschiede der TGF- β Isoformen zeigen sich u.a. bei der Bindung an ihre Rezeptoren. So kann die TGF- β 2 Isoform nicht direkt an T β RII binden [185] sondern benötigt die Co-Expression des Typ III Rezeptors und dessen ligandenpräsentierende Funktion (s. A.I.4.2.) [176] [193]. Aufgrund dieses unterschiedlichen Bindungsverhaltens der TGF- β Isoformen wurde in einigen Bindungs- und Crosslinking Experimenten das Bindungs- und Interaktionsverhalten von T β RII-B im Vergleich zu T β RII untersucht. Es konnte hierin gezeigt werden, daß T β RII-B im Gegensatz zu T β RII alle TGF- β Isoformen, bemerkenswerterweise auch TGF- β 2, ohne Mithilfe eines weiteren Rezeptortyps bindet (s. A.II.4.). Die N-terminale Insertion des T β RII-B scheint für dieses unterschiedliche Bindungsverhalten verantwortlich zu sein, erhöht aber nicht unspezifisch die Affinität gegenüber allen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie, da z.B. keine Bindung an Aktivin oder BMP festgestellt werden konnte (Abb.15). In weiterführenden Co-Expressionsstudien konnte die Interaktion des T β RII-B mit T β RI und T β RIII in Anwesenheit aller drei Isoformen nachgewiesen werden. Nachdem es offensichtlich zu einer Heterooligomerisierung von T β RII-B und T β RIII kommt, die eigentlich für eine TGF- β 2 Bindung nicht erforderlich ist, stellt sich die Frage, ob der Ligandenbindung über das Heterooligomer eine andere physiologische Bedeutung zukommt als der direkten Bindung. Es konnte in diesen Versuchen wiederholt bestätigt werden, daß T β RII nur in Anwesenheit eines co-exprimierten Rezeptors, T β RI oder T β RIII, in der Lage ist TGF- β 2 zu binden (Abb.16A und B). Von Rodriguez et al. (1995) wurde postuliert, daß neben T β RIII ein Vorhandensein präformierter Komplexe aus T β RII und T β RI essentiell für die TGF- β 2 Bindung ist [31]. Die Beobachtung, daß *in vivo* die Mehrheit der Typ I und II Rezeptoren als Homodimere und nicht als Heterooligomere in Abwesenheit des Liganden an der Zelloberfläche vorhanden sind, spricht allerdings gegen diese Theorie [194] [195]. Bindung von TGF- β 2 an den T β RII/T β RI

Rezeptorkomplex kann zwar durch Co-Expression der Rezeptoren in COS-7 Zellen erreicht werden, ist aber vermutlich auf die starke Überexpression der Rezeptoren und teilweise auf endogenes Vorhandensein von T β RIII zurückzuführen. Rodriguez stützt seine Theorie der vorgeformten Komplexe auf eine Beobachtung von Lopez-Casillas et al., der auch in Abwesenheit von T β RIII eine gewisse wachstumsinhibierende Wirkung von TGF- β 2 in L₆E₉ Zellen nachweisen konnte [176]. Ob dieser TGF- β 2 Effekt über den sehr geringen Anteil präformierter T β RII/T β RI Komplexe und/oder über direkte Bindung an T β RII – immerhin ist eine gewisse, wenn auch geringe Affinität des T β RII gegenüber TGF- β 2 vorhanden - oder über Bindung an T β RII-B, dessen Expression nie überprüft wurde, vermittelt wird, ist jedoch ungeklärt [167] [186].

In Mv1Lu und R1b/L17 Zellen, also Zellen, in denen die TGF- β Rezeptoren endogen exprimiert werden (R1b/L17 Zellen verfügen über T β RII und T β RIII, aber keinen funktionalen Typ I Rezeptor [204]), konnte nochmals bestätigt werden, daß eine Bindung von TGF- β 2 an T β RII nicht essentiell von dem Vorhandensein eines Typ I Rezeptors und präformierter Komplexe abhängig ist, aber durchaus von der T β RIII Expression (s. Abb.17). Denn wie in Mv1Lu Zellen ist auch in R1b/L17 Zellen trotz Fehlen von T β RI eine TGF- β 2 Bindung an den Typ II Rezeptor detektierbar. Dies ist nicht verwunderlich, da Mv1Lu und abgeleitete Zelllinien, wie R1b/L17 und DR-26, nachweislich das T β RIII Polypeptid exprimieren (vgl. Abb.24). Nachdem in diesen Zelllinien kein TGF- β Typ II-B Rezeptor detektierbar ist (vgl. Abb.22), ist hier das Vorhandensein von T β RIII für die β 2 Bindung und Signalübertragung von großer Wichtigkeit.

Erwähnt sei an dieser Stelle, daß aufgrund der Eigenschaft von Endoglin kein TGF- β 2 binden zu können [205], hier der Versuch unternommen wurde herauszufinden, ob die Co-Expression von T β RII-B die Bindung von TGF- β 2 an Endoglin ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde ein Bindungs- und Crosslinking-Experiment mit [¹²⁵I] TGF- β 2 in COS-7 Zellen durchgeführt, bei dem Endoglin mit T β RII-B co-transfiziert wurde. Es ging daraus hervor, daß eine Bindung von TGF- β 2 an Endoglin auch in Anwesenheit von T β RII-B ausbleibt. Dieses Experiment muß aus Gründen der Reproduzierbarkeit wiederholt werden und ist daher im Ergebnisteil nicht aufgeführt.

A.III.2.2. Oligomerisierungsverhalten von T β RII-B

In einem weiteren Ansatz wurde die Oligomerisierung der Typ II Rezeptoren, T β RII-B und T β RII, untereinander untersucht. In Anwesenheit von Liganden wurde hierbei versucht, Komplexe aus Epitop-markierten und unmarkierten Rezeptoren in aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, daß ligandenabhängig Heterooligomere aus T β RII und T β RII-B gebildet werden und daß diese Komplexe in der Lage sind sowohl TGF- β 1 als auch TGF- β 2 zu binden (s. Abb.18). Demnach reicht eine einzelne Rezeptor-Untereinheit des T β RII-B aus um eine TGF- β 2 Bindung an beide Rezeptorketten, auch die des T β RII, zu ermöglichen. Mit welcher Signifikanz diese heterooligomeren Komplexe in endogen exprimierenden Zellen auftreten und welche physiologische Bedeutung ihnen zukommt, ist ungeklärt. Es ist allerdings durchaus denkbar, daß durch diese Art der Rezeptor-Heterodimerisierung eine erhöhte Variabilität bei der Signalübertragung erreicht werden kann.

Es existieren neben TGF- β Homodimeren auch TGF- β Heterodimere (TGF- β 1.2 und TGF- β 2.3) *in vivo*, die sich aus zwei in ihrer Struktur leicht unterschiedlichen Monomeren zusammensetzen. Ein Liganden-Heterodimer, wie z.B. TGF- β 1.2, stellt somit bezüglich Bindungseigenschaften und Signalübertragungspotenz eine Zwischenstufe zwischen TGF- β 1 und TGF- β 2 dar. Daher ist TGF- β 1.2, verglichen mit TGF- β 2, zu einer stärkeren Bindung an T β RII fähig, erreicht aber trotzdem nicht die Qualität einer reinen TGF- β 1-Bindung [196] [206]. Rezeptor-Heterodimere wie T β RII/T β RII-B, deren Untereinheiten unterschiedliche Affinitäten gegenüber den einzelnen TGF- β Isoformen zeigen, könnten demnach ideale Signalübertragungsrezeptoren für heterodimere Liganden darstellen.

Versuche, diese Rezeptor-Heterooligomerisierung in Abwesenheit von Liganden mittels IP/WB-Experimenten nachzuweisen, scheiterten. Ebenso war es nicht möglich mit dieser Methode eine ligandenunabhängige Homodimerisierung, wie sie für T β RII bekannt ist, auch für T β RII-B zu zeigen. Es war schon immer problembehaftet oligomere Komplexe der TGF- β Typ II Rezeptoren (auch des Typ III Rezeptors, [193]) aufgrund ihrer labilen Konstitution ohne stabilisierende Unterstützung eines chemisch vernetzten Liganden nachzuweisen. Diese Rezeptorkomplexe halten keiner Behandlung mit Detergenzien, wie sie bei der Zellyse verwendet werden, stand und sind daher mit üblichen Immunpräzipitationsprotokollen kaum detektierbar. Auch Versuche bei denen mit

Hilfe zusätzlicher Proteinmarkierung, wie Biotinylierung oder [³⁵S]-Labelling, selbst geringe Rezeptor-Mengen sichtbar gemacht werden könnten, schlugen daher fehl. Nachweise zur ligandenunabhängigen Homooligomer-Bildung von TβRII konnten auch von anderen Arbeitsgruppen nur unter Verwendung von Techniken wie FACS-Analyse, Sucrose-Gradienten-Zentrifugation oder Co-Patching durchgeführt werden [207] [194] [193]. In dieser Arbeit wurde allerdings anhand von Reporterstudien mit dominant negativen Rezeptorkonstrukten, die in Punkt A.III.10.4. beschrieben sind, indirekt ligandenunabhängige Homo- und Heterooligomerisierungen gezeigt. In weiterführenden Experimenten soll aber auch mittels Co-Patching-Studien die Homo- und Heterooligomerisierungen des TGF-β Typ II-B Rezeptors genauer zu analysiert werden.

A.III.3. Analyse der TGF-β2 Bindung an TβRII-B

A.III.3.1. Alternative Ligandenbindungsstellen am Typ II-B Rezeptor ?

Die Insertion des TβRII-B, die auf alternatives Spleißen zurückzuführen ist, macht einen entscheidenden strukturellen Unterschied zwischen den beiden Typ II Rezeptoren aus und beeinflusst mit großer Wahrscheinlichkeit das Bindungsverhalten des TβRII-B. TGF-β2, wie auch die anderen Isoformen, werden an diesen Rezeptor, im Gegensatz zu TβRII, hochaffin gebunden. Dies ließe sich durch eine Veränderung innerhalb der Ligandenbindungsstelle oder durch eine andere Lokalisierung dieser Bindungsstelle erklären. Die Insertion des TβRII-B enthält zwei Cystein-Reste und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (Asn48), also Aminosäuren, die für den strukturellen Charakter einer potentiellen neuen Bindungsstelle wichtig sind und diese somit favorisieren. Der Austausch dieser AS-Reste gegen Alanin zeigt jedoch keine signifikanten Veränderungen im TGF-β2-Bindungspotential dieser TβRII-B-Konstrukte (s. A.II.6.1. und A.II.6.2.). Ebenso wird die Fähigkeit mit TβRI zu interagieren nicht beeinflusst (Daten sind unter A.III. nicht gezeigt).

Alternativ sollte mit Hilfe von Tunicamycin, einem deglykosylierenden Agens, die Wichtigkeit der zusätzlichen N-Glykosylierungsstelle des TβRII-B für die TGF-β Bindung untersucht werden. Von Wells et al. (1997), wurde bereits gezeigt, daß Tunicamycin-Behandlung transfizierter COS-7 Zellen die Bindung von TGF-β1 an TβRII nicht beeinträchtigt [208]. Vergleichbare Ergebnisse zur Bindung von TGF-β1

und TGF- β 2 wurden mit Tunicamycin-behandelten TGF- β Typ II-B Rezeptoren erzielt. Das ist ein weiteres Indiz dafür, daß Asn48 keinen entscheidenden Einfluß auf die Ligandenbindung hat (dieses Experiment wurde von M. Roth, Biozentrum Würzburg durchgeführt, die Daten sind aber im Ergebnisteil nicht enthalten).

Nachdem das T β RII-B Konstrukt N-terminal nur wenige AS vor der Insert-Sequenz mit einem HA-Epitop versehen wurde (s. A.II.2.), ergab sich die Fragestellung ob diese Modifikation – nahe der vermuteten ‚neuen‘ Ligandenbindungsstelle - möglicherweise die Bindungseigenschaften dieses Rezeptors verändert. Aufgrund eventueller gegenseitiger Behinderung von Epitop und Insert, wäre eine Verschlechterung der Zugänglichkeit zum Epitop, bzw. der Erkennung des Epitops durch den Antikörper durchaus vorstellbar. In Punkt A.II.6.3. ist der Versuch beschrieben, durch den gezeigt werden konnte, daß die Bindung von Antikörpern nahe der potentiellen T β RII-B Ligandenbindungsstelle mit der TGF- β 1 Bindung interferiert, und daß dies vermutlich auf gegenseitiger sterischer Hinderung der beiden Epitope (HA-Epitop und Insert) begründet ist.

In früheren Publikationen zum Thema T β RII-B, die kurz in der Einleitung beschrieben sind, wurde, wenn auch nur wenig detailliert, auf die Bindungs- und Signaleigenschaften der verschiedenen TGF- β Isoformen eingegangen. Hirai und Fujita haben beispielsweise den Versuch unternommen in einem Bindungs- und Crosslinking-Experiment die TGF- β 1 Bindung an T β RII-B durch einen Überschuß an TGF- β 2 zu kompetieren (s. Abb.36). Da keine Konkurrenz nachweisbar war, wurde postuliert, daß T β RII-B bezüglich Bindung und Affinität gegenüber den TGF- β Isoformen von T β RII nicht zu unterscheiden ist [129]. Aus den bisher vorgestellten Versuchen geht jedoch klar hervor, daß dieses Ausbleiben der Konkurrenz um die TGF- β 1 Bindung nicht auf eine geringe Affinität des T β RII-B gegenüber TGF- β 2 zurückzuführen ist (T β RII-B bindet TGF- β 2 direkt ohne Beisein eines anderen Rezeptors). Das Ergebnis von Hirai und Fujita gibt vielmehr einen Hinweis auf die Existenz unterschiedlicher Bindungsstellen für die TGF- β Isoformen. Um diese Theorie zu bestärken, wäre es sinnvoll den Konkurrenzversuch mit ‚vertauschten Rollen‘ erneut durchzuführen, d.h. es sollte getestet werden, ob sich TGF- β 2 durch einen Überschuß an TGF- β 1 vom Rezeptor verdrängen ließe.

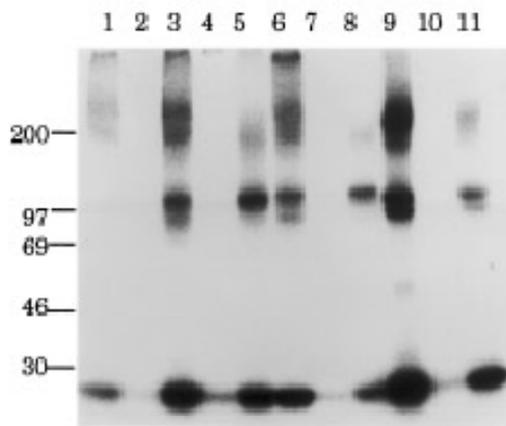


Abb.36 Wettbewerbsversuch (Fig.3A aus Hirai und Fujita (1996)). 293T Zellen wurden mit leerem pEF Vektor (Spalten 1 und 2), mit T β RII- (Spalten 3 –5) und T β RII-B-Konstrukten (Spalten 6-8) transfiziert, und mit [125 I] TGF- β 1 affinitätsmarkiert. Es erfolgte ein Wettbewerbsversuch mit 200fachem Überschuß an TGF- β 1 (Spalten 2, 4 und 7) sowie TGF- β 2 (Spalten 5 und 8). Zu den Ansätzen 1, 3 und 6 wurde kein Kompetitor gegeben. Ein Überschuß an nicht-radioaktivem TGF- β 1 führte zum Verschwinden der radioaktiven Signale für Typ II und Typ III Rezeptoren, was auf eine Konkurrenz um die TGF- β 1 Bindungsstelle an den Rezeptoren hinweist. Die Zugabe von nicht-radioaktivem TGF- β 2 führte zwar zu Verringerung der T β RII-Signalstärke, änderte aber nichts an den Typ II Rezeptor-Signalen. In den Ansätzen 9-11 wurden Mv1Lu Zellen verwendet, um einen vergleichbaren Nachweis in endogen exprimierenden Zellen zu erbringen. Hierbei wurden in den Ansätzen 10 und 11 TGF- β 1 bzw. TGF- β 2 im Überschuß eingesetzt, Ansatz 9 enthält hingegen keinen potentiellen Kompetitor.

Bei dem Versuch von Hirai und Fujita fällt außerdem das Verschwinden des T β RIII Signals nach TGF- β 2 Gabe auf (Abb.36, Spalten 5 und 8). Die Bindung von TGF- β 1 an T β RIII kann somit im Gegensatz zur Bindung an T β RII-B durch TGF- β 2 kompetiert werden. TGF- β 2 interagiert also mit T β RIII, was vermuten läßt, daß auch eine Überführung zum Typ II-B Rezeptor stattgefunden hat und einen weiteren Hinweis auf die Existenz einer alternativen TGF- β 2 Bindungsstelle an diesem Rezeptor gibt. Jedoch ist zu beachten, daß T β RIII geringfügig höhere Affinität zu TGF- β 2 als zu den anderen TGF- β Isoformen aufweist [209] [210], was eine Konkurrenz um die Bindung an T β RIII für TGF- β 2 leicht macht. Über die Affinitäten des T β RII-B zu den TGF- β Isoformen ist jedoch nichts bekannt. Wenn die Affinität gegenüber TGF- β 2 nur wenig schwächer als die gegenüber TGF- β 1 wäre, könnte dies eine Konkurrenz erschweren und würde somit ebenfalls einen möglichen Erklärungsansatz für das beobachtete Ergebnis liefern.

A.III.3.2. Erkenntnisgewinnung durch Strukturanalyse ?

Vergleicht man die Kristallstrukturen der drei TGF- β Isoformen, finden sich, trotz großer Ähnlichkeiten, in einzelnen Strukturelementen durchaus signifikante Differenzen bezüglich Konstellation und Flexibilität, was mit Unterschieden bei der Rezeptorbindung und Signaltransduktion in Verbindung steht [7] [211] [212] [213]. Bei der Gegenüberstellung von TGF- β 1 und TGF- β 2 konnten im Bereich der AS-Reste 69-72 Divergenzen festgestellt werden, die sich in der Ausprägung unterschiedlicher ‚Drehungs-Typen‘ (Typ I ‚turn‘ und Typ II ‚turn‘) manifestieren.

Diese Region des TGF- β Moleküls ist an der Rezeptorbindung beteiligt und Veränderungen in diesem Bereich sind daher möglicherweise von funktionaler Signifikanz [214] [215]. Weiterhin wurden die AS-Reste 92-95 bei der Erkennung der extrazellulären Domäne des Typ II Rezeptors für wichtig befunden [216]. Dieser Bereich stellt eine Oberflächen-exponierte Struktur der TGF- β Proteine dar und unterscheidet sich in TGF- β 1 und - β 2 bezüglich seiner Konformation. Es ist durchaus möglich, daß dieser strukturelle Unterschied die Affinitäten zwischen Ligand und Rezeptor (T β RII zeigt eine bis zu 100-fach höhere Affinität gegenüber TGF- β 1 im Vergleich zu TGF- β 2) sowie die Qualität der Interaktion beeinflusst. Es konnten neben den genannten noch weitere Regionen mit kritischen AS-Resten identifiziert werden, die sich in den TGF- β Isoformen unterscheiden und möglicherweise zur Spezifität der TGF- β Funktionen beitragen [213].

Um genaue Aussagen über die Beteiligung einzelner AS-Reste bei der Interaktion von Ligand und Rezeptor machen zu können, müssen strukturelle Analysen der Komplexe unter Verwendung von NMR-Messungen oder X-ray-Kristallographie vorgenommen werden. Über die Struktur der Rezeptoren der TGF- β Familie ist bisher relativ wenig bekannt. So ist der murine ActRII der einzige Typ II Rezeptor, über den strukturelle Informationen vorhanden sind [217]. Erst kürzlich konnte die Struktur des BMP-2/BMPRI-A Komplexes aufgeklärt werden, woraus eine Vielzahl an Informationen über die an der Ligandenbindung beteiligten AS-Reste und über Konformationen struktureller Elemente gewonnen werden konnten [218].

Von Hinck et al. wurde die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des TGF- β Typ II Rezeptors (ecT β RII) im Komplex mit TGF- β 3 aufgelöst [294]. Hieraus geht hervor, daß insgesamt elf Reste des ecT β RII und neun Reste des TGF- β 3 an der Komplexbildung beteiligt sind. Die AS-Reste der Rezeptoren sind in verschiedenen Spezies identisch, innerhalb der TGF- β Rezeptor-Familie ist die Konservierung an homologen Positionen jedoch variabel. Auf Seite der Liganden sind nur im Fall von TGF- β 2 drei AS-Reste, die an der Interaktion beteiligt sind, ausgetauscht (Arg25(β 1/ β 3) zu Lys(β 2), Val92(β 1/ β 3) zu Ile(β 2), Arg94(β 1/ β 3) zu Lys(β 2)). Man geht davon aus, daß die verringerte Affinität von T β RII gegenüber TGF- β 2 teilweise auf den Verlust dieser günstigen Interaktionen begründet ist [213] [212]. Direkte und indirekte Interaktionen zwischen T β RII und TGF- β 3 erstrecken sich über einen breiten Bereich der extrazellulären Rezeptorsequenz (beteiligte AS: Leu27, Phe30,

Ile 50, Thy51 und Ile53). Im Fall des TGF- β Typ II-B Rezeptors kommt es durch die Insertion von 25 AS zu einer bedeutenden strukturellen Veränderung des extrazellulären Proteinsegments, was somit mit großer Wahrscheinlichkeit die sehr diffizile Ligand-Rezeptor Interaktion entscheidend beeinflusst.

Weiter ist zu berücksichtigen, daß u.a. die Ergebnisse aus Mutationsanalysen sowie das Fehlen konservierter AS-Reste an homologen Regionen der ActRII und T β RII Liganden-Bindungsstellen darauf hinweisen, daß die Rezeptoren der TGF- β Superfamilie mit ihren entsprechenden Liganden über unterschiedliche Bindungsflächen interagieren und die Art der Bindung eine signifikante strukturelle Diversität aufweist [219] [220]. Auch dies spricht für ein im Vergleich zu T β RII abgewandeltes Ligandenbindungsverhalten des TGF- β Typ II-B Rezeptors.

A.III.4. Bedeutung der T β RII-B Expression in Knochengeweben

A.III.4.1. Spezifische Oberflächenexpression von T β RII-B

Die Expression von T β RII-B wurde auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Bindungs- und Crosslinking-Experimenten in Zellen unterschiedlicher Gewebe-Herkunft untersucht (s. A.II.7.). Überraschenderweise wurden abhängig von Zelltyp verschiedene Szenarien für die T β RII-B Expression beobachtet, aus denen hervorgeht, daß vom mRNA-Nachweis nicht automatisch auf das Vorhandensein des Polypeptids an der Zelloberfläche geschlossen werden darf. Es fällt außerdem auf, daß T β RII-B v.a. an der Zelloberfläche verschiedener osteoblastärer Zelllinien detektierbar ist. Beschränkt man sich auf die hier getesteten Zelllinien, so tritt T β RII-B im Vergleich zu T β RII relativ spezifisch auf. Ob diese Spezifizierung allerdings eindeutig als solche bezeichnet werden kann bleibt aufgrund des relativ schmalen Auswahlpektrums an Zelllinien fraglich. Trotzdem ist ein prädominantes Auftreten des TGF- β Typ II-B Rezeptors, der in der Lage ist TGF- β 2 hochaffin zu binden und demnach eine wichtige Rolle bei der TGF- β 2 Signalübertragung zu spielen scheint, in TGF- β 2-beeinflußten Geweben durchaus wahrscheinlich und sinnvoll. Neuronale Organsysteme sind in diesem Zusammenhang ebenfalls von Interesse, da hier TGF- β 2 neben TGF- β 3 die vorherrschende Isoform ist [221].

Aus diesen Erkenntnissen und Vermutungen geht hervor, daß weitere Untersuchungen zur Gewebeverteilung des T β RII-B unerlässlich sind. Versuche

hierzu, d.h. Northernblot-Analysen und Immunhistologien verschiedener Gewebe und Spezies, sind in Planung. Um jedoch ein Bild des gesamten Ausmaßes der T β RII-B Expression und Wirkungsweise zu bekommen, wäre es sinnvoll den Rezeptor spezifisch durch Gen-Knockout auszuschalten. Hierdurch können verschiedene Entwicklungs- sowie adulte Stadien intensiv untersucht werden.

Beachtenswert ist zudem die mesenchymale Vorläuferzelllinie C2C12. Diese Zellen haben das Potential durch Kultivierung in Medium mit geringem Serumanteil (0,2 – 2,0 % FCS) Myotuben auszubilden und bei gleichzeitiger Präsenz von BMP-2 in die osteoblastäre Richtung zu differenzieren (s. Abb.37) [198]. T β RII-B ist bereits in der Vorläuferzelllinie vorhanden, in differenzierten Zellen, v.a. in Osteoblasten, kommt es jedoch zu einer verstärkten Expression (s. Abb.22C). Da es in der Regel bei der Differenzierung pluripotenter Zellen zu Veränderungen der Proteinexpression und deren Regulierung kommt, ist dies nicht verwunderlich. So wurde auch ein Variieren der relativen Menge an T β RIII während Differenzierungsprozessen beobachtet. Beispielsweise befinden sich in wenig differenziertem Knochengewebe große T β RIII-Mengen, die im Laufe der weiteren Entwicklung, u.a. verstärkt durch BMP-2 Gabe, reduziert werden. Die T β RIII-Expression kann über Wachstumsfaktoren und Hormone reguliert werden, wie sich aus Analysen der Promotor-Region des *t β RIII* Gens ergab [222]. Die Präsenz von T β RIII ist bekanntlich essentiell für eine TGF- β Isoform-spezifische Signalübertragung. Durch die Regulation der T β RIII-Expression wird daher indirekt die TGF- β 2 Sensitivität der Zellen über T β RII, nicht jedoch über T β RII-B, kontrolliert.

Interessanterweise kommt es aber bei der Differenzierung zu Osteoblasten neben der verringerten T β RIII-Expression auch zu einer verstärkten T β RII-B-Expression. Durch diesen ausgleichenden Mechanismus bliebe trotz T β RIII-Verlust die Möglichkeit zur TGF- β 2 Signalübertragung erhalten. Ob jedoch durch die unterschiedlich vermittelten TGF- β 2 Signale unterschiedliche Genantworten hervorgerufen werden, ist fraglich. Wenn dies so wäre, würde eine gezielte Veränderung der Rezeptorkonstellation während der Differenzierung zu einer gezielten Veränderung der Genexpression führen.

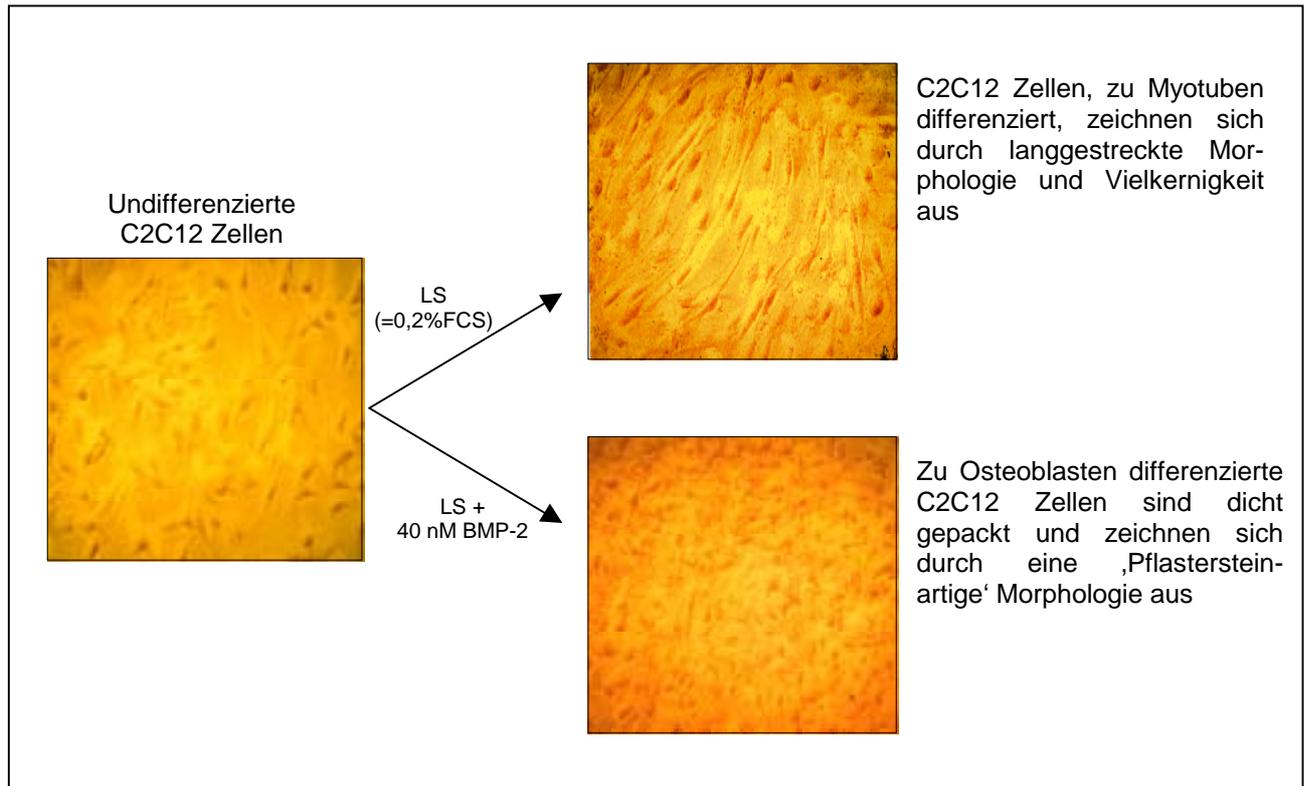


Abb.37 Verschiedenartige Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C2C12. Durch Kultivierung in ‚low serum‘ (LS = 0,2% FCS) wird eine Differenzierung zu Myotuben provoziert. Bei zusätzlicher Gabe von 40 nM BMP-2 erfolgt eine Differenzierung in die osteoblastäre Richtung.

Überproportionale Mengen an T β RIII behindern und limitieren das Binden von Liganden an Signalrezeptor-Komplexe ([223] [178] [224]). Möglicherweise soll auch einfach durch die Verringerung der T β RIII-Expression ein Funktionieren der TGF- β Signalübertragung im allgemeinen gewährleistet werden.

A.III.4.2. Die Rolle von TGF- β im Knochen

Das vorrangige Auftreten von T β RII-B in osteoblastären Zellen, lässt eine spezielle Funktion dieses Rezeptors in Knochen-verwandten Geweben vermuten, in denen neben den BMPs auch die TGF- β Isoformen entscheidende Rollen bei der Differenzierung von Knochen und Knorpel spielen. TGF- β s werden als sog. ‚Kopplungs-Faktoren‘ bezeichnet, da sie sowohl osteoblastäre als auch osteoklastäre Aktivitäten regulieren.

Knochengewebe besteht im Allgemeinen aus hoch strukturierter extrazellulärer Matrix, welche Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten enthält. Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs und synthetisieren und sekretieren Knochenmatrix,

die im Laufe der Zeit mineralisiert. In Knochenmatrix eingebettete Osteoblasten differenzieren zu Osteozyten. Im Gegensatz dazu sind Osteoklasten hämatopoetischen Ursprungs und für die Resorption des Knochen zuständig. Die Struktur und Integrität eines Knochens wird durch einen fortlaufenden Prozeß aus Knochenauf- und -abbau erhalten, der durch die Aktivitäten von Osteoblasten und Osteoklasten koordiniert wird [225]. Wie diese Aktivitäten allerdings miteinander gekoppelt sind, ist nicht vollständig verstanden. Die einzelnen Vorgänge sind jedoch genau aufeinander abgestimmt und Fehlfunktionen haben fortschreitende Knochenmasse-Veränderungen und erhöhtes Fraktur-Risiko zur Folge [226].

TGF- β wird sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten synthetisiert und in der Knochenmatrix abgelagert. Latentes, in der Matrix gespeichertes TGF- β wird durch die saure Umgebung, die innerhalb der Verschmelzungs-Zone unterhalb der Knochen-resorbierenden Osteoklasten geschaffen wird, freigesetzt und aktiviert [227] [228] [229]. Freies TGF- β dient dann wiederum der Regulation von Osteoklasten und Osteoblasten bei Knochen-Formation und -Umgestaltung [230] [231]. Wie die einzelnen Zelltypen auf TGF- β reagieren ist jedoch komplex und hängt vom Differenzierungsgrad der entsprechenden Zelle ab. So kann TGF- β z.B. inhibierend auf Differenzierungsaktivitäten von Knochenmark-Monozyten wirken, aber auch bereits differenzierte Osteoklasten in ihren Aktivitäten unterstützen [232] [233] [234]. Unterschiedliche, vom Differenzierungsstadium abhängige TGF- β Antworten ergeben sich möglicherweise durch Veränderungen der TGF- β Rezeptorzahl, der TypI/TypII Rezeptor Ratios, oder durch das Auftreten bestimmter Rezeptoren zu bestimmten Zeitpunkten [235] [224]. In diesem Zusammenhang könnte auch die Expression von T β RII-B von Bedeutung sein.

Neben regulatorischen Funktionen bezüglich des Zusammenspiels von Knochenauf- und -abbau, deren molekulare Mechanismen noch weitgehend unverstanden sind, werden TGF- β noch weitere Aufgaben zugesprochen. Beispielsweise nimmt TGF- β Einfluß auf die Expression verschiedener Gene, die mit osteoblastären Aktivitäten assoziiert sind. So wird die Expression von Matrix-Proteinen, wie Typ I Collagen, Osteopontin und Osteonectin, durch TGF- β induziert, während die Expression des Osteocalzins verringert wird [231]. TGF- β beeinflusst außerdem Expression und Zusammenspiel von PTH (Parathyroid-Hormon) und Vitamin D, Faktoren, die im Knochen für die Modulation des Calcium-Haushaltes verantwortlich sind. PTH ist ebenfalls an Auf- und Umbau Prozessen im Knochen beteiligt, indem es

osteoblastäre Vorläuferzellen rekrutiert und reife Osteoblasten aktiviert [236]. So konnte gezeigt werden, daß TGF- β die Expression des PTH Rezeptors beeinflusst und in die Regulation der PTHrP (Parathyroid hormon related protein) Sekretion involviert ist [237] [238]. Weiterhin soll TGF- β chemotaktisch auf Osteoblasten und im Besonderen auf osteoblastäre Vorläuferzellen wirken [239]. Eine derartige Aktivität ist möglicherweise für die Dirigierung mesenchymaler Zellen zu Stellen neuer Knochenbildung wichtig.

Defekte der TGF- β Expression oder Signalübertragung haben oftmals schwerwiegende Folgen. Beispielsweise führt eine vermehrte Expression von TGF- β 2 zu erhöhter Osteoblasten- und Osteoklasten-Aktivität, was wiederum in Knochenmassenverlust und spontanen Frakturen, vergleichbar mit einem Osteoporose-Phänotyp, resultiert [240]. Wird die TGF- β Signaltransduktion inhibiert, kommt es zur Degeneration von Gelenk-Gewebe, wie es auch bei Osteoarthritis beobachtet wird [241]. In einem anderen Ansatz wurde bei Inhibierung des T β RII durch eine dominant negativ wirkende Form des Rezeptors verringerte Knochenmodellierung festgestellt, was vermutlich auf verringerter Knochenresorption durch Osteoklasten beruht [242].

Die TGF- β Isoformen sind sowohl in embryonalem als auch in maturem Knochengewebe exprimiert, jedoch unterscheiden sie sich in Lokalisation und Potenz abhängig von Zelltyp und Entwicklungsstadium [231]. Inwieweit den einzelnen TGF- β Isoformen spezifische Aktivitäten und Funktionen bei der Knochenformation zukommen ist ungeklärt. Es konnten beispielsweise TGF- β 2-vermittelte Effekte nachgewiesen werden, wie die Erhöhung osteoblastärer Aktivität durch die Induktion der Sekretion extrazellulärer Matrixproteine. Dies führt zu Inhibierung von Matrix-Mineralisierung und moduliert die Proliferation von Osteoprogenitorzellen [231] [243]. Außerdem wird, wie bereits erwähnt durch Überexpression von TGF- β 2 ein Osteoporose-Phänotyp provoziert. Dies und ein Auftreten eines Phänotyps mit skelettären Defekten bei TGF- β 2 Knockout-Mäusen spricht durchaus für eine essentielle Rolle dieser Isoform in Knochengeweben [124].

TGF- β spielt auch bei der Metastasenbildung von Brustkrebszellen im Skelett eine Rolle, indem es nach Freisetzung aus der Knochenmatrix oder den Tumorzellen selbst metastatisches Wachstum fördert [238]. Auch in diesem Kontext kann die spezifizierte T β RII-B Expression von Bedeutung sein. Beispielsweise zeigt die MCF-7 Brustkrebs-Zelllinie keine Typ III Rezeptor Expression [168], trägt aber T β RII-B an

der Zelloberfläche (eigene nicht gezeigte Daten). Diese Zelllinie zeigt somit, wie auch U2OS Zellen, eine TGF- β 2 Antwort, die ausschließlich über T β RII-B vermittelt wird (vgl. Abb.26). Durch eine gezielte Blockade dieses Rezeptors, könnte also spezifisch die TGF- β 2 Signalübertragung ausgeschaltet und möglicherweise eine Verringerung der Proliferation dieser metastasierenden Zellen erreicht werden. Es scheint daher durchaus vielversprechend sich weiterführend mit Möglichkeiten der spezifischen Inhibierung von TGF- β Isoformen mittels T β RII-B in im Knochen metastasierenden Zellen, wie Brustkrebszellen oder Zellen aus Prostata-Karzinomen, zu beschäftigen.

A.III.5. Signalübertragung via T β RII-B

Um die Fähigkeit zur Signalübertragung des T β RII-B zu testen, bot sich die DR-26 Zelllinie an, da sie endogen keine TGF- β Typ II Rezeptoren exprimiert [204]. Diese ursprünglich TGF- β -resistente Zelllinie kann jedoch durch Einbringen eines funktionalen Typ II Rezeptors sensitiv gemacht werden, wie man in Reporteragen-Assays mit TGF- β -responsiven Elementen zeigen kann. Das Maß der Luziferaseexpression gibt hierbei Hinweise auf die Funktionalität des eingebrachten Rezeptors. Es stellte sich heraus, daß T β RII-B ein funktionierender TGF- β Rezeptor ist, der nicht nur verschiedene TGF- β Isoformen bindet, sondern auch deren Signale weiterleitet. In dem verwendeten System konnten bezüglich Qualität und Intensität der Signalübertragung keine signifikanten Unterschiede zwischen TGF- β 1 und - β 2 Stimulation festgestellt werden (s. A.II.8.1.). Hirai und Fujita erzielten in einem ähnlichen Versuchsansatz mit stabil transfizierten DR-26 Zellen ein vergleichbares Ergebnis [129]. Zu beachten ist jedoch die Präsenz des Typ III Rezeptors in dieser Zelllinie (s. Abb.24), aufgrund dessen hier nicht zwischen Signalübertragung via T β RII/T β RIII, T β RII-B/T β RIII oder T β RII-B alleine unterschieden werden kann. Die Verwendung von Reporteragen-Konstrukten, die andere, möglicherweise funktionsspezifische, TGF- β responsive Promotor-Elemente enthalten, könnte eher Aufschluß über Unterschiede bei der Genexpression, die eventuell durch die verschiedenen Rezeptorvariationen hervorgerufen werden, geben.

Um nun die ‚Konkurrenz‘, die bei der TGF- β 2 Signalübertragung durch den Typ III Rezeptor entsteht, auszuschalten, wurden für weitere Untersuchungen U2OS und L6

Zellen verwendet, da diese Zelllinien nachweislich kein T β RIII Polypeptid exprimieren (s. Abb.24) [168] [176]. U2OS Zellen verfügen jedoch im Gegensatz zu L6 Zellen über T β RII-B an der Zelloberfläche (s. Abb.22B). Durch Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch die phosphorylierte Form von Smad2 erkennt [202], konnte gezeigt werden, daß TGF- β 2-vermittelte Smad2-Phosphorylierung nur, bzw. im Vergleich zu L6 verstärkt, in U2OS Zellen auftritt (s. Abb.25). Die TGF- β 2 Signalübertragung ist in Abwesenheit von T β RIII also vom TGF- β Typ II-B Rezeptors abhängig.

Dieses Ergebnis bestätigte sich durch Reporter-gen-Messungen in U2OS Zellen. Auch hier kommt es zu TGF- β 2 vermittelter Luziferaseexpression, die auf die Präsenz des T β RII-B zurückzuführen ist und sich in ihrer Intensität nicht vom TGF- β 1 Signal unterscheidet (s. Abb.26).

Wenn also T β RIII-defiziente Zelllinien, wie vaskulären Endothelzellen, hämatopoetische Vorläuferzellen oder endokardiale Zellen des Herzens, Resistenz gegenüber TGF- β 2 zeigen, spricht dies mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls für ein Fehlen des T β RII-B [190] [244] [188] [189]. Interessant wäre zu verfolgen, ob Einbringen von T β RIII oder T β RII-B in diese Zellen eine TGF- β 2 Signalübertragung ermöglichen würde und ob dies, abhängig vom transfizierten Rezeptor, unterschiedliche TGF- β 2-Antworten hervorrufen würde.

Um sich dieser Fragestellung anzunähern, wurden die verschiedenen TGF- β Rezeptoren (T β RII, T β RII-B und T β RIII) in L6 Zellen transient überexprimiert. Die L6 Zelle liefert aufgrund ihres eingeschränkten Rezeptor-Repertoires ein ideales System, um die TGF- β 2 Signalübertragung via T β RIII und T β RII-B getrennt voneinander zu betrachten und miteinander zu vergleichen. In Reporter-genexperimenten mit p3TP-luc konnte gezeigt werden, daß sowohl Einbringen des T β RIII, als auch des T β RII-B eine TGF- β 2 Signalübertragung ermöglicht, während Überexpression von T β RII keinen vergleichbaren Effekt an den Tag legt (s. Abb.27). Auch Fragen bezüglich unterschiedlicher Genexpression könnten mit Hilfe dieses Zellsystems effizient untersucht werden, wobei sich hier die Verwendung von DNA-Chip Technologien anbieten würde.

A.III.6. Interaktion von T β RII-B mit Typ I Rezeptoren der TGF- β Familie

Die Vielzahl der verschiedenen Typ I Rezeptoren (Alks) und ihre Fähigkeit in einigen Fällen nicht nur mit einem speziellen Typ II Rezeptor interagieren zu können, gab Anlaß zu der Vermutung, daß möglicherweise auch T β RII-B nicht ausschließlich über Alk 5 Signale transduziert. Dies war v.a. im Hinblick auf die besondere Funktion des T β RII-B bei der TGF- β 2 Signalübertragung von Interesse. Über den Typ I Rezeptor wird festgelegt welcher Signalübertragungsweg eingeschlagen wird, was letztendlich Einfluß auf die Genexpression nimmt [24] [148]. Die Rekrutierung eines alternativen Typ I Rezeptors wäre somit ein Indiz für die Entstehung eines veränderten Genexpressionsmusters bei der Transduktion von TGF- β Signalen via T β RII-B. In Punkt A.I.3. wurden die verschiedenen Alks bereits ausführlich vorgestellt. V.a. Alk 1, Alk 2, Alk 4 und Alk 7 schienen als potentielle Interaktionspartner für T β RII-B in Frage zu kommen, da sie teilweise relativ unspezifisch in ihren Funktionen oder allgemein noch wenig charakterisiert sind.

Die Aktivin Typ I Rezeptoren Alk 2 und Alk 4 waren aufgrund ihrer Fähigkeit, wie Alk 5, Signale via Smad2/3 übertragen zu können von Interesse. Alk 2 nimmt außerdem eine Sonderstellung ein, da es sowohl Aktivin- als auch BMP-Signale überträgt und je nach Ligand unterschiedliche Smads phosphoryliert [158] [154]. Ebenso wurde eine Involvierung bei der AMH-Signalübertragung festgestellt [159].

Alk 1 ist ein relativ ungenau charakterisierter Typ I Rezeptor, der zwar mit TGF- β interagieren kann, dessen eigentlicher Ligand aber noch unbekannt ist [28] [153].

Alk 7 ist besonders interessant, da für diesen Rezeptor weder Ligand noch funktionale Interaktionspartner bekannt sind. Außerdem konnte Alk 7-vermittelte Induktion des Smad2/3 Signalweges nachgewiesen werden. Alk 7 wird präferenziell in neuronalen Geweben vorgefunden und ist dort an Proliferations- und Differenzierungsmechanismen beteiligt [162] [163] [150]. Wie bereits erwähnt ist es durchaus wahrscheinlich, daß T β RII-B in neuronalen Geweben eine besondere Rolle zukommt, da TGF- β 2 hier die vorherrschende Isoform ist. Eine Co-Expression der Rezeptoren wäre also durchaus vorstellbar und würde dementsprechend auf eine Interaktion hinweisen.

In einem Vorexperiment sollte mittels Bindungs- und Crosslinking-Studien herausgefunden werden, ob eine TGF- β 1- oder - β 2-abhängige auffallende

Interaktion des T β RII-B mit einem der Alk Proteine auftritt. Hierbei wurden Immunpräzitationen mit Antikörpern, die sowohl gegen T β RII-B als auch gegen die HA-Epitope der Alks gerichtet sind, durchgeführt. In Abb.28 ist ein repräsentativer Auszug (Alk 1 und Alk 4 neben der Alk 5-Kontrolle) des ganzen Experimentes dargestellt. Einheitlich konnten alle Alk-Proteine mit T β RII-B co-präzipitiert werden. Die Intensität einer Co-präzitation mit Alk 5 wurde jedoch mit keinem anderen Alk-Molekül erreicht. Ein vergleichbares Bild ergab sich bei analoger Versuchsdurchführung mit T β RII (Daten wurden nicht gezeigt). Übereinstimmend mit den hier erhaltenen Ergebnissen ist eine Affinität zwischen Typ I und Typ II Rezeptoren der TGF- β Superfamilie in der Literatur erwähnt [161]. Mit diesem Versuchsansatz konnten also keine Ergebnisse erzielt werden, aus denen auf funktionale Interaktion der Rezeptoren, geschlossen werden kann.

Dementsprechend wurden im folgenden Reporter-gen-Experimente in R1b/L17 Zellen durchgeführt, in denen das Reporter-gen p3TP-luc und, um auch Aktivierung über den Smad1/5/8 Signalweg detektieren zu können, das pSBE-luc Reporter-gen zum Einsatz kamen.

Aus dem Versuchsansatz mit p3TP-luc (s. Abb.29A) geht eindeutig hervor, daß eine ligandenabhängige Luziferaseaktivierung sowohl mit TGF- β 1 als auch mit TGF- β 2 nur über den T β RII-B/Alk 5 Komplex vermittelt wird. Auffällig hierbei ist die nur durch TGF- β 1 vermittelte Reporter-genexpression im Fall der Co-Expression von Alk 4 und T β RII-B. Dies wird auch bei Überexpression von Alk 4 und T β RII beobachtet (Daten wurden nicht gezeigt). Alk 4 kann also TGF- β 1 (nicht TGF- β 2) in Kombination mit T β RII oder T β RII-B binden, ist aber nur bei Gewährleistung einer hohen Typ II Rezeptor-Dichte in der Lage dieses TGF- β 1 Signal weiterzuleiten.

Bei der Verwendung des pSBE-luc Reporter-gens kann neben TGF- β -induzierter Luziferaseexpression über Alk5 oder T β RII-B/Alk5 auch vielfach eine Aktivierung des Reporter-gens in Anwesenheit eines der anderen Alk-Proteine (Alk 1, Alk 3, Alk 4 und Alk 6) festgestellt werden. Diese Induktion tritt unabhängig von einer Stimulation mit TGF- β 1 oder - β 2 auf. Ligandenunabhängige Signaltransduktion wird häufig beobachtet, wenn Rezeptoren transient überexprimiert werden und somit die Rezeptor-Dichte an der Zelloberfläche stark erhöht ist. Örtliche Nähe macht eine gegenseitige Aktivierung der Rezeptoren ohne Mitwirkung eines Liganden möglich. Die hier erhaltenen ligandenunabhängigen Signale werden durch TGF- β Stimulation jedoch nicht verstärkt.

Diese Beobachtung gab Anlaß zu der Vermutung, daß das pSBE-luc Reporter-gen möglicherweise versteckte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren beinhaltet, über die das eingebrachte Luziferasegen Stimulus-unabhängig aktiviert werden kann [203]. Aus diesem Grund wurde wie unter A.II.9.3 beschrieben der Smad-bindende DNA-Teil (SBE₄) aus dem pSBE-luc Konstrukt entfernt und das so erhaltene pSBE-luc(-) Plasmid in verschiedenen Versuchsansätzen (s. Abb.30) getestet. Eine Induktion der Luziferaseexpression blieb jedoch in allen Fällen aus. Es findet also in R1b/L17 Zellen eine Signaltransduktion über die transfizierten Rezeptorkomplexe statt, die tatsächlich eine Reaktion des pSBE-luc Reportergens, das im Vergleich zu p3TP-luc zwar weniger spezifisch aber dafür sensitiver ist, hervorruft.

Wenn also die beobachteten Luziferase-Signale auf Überexpression der Rezeptoren und hohe Sensitivität des pSBE-luc zurückzuführen sind, stellt sich die Frage, weshalb bei Transfektion von Alk 2 und Alk 7 diese Signale extrem gering, bzw. nicht vorhanden sind. Eine Interaktion mit TGF- β und/oder T β RII-B schien v.a. für diese beiden Typ I Rezeptoren wahrscheinlich, da Alk 2 als ein sehr vielseitiger Typ I Rezeptor bekannt ist und Alk 7 eine große Ähnlichkeit zu Alk 5 aufweist. Es wurde daher eine inhibitorische Wirkung dieser Rezeptoren erwartet. Möglicherweise findet zwar Ligandenbindung aber keine Komplexbildung mit Typ II Rezeptoren statt, oder umgekehrt. Beides würde keine Signalübertragung zulassen. Aus diesem Grund wurde Alk 7 auf inhibitorische Funktionen getestet, indem es zusammen mit T β RII-B und Alk 5 in R1b-/L17 Zellen eingebracht wurde. Es konnte jedoch kein negativer Effekt auf die Alk 5 vermittelte Signalübertragung festgestellt werden (Daten wurden nicht gezeigt). Alk 2 und Alk 7 zeigen also vermutlich extrem wenig Affinität gegenüber TGF- β Typ II Rezeptoren, weshalb es auch bei starker Überexpression zu keiner unspezifischen Interaktion bzw. Signalübertragung kommt.

Erwähnt sei hier ein weiterer Versuchsansatz, der sich mit TGF- β -vermittelter Induzierbarkeit von Alk 1, die von Oh et al. (2000) in Endothel-Zellen gezeigt wurde, beschäftigt [153]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Oh et al. konnte in dem hier verwendeten System durch Transfektion von Alk 1 Induzierbarkeit des Reportergens beobachtet werden, die nicht durch Stimulation mit TGF- β hervorgerufen wurde (vgl. Abb.29). Dieser Unterschied schien auf die Abwesenheit von Endoglin in R1b/L17 Zellen zurückzuführen zu sein, weshalb Alk 1 und Endoglin in einem neuen Ansatz co-exprimiert wurden. Dies führte allerdings zu keiner stimulationsabhängigen Erhöhung des Luziferasesignals (Daten wurden nicht gezeigt) und deutet somit

darauf hin, daß die Beobachtung von Oh et al. kein genereller Effekt ist, sondern vermutlich stark von zusätzlichen Faktoren abhängt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß T β RII-B im Komplex mit Alk 5 und über den Smad2/3 Signalweg Signale transduziert. Eine unspezifische Aktivierung der Smad-Signalkaskaden wird vermutlich durch starke Überexpression der Typ I Rezeptoren hervorgerufen. Die Co-Expression von T β RII-B hat hierauf keinen Einfluß. Inwieweit T β RII-B in die Aktivierung anderer Signalwege involviert ist, ist noch ungeklärt, aber von großem Interesse.

A.III.7. Spezifität dominant negativer Typ II Rezeptor-Mutanten

Durch Transfektion von dominant negativen Rezeptor-Mutanten können Signalwege blockiert, und die Auswirkungen dieser Ausschaltung analysiert werden. In Punkt A.II.10. ist kurz beschrieben, welche Intention hinter der Verwendung von Δ -cyt Mutanten im Zusammenhang mit T β RII-B steht.

Für die durchgeführten Untersuchungen, wurden entsprechende Δ -cyt-Konstrukte via PCR-Mutagenese hergestellt. Die Proteinexpression dieser Konstrukte in COS-7 Zellen wurde mit Hilfe von IP/WB-Experimenten getestet und bestätigt (s. Abb.32). Eine ligandenunabhängige Oligomerisierung von verkürzten mit wildtypischen Rezeptoren konnte hierbei jedoch nicht gezeigt werden. Vom Vorhandensein derartiger Oligomere wird jedoch ausgegangen, da sich dadurch mitunter die dominant negative Wirkung erklären läßt (vgl. I.2.5.). Es ist aber davon auszugehen, daß diese aufgrund der fehlenden Kinasedomäne der Δ -cyt-Mutanten ‚ungleichen‘ Oligomere extrem labile Komplexe repräsentieren. Die stringenten Lysisbedingungen (1% Triton-X) ließen daher keinen Zusammenhalt der Rezeptoroligomere während der Immunpräzipitation zu. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Verwendung milderer Lysispuffer einen Nachweis dieser extrem instabilen Komplexe ermöglicht, da auch Versuche homooligomere wt-Rezeptor Komplexe mit dieser Methode nachzuweisen, erfolglos blieben (vgl. A.III.2.2.).

In Bindungs- und Crosslinking-Experimenten konnte die Oberflächenexpression des T β RII-B- Δ cyt Konstruktes bestätigt werden (s. Abb.33). Eine ligandeninduzierte Oligomerisierung von T β RII-B- Δ cyt mit T β RII-B ist in Abb.34 gezeigt. Mit dem α CRII Antikörper wird T β RII-B immunpräzipitiert welcher mit T β RII-B- Δ cyt in einem

Komplex vorliegt. Da die Rezeptoren mit dem Liganden sowie auch untereinander quervernetzt wurden, ist der Nachweis von Oligomeren mit dieser Methode einfacher. Dennoch ist die Qualität des Antikörpers entscheidend. Der α HA Antikörper ist im Vergleich zum α CRII um ein Vielfaches schwächer und daher nicht in der Lage den Rezeptorkomplex zu detektieren.

Um die Spezifität von dominant negativ wirkenden Typ II Rezeptormutanten zu testen wurden DR-26 Zellen, welche aufgrund einer Mutation keinen funktionalen TGF- β Typ II Rezeptor tragen [204], mit wt-Rezeptoren und Δ -cyt-Mutanten transfiziert (s. A.II.10.4.). Durch Einbringen von wt-T β RII oder wt-T β RII-B wurde die Responsivität der Zellen gegenüber TGF- β wiederhergestellt (s. Abb.35). Sowohl Stimulation mit TGF- β 1, als auch mit TGF- β 2 hatte eine Induktion der Luziferase-Aktivität zur Folge. Bei einem Vergleich mit den mock-transfizierten Kontrollzellen, fällt die erhöhte Luziferase-Aktivität der nicht stimulierten Zellen ins Auge. Diese ligandenunabhängigen Signale sind vermutlich auf Überexpressionseffekte zurückzuführen. Wie bereits erwähnt bilden sich bei hoher Rezeptor-Dichte auch ohne Mitwirken eines Liganden allein durch örtliche Nähe aktivierte Rezeptorkomplexe an der Zelloberfläche. Eine andere mögliche Erklärung wäre eine autokrine Wirkung von TGF- β , welches von den Zellen selbst produziert wird.

Weiterhin kann festgestellt werden, daß sowohl T β RII- Δ cyt, als auch T β RII-B- Δ cyt inhibitorisch auf die Luziferaseexpression wirken, egal mit welchem wt-Rezeptor sie co-transfiziert wurden. Eine Rezeptorspezifität der dominant negativen Wirkung ist also nicht festzustellen. Ebenfalls scheint es keine Rolle zu spielen ob es sich beim Stimulus um TGF- β 1 oder - β 2 handelt. Beachtenswert ist der Rückgang des ligandenunabhängigen Signals, welches ebenfalls durch die Anwesenheit der verkürzten Rezeptoren verringert wird. Die leicht potentere Inhibierungswirkung von T β RII-B- Δ cyt könnte eventuell auf eine geringfügig höhere Affinität von T β RII-B gegenüber den TGF- β Isoformen, was in vielen Experimenten beobachtet werden konnte, zurückzuführen sein. An der Zelloberfläche exprimiertes T β RII-B- Δ cyt würde dann effektiv TGF- β binden und von verbleibenden wt-Rezeptoren abfangen. Jedoch sind hier auch Qualitätsunterschiede bei den einzelnen Plasmid-DNAs als Grund in Erwägung zu ziehen. Es wäre daher interessant Affinitätsmessungen mit Hilfe eines ‚Biacore‘-Meßgerätes durchzuführen, anhand derer genaue Aussagen über etwaige Affinitätsunterschiede gemacht werden können.

Der Einsatz von dominant negativ wirkenden Typ II Rezeptor-Mutanten ist also für Fragestellungen, die einen spezifischen Ausschluß eines der beiden Typ II Rezeptoren voraussetzen, nicht möglich. Es müssen daher andere Alternativen ins Auge gefaßt werden, wie z.B. die Verwendung von inhibitorischen Antikörpern, d.h. Antikörpern, die TGF- β -Bindungsstellen blockieren, oder Peptiden, die TGF- β affin binden können und somit mit den Rezeptoren um den Liganden konkurrieren.

In dieser Versuchsreihe konnte außerdem bewiesen werden, daß T β RII-B mit T β RII-B ligandeninduzierte Homooligomere bildet und diese in der Lage sind Signale zu transduzieren (vgl. A.III.2.2.). Ebenso wurde nochmals bestätigt, daß T β RII/T β RII-B Heterooligomere gebildet werden können (vgl. A.II.5.3.). Die Existenz von T β RII/T β RII Homooligomeren wurde bereits beschrieben und wird hier ebenfalls bestätigt [193] [194].

Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen und Diskussionspunkten geht hervor, daß dem TGF- β Typ II-B Rezeptor aufgrund seiner Isoform-spezifischen Wirkungsweise eine Sonderstellung innerhalb TGF- β Rezeptorfamilie zukommt. Die genauen Funktionen und Wirkungsorte sind noch weitgehend unerforscht und lassen eine Vielzahl von Fragen offen. Das ‚T β RII-B-Projekt‘ kann und soll in verschiedene Richtungen weitergeführt werden. Beispielsweise sind Versuche zur Gewebespezifischen Expression des Rezeptors und Studien zur Inhibierung der TGF- β 2 Signalübertragung durch T β RII-B-Blockade unter Verwendung von Peptiden und Antikörpern geplant. Fragestellungen, die T β RII-B vermittelte Genexpression betreffen könnten mit Hilfe von DNA-Chip Techniken angegangen werden, für Funktionsanalysen wäre die Generation von Gen-Knockouts in Erwägung zu ziehen.

B. Charakterisierung von Mutationen in der Signalpeptidsequenz des TGF- β Typ I Rezeptors in B-Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

B.I. Einleitung

B.I.1. Die Rolle von TGF- β bei Entstehung und Wachstum von Tumoren

Obwohl TGF- β ein potenter Inhibitor für das Wachstum epithelialer Gewebe ist, kann es sowohl hindernd als auch fördernd auf die Entstehung von Tumoren Einfluß nehmen. In frühen Tumorstadien wirkt TGF- β vorwiegend tumorsuppressiv, indem es die Proliferation von nicht-transformierten Zellen und damit die Formation von Tumoren inhibiert. In späteren Stadien geht diese suppressorische Wirkung jedoch häufig verloren, wodurch ein Fortschreiten des Tumorwachstums, die Einwanderung von tumorigenen Zellen ins Gewebe und Metastasierung begünstigt werden [245] [246].

In einer Vielzahl von Tumoren kommt es zu keiner TGF- β vermittelten Wachstumsinhibierung der Zellen [247]. Dies kann sowohl auf einer Fehlregulation von Zellzyklus-Effektoren (cdk-Inhibitoren, cdk, Cycline, *c-myc* usw.) beruhen, wodurch eine korrekte Arretierung der Zellen in G₁ verhindert wird [14], als auch auf Mutationen in einzelnen Komponenten des TGF- β Signalweges. Durch letzteres ist eine funktionierende TGF- β Signalübertragung nicht mehr möglich [247].

B.I.1.1. Autokrine Wirkung von TGF- β

Die tumorprogressive Wirkung von TGF- β wird größtenteils durch eine vermehrte TGF- β Ausschüttung der Tumorzellen selbst möglich gemacht. Eine autokrine Wirkung von TGF- β zeigt sich beispielsweise im Auftreten von EMT (epthelial to mesenchymal transition of cells). Hierbei kommt es zu Zerstörung von Zell-Zell-Kontakten sowie auch zu einer verringerten Expression von Zell-Zell Adhäsionsproteinen (z.B. E-Cadherin). Gleichzeitig werden vermehrt Moleküle gebildet, die für die Assoziation von Zellen mit extrazellulärer Matrix essentiell sind. All dies führt zu erhöhter Migrationsfähigkeit und verstärkt die invasiven Eigenschaften der Tumorzellen. Derartige Veränderungen im Zell-Phänotyp werden

häufig in späten Stadien der Tumorentwicklung beobachtet und korrelieren mit dem metastatischen Potential der Tumorzellen [248] [249].

B.I.1.2. Parakrine Wirkung von TGF- β

Vom Tumor produziertes TGF- β trägt auf indirektem Weg u.a. durch Induktion der Expression verschiedener Metalloproteasen (MMPs) zur Tumorprogression bei. MMPs spielen bei der proteolytischen Degradation von Basalmembranen eine wichtige Rolle und sind daher für eine Tumordinvasion essentiell [250].

Andere wichtige parakrine Effekte von TGF- β beziehen sich auf die Regulation der Tumor Angiogenese. Hierbei wird durch TGF- β vermittelte Stimulation die Produktion angiogener Faktoren erzielt. Durch die Formation neuer Blutgefäße wird eine adäquate Blutversorgung eines soliden Tumors gewährleistet [251].

Da TGF- β 1 und - β 2 stark immunsuppressiv wirken können [118], ist es durchaus denkbar, daß aufgrund der erhöhten TGF- β -Sekretion im Tumor die immune Überwachung unterdrückt wird. TGF- β sorgt also für ein ‚Überleben‘ des Tumors, indem es die Effektorzellen des Immunsystems (z.B. cytotoxische T-Zellen) inhibiert und die Entstehung tumor-reaktiver T-Zellen abschwächt [252].

B.I.1.3. Tumorprogression durch selektive Signalübertragung

Wie bereits erwähnt, unterliegen Tumorzellen in einem fortgeschrittenerem Stadium meist keiner TGF- β vermittelten Wachstumskontrolle, sind jedoch anderweitig TGF- β responsiv. Sie zeigen beispielsweise erhöhte Migrationsfähigkeit und invasives Verhalten. Um zwischen antiproliferativen und Matrix-assoziierten Effekten zu unterscheiden, scheint es Mechanismen zu geben, welche es Tumorzellen ermöglichen, den TGF- β Signalweg selektiv im Hinblick auf Tumorprogression zu nutzen. Einige Studien tragen mittlerweile zum Verständnis bei, wie es transformierten Zellen möglich ist autokrine Wachstumskontrolle zu verlieren und gleichzeitig andere TGF- β vermittelte Eigenschaften beizubehalten. Vermutlich müssen, um bestimmte TGF- β Antworten hervorrufen zu können, entsprechende Signalschwellenwerte erreicht werden. Möglicherweise kann bereits eine geringe Beeinträchtigung des TGF- β Signals zum Verlust des antimitogenen TGF- β Effekts führen, während die Toleranzgrenze für TGF- β Effekte, welche mit Zelladhäsion, Invasion und Metastasenbildung einhergehen, um einiges höher liegt. Außerdem scheint nicht eine sondern multiple biochemische Mechanismen zur Verstärkung des

tumorprogressiven Effekts von autokrinem TGF- β beizutragen. Einige dieser Mechanismen sind möglicherweise unabhängig von Smad Funktion und T β RI-Phosphorylierung [249].

B.I.2. Inaktivierung von Komponenten der TGF- β Signalkaskade während der Tumorgenese

Das Entwickeln einer Resistenz gegenüber TGF- β stellt ein Schlüsselereignis für das Fortschreiten der Tumorentstehung dar. Zelluläre Insensitivität gegenüber TGF- β ist in vielen Fällen das Resultat einer defekten Signalübertragung. Eine Reihe von Komponenten der TGF- β Signalkaskade liegen in einer Vielzahl von Tumoren inaktiviert vor oder sind ganz verloren gegangen. Verantwortlich hierfür sind beispielsweise Genmutationen, LOH (loss of heterozygosity), Repression der Transkription und Auftreten von DNA-Methylierung an CG-reichen Regionen vornehmlich im Promotorbereich [253].

B.I.2.1. Defekte der TGF- β Rezeptoren bei der Tumorentstehung

Der TGF- β Typ II Rezeptor:

Derart inaktiviert liegen in einer beträchtlichen Zahl von Tumoren die TGF- β Rezeptoren vor. Der TGF- β Typ II Rezeptor (T β RII) ist bei der Mehrzahl von Magen und Darm Karzinomen, welche mit Microsatelliten Instabilität (MSI) einhergehen, mutiert [254] [255]. Als Beispiel kann hier HNPCC (hereditary nonpolyposis colon cancer), ein familiär vererbtes Krebsyndrom, genannt werden [256]. Ein Charakteristikum derartiger Tumoren ist ein Defekt der DNA-Reparatur Maschinerie (MMR = DNA missmatch repair), welcher zum Phänomen der Microsatelliten-Instabilität führt. Aufgrund dieses DNA-Reparatur Defizits kommt es im kodierenden Bereich des TGF- β Typ II Rezeptors häufig zu ‚frame-shift‘ Mutationen innerhalb einer zehn Basenpaar langen Adenin-Sequenz (nt 709 – 718, Sequenz siehe Anhang). Durch Insertion oder Deletion von Adeninen in diesem Bereich kommt es zum vorzeitigen Abbruch der Translation. Derartig verkürzte Proteine sind aufgrund der fehlenden Kinase-Domäne nicht funktionsfähig. In Kolon-Karzinomen ohne MSI können mit einer Häufigkeit von 15% Missense-Mutationen in der Kinase-Domäne des Typ II Rezeptors gefunden werden [253].

Verlust von funktionalem T β RII spielt auch in einer Reihe von T-Zell Lymphomen eine Rolle. Beispielsweise wurde in einem cutanen T-Zell Lymphom eine dominant negativ wirkende Mutation im TGF- β Typ II Rezeptor gefunden. Hierbei führt eine heterozygot auftretende Substitution einer einzelnen AS (D404G) in der Kinase-Domäne von T β RII zur Inhibierung des wildtypischen Rezeptors und somit zum Verlust der TGF- β vermittelten Wachstumsinhibierung [257]. In Fällen von myodysplastischem Syndrom, akuter lymphoblastischer Leukämie und chronischer myeloider Leukämie wurden zwar keine T β RII-Mutationen gefunden, jedoch konnte eine verringerte Expression des Proteins beobachtet werden [258] [259] [260]. Inaktivierung und verringerte bzw. nicht nachzuweisende Expression des TGF- β Typ II Rezeptors wurden in einer Vielzahl weiterer Tumorarten beschrieben. Zu nennen sind hier neben diversen Lungenkrebsarten v.a. Brustkrebs, Eierstock-Karzinom, Tumoren der Prostata, der Harnblase und Speiseröhre sowie Osteosarkome [253].

Der TGF- β Typ I Rezeptor:

Nachdem beide TGF- β Rezeptorarten gleichermaßen essentiell für die Signalübertragung sind, kann davon ausgegangen werden, daß Mutationen im Gen für T β RI gleiche funktionale Auswirkungen haben wie T β RII-Mutationen.

Das Fehlen einer einfachen repetitiven Nukleotidsequenz scheint das *t β RI* Gen weniger anfällig für Mutationen zu machen, die aus DNA-Reparatur Defekten resultieren. Trotzdem konnten bereits häufig Veränderungen am TGF- β Typ I Rezeptor und dessen Expression festgestellt werden, welche die TGF- β Signaltransduktion negativ beeinflussen.

Beispielsweise wurde eine Kinase-Mutante von T β RI in einem Brust Karzinom beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Substitution im Codon 387, bei welcher Serin durch Tyrosin ausgetauscht wird. Diese Mutation verringert die Fähigkeit des Rezeptors TGF- β abhängige Effekte auf Genexpressionsebene zu übertragen [261]. In einem Cervix-Karzinom beeinflußt eine stille Mutation korrektes Spleißen der T β RI mRNA [262]. Transkriptionelle Repression von T β RI, welche zu verringerter bzw. fehlender Expression des Rezeptors führt, wurde in verschiedenen Krebs-Zelllinien festgestellt. Es handelt sich hierbei um Zellen aus Kolon-Karzinomen, sowie Tumoren des Magens und der Prostata [263] [264].

Um den transkriptionellen Startpunkt des *t β RI* Gens gelegene Sequenzbereiche weisen einen auffallend hohen Gehalt an Guanin und Cytosin auf (66%). Diese

sogenannten CpG Inseln sind Angriffspunkte für DNA-Methylierung. Hypermethylierung an CpG Inseln im 5'-Bereich des *tβRI* Gens wurde sowohl in Magenkrebs Zelllinien, als auch in primären Tumoren nachgewiesen [265]. Dies stellt möglicherweise eine Alternative für die Inhibierung der TGF-β Signaltransduktion in humanen Tumoren dar.

Eine 5kb große Deletion im *tβRI* Gen führt zu TGF-β Resistenz in einem cutanen T-Zell Lymphom. Die Deletion eliminiert die letzten 178bp von Exon 1 einschließlich des Start-Methionins sowie das gesamte Intron 1. Der verkürzte Rezeptor wird nicht an der Zelloberfläche exprimiert und führt daher zu Insensitivität bezüglich TGF-β vermittelter Wachstumskontrolle [266]. Fehlen von funktionalem TβRI an der Zellmembran wird auch bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie beobachtet [267]. Genauere Untersuchungen zu diesem Phänomen sind u.a. Inhalt dieser Arbeit und werden an entsprechende Stellen genau dargestellt und diskutiert. In einer Reihe von Krebsarten wurden Deletionen von drei Alaninen in einer neun AS langen Alanin-Sequenz des TβRI entdeckt [268, 269] [262]. Diese Mutationen führen nicht zu Insensitivität gegenüber TGF-β, scheinen jedoch die TGF-β Signalübertragung negativ zu beeinflussen und damit Tumorprogression zu unterstützen. Auch hierauf soll in dieser Arbeit noch genauer eingegangen werden.

B.I.2.2. Defekte der Smad-Proteine bei der Tumorentstehung

Die TGF-β Signalübertragung kann auch durch Mutationen in den Smad Molekülen negativ beeinflusst werden. Das Gen für Smad4 wurde ursprünglich als Tumorsuppressorgen auf Chromosom 18q21 kloniert. Dieses Gen ist in ungefähr der Hälfte aller Pankreas-Karzinome deletiert, worauf auch der Originalname, DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma locus 4), begründet ist [61]. Smad4 liegt in mutierter Form außerdem in einem beträchtlichen Anteil der kolorektalen Karzinome vor, weniger häufig in Brust-, Eierstock-, Prostata- und Magen-Karzinomen [270]. Hin und wieder werden Smad4-Mutationen im Zusammenhang mit Mutationen der TGF-β Rezeptoren gefunden, woraus gefolgert werden kann, daß Smad4, TβRII und TβRI bestimmte, sich nicht überschneidende tumorsuppressive Aktivitäten beinhalten [271] [272].

Das Gen für Smad2 ist ebenfalls auf Chromosom 18q21 lokalisiert und ist häufig Ziel inaktivierender Mutationen in kolorektalen Karzinomen [60]. Zur Inaktivierung von Smad2 oder Smad4 kommt es durch den Verlust der gesamten

Chromosomenregion, durch kleinere Deletionen oder durch Frameshift-, Nonsense- und Missense-Mutationen. Derartige Mutationen sind vornehmlich in der Smad-MH2-Domäne zu finden und beeinträchtigen die Proteinfunktion auf unterschiedlich Weise. Ein Teil der beschriebenen Mutationen verhindert ein korrektes Falten der MH2-Domäne, wodurch die Stabilität des gesamten Proteins verringert wird. Während der TGF- β Signalübertragung von der Membran in den Zellkern, bilden sich sowohl homo- also auch heterooligomere Smad-Komplexe. Diverse Mutationen in der MH2-Domäne führen zur Destabilisierung dieser Komplexe und wirken so negativ auf die Signalweiterleitung. Andere Mutationen wiederum betreffen die L3-loop Region der Smads, die, da sie permanent an der Proteinaußenseite exponiert ist, Interaktionen mit anderen Proteinen, im Speziellen Rezeptoren, vermitteln kann [270]. Beispielsweise verhindert eine Mutation im L3-loop von Smad2 die Interaktion mit dem aktivierten TGF- β Rezeptor [78].

Nur eine geringe Zahl inaktivierender Mutationen betreffen die Smad-MH1-Domäne und wurden bisher nur in Pankreas- und Kolon-Karzinomen nachgewiesen. In einem bemerkenswerten Fall tritt eine Mutation an dem gleichen konservierten AS-Rest sowohl in Smad2 (R133C) als auch in Smad4 (R100Y) auf. Hierbei erhöht sich die Affinität der MH1-Domäne zur MH2-Domäne, wodurch ein ‚Aufklappen‘ des Proteins und somit dessen Aktivierung erschwert bzw. verhindert wird. Diese autoinhibitorische Interaktion der beiden Domänen verringert gleichzeitig die Stabilität des gesamten Proteins [273] [274]. Da die MH1-Domäne von Smad4 auch an der DNA-Bindung beteiligt ist, ist eine Inhibierung von TGF- β Effekten durch MH1-Mutationen auch auf Genexpressionsebene durchaus wahrscheinlich [270].

Smad3-Mutationen konnten bisher in keinem humanen Tumor entdeckt werden. Dennoch war es möglich nachzuweisen, daß Mäuse mit homozygoter Deletion von Smad3 aggressive kolorektale Karzinome entwickeln [275]. Außerdem wurde in weiteren Versuchen mit Smad-defizienten Mäusen die Tumorsuppressor-Rolle der Smads eindeutig belegt [247]. Auch die sogenannten inhibitorischen Smads, Smad6 und Smad7, können zum Verlust der wachstumsinhibitorischen Funktion von TGF- β beitragen. So wurde konstitutive Überexpression von Smad 6 und Smad7 in pankreatischen Tumorgeweben und Zelllinien nachgewiesen [276] [277]. Inhibitorische Smads bilden Komplexe mit Typ I Rezeptoren und verhindern dadurch das Andocken und Aktivieren der signaltransduzierenden Smads. Durch eine Überexpression dieser Inhibitoren wird also die TGF- β Signalkaskade unterbrochen.

Nachdem v.a. in letzter Zeit vermehrt Proteine identifiziert wurden, die mit Smads interagieren können und als transkriptionelle Co-Repressoren bzw. -Aktivatoren dienen (Ski, SnoN, TGIF, CBP, p300), ist durchaus denkbar, daß Ungleichgewichte bei der Smad-Aktivierung und -Repression, die durch diese Proteine verursacht werden, in den Prozeß der Tumorprogression einfließen [278].

B.I.3. Chronische lymphatische Leukämie (B-CLL)

B.I.3.1. Charakteristische Merkmale der Erkrankung

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Expression der TGF- β Rezeptoren in B-Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie beschäftigt, soll die Krankheit an dieser Stelle kurz charakterisiert werden.

Chronische lymphatische Leukämie ist die häufigste Form adulter Leukämie in westlichen Ländern. Das Durchschnittsalter von Patienten beträgt zum Zeitpunkt der Diagnose ca. 65 Jahre, nur ein geringer Prozentsatz der Patienten ist jünger als 50 Jahre. Meist sind mehr Männer als Frauen betroffen. B-CLL ist ein langsam voranschreitender Krebs, der sich durch klonale Proliferation und Akkumulation neoplastischer B-Lymphozyten in Blut, Knochenmark, Lymphknoten und Milz auszeichnet. Der klinische Verlauf dieser Krankheit kann sehr unterschiedlich sein. So liegt die Überlebensdauer von Patienten in einem Bereich von wenigen Monaten und einigen Jahren. Jedoch ist B-CLL bis dato unheilbar und wird von sekundären Komplikationen begleitet, die sich negativ auf eine Prognose auswirken können [279] [280]. Typisches B-CLL kann zu einem aggressiven Großzell Lymphom transformieren (Richter's Syndrom), welches äußerst schlecht auf Therapien anspricht [281]. Die für B-CLL typische erhöhte Lymphozytenzahl kommt aufgrund von Apoptose-Defizienzen zustande und nicht durch autonomes und unkontrolliertes Zellwachstum. So sind B-Zellen von B-CLL Patienten in der G₀ Phase arretiert anstatt klonal zu expandieren und den Zellzyklus übermäßig schnell zu passieren. Die Zellen werden also in einem nicht-apoptotischen Ruhestadium gehalten. Das ‚normale‘ Gegenstück von CLL Zellen sind reife CD5+ B-Lymphozyten. Aufgrund inhibierter Apoptosemechanismen akkumulieren diese CD5+ Lymphozyten mit der Zeit und transformieren zu CLL-Zellen. Zytokine wie TNF α , IL10 und TGF- β sind bei Regulation, Wachstum und Differenzierung der CLL-Zellen involviert. In Fällen von B-

CLL werden außerdem häufig Überexpression des *c-myc* Onkogens, Deletion des Retinoblastoma Gens *Rb1*, sowie Mutationen des *p53* Tumorsuppressorgens detektiert [280] [282]. Zytogenetische Abnormalitäten werden in ca. 50% der B-CLL Patienten nachgewiesen. Hierbei sind Deletionen in den Chromosomen 13q, 11q und 6q zu erwähnen. Chromosom 17p beinhaltet den *p53* Genlocus und weist ebenfalls eine hohe Deletionsfrequenz auf. Außerdem sind Trisomie des Chromosoms 12q sowie Translokationen an Chromosom 14q nicht selten. Es konnte gezeigt werden, daß diese Chromosomenaberrationen mit einem rapiden Voranschreiten der Krankheit, verringerter Überlebenszeit und Therapieresistenz einhergehen [283] [284].

Therapieansätze für B-CLL beinhalten meist kombinatorische Chemotherapie, bei der u.a. Purin-Analogs verwendet werden. Ziel hierbei ist v.a. die Induktion von Apoptose hervorzurufen [280].

B.I.3.2. Verlust von funktionalem T β RI an der Zelloberfläche von TGF- β resistenten B-Zellen bei chronischer lymphatischer Leukämie

B-Zellen zeigen generell eine über TGF β vermittelte Wachstumshemmung. In DeCoteau et al. (1997) wurde jedoch beschrieben, daß B-Zellen in etwa 1/3 der untersuchten Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie eine Resistenz gegen TGF- β vermittelte Wachstumsinhibierung entwickelt haben [267]. Diese Zellen tragen keinen funktionalen TGF- β Typ I Rezeptor an der Zelloberfläche und dies obwohl normale Mengen an Rezeptor mRNA exprimiert werden. Anhand der bisherigen Daten aus Bindungs- und Crosslinking-Studien können keine definitiven Aussagen darüber gemacht werden, ob der scheinbare Verlust von T β RI an der Zelloberfläche auf einem tatsächlichen Fehlen des Proteins beruht, oder ob T β RI zwar vorhanden ist, aber nicht in der Lage mit T β RII zu interagieren oder TGF- β zu binden. Es ist auch nicht vollständig auszuschließen, daß ein Defekt am Typ II Rezeptor vorliegt, der die Detektion von T β RI mit den verwendeten Techniken nicht möglich macht. Es war nun Ziel dieser Arbeit diesen noch ungeklärten Punkten nachzugehen und die bisherigen Studien zu vervollständigen. Eventuelle Mutationen in den TGF- β Rezeptoren sollten mittels RT-PCR auffindig gemacht und anhand von Expressions- und Aktivitätstests charakterisiert werden. Genaue Vorgehensweisen und Ergebnisse sind im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben.

B.II. Ergebnisse

B-Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) zeigen Resistenz gegenüber TGF- β vermittelter Wachstumsinhibierung und veränderte Oberflächenexpression der TGF- β Rezeptoren. Dies beruht möglicherweise auf Mutationen in den Rezeptorgenen. Um nun die molekulare Basis der TGF- β Resistenz von B-CLL-Zellen zu definieren wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse wurden zur Veröffentlichung eingereicht und werden unter ‚Schiemann et al., *TGF- β -resistant B Cells from Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Contain Recurrent Mutations in the Signal Sequence of TGF- β Type I Receptor*‘, zu finden sein.

B.II.1. Klonierung von T β RI und T β RII cDNAs mittels RT-PCR und deren Sequenzierung

Zur Verfügung stand mRNA, welche aus TGF- β resistenten B-Zellen zweier CLL-Patienten (s. DeCoteau et al., Patienten 2 und 3) isoliert wurde (erh. v. P. Knaus, Biozentrum Würzburg) [267]. Mit Hilfe von RT-PCR konnten die cDNAs der beiden TGF- β Rezeptoren (T β RI und T β RII) unter Verwendung rezeptorspezifischer Primer, welche außerdem Restriktionsschnittstellen einführen; amplifiziert werden. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in das prokaryontische Expressionsplasmid pBluescript einligiert. DH5 α -Bakterien wurden anschließend mit diesem Konstrukt transformiert. Positive Bakterienklone wurden auf Amp/Tet-Agarplatten selektioniert und in 2ml LB-Medium weiterkultiviert. Es wurden Mini-Plasmidpräparationen durchgeführt, woraufhin die Rezeptor-cDNAs mit entsprechenden Primern sequenziert werden konnten.

In den cDNAs des TGF- β Typ II Rezeptors konnten keine Veränderungen der Nukleotidsequenz festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden in den T β RI cDNAs beider Patienten zwei Mutationen mit 100%iger Häufigkeit detektiert, welche in der mutmaßlichen Signalpeptidsequenz des Rezeptors lokalisiert sind. Es handelt sich zum einen um die Substitution eines einzelnen Nukleotids in Codon 12 (CTG \rightarrow CAG), was einen Aminosäureaustausch von Leucin gegen Glutamin, L(12)Q, zur Folge hat. Diese Mutation tritt in Kombination mit der ‚in-frame‘-Deletion eines

B.II.3. Untersuchungen zur Expression und Transport von T β RI/A8

Zuerst sollte die Frage beantwortet werden, ob die beiden Mutationen die Expression des T β RI-Proteins beeinflussen. Zur Klärung wurde die Methode des *in vivo* Labellings eingesetzt.

Unter Verwendung der CaCl₂-Methode wurden 293T Zellen transient mit einem wt-T β RI-HA Konstrukt bzw. mit T β RI/A8 transfiziert. Kontrollzellen wurden mit einem ‚leeren‘ Expressionsplasmid transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit [³⁵S] Cys/Met *in vivo* markiert. Die Zellysate wurden einer Immunpräzipitation mit dem T β RI-spezifischen Antiserum α -VPN (vgl. IV.2.7.) unterzogen und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. Die markierten T β RI-Proteine konnten mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden und sind in Abb.39 dargestellt.

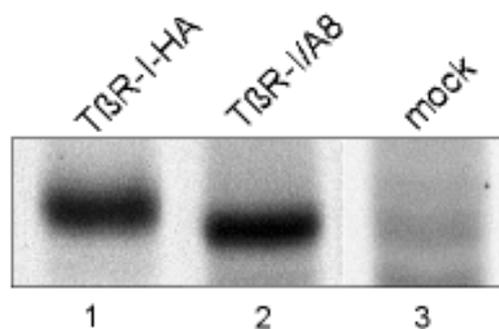


Abb.39 Nachweis der Proteinexpression von T β RI/A8 durch *in vivo* Markierung mit [³⁵S] Cys/Met.

Es wird deutlich, daß durch die Expression der T β RI/A8 cDNA in 293T Zellen ein Polypeptid produziert wurde, welches bezüglich Größe und Intensität nur aufgrund des HA-Epitops am wt-T β RI-Konstrukt vom wt-T β RI Polypeptid (Abb.39, Spalten 1 und 2) unterscheidbar ist. Die Kontrollzellen (mock) liefern eine leichte T β RI-Bande, die auf das Vorhandensein endogenen Rezeptors zurückzuführen ist (Abb.39, Spalte 3). Die Mutationen innerhalb der T β RI-Signalpeptidsequenz beeinflussen also nicht die Translation der mRNA.

Im Weiteren sollte getestet werden, ob die Mutationen, die ja innerhalb des Signalpeptids von T β RI/A8 lokalisiert sind, die Prozessierung des Proteins und seine Translokation zur Plasmamembran behindern.

Es wurden wiederum 293T Zellen mit wildtypischen oder mutanten T β RI-cDNA-Konstrukten transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zelloberflächenproteine mit einem Biotin-Derivat (EZ-Link Sulfo-NHS-LC Biotin) markiert. Nach Zellyse wurden die T β RI Polypeptide durch Immunpräzipitation mit α -VPN isoliert. Es wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. Biotinylierte TGF- β Typ I Rezeptoren konnten durch Interaktion mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin über Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

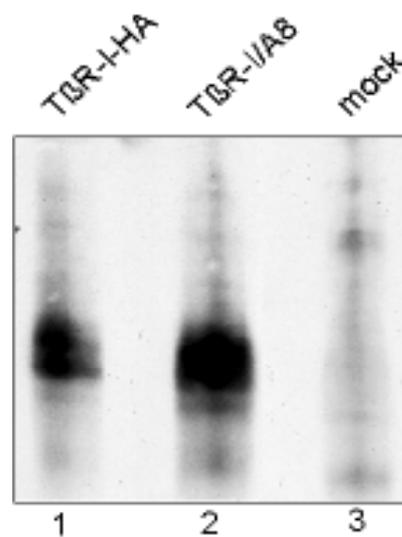


Abb.40 Nachweis der Oberflächenexpression von T β RI/A8 mittels Rezeptorbindung an ein Biotin-Derivat.

Abb.40 zeigt die äquivalente Zelloberflächenexpression von wt-T β RI-HA und T β RI/A8 in 293T Zellen (Abb.40, Spalten 1 und 2). Der geringe Größenunterschied der Signale ist wiederum auf des HA-tag am wt-T β RI zurückzuführen. Die mock-Kontrolle, bei der ‚leerer‘ Vektor transfiziert wurde, zeigt keine Bande (Abb.40, Spalte 3). Demnach wird auch ein korrekter Transport von T β RI zur Plasmamembran durch die beiden Signalsequenz-Mutationen nicht negativ beeinflusst.

B.II.4. Reportergergenstudien zur Untersuchung der Signalübertragungsaktivität von T β RI/A8

Nachdem gezeigt werden konnte, daß T β RI/A8 trotz der Mutationen im Signalpeptid nicht im Zytoplasma zurückgehalten wird, sollte als nächstes untersucht werden, ob Veränderungen bezüglich der Signalübertragungskapazität von T β RI/A8 zu beobachten sind. Aus diesem Grund wurden Reportergergenstudien in R1b/L17 Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie ist im parentalen Zustand nicht TGF- β responsiv, da sie über keinen funktionalen Typ I Rezeptor verfügt [197]. Durch Einbringen von T β RI kann die TGF- β Responsivität der Zellen wiederhergestellt werden. Unterschiede bei der Reportergergenexpression in diesen Zellen lassen folglich Schlüsse über die Funktionalität des transfizierten Typ I Rezeptors zu.

Für die Durchführung eines Reportergergen-Assays wurden $1,3 \times 10^5$ Zellen mit $1 \mu\text{g}$ p3TP-luc-Reportergergen zusammen mit $0,3 \mu\text{g}$ Referenzplasmid (pRL-TK) und $2 \mu\text{g}$ T β RI-wt bzw. T β RI/A8 unter Verwendung der Lipofectamin-Transfektionsmethode transfiziert. Die Zellen wurden mit 200 pM TGF- β 1 ca. 20 h inkubiert. Anschließend wurden die Luziferaseaktivitäten in einem Luminometer bestimmt. Abb.41 und Abb.42 beinhalten die Mittelwerte der Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit entsprechenden Standardabweichungen (\pm SEM).

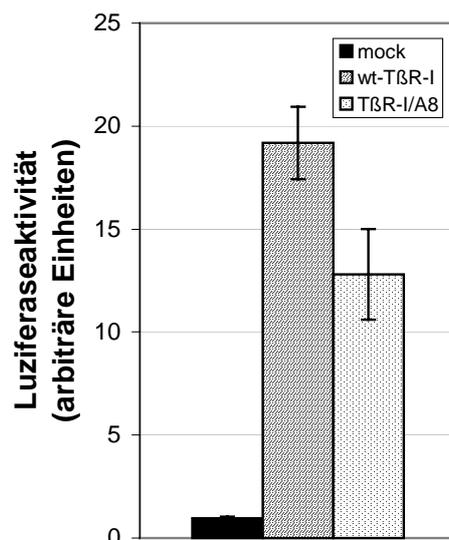


Abb.41 Luziferase-Messung in R1b/L17 Zellen. TGF- β Responsivität wird durch Einbringen beider Rezeptorkonstrukte wiederhergestellt.

Wie erwartet wurde die TGF- β induzierte Luziferase-Expression in R1b/L17 Zellen durch Einbringen von T β RI-wt wiederhergestellt (Abb.41, Säule 2). Die Transfektion von T β RI/A8 führte ebenfalls zu Luziferase-Expression (Abb.41, Säule 3). Die gemessene Luziferase-Aktivität in T β RI/A8-Proben lag jedoch ca. 30% unter dem T β RI-wt-Wert. Diese Beobachtung weist auf eine negative Beeinflussung der Signalübertragungsaktivität durch die Mutationen hin.

Durch Überexpression der transfizierten Rezeptorkonstrukte, die von einem starken CMV-Promotor getrieben sind, könnten möglicherweise Differenzen zwischen wildtypischem und mutantern T β RI, die zwar geringfügig erscheinen aber dennoch biologisch signifikant sind, nicht angemessen detektiert werden. Aus diesem Grund wurden in einem neuen Ansatz R1b/L17 Zellen mit fortlaufend geringeren Mengen Rezeptor-DNA transfiziert. Es wurden die gleiche Zellzahl, sowie gleiche Reporter- und Referenzplasmid Mengen wie im vorherigen Versuch verwendet. Ebenso wurden die Zellen wiederum mit 200 pM TGF- β 1 stimuliert.

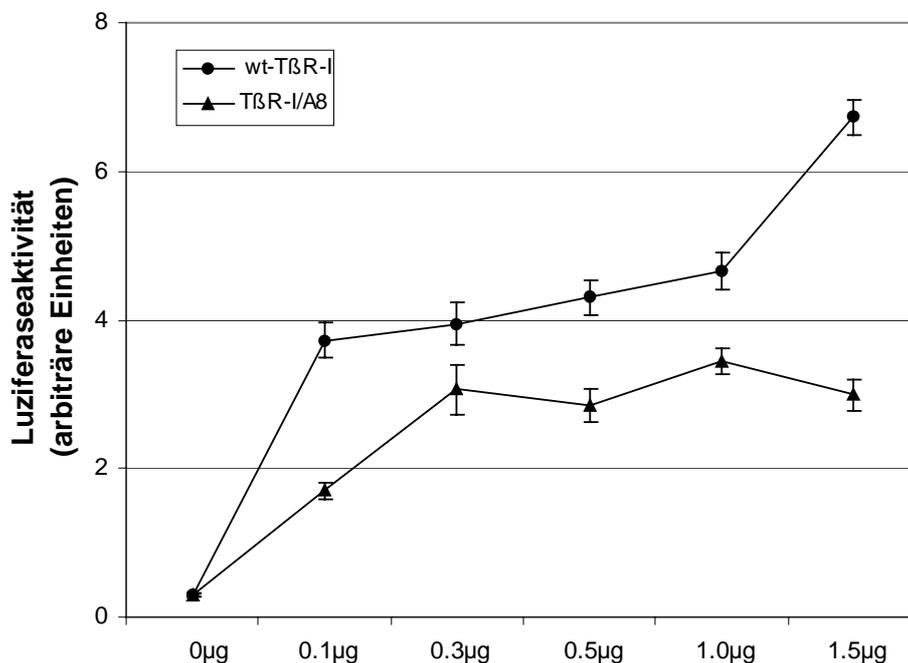


Abb.42 Luziferase-Messung mit unterschiedlichen Mengen an transfizierter Rezeptor cDNA.

In Abb.42 ist zu sehen, daß beide Rezeptortypen, wt-T β RI und T β RI/A8, in der Lage sind sogar in sehr geringer Konzentration (0,1 μ g) die TGF- β Sensitivität der Zellen zu rekonstruieren. Jedoch ist die Signalstärke der T β RI/A8 transfizierten Zellen im Vergleich zu den T β RI-Kontrollzellen erheblich verringert. T β RI/A8 ist also weniger effizient bei der TGF- β Signalübertragung als wt-T β RI und zwar in allen verwendeten cDNA Konzentrationen. Eine maximale Reduktion der Luziferase-Aktivität um 65% wurde mit einer cDNA Konzentration von 1,5 μ g erreicht. Aus den in Abb.42 dargestellten Ergebnissen läßt sich wiederum ablesen, daß der mutierte TGF- β Typ I Rezeptor die TGF- β Signalübertragung beeinträchtigt. Eine starke Überexpression scheint das allgemeine Bild nicht zu beeinflussen, da sich alle bei allen cDNA-Konzentrationen, auch bei geringen, die gleiche Tendenz abzeichnet. Es bleibt allerdings zu beachten, daß vermutlich auch geringe Mengen transfizierter DNA physiologische Konzentrationen um ein Vielfaches übersteigen. So kann ein maskierender Überexpressionseffekt auch bei geringen DNA-Mengen nicht ausgeschlossen werden.

B.III. Diskussion

Ein heterotetramerer Komplex aus T β RI und T β RII ist Voraussetzung für eine TGF- β vermittelte Signalübertragung [22] [195]. Der Verlust einer dieser beiden Rezeptoren hat in einer Vielzahl von Tumorzellen Insensitivität gegenüber TGF- β vermittelter Wachstumsinhibierung zur Folge. Unterschiedlichste Mechanismen können einem Rezeptorverlust zu Grunde liegen. Beispielsweise haben Deletionen und Mutationen in den entsprechenden Gensequenzen den Verlust von mRNA Expression zur Folge. Ebenso können Translation und Proteintargeting negativ beeinflusst sein. Beobachtet werden auch Mutationen innerhalb der Rezeptor-Kinase Domänen, welche diese inaktivieren, somit eine Signalübertragung verhindern und daher eine TGF- β Resistenz verursachen (s. B.I.2.).

In DeCoteau et al. (1997) konnte gezeigt werden, daß B-Zellen einiger B-CLL Patienten Resistenzen gegenüber TGF- β vermittelten wachstumsinhibitorischen Effekten aufweisen. Dies hat eine Proliferation der Zellen trotz permanenter Anwesenheit von TGF- β im Kulturmedium zur Folge. Aus Bindungs- und Crosslinking- Studien ging außerdem hervor, daß B-Zellen sowohl von TGF- β sensitiven als auch von TGF- β insensitiven B-CLL Patienten TGF- β Typ II Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimieren. Ein funktionaler TGF- β Typ I Rezeptor findet sich jedoch nur in TGF- β sensitiven B-Zellen, nicht in insensitiven. Der Nachweis von mRNA der TGF- β Rezeptoren mittels Northern Blot Analyse macht deutlich, daß B-Zellen beider B-CLL-Populationen äquivalente Mengen Typ I und Typ II Rezeptor mRNA exprimieren. Eine vollständige Deletion des T β RI Gens kann demnach ausgeschlossen werden. Außerdem liegen scheinbar keine Veränderungen in den Rezeptorgenen vor, die eine Transkription verhindern oder beeinträchtigen würden [267].

Diese Feststellungen lassen nun die Vermutung zu, daß TGF- β Resistenz von B-Zellen einiger B-CLL Patienten die Konsequenz von Mutationen innerhalb des kodierenden Bereichs des *t β ri* Gens ist. Dadurch wird möglicherweise die Expression des Rezeptorproteins an der Zelloberfläche, die TGF- β Bindung an den Rezeptor oder die Interaktion von T β RI mit T β RII verhindert. Im Hinblick auf eine funktionelle Rezeptor-Interaktion sind demnach auch Defekte am TGF- β Typ II Rezeptor nicht auszuschließen. Es ist demnach durchaus denkbar, daß ein Fehlen funktionaler TGF- β Rezeptoren an der Zelloberfläche für die TGF- β Resistenz der B-Zellen in

einigen Fällen von CLL verantwortlich ist. Ziel dieser Arbeit war nun die molekulare Basis dieser Resistenz zu definieren.

Hierfür wurde RT-PCR an B-Zell mRNA durchgeführt um die TGF- β Rezeptor cDNAs aus beiden in DeCoteau et al. (1997) beschriebenen Patienten (Patienten 2 und 3) zu isolieren und anschließend zu sequenzieren (vgl. B.II.1.).

In einer Mehrzahl humaner Tumoren ist TGF- β Resistenz auf mutationsbedingter Inaktivierung des T β RII Gens begründet. Mutationen in der Poly-Adenin Sequenz des T β RII entstehen als Konsequenz von zellulärer Microsatelliteninstabilität und resultieren in verkürzten T β RII-Polypeptiden [254] [255]. Ein Vorhandensein von Veränderungen dieser Art scheint für die T β RII Gene der o.g. B-CLL Patienten sehr unwahrscheinlich, da B-Zellen beider Patienten normal große T β RII Proteine exprimieren [267]. Mutationen, die einen dominant negativ wirkenden T β RII-Phänotyp zur Folge haben, sind daher ebenfalls weitgehend ausgeschlossen; ebenso Mutationen, die die Ligandenbindung beeinflussen. Es galt dennoch die T β RII cDNA bezüglich anderweitiger Auffälligkeiten zu untersuchen, die möglicherweise Strukturveränderungen oder Rezeptorinaktivierung bewirken. Durch Sequenzierung einer repräsentativen Zahl von T β RII cDNA-Klonen konnte definitiv gezeigt werden, daß keine Veränderungen in der T β RII-Nukleotidsequenz in B-CLL-Zellen auftreten.

Im Gegensatz dazu wurden Mutationen in den T β RI cDNAs beider Patienten detektiert. 100% der untersuchten cDNAs enthalten eine L(12)Q Substitution in Kombination mit einer ‚in-frame‘-Deletion eines einzelnen Alaninrestes innerhalb einer Aneinanderreihung von insgesamt neun Alaninen (9-Alanin-Kette) (s. Abb.38). Beide Mutationen sind im Exon 1 lokalisiert und sind Teil der putativen Signalpeptidsequenz des Rezeptors [16]. Da beide Mutationen in allen cDNA-Klonen vorhanden sind, kann von einer homozygoten Manifestation ausgegangen werden.

Eine große Anzahl an hydrophoben Aminosäureresten ist nachweislich ein essentielles Charakteristikum für Signalpeptide sekretorischer Proteine [285]. Die Zahl der Alanine in einem Bereich, der zusätzlich die potentielle Signalpeptidspaltungsstelle im *t β RI* Gen beinhaltet, könnte demnach ein wichtiges Kriterium für effiziente Peptidspaltung und funktionierendes Proteintargeting darstellen. Falsches Targeting aufgrund unvollkommener Peptidabspaltung wäre durchaus eine Erklärung für das beobachtete Fehlen des T β RI an der Zelloberfläche der untersuchten B-Zellen.

Mit dieser Intension und um den genaueren Einfluß beider Mutationen auf die TGF- β Signalübertragung zu validieren, wurde eine die Mutationen enthaltende T β RI Variante, T β RI/A8, konstruiert und Untersuchungen zu deren Expression, Targeting und biologischer Aktivität durchgeführt.

Experimente in 293T Zellen (s. B.II.3.) zeigen, daß weder die Translation der T β RI mRNA, noch die Expression des T β RI Polypeptids an der Zelloberfläche durch die vorhandenen Signalsequenz-Mutationen negativ beeinflußt werden. Größenunterschiede im Vergleich zu wt-T β RI, die auf eine fehlende Abspaltung des Signalpeptids hinweisen würden, sind nicht zu erkennen. Aufgrund der vorliegenden Daten kann fehlgesteuertes Proteintargeting ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse bestätigen u.a. die Daten von Chen et al. (1999) und bekräftigen somit die Vermutung, daß die 9-Alanin-Kette innerhalb der Signalpeptidsequenz von T β RI für die Translokation und Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche nicht benötigt wird [262]. Die vermutete Abwesenheit des TGF- β Typ I Rezeptors an der Zelloberfläche TGF- β resistenter B-CLL-Zellen ist demnach nicht das Resultat der beiden Mutationen innerhalb der Signalsequenz. Statt dessen müssen andere, bisher ungeklärte Mechanismen zugrunde liegen.

Nachdem die exakte Spaltstelle des Signalpeptids noch nicht exakt festgelegt wurde, ist eine Lokalisation der neun Alaninreste am äußersten N-Terminus des reifen Polypeptids und somit eine Einbeziehung in den Ligandenbindungsprozess ebenfalls denkbar. Eine verringerte Alaninzahl könnte somit die Ligandenbindung und Signalübertragung störend beeinflussen. Um dies zu untersuchen wurden Reporterstudien in R1b/I17 Zellen durchgeführt (s. B.II.4.). Diese Zelllinie ist aufgrund fehlender T β RI Expression nicht TGF- β responsiv. Sensitivität gegenüber TGF- β kann jedoch durch Einbringen von T β RI cDNA vollständig wiederhergestellt werden. In Abb.41 ist dargestellt, wie sowohl Einbringen von wt-T β RI als auch von T β RI/A8 eine TGF- β -stimulierte Luziferaseexpression ermöglicht. Die durch T β RI/A8-Transfektion erzielte Luziferase-Aktivität ist jedoch um ca. 30% geringer als die von wt-T β RI transfizierten Zellen. Dennoch ist T β RI/A8 biologisch aktiv und in der Lage mit dem Liganden TGF- β 1 zu interagieren. Trotz durchaus bemerkenswerter Unterschiede bezüglich der Luziferaseexpression darf ein möglicher Überexpressionseffekt, ein Nebeneffekt eines starken CMV-Promotors im Expressionsplasmid, nicht ausgeschlossen werden. Die Überexpression der Rezeptoren, welche die Proteinmenge biologischer Systeme um ein Vielfaches

übersteigt, maskiert möglicherweise ausschlaggebende Unterschiede bei der Signalübertragung von wildtypischem und mutiertem Rezeptor. Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen und um Effekte der Überexpression zu mindern, wurden R1b/L17 Zellen in einem neuen Ansatz mit sukzessiv abnehmenden Mengen an Rezeptor cDNA transfiziert. Die TGF- β Sensitivität von R1b/L17 Zellen wurde bei allen cDNA-Konzentrationen (0,1 - 1.5 μ g) wiederhergestellt, jedoch zeigten T β RI/A8 transfizierte Zellen in allen verwendeten cDNA Konzentrationen verringerte Luziferase-Signalstärken im Vergleich zu wt-T β RI transfizierten Zellen (s.Abb.42). T β RI/A8 ist demnach weniger effizient bei der TGF- β Signalübertragung, unbeeinflusst von Überexpressionseffekten und cDNA Konzentrationen.

Veränderungen in der Zahl der Alaninreste dieser N-terminalen Alanin-Kette des TGF- β Typ I Rezeptors wurden bereits mehrfach in unterschiedlichen humanen Tumorformen, wie in Kolon-, Cervix- und Blasen-Karzinomen, Keimzelltumoren und Tumoren des hämatopoethischen Systems beschrieben [268] [269] [262] [286]. Auffallend häufig kommt es zur Deletion von drei Alaninresten der 9-Alanin-Kette. Diese Rezeptormutante (T β RI/A6) findet sich hetero- und homozygot häufig bei Patienten mit Krebsdiagnose. Es wird vermutet, daß es sich bei diesem polymorphen Allel um ein 'Tumor-Empfänglichkeits-Allel' handelt, das möglicherweise zur Tumorentstehung beiträgt [269]. Alle T β RI-Moleküle mit veränderter 9-Alanin-Kette (Deletionen, Insertion von einem Alanin) können normal exprimiert und zur Zelloberfläche transferiert werden [262] [268]. Beachtenswerterweise zeigt T β RI/A6 in Reporterstudien genau wie T β RI/A8 eine etwas geringere Signalübertragungsaktivität. Auch Limitierung der Rezeptorexpression durch Transfektion geringer DNA Mengen liefert vergleichbare Ergebnisse [262]. Pasche et al. (1998) konnten zwar in Reporterstudien keine derartigen Tendenzen, sprich verringerte TGF- β Responsivität von T β RI/A6 transfizierten Zellen im Vergleich zu wt-T β RI transfizierten Zellen, feststellen, jedoch durchaus beachtenswerte Unterschiede bezüglich TGF- β vermittelter Wachstumsinhibierung. Expression von T β RI/A6 resultierte in einem verringerten TGF- β antiproliferativen Effekt und läßt daher auf eine gesteigerte tumorogene Empfänglichkeit schließen [268, 269].

Es konnte also von verschiedenen Seiten gezeigt werden, daß sowohl Wachstumsinhibierung als auch Reporter-Induktion durch Überexpression von Alanin-Mutanten verringert werden. Die molekularen Mechanismen jedoch, die der Fähigkeit von T β RI-Alanin-Mutanten TGF- β Resistenz hervorzurufen, zugrunde

liegen, sind soweit noch vollständig ungeklärt. Obwohl gezeigt wurde, daß die 9-Alanin-Kette nicht zur Translokation und Expression des T β RI Proteins benötigt wird [262], ist dennoch unklar ob dieser Sequenz nicht eine alternative Rolle bezüglich Bindungsverhalten, Signalübertragung und/oder zielgerichteter Expression des Polypeptids, zukommt.

Verringerte Sensitivität gegenüber TGF- β involviert möglicherweise zelluläre Schwellenwerte für die TGF- β Signalübertragung. Es ist davon auszugehen, daß eine verringerte Wirksamkeit von TGF- β , die beispielsweise auf einer Reduktion der Rezeptorzahl an der Zelloberfläche oder auf einer Reduktion der Rezeptorkopplung beruht, die Stärke des intrazellulären TGF- β vermittelten Signals ernsthaft abschwächt. Aufgrund der zu geringen Signalstärke, die gewisse Schwellenwerte nicht übersteigt, könnte es zu einem Ausfall einer entsprechenden biologischen Antwort kommen. Chen et al. (1999) konnte zeigen, daß Signalübertragungsdifferenzen von T β RI/A6 offensichtlicher bei geringeren als höheren cDNA Konzentrationen werden [262]. Eine supra-physiologische Expression dieser T β RI Mutante übersteigt also Minimal-Schwellenwerte, die für eine zelluläre Antwort benötigt werden. Aus diesem Grund wird die wahre Signalübertragungseffizienz, die sich in diesen Zellen manifestiert hat, verdeckt.

Von Piek et al. (1999) konnte in einem weiteren Beispiel gezeigt werden, daß zelluläre Responsivität gegenüber Mitgliedern der TGF- β Superfamilie durch ein Erreichen von basalen Schwellenwerten reguliert wird. Eine Differenzierung von Brust-Epithelzellen (NuMG) in die mesenchymale Richtung (epithelial to mesenchymal transdifferentiation, EMT) ist durch Stimulation mit TGF- β , jedoch nicht mit Aktivin, erreichbar, und dies, obwohl die Rezeptoren für Aktivin und TGF- β die gleiche Signalmaschinerie benutzen. Dies beruht auf einer zu geringen Expression der Aktivin Rezeptoren an der Zelloberfläche. Das durch Aktivin propagierte Signal ist demnach zu gering um erforderliche zelluläre Schwellenwerte zu übersteigen [287]

Im Hinblick auf B-CLL darf nicht außer Acht gelassen werden, daß TGF- β Rezeptoren endogen in sehr geringer Zahl an der Zelloberfläche exprimiert werden (< 2000 Rezeptoren / Zelle) [288]. Es ist daher durchaus denkbar, daß bereits geringfügige Veränderungen entweder der Zelloberflächenexpression oder der Signalübertragungsaktivität des TGF- β Typ I Rezeptors pathologische Konsequenzen haben können. Zusätzlich ist für eine funktionierende TGF- β

Signalübertragung das Beibehalten einer korrekten zellulären Ratio von Typ I zu Typ II Rezeptoren absolut essentiell [265] [289].

Eine verringerte Signalentwicklung unterhalb von bestimmten zellulären Schwellenwerten, würde also maligne B-Zellen einer Wachstumskontrolle durch TGF- β entziehen und gleichzeitig vor TGF- β vermittelter Apoptose, dem prinzipiellen Mechanismus zur Eliminierung von autoreaktiven Lymphozyten, schützen. Da TGF- β als extrem immunsuppressiv gilt, kann zusätzlich die generelle Immunüberwachung durch vermehrte Produktion von TGF- β von malignen TGF- β resistenten B-Zellen unterdrückt werden. Durch diese Mechanismen würde eine graduelle Expansion von malignen B-Zellen vorangetrieben.

Obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen noch ungeklärt sind, schwächen Mutationen innerhalb der 9-Alanin-Kette die TGF- β Signalübertragung nachweislich ab. Es stellt sich daher die Frage nach der Häufigkeit des Auftretens von derartigen Mutationen in TGF- β sensitiven und insensitiven Zellen von B-CLL Patienten. In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von M. Kadin (Beth Israel Medical Center, Boston) wurden Zellen von 33 B-CLL Patienten bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber TGF- β mit Hilfe eines [3 H]Thymidin-Einbau-Proliferationstests untersucht [267]. Eine verringerte Proliferationshemmung der Zellen dient als Nachweis für TGF- β Resistenz. Es wurde festgestellt, daß TGF- β Resistenz von B-CLL-Zellen nicht auf den Gesundheitszustand des Patienten oder den klinischen Status der Krankheit schließen läßt. Jedoch konnte eine absolute Korrelation zwischen der TGF- β Sensitivität eines B-CLL Patienten und dem Vorhandensein von Alanin Mutationen innerhalb der Signalsequenz des *t β rl* Gens nachgewiesen werden. Jeder TGF- β insensitive B-CLL Patient besaß, ganz im Gegensatz zu TGF- β sensitiven Kandidaten, eine oder mehrere 'in frame' Alanin-Deletionen innerhalb der 9-Alanin-Kette des Rezeptor Polypeptids. Ungefähr 10% der untersuchten B-CLL Patienten wiesen TGF- β Resistenz der B-Zellen und somit Alanin-Mutationen im T β RI auf, ein Prozentsatz der mit Untersuchungen anderer Tumorarten übereinstimmt [268, 269]. Wiederum konnte hier, wie auch in einer Vielzahl anderer Tumoren, die 9-Alanin-Kette des TGF- β Typ I Rezeptors als ein 'hot spot' für Mutationen identifiziert werden. TGF- β Resistenz ist für die Entwicklung von B-CLL nicht erforderlich. Dies läßt die Spekulation zu, daß Signalsequenz-Mutationen des T β RI und deren Fähigkeit die zelluläre Sensitivität gegenüber TGF- β zu verringern, den Übergang vom indolenten zum aktiven Krankheitsstadium fördern.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß hier die ersten Mutationen in den *tβrl* Genen TGF-β resistenter B-CLL Patienten identifiziert wurden. Diese Signalsequenz-Mutationen, die die Signalwirkung von TGF-β reduzieren, beeinflussen möglicherweise die Wachstumskontrolle maligner B-Zellen und unterstützen gleichzeitig deren langsame und graduelle Expansion, eine Eigenschaft, die typisch für diese bisher noch unheilbare Krankheit ist [280]. Nachdem Alanin-Mutationen des TβRI mit TGF-β Resistenz der B-Zellen korrelieren, könnten durch einfaches Screenen von B-CLL Patienten für Signalsequenz-Mutationen im *tβrl* Gen Aussagen über die TGF-β Sensitivität der Patienten gemacht werden. Wenn Alanin-Mutationen tatsächlich den Übergang zum aktiven Status der Krankheit beeinflussen, kann die Einschätzung der TGF-β Resistenz eine wichtige Voraussetzung für eine zielgerichtete Therapie dieser weitverbreiteten Krankheit sein.

IV. Material und Methoden

IV.1. Abkürzungen

α -	anti-
AK	Antikörper
Alk	Activin like kinase
AA	Acrylamid
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BA	Methylenbisacrylamid
β -Gal	β -Galaktosidase
bp	Basenpaare
BMP	bone morphogenetic protein
BR-IA	BMP Typ IA Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
CMV	Cytomegalo-Virus
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-nucleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
ECL	Enhanced Chemilumineszens
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EtBr	Ethidiumbromid
FKBP12	FK506 binding protein
HA	Hämagglutinin
HPLC	high performance liquid chromatography
IP	Immunpräzipitation

kDa	Kilodalton
LB	Luria-Broth
MAD	mothers against dpp
MH	MAD-Homology
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
P-	Phospho-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pen	Penicillin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pox	horseradish peroxidase
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
ss	einzelsträngig
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TβRI/II	TGF-β-Rezeptor Typ I/II
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TGFβ	transforming growth factor β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIP	TGF-β receptor interacting protein
U	unit
ÜNK	über Nacht Kultur
UV	ultraviolett

Vol	Volumen
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-galactopyranosid

IV.2. Arbeitsmaterialien

IV.2.1. Geräte

Blot-System	Mini-V 8.10 (Blot Module)	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Mini-Protean II	Bio-Rad
Elektrophorese-Powersupply	Phero-stab. 500	Biotech-Fischer
Horizontal-Elektrophorese		Werkstatt Biozentrum
Entwicklermaschine	Caomcompact 35	Protec
Geltrockner	Model 483 slab dryer	Biorad
Heizblock		Liebisch
Inkubationsschrank	Heraeus 6000	Heraeus
Lichtmikroskop	Leitz DM IL	Leica
Luminometer	FB 12	Berthold
PCR-Cycler	Cetus DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer
Phosphoimager		Molecular Dynamics
Schüttler	Mixer 5432	Eppendorf
Speed-Vac		Bachofer
Spektrophotometer	Kontron Uvicon 930	Kontron
Sterilbank	HLB 2472	Heraeus
Waage	1264 MP	Satorius
Feinwaage	2001 MP2	Satorius
γ -Zähler	Gamma 4000	Beckman
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417C	Eppendorf
Zentrifuge	Sepatech Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge	Rotanta/RPC	Hettich
Kühlzentrifuge	Beckman J2-21	Beckman

IV.2.2. Chemikalien und Reagenzien

- Grundchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Serva und Sigma in den höchsten Reinheitsstufen bezogen.
- Artikel und Reagenzien für die Zellkultur stammen von den Firmen Biochrom, BioWhittaker, Falcon, Gibco BRL, Greiner, Nunc und Merck.
- Nährmedien für Bakterien wurden bei den Firmen Roth und Difco erworben.
- Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das teilweise Millipore-Qualität besaß.

IV.2.3. Zellkulturmaterial

Kulturmedien werden nach Herstellerangaben gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

- EMEM (BioWhittaker) Essential Minimum Eagle Medium
- DMEM (Gibco BRL) Dulbecco's Modified Eagle Medium

- FCS (Gibco BRL) Fetal Calf Serum wird vor Verwendung für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.
- L-Glutamin (Biochrom) wird in einem 1:100 Verhältnis zugegeben;
⇒ Konzentration im Medium =1mM
- P/S 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (=100x Stocklösung)
- Nu-Serum (BD) wird vor Verwendung für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.
- NEA (Biochrom) Nicht essentielle Aminosäuren werden in einem 1:100 Verhältnis zugegeben.
- 2x Trypsin (Biochrom) wird zusammen mit EDTA in PBS gelöst
- Trypanblau (Biochrom) wird 1:4 mit PBS verdünnt

IV.2.4. Zytokine

Rekombinantes humanes TGF- β 1, 2 und 3 sowie humanes Aktivin A wurden von der Fa. R&D bezogen.

Rekombinant hergestelltes BMP-2 [290] wurde von Prof. W. Sebald, Universität Würzburg, erhalten.

IV.2.5. Oligonukleotide

Die hier verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. Interactiva synthetisiert. Die Lyophilisate wurden in dH₂O aufgenommen (Endkonzentration 100 pmol/ μ l, Sequenzen s. Anhang)

IV.2.6. Enzyme

- Restriktionsenzyme MBI Fermentas oder New England Biolabs (NEB)
- DNA-modifizierende Enzyme:
 - Pfu-Polymerase Stratagene
 - Taq-Polymerase wurde von W. Hädelt (Biozentrum, Uni-Würzburg) hergestellt
 - T4-DNA-Ligase Promega
 - Superscript II reverse Transkriptase Gibco BRL
- RNase Roth

IV.2.7. Antikörper

Die in Tab.1 aufgelisteten Antikörper wurden in Immunpräzipitationen sowie für die Identifizierung spezifischer Proteine in Western-Blots mit anschließender Luminoldetektion eingesetzt. Detektionsantikörper (Tab.2) sind Meerrettich-Peroxidase (pox) konjugiert. Als Affinitätsmatrize in Immunpräzipitationen wurde Protein A-Sepharose (Sigma) verwendet.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Herkunft / Referenz</u>
anti-HA (12CA5) (monoklonal, Maus)	Hämagglutinin-Epitop,	wurde von T. Lutz (Uni-Würzburg) aus Hybridomazellen nach Standardmethoden isoliert und gereinigt.
anti-myc (9E10) (monoklonal, Maus)	myc-Epitop,	wurde von T. Lutz (Uni-Würzburg) aus Hybridomazellen nach Standardmethoden isoliert und gereinigt.
anti-flag (M2) (monoklonal, Maus)	flag-Epitop,	Sigma
anti-P-Smad2 (polyklonal, Hase)	phosphorylierte Form des Smad2 SSXS-Motivs	erhalten von P. ten Dijke (Upsalla); [202]
anti-Smad2 (SED) (polyklonal, Hase)	Smad2 Linker-Region	erhalten von P. ten Dijke (Upsalla); [26]
anti-BRIa(FB14/15) (polyklonal, Hase)	juxtamembrane Domäne des BR-IA	[29]
anti-CRII (260) (polyklonal, Hase)	C-Terminus des TGF- β Typ II Rezeptors (C552 – K567)	[177]
anti-RIIB(750/751) (polyklonal, Hase)	Insertsequenz des murinen TGF- β Typ II-B Rezeptors (DVEMEAQKDEI)	[128]
anti-hRIIB(500/501) (polyklonal, Hase)	Insertsequenz des humanen TGF- β Typ II-B Rezeptors (KDEIICPSCNRTAHPLRH)	[128]
anti-RIII (277) (polyklonal, Hase)	Zytoplasmatische Domäne des TGF- β Typ III Rezeptors (S833 - C847)	[177]
anti-VPN (polyklonal, Hase)	Zytoplasmatische Region des humanen T β RI (V156 – D177)	[16]

Tab.1 Erstantikörper

<u>Detektionsantikörper</u>	<u>Beschreibung</u>
anti-mouse-IgG-pox	erkennt schwere und leichte Kette von Maus-IgG (Dianova), polyklonal, Ziege
anti-rabbit-IgG-pox	erkennt schwere und leichte Kette von Hasen-IgG (Dianova), polyklonal, Ziege
Streptavidin-pox	Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin zur Detektion von Biotin-Markierungen (Pierce)

Tab.2 Zweitantikörper

IV.2.8. Expressionsvektoren und Bakterienstämme

pBluescript (pBS) (Stratagene)	prokaryotischer Expressionsvektor
pcDNA 1* (Invitrogen)	Vektoren zur Expression von rekombinanten Proteinen in eukaryotischen Säugerzellen. *Vermehrung nur in <i>E.coli</i> MC1061 möglich
pcDNA 3 (Invitrogen)	
pcDNA 3.1 (Invitrogen)	

Tab.3 Expressionsvektoren

Escherichia coli MC1061/P3:

Genotyp: F^- *hsdR* (r_k^- , m_k^-) *araD139* Δ (*araABC-leu*)7679 *galU galK* Δ *lacX74* *rpsL thi merB* {P3: KanR AmpR (am) TetR (am)}

Dieser Bakterienstamm ist für Vektoren entwickelt worden, die das P3 Episom zur Selektionierung der transfizierten Bakterien besitzen wie z.B. pcDNA 1.

Escherichia coli DH5 α :

Genotyp: ϕ 80*dlacZ* Δ M15,*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17* (R_k^- , m_k^+), *supE44, relA1, deoR, \Delta(*lacZYA-argF*)U169 [291]*

Escherichia coli C600:

Genotyp: *thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44* [292]

IV.2.9. Zelllinien

COS-7 (CRL-1651, ATCC)	fibroblastenähnliche Nierenzellen aus Makaken, transformiert mit dem T-Antigen das SV40 Virus
293T (erh. v. D. Lindemann, Würzburg)	Humane, embryonale Nierenzelllinie
Hep3B (HB-8064, ATCC)	humane Hepatoma Zelllinie
Mv1Lu (CRL-6584, ATCC)	Lungenepithelzelllinie vom Nerz
R1b/L17 (erh. v. J. Massague, New York)	Mv1Lu abgeleitete Zelllinie, die keinen TβRI exprimiert [293].
DR 26 (erh. v. J. Massague, New York)	Mv1Lu abgeleitete Zelllinie, die keinen TβRII exprimiert [197].
C2C12 (CRL-1722, ATCC)	murine mesenchymale Vorläuferzelllinie
C3H10T ^{1/2} (CRL-226, ATCC)	murine pluripotente fibroblastenähnliche Zelllinie
MC3T3-E1 (erh. v. P. ten Dijke, Uppsala)	murine mesenchymale Osteoblasten-vorläuferzelllinie
hFOB (CRL-11372, ATCC)	humane fötale Osteoblastenlinie
U2OS (erh. v. J. Hoppe, Würzburg)	humane Osteosarkoma Zelllinie
IMR 32 (erh. v. K. Unsicker, Heidelberg)	humane Neuroblastoma Zelllinie
L6 (CRL-1458, ATCC)	myoblastäre Rattenzelllinie

IV.3. Lösungen und Puffer

AA/BAA:	30% Acrylamid 1% N, N'-Methylenbisacrylamid
Chloroquin-NS-Medium:	DMEM-Medium 10% NU-Serum (Becton Dickinson) 80 µM Chloroquine (in H ₂ O gel.)
DNA-Probenpuffer (6x):	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerin
Elutionspuffer:	4 mM HCl 75 mM NaCl 0,1% BSA
2x HBS:	50 mM Hepes (pH 7,05) 10 mM KCl 12 mM α-D-Glucose 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
KRH-Lösung (pH 7,5):	50 mM Hepes 128 mM NaCl 1,3 mM CaCl ₂ 5 mM MgSO ₄ 5 mM KCl,
LB-Medium (pH 7,4):	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Yeast-Extrakt 10 g/l NaCl
Lower Tris (4x) (pH 8,8):	1,5 M Tris/HCl 0,4% SDS
Lösung 1 (pH 8,0):	25 mM Tris/HCl 50 mM Glucose 10 mM EDTA 5 mg/ml Lysozym
Lösung 2:	0,2 N NaOH 1% SDS
Lösung 3 (pH 4,8):	3 M KaAc
PBS:	120 mM NaCl 2 mM KCl 3 mM KH ₂ PO ₄ 7 mM Na ₂ HPO ₄
Phosphataseinhibitor-Mix (100x):	5 M NaF 0,01 M NaVO ₄ 3 M Na-PP
Proteinprobenpuffer (pH 8,6):	62,5 mM Tris/HCl 2% SDS 20% Glycerin (87%) 1% Bromphenolblau 5% β-Mercaptoethanol
Re-IP-Puffer:	1% SDS 50 mM Dithiothreitol 10% β-Mercaptoethanol

SDS-Laufpuffer (pH 8,6):	25 mM Tris/HCl 190 mM Glycin 0,15% SDS
SOB-Medium (pH 7,0):	20 g/l Bacto Trypton 5 g/l Yeast-Extrakt 0,5 g/l NaCl 0,83 mM KCl
SOC-Medium:	100 ml SOB-Medium + 1 ml 40% Glucose + 1 ml 1 M MgCl ₂ + 1 ml 1 M MgSO ₄
Stripping-Puffer:	5 mM Phosphatpuffer 2% SDS 0,014% β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer (10x):	400 mM Tris/Acetat (pH 8,5) 10 mM EDTA
TBS (TBS-T):	50 mM Tris (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,1% Tween-20 (=T)
Taq-Polymerase-Puffer	500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
Tbf 1:	30 mM KCl 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ -2H ₂ O 50 nM MnCl ₂ -4H ₂ O (pH 5,8) + 75 ml Glycerin (86%) ad 500 ml H ₂ O
Tbf 2:	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ -2H ₂ O 10 mM RbCl (pH 6,5) + 15 ml Glycerin (86%) ad 100 ml H ₂ O
TNE-Lysispuffer:	10 mM Tris (pH 7,8) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% NP-40
Transfektionspuffer (pH 7,4):	10 mM NaPO ₄ 150 mM NaCl
Tx-Lysispuffer	1 mM EDTA 1,0% oder 0,5% Triton X-100 in PBS
Upper Tris (4x) (pH 6,7):	0,5 M Tris/HCl 0,4% SDS
WB-Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol
WB-Waschpuffer:	10 mM Tris (pH 8,0) 150 mM NaCl 0,1% oder 0,5% Tween-20

X-Gal Inkubationspuffer (pH 7,0):	10 mM PBS 1 mM MgCl ₂ 3,3 mM K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O 3,3 mM K ₃ Fe(CN) ₆
-----------------------------------	--

Tab.4 Puffer und Lösungen

IV.4. Mikrobiologische Methoden

IV.4.1. Kultivierung von Bakterien

Bakterienkulturen wurden entweder aus bereits bestehenden Flüssigkulturen, Glycerin-Stammkulturen oder durch Picken einzelner Bakterienkolonien von Agarplatten angelegt und über Nacht bei 37°C in LB-Medium (s. Tab.4) mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen unter Schütteln kultiviert.

IV.4.2. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Einer Hitzeschocktransformation muß die Herstellung chemisch kompetenter Zellen vorausgehen.

Herstellung chemisch kompetenter Bakterien:

Die Bakterien wurden in 100 ml LB-Medium bei 37°C kultiviert, bis die Kultur eine OD von 0,2-0,3 erreicht hatte. Nachdem die Bakterien 5 min auf Eis gekühlt wurden, wurden sie durch Zentrifugation sedimentiert (4°C, 2500 rpm, 10 min). Das erhaltene Pellet wurde in 40 ml sterilem Tfb 1 (s. Tab.4) resuspendiert und erneut zentrifugiert (4°C, 3000 rpm, 10 min). Nach erneuter Resuspension des Pellets in 8 ml sterilem Tfb 2 (s. Tab.4) und Inkubation der Bakteriensuspension bei 0°C für 15 min wurden Aliquots von 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock:

Der gewünschte kompetente Bakterienstamm wurde auf Eis aufgetaut. Zu 100µl der Zellsuspension wurden 1-10 ng Plasmid-DNA oder 100-200ng eines Ligationsansatzes gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation des Bakterien/DNA-Gemisches auf Eis erfolgte der Hitzeschock, welcher zu der Aufnahme der DNA in

die Bakterien führen soll, bei 42°C für 90 sec. Die Zellen wurden anschließend in 1ml SOC-Medium (s. Tab.4) aufgenommen und 45–60 min bei 37°C inkubiert. Um nun die transformierten Bakterien zu selektionieren, wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

IV.5. Molekularbiologische Methoden

IV.5.1. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

(s. Sambrook et al.,(1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*; abgeändert)

Mini-Plasmidpräparation (analytisch):

(Lösungen s. Tab.4)

Eine 2ml-Bakterienkultur wurde angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, durch Zentrifugation (10.000 rpm, 1 min, RT) sedimentiert und in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl RNase A (10 mg/ml) wurde das Gemisch 5-10 min auf Eis inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung 2, vorsichtiges Mischen durch Invertieren und Inkubation für weitere 5-10 min auf Eis. Mit 150 µl Lösung 3 wurde anschließend neutralisiert und wie zuvor inkubiert. Nach Zugabe von 450 µl 5 M LiCl wurde das Gemisch wiederum 5-10 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (Mikrozentrifuge, 13.000 rpm, 10-15 min, RT). Aus dem Überstand wurde anschließend die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumenanteilen Isopropanol in Gegenwart von monovalenten Kationen ausgefällt und danach in 20 µl dH₂O aufgenommen.

Midi-Plasmidpräparation (präparativ):

(Lösungen s. Tab.4)

50 ml einer LB-ÜNK wurden für 5 min zentrifugiert (Kühlzentrifuge, 6.000 rpm, 5 min, 4°C). Das Bakteriensediment wurde in 2 ml Lösung 1 resuspendiert, mit 50 µl RNase A (10 mg/ml) gemischt und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung 2 wurde das Reaktionsgefäß mehrmals vorsichtig invertiert und für weitere 5 min auf Eis gestellt. Nach Neutralisation mit 3 ml Lösung 3 für 5-10 min auf Eis,

wurden Zelltrümmer und Präzipitate durch Zentrifugation (16.000 rpm, 15 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend durch Filtration in ein frisches Falcon-Röhrchen von restlichen Verunreinigungen befreit. Nach Fällung der DNA aus dem Filtrat mit Hilfe von Isopropanol (0,6 Vol.-Einheiten), wurde das abzentrifugierte DNA-Pellet, luftgetrocknet, in 1 ml dH₂O aufgenommen und mit 50 µl RNase A versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30-60 min bei 37°C inkubiert.

Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. IV.5.5.) zum Entfernen der RNase und anderer Proteine. Anschließend wurde durch Zugabe von 0,1 Volumenanteilen NaAc, pH 5,2 und 0,6 Volumenanteilen Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation und einem Waschschriff mit 70% Ethanol wurde die DNA in 50-100 µl dH₂O aufgenommen und die Ausbeute wie unter IV.5.2. beschrieben spektrophotometrisch bestimmt.

IV.5.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden.

Hierzu wurde die Proben entsprechend verdünnt und deren Absorptionsspektrum im Bereich von 240-320 nm aufgenommen.

Eine Absorptionseinheit (A_{260}) entspricht:

- 33 µg/ml bei Oligonukleotiden
- 40 µg/ml bei ssDNA oder RNA
- 50 µg/ml bei dsDNA

IV.5.3. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen können spezifische palindrome DNA-Bereiche erkennen und dsDNA an dieser Stelle spalten.

DNA wurde nach Standardmethoden und unter Berücksichtigung von Herstellerinformationen mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt. Die Spaltprodukte konnten durch Agarose-Gelelektrophorese (s. IV.5.6.) aufgetrennt werden.

IV.5.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde von T4-DNA-Ligase (Promega) katalysiert, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl-Gruppen und 5'-Phosphat-Gruppen in dsDNA ermöglicht.

Ligationsansätze wurden den Herstellerangaben entsprechend pipettiert. Die Ligrationsreaktion erfolgte über 2-3 h bei RT oder über Nacht bei 16°C.

IV.5.5. Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Die Phenol/Chloroform-Extraktion stellt eine Standardmethode zur Entfernung von Enzymen und anderen Proteinen aus Nukleinsäure-Lösungen dar.

Nach Zugabe des gleiches Volumens Tris/Phenol zu einer DNA-Probe wurde durch Zentrifugation eine Phasentrennung erreicht. Die obere wäßrige Phase wurde in einem analogen Arbeitsprozess mit der gleichen Menge eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) versetzt und abzentrifugiert. Nach Wiederholen dieses Schrittes konnte die DNA, die sich in der oberen wäßrigen Phase befand, mit Isopropanol gefällt werden.

IV.5.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Reinigung von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese. Durch Variation der Agarosekonzentration, d.h. Veränderung des Vernetzungsgrades des Gels, schafft man optimale Trennbereiche für die jeweilige Länge der zu trennenden Fragmente. Überwiegend wurden 1%ige Gele verwendet, die für Fragment-Längen von 400 bp bis 7 kb gut geeignet sind. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer (s. Tab.4) aufgekocht und bei 65°C gelagert. Aufzutrennende Proben wurden nach Zugabe von $\frac{1}{5}$ Volumen 6x DNA-Probenpuffer (s. Tab.4) neben Längenstandards (s. IV.5.7.), die die spätere Zuordnung der untersuchten DNA-Fragmente erlaubten, aufgetragen. Durch Interkalation von EtBr in die DNA konnte diese im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Anschließende Elution der DNA aus Gelstücken wurde mit dem CONCERT Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL) nach Herstellerangaben durchgeführt.

IV.5.7. DNA-Größenstandard

HMS ("high molecular weight standard"): λ -Phagen-DNA, *HindIII* gespalten

LMS ("low molecular weight standard"): pUC lac-DNA, *EcoRI* und *HinfI* gespalten

Die Marker wurden in einer Konzentration von 25 ng/ μ l aufgetragen.

HMS		LMS	
Basenpaare	Anteil	Basenpaare	Anteil
23130	48%	1608	21,2%
9416	19%	1201	15,9%
6557	14%	999	13,2%
4361	9%	711	9,4%
2322	5%	567	7,5%
2027	4%	517	6,8%
564	1%	396	5,2%
		360	4,8%
		222/219/214	8,6%
		132/120/112	4,8%
		75/65/30/27	2,6%

Tab.5 DNA-Größenstandards

IV.5.8. Reverse Transkription (RT)

Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen:

RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Kits von Quiagen aus Gewebekulturzellen nach Herstellerangaben isoliert. Es wurden in der Regel $1-5 \times 10^7$ Zellen pro Präparation eingesetzt. Ausbeute und Qualität der RNA wurden spektrophotometrisch sowie durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Reverse Transkription:

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde SUPERSCRIPT II RNase H Reverse Transcriptase (GIBCO BRL) verwendet. Pro Ansatz wurden 5 μ g RNA eingesetzt, welche, um Gesamt-RNA zu erhalten, mit 50 pmol Random-Hexameren (Boehringer) geprimt wurden. Da ein möglicher Abbau der RNA durch RNasen verhindert werden sollte, wurden 0,5 μ l RNasin zum Reaktionsansatz beigefügt. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die so produzierte cDNA konnte als Matrize in einer PCR eingesetzt werden (RT-PCR).

IV.5.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation definierter DNA- bzw. cDNA-Fragmente.

Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt muß zunächst in Einzelstrang-DNA überführt werden (Denaturierung) und kann dann als Vorlage (Template) zur Synthese neuer DNA dienen. Als Primer für die darauffolgende DNA-Synthese werden synthetische Oligonukleotide verwendet. Dem Denaturierungsschritt folgt die "Annealing"-Phase, in der durch die Reaktion der DNA-Polymerase mit den dNTPs neue DNA gebildet werden kann. In dem anschließenden Extensionsschritt werden die DNA-Fragmente in ihrer Länge vervollständigt. In jedem Zyklus wird die gesamte vorhandene DNA verdoppelt. Die Reaktionen eines Verdopplungszyklus müssen bezüglich Zeit und Temperatur genau aufeinander abgestimmt sein.

Die PCR erfolgte in einem Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler in der Regel nach folgendem Programm:

Denaturierung:	5 min	95° C	

Denaturierung:	1 min	95° C	} x 30 Zyklen
Annealing:	1 min	55° C	
Extention:	2 min	72° C	

Extention:	8 min	72° C	

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer. Je höher der GC-Gehalt, desto höher sollte die Annealing-Temperatur gewählt werden. Da mit steigender Annealing-Temperatur die Spezifität der Primer-Bindung zunimmt, kann durch Veränderung dieses Parameters der Grad der Stringenz gewählt werden.

Analytische PCR:

Um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen wurden entweder DNA-Proben (analytisch präpariert) oder Einzelkolonien der zu untersuchenden Bakterien als Template verwendet und mit geeigneten Primern amplifiziert. Es wurde hierbei

üblicherweise in 20µl-Ansätzen gearbeitet und Taq-Polymerase (0,5 U / Ansatz) verwendet.

Präparative PCR:

Da hierbei das gesamte PCR-Produkt in Klonierungen oder Sequenzierungen weiterverarbeitet wird, muß in größeren Ansätzen (50 µl) gearbeitet werden sowie die Fehlerrate der DNA-Amplifikation durch Verwenden einer Polymerase mit hoher ‚proof-reading‘ Aktivität (Pfu-Polymerase (1,0 U / Ansatz)) minimal gehalten werden.

PCR-Ansätze enthielten üblicherweise 10 pmol dNTPs (Pharmacia), $\frac{1}{10}$ Vol. 10 x Reaktionspuffer, 100 pmol Primer a, 100 pmol Primer b und 1-10 ng Template-DNA, sowie die entsprechende DNA-Polymerase.

Die erhaltenen DNA-Fragmente konnten durch Agarose-Gelelektrophorese (s. IV.5.6.) aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

Rekombinante PCR:

Diese Art der PCR wird bei der PCR-Mutagenese verwendet. Durch spezifisch ausgewählte Primer, die Epitope, zusätzliche Restriktionsschnittstellen oder Mutationen einführen werden überlappende DNA-Fragmente amplifiziert. Diese DNA-Stücke werden in einer folgenden PCR 1:1 eingesetzt und durch gegenseitige Anlagerung miteinander verbunden. Sie dienen somit als Matrize und durch den Einsatz der äußeren, beide Fragmente flankierenden Primer können die entsprechenden Veränderungen an der DNA-Sequenz doppelsträngig abgeschrieben werden.

Die Methode der PCR wurde auch zur Amplifikation und Identifikation von genomischer DNA verwendet.

IV.5.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmente aus PCR und RT-PCR, sowie von DNA-Konstrukten wurde von W. Hädelt (Biozentrum, Uni-Würzburg) mit Hilfe eines DNA-Sequencers 373A (Applied Biosystems) durchgeführt.

IV.6. Zellbiologische Methoden

IV.6.1. Zellkultur

Die Kultivierung von Zellen erfolgte nach Standardmethoden (s. Lindl, T. und Bauer, J. (1989): *Zell- und Gewebekultur*) in DMEM oder EMEM mit 10%FCS, 1% P/S und 1% Glutamin unter Berücksichtigung empfohlener Kultivierungsbedingungen bei 37°C, 5% bzw. 10% CO₂ und 95% relativer Feuchte.

IV.6.2. Zellzahlbestimmung

Durch Behandlung der Zellen mit 0,5%iger Trypanblau-Lösung konnten tote Zellen identifiziert werden, da nur diese den blauen Farbstoff aufnehmen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Auszählen von zwei großen Quadranten einer Neubauer-Zählkammer. Durch Multiplikation der so erhaltenen Zahl mit dem Faktor 10⁴ erhielt man die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension.

IV.6.3. Transfektionsmethoden

Die Transfektion ist eine Möglichkeit Plasmid-DNA in Zellen zu schleusen, in denen die transferierten Gene exprimiert werden sollen.

Transfektion nach der DEAE-Dextran Methode: [294]

Die Transfektion wurde in 10 cm Kulturschalen bei 50-70%iger Konfluenz der Zellen durchgeführt. Jeweils 10 µg der zu transfizierenden DNA-Konstrukte wurden in 1140 µl Transfektionspuffer (s.Tab.4) aufgenommen und mit 60 µl DEAE-Dextran (10 mg/ml) vermischt. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit Transfektionspuffer wurden die Zellen mit dem DNA/DEAE-Dextran-Gemisch 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 14 ml Chloroquine-NS-Medium (s. Tab.4) wurden die Zellen wiederum für weitere 2,5 – 3 h im Brutschrank kultiviert. Danach erfolgte der sog. ‚DMSO-Schock‘. Hierbei wurde das Transfektionsmedium durch DMEM-Medium mit 10% DMSO Anteil ersetzt und nach einer Einwirkzeit von 2,5 min bei RT wieder abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit Wachstumsmedium überschichtet und unter entsprechenden Bedingungen weiterkultiviert. Nach 48 h konnten die transfizierten Zellen für weiterführende Experimente verwendet werden.

Transfektion mit CaCl₂:

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf 6 cm Platten in definierter Zelldichte ausgesät. Da der pH-Wert des Mediums bei der Transfektion entscheidend ist, wurde vor der Transfektion das Wachstumsmedium durch bereits im Inkubator vorgewärmtes Medium ersetzt. Insgesamt 15 µg der zu transfizierenden DNA wurden mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 438 µl gebracht und mit 62 µl 2 M CaCl₂ vermischt. Unter ständigem Vortexen wurden anschließend tropfenweise 500 µl 2xHBS (s. Tab.4) zugegeben. Nachdem dieses Transfektionsgemisch vorsichtig in das Zellmedium pipettiert wurde, wurden die Kulturplatten für 7-10 h im Inkubator kultiviert. Danach konnte das Transfektionsmedium durch Wachstumsmedium ausgetauscht werden. Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen in weiterführenden Experimenten eingesetzt.

Alternativ wurden Zellen in 6-well Platten mit dem ‚Calcium Phosphate Transfection Kit‘ (Invitrogen), der auf der gleichen Methode basiert, nach Herstellerangaben transfiziert.

Transfektion mit Lipofectamin:

Zellen wurden in definierter Zahl auf 6-well Platten ausgesät und am nächsten Tag bei ca. 80%iger Konfluenz transfiziert. Es wurde Lipofectamin der Fa. Life Technologies verwendet und die vorwiegend nach Herstellerangaben gearbeitet. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen weiterverwendet.

IV.6.4. β-Galactosidase-Test

Nach 48-stündiger Inkubation von Zellen, die mit einem β-Galactosidase-Konstrukt transfiziert wurden, konnte die Transfektionseffizienz mit Hilfe des β-Galactosidase-Tests festgestellt werden. Hierzu wurden die Zellen 15 min lang mit 200 µl Glutaraldehyd in 5,5 ml PBS (s. Tab.4) bei 37°C inkubiert und somit fixiert. Anschließend wurde ein Gemisch aus 300 µl 2% X-Gal und 2,7 ml X-Gal-Inkubationspuffer (s. Tab.4) auf die Platte gegeben. X-Gal ist ein blauer Farbstoff, der nach Hydrolyse von Galactosid aktiviert wird. Während der Inkubationsdauer von 30 min bis 2 h konnte eine Blaufärbung der erfolgreich transfizierten Zellen beobachtet werden. Anhand der Zahl der blaugefärbten Zellen ergab sich die Transfektionseffizienz.

IV.7. Proteinchemische und Immunologische Methoden

IV.7.1. Jodierung von TGF- β

Die radioaktive Markierung von TGF- β erfolgte nach der Chloramin T Methode [196]. 2 μ g TGF- β (gelöst in 4 mM HCl) wurden mit 10 μ l einer 1 M NaPO₄-Lösung (pH 7,2) verdünnt. Nach Zugabe von 2 μ l radioaktiv markiertem NaI (Amersham) (= 0,2 mCi), wurden 2 μ l Chloramin T (50 μ g/ μ l, gelöst in H₂O) zum Reaktionsgemisch pipettiert. Nach einer Wartezeit von 2 min wurden nochmals 2 μ l Chloramin T zugegeben, was nach weiteren 90 s wiederholt wurde. 60 s später wurde die Reaktion durch Quenchen mit 10 μ l einer 100mM Acetyl-Thyrosin-Lösung abgebrochen. Anschließend wurden 100 μ l einer 100mM KI-Lösung sowie 100 μ l einer gesättigten Harnstoffessigsäure-Lösung zupipettiert.

Der Reaktionsansatz wurde auf eine NAP 10 Sephadex-G-25-Säule (Pharmacia) aufgetragen. Das radioaktiv markierte TGF- β konnte nun mit Elutionspuffer (s. Tab.4) von der Säule gewaschen und fraktionsweise in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen werden. Anschließend wurde mit einem Aliquot jeder Eluat-Fraktion eine Dünnschichtchromatographie in 10%iger TCA durchgeführt, wodurch proteingebundenes von freiem [¹²⁵I] getrennt wurde. Durch die darauffolgenden Radioaktivitätsmessung mit einem γ -Zähler konnte somit ermittelt werden, in welcher Eluat-Fraktion das [¹²⁵I]-markierte TGF- β vorrangig vorhanden war.

IV.7.2. Chemische Quervernetzung von [¹²⁵I]-TGF β (Crosslinking)

Durch Crosslinking kann der Ligand kovalent an den entsprechenden Rezeptor gebunden werden, welcher dadurch gleichzeitig radioaktiv markiert wird.

Zellen wurden dreimal mit erwärmten KRH-Lösung (+0,5% faf BSA) (s. Tab.4) gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C inkubiert. [¹²⁵I]-TGF β wurde 350-500 pM der KRH-Lösung (+0,5%BSA) zugesetzt und dieses Gemisch auf die Zellen pipettiert. Die Bindungsreaktion wurde für 3-4 h bei 4°C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nicht gebundenes [¹²⁵I]-TGF β wurde daraufhin durch viermaliges Waschen der Zellen bei 4°C mit KRH-Lösung entfernt. Für die Vernetzungsreaktion (crosslinking) wurden 10 mg/ml DSS (Disuccinimidyl Suberat, Pierce) in DMSO gelöst und 1:100 in KRH-Lösung verdünnt. Die Zellen wurden mit jew. 3 ml dieses

Ansatzes für 15 min bei 4°C leicht geschüttelt. Es schlossen sich eine Zellyse, wie unter IV.7.3. beschrieben, und eine Immunpräzipitation der Zielproteine (s. IV.7.4.) an. Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE (s. IV.7.5.) wurde das Gel in einem Gelrockner für 3 h bei 80°C getrocknet. Zur Auswertung der radioaktiven Signale wurde ein Phosphoimager benutzt.

IV.7.3. Zellyse

Zellen wurden mit Hilfe von entsprechenden Puffern (TNE-Lysispuffer, Tx-Lysispuffer; s. Tab.4) lysiert, denen Proteaseinhibitoren (Protease-Inhibitor-Cocktail-COMplete, Boehringer), PMSF und nach Bedarf Phosphataseinhibitoren (s. Tab.4) zugesetzt wurden. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen wurden diese mit Lysispuffer bedeckt und mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund abgelöst. Die Lyse erfolgte anschließend in Eppendorf Reaktionsgefäßen für mindestens 30 min bei 4°C unter leichter Rotation. Die Sedimentation der Zelltrümmer erfolgte durch 10 minütige Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge bei 13000 rpm und 4°C. Das überstehende Lysat konnte abgenommen und in einer Immunpräzipitation oder im Western-Blot verwendet werden.

IV.7.4. Immunpräzipitation von Proteinen

Der Überstand einer Zellyse (s. IV.7.3.) wurde mit einem Antikörper gegen ein Zielmolekül ÜN bei 4°C rotiert (s. Tab.1). Anschließend wurde der Probe Protein A-Sepharose (50 µl/ml Zellysat bzw. 30 µl / 500 µl Zellysat) zugesetzt und weitere 2 h bei 4°C rotiert. Protein A bindet IgG mit hoher Affinität; die Kopplung an Sepharose erlaubt eine Präzipitation des Immunkomplexes durch Zentrifugation. Die Probe wurde anschließend zweimal mit Lysispuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Die Präzipitate wurden in 30 µl reduzierendem Proteinprobenpuffer (s. Tab.4) 5-8 min aufgekocht, kurz bei 13000 rpm zentrifugiert und über SDS-PAGE analysiert.

Im Fall einer Doppel-Immunpräzipitation wurden die gebundenen Proteine durch Aufkochen der Probe (95°C für 5 min) mit 20-50 µl eines Re-IP-Puffers (s. Tab.4) von der Affinitätsmatrix abgelöst. Der IP-Überstand wurde mit Lysispuffer bis zu einer SDS-Endkonzentration von $\leq 0,1\%$ verdünnt und konnte daraufhin mit einem

Antikörper für eine zweite Immunpräzipitation versetzt werden. Diese wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

<u>Antikörper</u>	<u>µl/ Lysat</u>
α-HA	20 – 30 µl
α-myc	20 – 30 µl
α-flag	2 µl
α-CR11 (260)	15 µl
α-RIIB (750/751)	20 µl
α-hRIIB (500/501)	20 µl
α-VPN	15 µl

Tab.6 Antikörpermengen für die Immunpräzipitation. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf das Lysat einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale.

IV.7.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-V 8.10 Apparatur von Gibco BRL mit SDS-Laufpuffer (s. Tab.4) nach Herstellerangaben durchgeführt. Sie folgte im Prinzip den Angaben von Laemmli (1970) [295].

Es wurden 10- bzw. 15%-Gele ($d=0,5$ mm) nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

<u>Lösung</u>	<u>Sammelgel (3,75%)</u>	<u>Trenngel (10%)</u>	<u>Trenngel (15%)</u>
AA/BAA	250 µl	2,0 ml	3,0 ml
4x Lower Tris		1,5 ml	1,5 ml
4x Upper Tris	500 µl		
H ₂ O	1250 µl	2,5 ml	1,5 ml
APS 40%	4 µl	12 µl	12 µl
TEMED	4 µl	12 µl	12 µl

Tab.7 SDS-PAGE Pipettierschema

Nach Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Gele getrocknet oder im Western-Blot eingesetzt.

IV.7.6. Western-Blot

Western-Blots wurden in einer Mini-V8.10 Apparatur von Gibco BRL nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll) erfolgte bei 120 V für 2 h mit WB-Transferpuffer (s. Tab.4). Die Nitrozellulosemembran wurde für mind. 30 min in PBS oder Waschpuffer (s. Tab.4) + 3% Milchpulver geblockt. Erstantikörper (s. Tab.1) wurden wie in Tab.8 dargestellt in PBS oder Waschpuffer verdünnt und ÜN bei 4°C inkubiert.

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
α -HA	1:200 in PBS
α -myc	1:200 in PBS
α -flag	1:440 in Waschpuffer (0,5% Tween)
α -Smad2	1:1000 in Waschpuffer (0,5% Tween)
α -P-Smad2	1:1000 in Waschpuffer (0,5% Tween)
α -rabbit-IgG-pox	1:10000 in Waschpuffer (0,5% Tween)
α -mouse-IgG-pox	1:10000 in PBS

Tab.8 Antikörperverdünnungen

Nach dreimaligem Waschen mit WB-Waschpuffer wurde die Membran 1 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper in entsprechender Verdünnung (s. Tab.8) bei RT geschüttelt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch ECL und Exposition auf Röntgenfilm.

Um einen Western-Blot ein weiteres Mal mit einen anderen Antikörper behandeln zu können, müssen die bereits gebundenen Antikörper von der Membran entfernt werden. Dies erfolgt durch Inkubation der Membran in sog. Stripping-Puffer (s. Tab.4) für 30 min bei 65°C. Nach intensivem Waschen mit PBS, kann die Membran erneut geblockt werden und nochmals mit Antikörpern, wie oben beschrieben, behandelt werden.

IV.7.7. Proteingrößenstandard

Zur Identifizierung von Proteinen wurden bei der SDS-PAGE vorgefärbte Proteinstandards verwendet. Es wurden jeweils nur wenige μl der Marker auf Proteingele aufgetragen. Je nach Herstellungsnummer variierten die Molekulargewichte der Standardproteine leicht.

^{14}C -Rainbow-Protein-Marker (Amersham):

Dieser Marker wurde in Versuchen mit radioaktiv markierten Proteinen eingesetzt.

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht</u>
Myosin	200 kDa
Phosphorylase b	96 kDa
BSA	69 kDa
Ovalbumin	46 kDa
Carbonic anhydrase	30 kDa
Trypsin inhibitor	21,5 kDa
Lysozym	14,3 kDa

Tab.9 Proteingrößenstandard (^{14}C)

SDS-7B-Proteinmarker (Sigma):

Dieser Marker wurde üblicherweise in Western-Blot-Versuchen eingesetzt

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht</u>
α -Macroglobulin	205 kDa
β -Galactosidase	130 kDa
Fructose-6-Phosphat-Kinase	90 kDa
Pyruvat-Kinase	64 kDa
Fumarase	53 kDa
Lactische Dehydrogenase	37 kDa
Triosephosphat Isomerase	32 kDa

Tab.10 Proteingrößenstandard (SDS-7B)

IV.7.8. *In vivo* Markierung von Zellen mit [³⁵S]-Cystein/Methionin

Vor der methabolischen Markierung wurden Zellen in serumfreien Medium ohne Cystein und Methionin für 3-4 h bei 37°C gehungert. Danach wurde dieses Medium durch frisches Hungermedium ersetzt, welches mit 0,2 mM oxidiertem Gluthation und mit einem Gemisch aus [³⁵S]Methionin und [³⁵S]Cystein (Dupont) in einer Konzentration von 0,5 mCi/ml versetzt war. Die Zellen wurden daraufhin für 2-3 h im Brutschrank inkubiert. Danach schloß sich intensives Waschen mit PBS und die Lyse der Zellen (s.IV.7.3.) an. Die Lysate wurden als Immunpräzipitate oder direkt über SDS-PAGE aufgetrennt. Die markierten Proteine konnten anschließend mittels Autoradiographie detektiert werden.

IV.7.9. Biotinylierung von Oberflächenproteinen

Aufgrund der starken Interaktion von Biotin mit Streptavidin, können Biotin-markierte Proteine sehr effizient mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin detektiert werden. Bei der Biotin-Markierung wird Biotin über Lysine an Proteine gebunden.

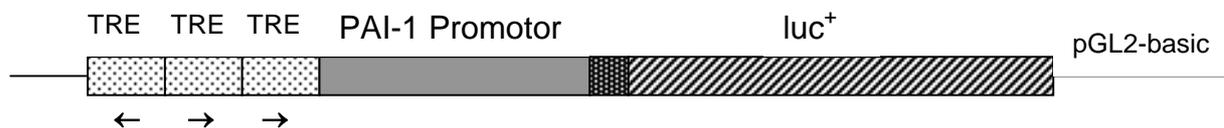
Ausplattierte Zellen wurden 3 x mit eiskaltem PBS (pH 8,0) gewaschen um kontaminierende Proteine zu entfernen. Biotin (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in PBS (pH 8,0) gelöst und auf die Zellen gegeben (2 ml / 10cm Platte). Nachdem die Zellen 30 min bei RT inkubiert wurden, erfolgten, um nicht gebundenes Biotin zu entfernen, 3 weitere Waschschritte mit eiskaltem PBS (pH 8,0). Die Zellen konnten daraufhin lysiert (s. IV.7.3.) und eine Immunpräzipitation (s. IV.7.4.) durchgeführt werden. Es erfolgte die Auftrennung des Immunpräzipitate via SDS-PAGE (s. IV.7.5.) sowie der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (s. IV.7.6.). Die Membran wurde für ca. 30 min in TBS (s. Tab.4) mit 5% BSA geblockt und anschließend 20 min mit Streptavidin-pox (ImmunoPure Streptavidin, Pierce) in einer 1 : 10000 Verdünnung in TBS-T (s. Tab.4) inkubiert. Danach wurde die Membran intensiv mit TBS-T gewaschen und mit ECL entwickelt.

IV.7.10. Reporteragen-Assay

Für die Durchführung eines Luziferase-Reporteragen-Assays müssen Zellen mit entsprechenden Reporteragen-Plasmiden transfiziert werden. Die Transfektion wurde üblicherweise mit Lipofectamin durchgeführt.

Um eine TGF- β Responsivität mittels Reporteragen-Aktivierung messen zu können, muß dem eigentlichen Reporteragen (Luziferase) ein TGF- β responsives Element, wie beispielsweise das ‚Smad binding element‘ (SBE = CAGA-Box) oder der PAI-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor-1) Promotor vorangestellt sein. Die verwendeten Reporteragen-Konstrukte, p3TP-luc und pSBE-luc, sind im Folgenden dargestellt [15] [65]:

p3TP-luc:



TRE = TPA Responsive Element (3TP) aus dem Kollagenase Promotor

pSBE-luc:



Um die gemessene Luziferase-Aktivität mit der Transfektionseffizienz eines Ansatzes in Relation setzen zu können, wurde das pRL-TK Konstrukt (=Renilla-Luziferase vom Thymidin-Kinase-Promotor getrieben, Promega) als Referenz-Plasmid co-transfiziert. In der Regel enthielt ein Transfektionsansatz 1 μ g Reporteragen-Plasmid, 0,3 μ g Referenz-Plasmid und max. 2 μ g einer weiteren DNA von Interesse.

12-24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 4-6 h in Medium mit 0,2% FCS gehungert und anschließend mit entsprechenden Mengen an TGF- β für weitere 18-24 h stimuliert.

Die Zellyse und die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte unter Verwendung des Dualen-Luziferase-Assay-System von Promega nach Herstellerangaben in einem FB12 Luminometer von Berthold.

Berechnung arbiträrer Einheiten:

Durch Aktivierung der Reportergene p3TP-luc und pSBE-luc kommt es zur Expression der ‚Firefly‘-Luziferase, deren Wert (A) in einem ersten Meßschritt erfaßt wird. In einer zweiten Messung wird die Expression der ‚Renilla‘-Luziferase (B), die im co-transfizierten Referenzplasmid enthalten ist und konstitutiv aktiv vorliegt, detektiert. Der Renilla-Wert ist im Gegensatz zum Firefly-Wert stimulationsunabhängig und dient der Ermittlung der Transfektionseffizienz.

Probe	Rep 1 A	Net A	Rep 1 B	Net B	Ratio (A/B)
ohne β 1	3789	3789.00	7987216	7987216.00	0,00047438
5pM β 1	7574	7574.00	7698782	7698782.00	0,00098379
10pM β 1	20630	20630.00	7312256	7312256.00	0,00282129
20pM β 1	30306	30306.00	7290033	7290033.00	0,00415718
50pM β 1	103316	103316.00	5360784	5360784.00	0,01927255
200pM β 1	109100	109100.00	4900694	4900694.00	0,02226215

Tab.11 Werte einer Luziferasemessung unter Verwendung des Dualen-Luziferase-Assay-Systems. TGF- β responsive Zellen wurde mit ansteigender TGF- β 1 Konzentration stimuliert. Für jede Probe wurde zwei Werte gemessen: A= Firefly-Luziferasewert, B= Renilla-Luziferasewert. Die Berechnung der Ratio A/B ist nötig um, die eigentliche Induktion der Luziferaseaktivität zu erhalten und um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können.

Um nun die eigentliche Induktion der Luziferaseaktivität verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können, werden A- und B-Wert jeder Probe zueinander in Relation gesetzt (A/B). Die resultierende Ratio repräsentiert einen abgeglichenen Luziferasewert, der für weitere uswertungen verwendet werden kann (vgl. Tab.11).

V. Anhang

Name	Sequenz
P0	⁷² ATCCCACCCGCACGTTTCAGAAGT ⁹³
P1	⁻²³ TATGACGAGCAGCGGGGTCT ⁻⁴
HH-P1	GGCCGGAAGCTTAAGCTT ⁻²³ TATGACGAGCAGCGGGGTCT ⁻⁴
P3	¹⁹⁶ TTCTGGTTGTTCACAGGT ¹⁸⁰
P5	⁴³⁴ TCATTGCACTCATCAGAG ⁴¹⁷
P10	⁹⁷⁸ GGCGGTGATCAGCCAGTATTGTTTCCCC ⁹⁶¹
Pins (TβRII-B)	¹⁰⁶ GAGGCCAGAAAGATGAAATCATCTGC ¹³²
Prev (TβRII-B)	¹³² GCAGATGATTTTCATCTTTCTGGGCC ¹⁰⁸

Primer zur Herstellung Epitop-markierter Typ II Rezeptoren (s. A.II.2.)

Name	Sequenz
RIIB-HA-1 (TβRII-B)	TACCCATACGACGTCCCAGACTACGCC ⁸¹ CACGTTTCAGAAGTCGGATGTGGAA ATGGAG ¹⁰⁸
RIIB-HA-2 (TβRII-B)	GGCGTAGTCTGGGACGTTCGTATGGGTA ⁷⁹ CGGTGGGATCGTGCTGGCGATACG CGTCCA ⁵¹
RIIB-myc-1 (TβRII-B)	GAGCAGAAGCTTATCTCTGAGGAGGACCTG ⁸¹ CACGTTTCAGAAGTCGGATGTG GAAATGGAG ¹⁰⁸
RIIB-myc-2 (TβRII-B)	CAGGTCCTCCTCAGAGATAAGCTTCTGCTC ⁷⁹ CGGTGGGATCGTGCTGGCGAT ACGCGTCCA ⁵¹
RII/IIB-flag-1	GACTACAAGGACGACGATGACAAG ¹⁵⁸² TAGCTCTTAGCGGC ¹⁵⁹⁵ CGCTCGAGC ATGCATC
RII/IIB-flag-2	CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTC ¹⁵⁸¹ TTGGTAGTGTTTAGGGAGCCGTCTT CAGG ¹⁶⁷²

Primer zur Herstellung von TBR1I-B-Insert-Mutanten (s. A.II.6.2.)	
Name	Sequenz
PKTB-1	¹⁴⁴ ATTACAGCTGGGG GGC GATGATTTTCATCTTT ¹¹⁵
PKTB-2	¹¹⁵ AAAGATGAAATCATC GCCCC CAGCTGTAAT ¹⁴⁴
PKTB-3	¹⁵⁵ TGGGCAGTCCTATTAG GCG CTGGGGCAGATG ¹²⁶
PKTB-4	¹²⁶ CATCTGCCCCAGC GCT AATAGGACTGCCCA ¹⁵⁵
PKTB-5	¹⁵⁵ TGGGCAGTCCTATTAG GCG CTGGGG GGC GATGATTTTCATCTTT ¹¹⁵
PKTB-6	¹¹⁵ AAAGATGAAATCATC GCCCC CAGC GCT AATAGGACTGCCCA ¹⁵⁵
PKTB-7	¹³⁰ TGCCCCAGCTGT GCT AGGACTGCCCAT ¹⁵⁶
PKTB-8	¹⁵⁶ ATGGGCAGTCCTAG CAC AGCTGGGGCA ¹³⁰

Primer zur Herstellung von TBR1I/II-B Δ-cyt-Mutanten (s. A.II.10.1.)	
Name	Sequenz
DC-1	⁶⁰² CAGGTTCAACTCAGCTTCTGCTG ⁵⁸⁰
DC-2	⁵⁸⁰ CACCAGAAGCTGAGTT GAAC CTG ⁶⁰²
DC-3	⁸⁶³ TTCCAAGAGGGAT CCT CCTCATAG ⁸⁴⁰

VI. Literatur

1. Roberts, A.B., *TGF-beta signaling from receptors to the nucleus*. *Microbes Infect*, 1999. **1**(15): p. 1265-73.
2. Sporn, M.B. and A.B. Roberts, *Peptide growth factors: current status and therapeutic opportunities*. *Important Adv Oncol*, 1987: p. 75-86.
3. Massague, J., *The transforming growth factor-beta family*. *Annu Rev Cell Biol*, 1990. **6**: p. 597-641.
4. Huang, S.S., M. Zhou, F.E. Johnson, H.S. Shieh, and J.S. Huang, *An active site of transforming growth factor-beta(1) for growth inhibition and stimulation*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27754-8.
5. Lawrence, D.A., *Transforming growth factor-beta: a general review*. *Eur Cytokine Netw*, 1996. **7**(3): p. 363-74.
6. Miyazono, K., K. Kusanagi, and H. Inoue, *Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling*. *J Cell Physiol*, 2001. **187**(3): p. 265-76.
7. Daopin, S., K.A. Piez, Y. Ogawa, and D.R. Davies, *Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily*. *Science*, 1992. **257**(5068): p. 369-73.
8. Daopin, S., M. Li, and D.R. Davies, *Crystal structure of TGF-beta 2 refined at 1.8 A resolution*. *Proteins*, 1993. **17**(2): p. 176-92.
9. Munger, J.S., J.G. Harpel, P.E. Gleizes, R. Mazzieri, I. Nunes, and D.B. Rifkin, *Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation*. *Kidney Int*, 1997. **51**(5): p. 1376-82.
10. Murphy-Ullrich, J.E. and M. Poczatek, *Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000. **11**(1-2): p. 59-69.
11. Schwarz, J.K., C.H. Bassing, I. Kovesdi, M.B. Datto, M. Blazing, S. George, X.F. Wang, and J.R. Nevins, *Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type beta transforming growth factor-mediated growth suppression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(2): p. 483-7.
12. Hu, X. and K.S. Zuckerman, *Transforming growth factor: signal transduction pathways, cell cycle mediation, and effects on hematopoiesis*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001. **10**(1): p. 67-74.
13. Alexandrow, M.G. and H.L. Moses, *Transforming growth factor beta and cell cycle regulation*. *Cancer Res*, 1995. **55**(7): p. 1452-7.
14. Donovan, J. and J. Slingerland, *Transforming growth factor-beta and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer*. *Breast Cancer Res*, 2000. **2**(2): p. 116-24.
15. Wrana, J.L., L. Attisano, J. Carcamo, A. Zentella, J. Doody, M. Laiho, X.F. Wang, and J. Massague, *TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex*. *Cell*, 1992. **71**(6): p. 1003-14.

16. Franzen, P., P. ten Dijke, H. Ichijo, H. Yamashita, P. Schulz, C.H. Heldin, and K. Miyazono, *Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor*. Cell, 1993. **75**(4): p. 681-92.
17. Chen, Y.G., F. Liu, and J. Massague, *Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12*. Embo J, 1997. **16**(13): p. 3866-76.
18. Huse, M., Y.G. Chen, J. Massague, and J. Kuriyan, *Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12*. Cell, 1999. **96**(3): p. 425-36.
19. Wieser, R., J.L. Wrana, and J. Massague, *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): p. 2199-208.
20. Weis-Garcia, F. and J. Massague, *Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF- beta receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling*. Embo J, 1996. **15**(2): p. 276-89.
21. Lin, H.Y., X.F. Wang, E. Ng-Eaton, R.A. Weinberg, and H.F. Lodish, *Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase*. Cell, 1992. **68**(4): p. 775-85.
22. Wrana, J.L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura, and J. Massague, *Mechanism of activation of the TGF-beta receptor*. Nature, 1994. **370**(6488): p. 341-7.
23. Luo, K. and H.F. Lodish, *Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues*. Embo J, 1997. **16**(8): p. 1970-81.
24. Feng, X.H. and R. Derynck, *A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity*. Embo J, 1997. **16**(13): p. 3912-23.
25. ten Dijke, P., K. Miyazono, and C.H. Heldin, *Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(2): p. 139-45.
26. Nakao, A., T. Imamura, S. Souchelnytskyi, M. Kawabata, A. Ishisaki, E. Oeda, K. Tamaki, J. Hanai, C.H. Heldin, K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4*. Embo J, 1997. **16**(17): p. 5353-62.
27. Ebner, R., R.H. Chen, L. Shum, S. Lawler, T.F. Zioncheck, A. Lee, A.R. Lopez, and R. Derynck, *Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor*. Science, 1993. **260**(5112): p. 1344-8.
28. Bassing, C.H., J.M. Yingling, D.J. Howe, T. Wang, W.W. He, M.L. Gustafson, P. Shah, P.K. Donahoe, and X.F. Wang, *A transforming growth factor beta type I receptor that signals to activate gene expression*. Science, 1994. **263**(5143): p. 87-9.
29. Gilboa, L., A. Nohe, T. Geissendorfer, W. Sebald, Y.I. Henis, and P. Knaus, *Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 1023-35.
30. Liu, F., F. Ventura, J. Doody, and J. Massague, *Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(7): p. 3479-86.

31. Rodriguez, C., F. Chen, R.A. Weinberg, and H.F. Lodish, *Cooperative binding of transforming growth factor (TGF)-beta 2 to the types I and II TGF-beta receptors*. J Biol Chem, 1995. **270**(27): p. 15919-22.
32. Onichtchouk, D., Y.G. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Delius, J. Massague, and C. Niehrs, *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 480-5.
33. Degen, W.G., M.A. Weterman, J.J. van Groningen, I.M. Cornelissen, J.P. Lemmers, M.A. Agterbos, A. Geurts van Kessel, G.W. Swart, and H.P. Bloemers, *Expression of nma, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of human melanoma cell lines and xenografts*. Int J Cancer, 1996. **65**(4): p. 460-5.
34. Chen, R.H., P.J. Miettinen, E.M. Maruoka, L. Choy, and R. Derynck, *A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF-beta receptor*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 548-52.
35. Choy, L. and R. Derynck, *The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31455-62.
36. Datta, P.K., A. Chytil, A.E. Gorska, and H.L. Moses, *Identification of STRAP, a novel WD domain protein in transforming growth factor-beta signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 34671-4.
37. Datta, P.K. and H.L. Moses, *STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(9): p. 3157-67.
38. Griswold-Prenner, I., C. Kamibayashi, E.M. Maruoka, M.C. Mumby, and R. Derynck, *Physical and functional interactions between type I transforming growth factor beta receptors and Balpha, a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6595-604.
39. Charng, M.J., D. Zhang, P. Kinnunen, and M.D. Schneider, *A novel protein distinguishes between quiescent and activated forms of the type I transforming growth factor beta receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9365-8.
40. Ventura, F., F. Liu, J. Doody, and J. Massague, *Interaction of transforming growth factor-beta receptor I with farnesyl- protein transferase-alpha in yeast and mammalian cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 13931-4.
41. Wang, T., P.D. Danielson, B.Y. Li, P.C. Shah, S.D. Kim, and P.K. Donahoe, *The p21(RAS) farnesyltransferase alpha subunit in TGF-beta and activin signaling*. Science, 1996. **271**(5252): p. 1120-2.
42. Adachi-Yamada, T., M. Nakamura, K. Irie, Y. Tomoyasu, Y. Sano, E. Mori, S. Goto, N. Ueno, Y. Nishida, and K. Matsumoto, *p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in Drosophila wing morphogenesis*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2322-9.
43. Iwasaki, S., M. Iguchi, K. Watanabe, R. Hoshino, M. Tsujimoto, and M. Kohno, *Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2*. J Biol Chem, 1999. **274**(37): p. 26503-10.

44. Hocevar, B.A., T.L. Brown, and P.H. Howe, *TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway*. *Embo J*, 1999. **18**(5): p. 1345-56.
45. Zhou, G., S.C. Lee, Z. Yao, and T.H. Tan, *Hematopoietic progenitor kinase 1 is a component of transforming growth factor beta-induced c-Jun N-terminal kinase signaling cascade*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(19): p. 13133-8.
46. Shibuya, H., K. Yamaguchi, K. Shirakabe, A. Tonegawa, Y. Gotoh, N. Ueno, K. Irie, E. Nishida, and K. Matsumoto, *TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction*. *Science*, 1996. **272**(5265): p. 1179-82.
47. Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto, *The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway*. *Nature*, 1999. **398**(6724): p. 252-6.
48. Sano, Y., J. Harada, S. Tashiro, R. Gotoh-Mandeville, T. Maekawa, and S. Ishii, *ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(13): p. 8949-57.
49. Herskowitz, I., *Functional inactivation of genes by dominant negative mutations*. *Nature*, 1987. **329**(6136): p. 219-22.
50. Bottinger, E.P., J.L. Jakubczak, I.S. Roberts, M. Mumy, P. Hemmati, K. Bagnall, G. Merlino, and L.M. Wakefield, *Expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF-beta in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas*. *Embo J*, 1997. **16**(10): p. 2621-33.
51. Nathan, C. and M. Sporn, *Cytokines in context*. *J Cell Biol*, 1991. **113**(5): p. 981-6.
52. Oshima, M., H. Oshima, and M.M. Taketo, *TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis*. *Dev Biol*, 1996. **179**(1): p. 297-302.
53. Chen, R.H., R. Ebner, and R. Derynck, *Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF-beta activities*. *Science*, 1993. **260**(5112): p. 1335-8.
54. Wieser, R., L. Attisano, J.L. Wrana, and J. Massague, *Signaling activity of transforming growth factor beta type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(12): p. 7239-47.
55. Chen, R.H. and R. Derynck, *Homomeric interactions between type II transforming growth factor-beta receptors*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(36): p. 22868-74.
56. Kulkarni, A.B., C.G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K.C. Flanders, A.B. Roberts, M.B. Sporn, J.M. Ward, and S. Karlsson, *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(2): p. 770-4.
57. Sekelsky, J.J., S.J. Newfeld, L.A. Raftery, E.H. Chartoff, and W.M. Gelbart, *Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1995. **139**(3): p. 1347-58.
58. Savage, C., P. Das, A.L. Finelli, S.R. Townsend, C.Y. Sun, S.E. Baird, and R.W. Padgett, *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): p. 790-4.
59. Riggins, G.J., S. Thiagalingam, E. Rozenblum, C.L. Weinstein, S.E. Kern, S.R. Hamilton, J.K. Willson, S.D. Markowitz, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Mad-related genes in the human*. Nat Genet, 1996. **13**(3): p. 347-9.
60. Eppert, K., S.W. Scherer, H. Ozcelik, R. Pirone, P. Hoodless, H. Kim, L.C. Tsui, B. Bapat, S. Gallinger, I.L. Andrulis, G.H. Thomsen, J.L. Wrana, and L. Attisano, *MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma*. Cell, 1996. **86**(4): p. 543-52.
61. Hahn, S.A., M. Schutte, A.T. Hoque, C.A. Moskaluk, L.T. da Costa, E. Rozenblum, C.L. Weinstein, A. Fischer, C.J. Yeo, R.H. Hruban, and S.E. Kern, *DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1*. Science, 1996. **271**(5247): p. 350-3.
62. Howell, M., F. Itoh, C.E. Pierreux, S. Valgeirsdottir, S. Itoh, P. ten Dijke, and C.S. Hill, *Xenopus Smad4beta is the co-Smad component of developmentally regulated transcription factor complexes responsible for induction of early mesodermal genes*. Dev Biol, 1999. **214**(2): p. 354-69.
63. Derynck, R., Y. Zhang, and X.H. Feng, *Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses*. Cell, 1998. **95**(6): p. 737-40.
64. Candia, A.F., T. Watabe, S.H. Hawley, D. Onichtchouk, Y. Zhang, R. Derynck, C. Niehrs, and K.W. Cho, *Cellular interpretation of multiple TGF-beta signals: intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads*. Development, 1997. **124**(22): p. 4467-80.
65. Jonk, L.J., S. Itoh, C.H. Heldin, P. ten Dijke, and W. Kruijer, *Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer*. J Biol Chem, 1998. **273**(33): p. 21145-52.
66. Zawel, L., J.L. Dai, P. Buckhaults, S. Zhou, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and S.E. Kern, *Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 611-7.
67. Hata, A., G. Lagna, J. Massague, and A. Hemmati-Brivanlou, *Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor*. Genes Dev, 1998. **12**(2): p. 186-97.
68. Imamura, T., M. Takase, A. Nishihara, E. Oeda, J. Hanai, M. Kawabata, and K. Miyazono, *Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 622-6.
69. Hayashi, H., S. Abdollah, Y. Qiu, J. Cai, Y.Y. Xu, B.W. Grinnell, M.A. Richardson, J.N. Topper, M.A. Gimbrone, Jr., J.L. Wrana, and D. Falb, *The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1165-73.
70. Ulloa, L., J. Doody, and J. Massague, *Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway*. Nature, 1999. **397**(6721): p. 710-3.

71. Yagi, K., D. Goto, T. Hamamoto, S. Takenoshita, M. Kato, and K. Miyazono, *Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 703-9.
72. Dennler, S., S. Huet, and J.M. Gauthier, *A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3*. Oncogene, 1999. **18**(8): p. 1643-8.
73. Xiao, Z., X. Liu, Y.I. Henis, and H.F. Lodish, *A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7853-8.
74. Shi, Y., A. Hata, R.S. Lo, J. Massague, and N.P. Pavletich, *A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4*. Nature, 1997. **388**(6637): p. 87-93.
75. Shi, Y., Y.F. Wang, L. Jayaraman, H. Yang, J. Massague, and N.P. Pavletich, *Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling*. Cell, 1998. **94**(5): p. 585-94.
76. Wu, G., Y.G. Chen, B. Ozdamar, C.A. Gyuricza, P.A. Chong, J.L. Wrana, J. Massague, and Y. Shi, *Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation*. Science, 2000. **287**(5450): p. 92-7.
77. Wrana, J.L. and L. Attisano, *The Smad pathway*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 5-13.
78. Lo, R.S., Y.G. Chen, Y. Shi, N.P. Pavletich, and J. Massague, *The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors*. Embo J, 1998. **17**(4): p. 996-1005.
79. Chen, Y.G., A. Hata, R.S. Lo, D. Wotton, Y. Shi, N. Pavletich, and J. Massague, *Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction*. Genes Dev, 1998. **12**(14): p. 2144-52.
80. Wurmser, A.E., J.D. Gary, and S.D. Emr, *Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9129-32.
81. Tsukazaki, T., T.A. Chiang, A.F. Davison, L. Attisano, and J.L. Wrana, *SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor*. Cell, 1998. **95**(6): p. 779-91.
82. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
83. Zhu, H., P. Kavsak, S. Abdollah, J.L. Wrana, and G.H. Thomsen, *A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation*. Nature, 1999. **400**(6745): p. 687-93.
84. Lin, X., M. Liang, and X.H. Feng, *Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36818-22.
85. Lo, R.S. and J. Massague, *Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(8): p. 472-8.
86. Chen, X., M.J. Rubock, and M. Whitman, *A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 691-6.

87. Watanabe, M. and M. Whitman, *FAST-1 is a key maternal effector of mesoderm inducers in the early Xenopus embryo*. *Development*, 1999. **126**(24): p. 5621-34.
88. Labbe, E., C. Silvestri, P.A. Hoodless, J.L. Wrana, and L. Attisano, *Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2*. *Mol Cell*, 1998. **2**(1): p. 109-20.
89. Saijoh, Y., H. Adachi, R. Sakuma, C.Y. Yeo, K. Yashiro, M. Watanabe, H. Hashiguchi, K. Mochida, S. Ohishi, M. Kawabata, K. Miyazono, M. Whitman, and H. Hamada, *Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2*. *Mol Cell*, 2000. **5**(1): p. 35-47.
90. Hata, A., J. Seoane, G. Lagna, E. Montalvo, A. Hemmati-Brivanlou, and J. Massague, *OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP- Smad and Olf signaling pathways*. *Cell*, 2000. **100**(2): p. 229-40.
91. Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. *Embo J*, 2000. **19**(8): p. 1745-54.
92. Hua, X., X. Liu, D.O. Ansari, and H.F. Lodish, *Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene*. *Genes Dev*, 1998. **12**(19): p. 3084-95.
93. Hua, X., Z.A. Miller, G. Wu, Y. Shi, and H.F. Lodish, *Specificity in transforming growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and Smad proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(23): p. 13130-5.
94. Zhang, Y., X.H. Feng, and R. Derynck, *Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription*. *Nature*, 1998. **394**(6696): p. 909-13.
95. Pardali, E., X.Q. Xie, P. Tsapogas, S. Itoh, K. Arvanitidis, C.H. Heldin, P. ten Dijke, T. Grundstrom, and P. Sideras, *Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3552-60.
96. Yanagisawa, J., Y. Yanagi, Y. Masuhiro, M. Suzawa, M. Watanabe, K. Kashiwagi, T. Toriyabe, M. Kawabata, K. Miyazono, and S. Kato, *Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators*. *Science*, 1999. **283**(5406): p. 1317-21.
97. Feng, X.H., Y. Zhang, R.Y. Wu, and R. Derynck, *The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation*. *Genes Dev*, 1998. **12**(14): p. 2153-63.
98. Janknecht, R., N.J. Wells, and T. Hunter, *TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300*. *Genes Dev*, 1998. **12**(14): p. 2114-9.
99. Topper, J.N., M.R. DiChiara, J.D. Brown, A.J. Williams, D. Falb, T. Collins, and M.A. Gimbrone, Jr., *CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9506-11.

100. Pouponnot, C., L. Jayaraman, and J. Massague, *Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 22865-8.
101. Shen, X., P.P. Hu, N.T. Liberati, M.B. Datto, J.P. Frederick, and X.F. Wang, *TGF-beta-induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(12): p. 3309-19.
102. Nakashima, K., M. Yanagisawa, H. Arakawa, and T. Taga, *Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2*. FEBS Lett, 1999. **457**(1): p. 43-6.
103. Nakashima, K., M. Yanagisawa, H. Arakawa, N. Kimura, T. Hisatsune, M. Kawabata, K. Miyazono, and T. Taga, *Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300*. Science, 1999. **284**(5413): p. 479-82.
104. Wotton, D., R.S. Lo, S. Lee, and J. Massague, *A Smad transcriptional corepressor*. Cell, 1999. **97**(1): p. 29-39.
105. Westerhausen, D.R., Jr., W.E. Hopkins, and J.J. Billadello, *Multiple transforming growth factor-beta-inducible elements regulate expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene in Hep G2 cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(2): p. 1092-100.
106. Akiyoshi, S., H. Inoue, J. Hanai, K. Kusanagi, N. Nemoto, K. Miyazono, and M. Kawabata, *c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 35269-77.
107. Luo, K., S.L. Stroschein, W. Wang, D. Chen, E. Martens, S. Zhou, and Q. Zhou, *The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling*. Genes Dev, 1999. **13**(17): p. 2196-206.
108. Sun, Y., X. Liu, E.N. Eaton, W.S. Lane, H.F. Lodish, and R.A. Weinberg, *Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 499-509.
109. Sun, Y., X. Liu, E. Ng-Eaton, H.F. Lodish, and R.A. Weinberg, *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): p. 12442-7.
110. Stroschein, S.L., W. Wang, S. Zhou, Q. Zhou, and K. Luo, *Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein*. Science, 1999. **286**(5440): p. 771-4.
111. Kretschmar, M., J. Doody, and J. Massague, *Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 618-22.
112. de Caestecker, M.P., W.T. Parks, C.J. Frank, P. Castagnino, D.P. Bottaro, A.B. Roberts, and R.J. Lechleider, *Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases*. Genes Dev, 1998. **12**(11): p. 1587-92.
113. Brown, J.D., M.R. DiChiara, K.R. Anderson, M.A. Gimbrone, Jr., and J.N. Topper, *MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8797-805.
114. Afrakhte, M., A. Moren, S. Jossan, S. Itoh, K. Sampath, B. Westermark, C.H. Heldin, N.E. Heldin, and P. ten Dijke, *Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(2): p. 505-11.

115. Heine, U., E.F. Munoz, K.C. Flanders, L.R. Ellingsworth, H.Y. Lam, N.L. Thompson, A.B. Roberts, and M.B. Sporn, *Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 2): p. 2861-76.
116. Lehnert, S.A. and R.J. Akhurst, *Embryonic expression pattern of TGF beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action*. Development, 1988. **104**(2): p. 263-73.
117. Shull, M.M., I. Ormsby, A.B. Kier, S. Pawlowski, R.J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 693-9.
118. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 137-61.
119. Thompson, N.L., K.C. Flanders, J.M. Smith, L.R. Ellingsworth, A.B. Roberts, and M.B. Sporn, *Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice*. J Cell Biol, 1989. **108**(2): p. 661-9.
120. Kulkarni, A.B. and S. Karlsson, *Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease*. Am J Pathol, 1993. **143**(1): p. 3-9.
121. Kulkarni, A.B. and S. Karlsson, *Inflammation and TGF beta 1: lessons from the TGF beta 1 null mouse*. Res Immunol, 1997. **148**(7): p. 453-6.
122. Diebold, R.J., M.J. Eis, M. Yin, I. Ormsby, G.P. Boivin, B.J. Darrow, J.E. Saffitz, and T. Doetschman, *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): p. 12215-9.
123. Dickson, M.C., J.S. Martin, F.M. Cousins, A.B. Kulkarni, S. Karlsson, and R.J. Akhurst, *Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice*. Development, 1995. **121**(6): p. 1845-54.
124. Sanford, L.P., I. Ormsby, A.C. Gittenberger-de Groot, H. Sariola, R. Friedman, G.P. Boivin, E.L. Cardell, and T. Doetschman, *TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes*. Development, 1997. **124**(13): p. 2659-70.
125. Kaartinen, V., J.W. Voncken, C. Shuler, D. Warburton, D. Bu, N. Heisterkamp, and J. Groffen, *Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 415-21.
126. Proetzel, G., S.A. Pawlowski, M.V. Wiles, M. Yin, G.P. Boivin, P.N. Howles, J. Ding, M.W. Ferguson, and T. Doetschman, *Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 409-14.
127. Larsson, J., M.J. Goumans, L.J. Sjostrand, M.A. van Rooijen, D. Ward, P. Leveen, X. Xu, P. ten Dijke, C.L. Mummery, and S. Karlsson, *Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice*. Embo J, 2001. **20**(7): p. 1663-73.
128. Rotzer, D., M. Roth, M. Lutz, D. Lindemann, W. Sebald, and P. Knaus, *Type III TGF-beta receptor-independent signalling of TGF-beta2 via TbetaRII-B, an alternatively spliced TGF-beta type II receptor*. Embo J, 2001. **20**(3): p. 480-90.

129. Hirai, R. and T. Fijita, *A human transforming growth factor-beta type II receptor that contains an insertion in the extracellular domain*. Exp Cell Res, 1996. **223**(1): p. 135-41.
130. Rosenzweig, B.L., T. Imamura, T. Okadome, G.N. Cox, H. Yamashita, P. ten Dijke, C.H. Heldin, and K. Miyazono, *Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7632-6.
131. Nohno, T., T. Ishikawa, T. Saito, K. Hosokawa, S. Noji, D.H. Wolsing, and J.S. Rosenbaum, *Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors*. J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22522-6.
132. Padgett, R.W., J.M. Wozney, and W.M. Gelbart, *Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2905-9.
133. Yamashita, H., P. ten Dijke, D. Huylebroeck, T.K. Sampath, M. Andries, J.C. Smith, C.H. Heldin, and K. Miyazono, *Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects*. J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 217-26.
134. Hoodless, P.A., T. Haerry, S. Abdollah, M. Stapleton, M.B. O'Connor, L. Attisano, and J.L. Wrana, *MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways*. Cell, 1996. **85**(4): p. 489-500.
135. ten Dijke, P., H. Yamashita, T.K. Sampath, A.H. Reddi, M. Estevez, D.L. Riddle, H. Ichijo, C.H. Heldin, and K. Miyazono, *Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4*. J Biol Chem, 1994. **269**(25): p. 16985-8.
136. Koenig, B.B., J.S. Cook, D.H. Wolsing, J. Ting, J.P. Tiesman, P.E. Correa, C.A. Olson, A.L. Pecquet, F. Ventura, R.A. Grant, and et al., *Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5961-74.
137. Penton, A., Y. Chen, K. Staehling-Hampton, J.L. Wrana, L. Attisano, J. Szidonya, J.A. Cassill, J. Massague, and F.M. Hoffmann, *Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in Drosophila and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor*. Cell, 1994. **78**(2): p. 239-50.
138. Letsou, A., K. Arora, J.L. Wrana, K. Simin, V. Twombly, J. Jamal, K. Staehling-Hampton, F.M. Hoffmann, W.M. Gelbart, J. Massague, and et al., *Drosophila Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family*. Cell, 1995. **80**(6): p. 899-908.
139. Childs, S.R., J.L. Wrana, K. Arora, L. Attisano, M.B. O'Connor, and J. Massague, *Identification of a Drosophila activin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9475-9.
140. Brummel, T.J., V. Twombly, G. Marques, J.L. Wrana, S.J. Newfeld, L. Attisano, J. Massague, M.B. O'Connor, and W.M. Gelbart, *Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in Drosophila*. Cell, 1994. **78**(2): p. 251-61.
141. Sampath, T.K., K.E. Rashka, J.S. Doctor, R.F. Tucker, and F.M. Hoffmann, *Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6004-8.

142. Mathews, L.S., *Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family*. *Endocr Rev*, 1994. **15**(3): p. 310-25.
143. Attisano, L., J.L. Wrana, S. Cheifetz, and J. Massague, *Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors*. *Cell*, 1992. **68**(1): p. 97-108.
144. Yeo, C. and M. Whitman, *Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms*. *Mol Cell*, 2001. **7**(5): p. 949-57.
145. Kawabata, M., A. Chytil, and H.L. Moses, *Cloning of a novel type II serine/threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor-beta receptor*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(10): p. 5625-30.
146. di Clemente, N., C. Wilson, E. Faure, L. Boussin, P. Carmillo, R. Tizard, J.Y. Picard, B. Vigier, N. Josso, and R. Cate, *Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone*. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(8): p. 1006-20.
147. Beppu, H., O. Minowa, K. Miyazono, and M. Kawabata, *cDNA cloning and genomic organization of the mouse BMP type II receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **235**(3): p. 499-504.
148. Persson, U., H. Izumi, S. Souchelnytskyi, S. Itoh, S. Grimsby, U. Engstrom, C.H. Heldin, K. Funo, and P. ten Dijke, *The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation*. *FEBS Lett*, 1998. **434**(1-2): p. 83-7.
149. ten Dijke, P., H. Ichijo, P. Franzen, P. Schulz, J. Saras, H. Toyoshima, C.H. Heldin, and K. Miyazono, *Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity*. *Oncogene*, 1993. **8**(10): p. 2879-87.
150. Tsuchida, K., P.E. Sawchenko, S. Nishikawa, and W.W. Vale, *Molecular cloning of a novel type I receptor serine/threonine kinase for the TGF beta superfamily from rat brain*. *Mol Cell Neurosci*, 1996. **7**(6): p. 467-78.
151. Yelick, P.C., T.S. Abduljabbar, and P. Stashenko, *zALK-8, a novel type I serine/threonine kinase receptor, is expressed throughout early zebrafish development*. *Dev Dyn*, 1998. **211**(4): p. 352-61.
152. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 753-91.
153. Oh, S.P., T. Seki, K.A. Goss, T. Imamura, Y. Yi, P.K. Donahoe, L. Li, K. Miyazono, P. ten Dijke, S. Kim, and E. Li, *Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(6): p. 2626-31.
154. Macias-Silva, M., P.A. Hoodless, S.J. Tang, M. Buchwald, and J.L. Wrana, *Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(40): p. 25628-36.
155. Armes, N.A. and J.C. Smith, *The ALK-2 and ALK-4 activin receptors transduce distinct mesoderm-inducing signals during early Xenopus development but do not co-operate to establish thresholds*. *Development*, 1997. **124**(19): p. 3797-804.
156. Suzuki, A., E. Kaneko, N. Ueno, and A. Hemmati-Brivanlou, *Regulation of epidermal induction by BMP2 and BMP7 signaling*. *Dev Biol*, 1997. **189**(1): p. 112-22.

157. Mishina, Y., R. Crombie, A. Bradley, and R.R. Behringer, *Multiple roles for activin-like kinase-2 signaling during mouse embryogenesis*. Dev Biol, 1999. **213**(2): p. 314-26.
158. Chen, Y., A. Bhushan, and W. Vale, *Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 [corrected] receptor serine kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12938-43.
159. Visser, J.A., R. Olaso, M. Verhoef-Post, P. Kramer, A.P. Themmen, and H.A. Ingraham, *The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(6): p. 936-45.
160. Nomura, M. and E. Li, *Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development*. Nature, 1998. **393**(6687): p. 786-90.
161. ten Dijke, P., H. Yamashita, H. Ichijo, P. Franzen, M. Laiho, K. Miyazono, and C.H. Heldin, *Characterization of type I receptors for transforming growth factor- beta and activin*. Science, 1994. **264**(5155): p. 101-4.
162. Jornvall, H., A. Blokzijl, P. ten Dijke, and C.F. Ibanez, *The orphan receptor serine/threonine kinase ALK7 signals arrest of proliferation and morphological differentiation in a neuronal cell line*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5140-6.
163. Ryden, M., T. Imamura, H. Jornvall, N. Belluardo, I. Neveu, M. Trupp, T. Okadome, P. ten Dijke, and C.F. Ibanez, *A novel type I receptor serine-threonine kinase predominantly expressed in the adult central nervous system*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30603-9.
164. Watanabe, R., et al., *The MH1 domains of smad2 and smad3 are involved in the regulation of the ALK7 signals*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **254**(3): p. 707-12.
165. Nellen, D., M. Affolter, and K. Basler, *Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of Drosophila body pattern by decapentaplegic*. Cell, 1994. **78**(2): p. 225-37.
166. Wrana, J.L., H. Tran, L. Attisano, K. Arora, S.R. Childs, J. Massague, and M.B. O'Connor, *Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from Drosophila melanogaster form an activin receptor complex*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 944-50.
167. Cheifetz, S., J.A. Weatherbee, M.L. Tsang, J.K. Anderson, J.E. Mole, R. Lucas, and J. Massague, *The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors*. Cell, 1987. **48**(3): p. 409-15.
168. Wang, X.F., H.Y. Lin, E. Ng-Eaton, J. Downward, H.F. Lodish, and R.A. Weinberg, *Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor*. Cell, 1991. **67**(4): p. 797-805.
169. Gougos, A. and M. Letarte, *Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line*. J Immunol, 1988. **141**(6): p. 1925-33.
170. Gougos, A. and M. Letarte, *Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8361-4.
171. Lopez-Casillas, F., S. Cheifetz, J. Doody, J.L. Andres, W.S. Lane, and J. Massague, *Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system*. Cell, 1991. **67**(4): p. 785-95.
- 172., S. Cheifetz, T. Bellon, C. Cales, S. Vera, C. Bernabeu, J. Massague, and M. Letarte, *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.

173. Segarini, P.R. and S.M. Seyedin, *The high molecular weight receptor to transforming growth factor-beta contains glycosaminoglycan chains*. J Biol Chem, 1988. **263**(17): p. 8366-70.
174. Blobe, G.C., W.P. Schiemann, M.C. Pepin, M. Beauchemin, A. Moustakas, H.F. Lodish, and M.D. O'Connor-McCourt, *Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24627-37.
175. Cheifetz, S. and J. Massague, *Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C*. J Biol Chem, 1991. **266**(31): p. 20767-72.
176. Lopez-Casillas, F., J.L. Wrana, and J. Massague, *Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor*. Cell, 1993. **73**(7): p. 1435-44.
177. Moustakas, A., H.Y. Lin, Y.I. Henis, J. Plamondon, M.D. O'Connor-McCourt, and H.F. Lodish, *The transforming growth factor beta receptors types I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22215-8.
178. Lopez-Casillas, F., H.M. Payne, J.L. Andres, and J. Massague, *Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites*. J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 557-68.
179. Vilchis-Landeros, M.M., J.L. Montiel, V. Mendoza, G. Mendoza-Hernandez, and F. Lopez-Casillas, *Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 1): p. 215-22.
180. Barbara, N.P., J.L. Wrana, and M. Letarte, *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- beta superfamily*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 584-94.
181. Fonsatti, E., L. Del Vecchio, M. Altomonte, L. Sigalotti, M.R. Nicotra, S. Coral, P.G. Natali, and M. Maio, *Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor- complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies*. J Cell Physiol, 2001. **188**(1): p. 1-7.
182. Lastres, P., A. Letamendia, H. Zhang, C. Rius, N. Almendro, U. Raab, L.A. Lopez, C. Langa, A. Fabra, M. Letarte, and C. Bernabeu, *Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1*. J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1109-21.
183. McAllister, K.A., K.M. Grogg, D.W. Johnson, C.J. Gallione, M.A. Baldwin, C.E. Jackson, E.A. Helmbold, D.S. Markel, W.C. McKinnon, J. Murrell, and 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): p. 345-51.
184. Johnson, D.W., et al., *Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2*. Nat Genet, 1996. **13**(2): p. 189-95.
185. Lin, H.Y., A. Moustakas, P. Knaus, R.G. Wells, Y.I. Henis, and H.F. Lodish, *The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands*. J Biol Chem, 1995. **270**(6): p. 2747-54.

186. Cheifetz, S., H. Hernandez, M. Laiho, P. ten Dijke, K.K. Iwata, and J. Massague, *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): p. 20533-8.
187. Lawler, S., A.F. Candia, R. Ebner, L. Shum, A.R. Lopez, H.L. Moses, C.V. Wright, and R. Derynck, *The murine type II TGF-beta receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF-beta 1*. Development, 1994. **120**(1): p. 165-75.
188. Sankar, S., N. Mahooti-Brooks, M. Centrella, T.L. McCarthy, and J.A. Madri, *Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13567-72.
189. Brown, C.B., A.S. Boyer, R.B. Runyan, and J.V. Barnett, *Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart*. Science, 1999. **283**(5410): p. 2080-2.
190. Ohta, M., J.S. Greenberger, P. Anklesaria, A. Bassols, and J. Massague, *Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells*. Nature, 1987. **329**(6139): p. 539-41.
191. Nikawa, J., *A cDNA encoding the human transforming growth factor beta receptor suppresses the growth defect of a yeast mutant*. Gene, 1994. **149**(2): p. 367-72.
192. Suzuki, A., N. Shioda, T. Maeda, M. Tada, and N. Ueno, *Cloning of an isoform of mouse TGF-beta type II receptor gene*. FEBS Lett, 1994. **355**(1): p. 19-22.
193. Henis, Y.I., A. Moustakas, H.Y. Lin, and H.F. Lodish, *The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers*. J Cell Biol, 1994. **126**(1): p. 139-54.
194. Gilboa, L., R.G. Wells, H.F. Lodish, and Y.I. Henis, *Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane*. J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 767-77.
195. Wells, R.G., L. Gilboa, Y. Sun, X. Liu, Y.I. Henis, and H.F. Lodish, *Transforming growth factor-beta induces formation of a dithiothreitol- resistant type I/Type II receptor complex in live cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5716-22.
196. Cheifetz, S., A. Bassols, K. Stanley, M. Ohta, J. Greenberger, and J. Massague, *Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors*. J Biol Chem, 1988. **263**(22): p. 10783-9.
197. Laiho, M., F.M. Weis, F.T. Boyd, R.A. Ignatz, and J. Massague, *Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II*. J Biol Chem, 1991. **266**(14): p. 9108-12.
198. Katagiri, T., A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J.M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara, and T. Suda, *Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1755-66.
199. Zhang, Y., X. Feng, R. We, and R. Derynck, *Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response*. Nature, 1996. **383**(6596): p. 168-72.

200. Macias-Silva, M., S. Abdollah, P.A. Hoodless, R. Pirone, L. Attisano, and J.L. Wrana, *MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1215-24.
201. Massague, J., S. Cheifetz, F.T. Boyd, and J.L. Andres, *TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **593**: p. 59-72.
202. Ishisaki, A., K. Yamato, S. Hashimoto, A. Nakao, K. Tamaki, K. Nonaka, P. ten Dijke, H. Sugino, and T. Nishihara, *Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13637-42.
203. Leers, J., C. Steiner, R. Renkawitz, and M. Muller, *A thyroid hormone receptor-dependent glucocorticoid induction*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(4): p. 440-7.
204. Laiho, M., M.B. Weis, and J. Massague, *Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)-beta receptor types I and II in TGF-beta-resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction*. J Biol Chem, 1990. **265**(30): p. 18518-24.
205. Cheifetz, S., T. Bellon, C. Cales, S. Vera, C. Bernabeu, J. Massague, and M. Letarte, *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.
206. Ogawa, Y., D.K. Schmidt, J.R. Dasch, R.J. Chang, and C.B. Glaser, *Purification and characterization of transforming growth factor-beta 2.3 and -beta 1.2 heterodimers from bovine bone*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2325-8.
207. Dore, J.J., Jr., M. Edens, N. Garamszegi, and E.B. Leof, *Heteromeric and homomeric transforming growth factor-beta receptors show distinct signaling and endocytic responses in epithelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 31770-7.
208. Wells, R.G., H. Yankelev, H.Y. Lin, and H.F. Lodish, *Biosynthesis of the type I and type II TGF-beta receptors. Implications for complex formation*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11444-51.
209. Mitchell, E.J. and M.D. O'Connor-McCourt, *A transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor from human placenta exhibits a greater affinity for TGF-beta 2 than for TGF-beta 1*. Biochemistry, 1991. **30**(17): p. 4350-6.
210. Mitchell, E.J., L. Fitz-Gibbon, and M.D. O'Connor-McCourt, *Subtypes of betaglycan and of type I and type II transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors with different affinities for TGF-beta 1 and TGF-beta 2 are exhibited by human placental trophoblast cells*. J Cell Physiol, 1992. **150**(2): p. 334-43.
211. Schlunegger, M.P. and M.G. Grutter, *An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 A resolution of human transforming growth factor-beta 2*. Nature, 1992. **358**(6385): p. 430-4.
212. Mittl, P.R., J.P. Priestle, D.A. Cox, G. McMaster, N. Cerletti, and M.G. Grutter, *The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding*. Protein Sci, 1996. **5**(7): p. 1261-71.

213. Hinck, A.P., S.J. Archer, S.W. Qian, A.B. Roberts, M.B. Sporn, J.A. Weatherbee, M.L. Tsang, R. Lucas, B.L. Zhang, J. Wenker, and D.A. Torchia, *Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2*. *Biochemistry*, 1996. **35**(26): p. 8517-34.
214. Qian, S.W., J.K. Burmester, J.R. Merwin, J.A. Madri, M.B. Sporn, and A.B. Roberts, *Identification of a structural domain that distinguishes the actions of the type 1 and 2 isoforms of transforming growth factor beta on endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(14): p. 6290-4.
215. Qian, S.W., J.K. Burmester, P.D. Sun, A. Huang, D.J. Ohlsen, L. Suardet, K.C. Flanders, D. Davies, A.B. Roberts, and M.B. Sporn, *Characterization of mutated transforming growth factor-beta s which possess unique biological properties*. *Biochemistry*, 1994. **33**(40): p. 12298-304.
216. Qian, S.W., J.K. Burmester, M.L. Tsang, J.A. Weatherbee, A.P. Hinck, D.J. Ohlsen, M.B. Sporn, and A.B. Roberts, *Binding affinity of transforming growth factor-beta for its type II receptor is determined by the C-terminal region of the molecule*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(48): p. 30656-62.
217. Greenwald, J., W.H. Fischer, W.W. Vale, and S. Choe, *Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase*. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(1): p. 18-22.
218. Kirsch, T., W. Sebald, and M.K. Dreyer, *Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(6): p. 492-6.
219. Gray, P.C., J. Greenwald, A.L. Blount, K.S. Kunitake, C.J. Donaldson, S. Choe, and W. Vale, *Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3206-12.
220. Kirsch, T., J. Nickel, and W. Sebald, *BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II*. *Embo J*, 2000. **19**(13): p. 3314-24.
221. Bottner, M., K. Krieglstein, and K. Unsicker, *The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions*. *J Neurochem*, 2000. **75**(6): p. 2227-40.
222. Ji, C., Y. Chen, T.L. McCarthy, and M. Centrella, *Cloning the promoter for transforming growth factor-beta type III receptor. Basal and conditional expression in fetal rat osteoblasts*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(43): p. 30487-94.
223. Centrella, M., T.L. McCarthy, and E. Canalis, *Parathyroid hormone modulates transforming growth factor beta activity and binding in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat parietal bone*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(16): p. 5889-93.
224. Centrella, M., S. Casinighino, J. Kim, T. Pham, V. Rosen, J. Wozney, and T.L. McCarthy, *Independent changes in type I and type II receptors for transforming growth factor beta induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of the osteoblast phenotype*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(6): p. 3273-81.
225. Erlebacher, A., E.H. Filvaroff, S.E. Gitelman, and R. Derynck, *Toward a molecular understanding of skeletal development*. *Cell*, 1995. **80**(3): p. 371-8.

226. Bostrom, M.P. and P. Asnis, *Transforming growth factor beta in fracture repair*. Clin Orthop, 1998(355 Suppl): p. S124-31.
227. Baron, R., L. Neff, D. Louvard, and P.J. Courtoy, *Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border*. J Cell Biol, 1985. **101**(6): p. 2210-22.
228. Oreffo, R.O., G.R. Mundy, S.M. Seyedin, and L.F. Bonewald, *Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **158**(3): p. 817-23.
229. Mostov, K. and Z. Werb, *Journey across the osteoclast*. Science, 1997. **276**(5310): p. 219-20.
230. Bonewald, L.F. and S.L. Dallas, *Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation*. J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 350-7.
231. Centrella, M., M.C. Horowitz, J.M. Wozney, and T.L. McCarthy, *Transforming growth factor-beta gene family members and bone*. Endocr Rev, 1994. **15**(1): p. 27-39.
232. Chenu, C., J. Pfeilschifter, G.R. Mundy, and G.D. Roodman, *Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5683-7.
233. Pfeilschifter, J., S.M. Seyedin, and G.R. Mundy, *Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures*. J Clin Invest, 1988. **82**(2): p. 680-5.
234. Hattersley, G. and T.J. Chambers, *Effects of transforming growth factor beta 1 on the regulation of osteoclastic development and function*. J Bone Miner Res, 1991. **6**(2): p. 165-72.
235. Gazit, D., R. Ebner, A.J. Kahn, and R. Derynck, *Modulation of expression and cell surface binding of members of the transforming growth factor-beta superfamily during retinoic acid-induced osteoblastic differentiation of multipotential mesenchymal cells*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(2): p. 189-98.
236. Christiansen, P., *The skeleton in primary hyperparathyroidism: a review focusing on bone remodeling, structure, mass, and fracture*. APMIS Suppl, 2001. **102**: p. 1-52.
237. Seitz, P.K., B.T. Zhu, and C.W. Cooper, *Effect of transforming growth factor beta on parathyroid hormone receptor binding and cAMP formation in rat osteosarcoma cells*. J Bone Miner Res, 1992. **7**(5): p. 541-6.
238. Yin, J.J., K. Selander, J.M. Chirgwin, M. Dallas, B.G. Grubbs, R. Wieser, J. Massague, G.R. Mundy, and T.A. Guise, *TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 197-206.
239. Hughes, F.J., J.E. Aubin, and J.N. Heersche, *Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta*. Bone Miner, 1992. **19**(1): p. 63-74.
240. Erlebacher, A. and R. Derynck, *Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype*. J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 195-210.
241. Serra, R., M. Johnson, E.H. Filvaroff, J. LaBorde, D.M. Sheehan, R. Derynck, and H.L. Moses, *Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue*

- promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis.* J Cell Biol, 1997. **139**(2): p. 541-52.
242. Filvaroff, E., A. Erlebacher, J. Ye, S.E. Gitelman, J. Lotz, M. Heilman, and R. Derynck, *Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass.* Development, 1999. **126**(19): p. 4267-79.
243. Rosen, D., S.C. Miller, E. DeLeon, A.Y. Thompson, H. Bentz, M. Mathews, and S. Adams, *Systemic administration of recombinant transforming growth factor beta 2 (rTGF-beta 2) stimulates parameters of cancellous bone formation in juvenile and adult rats.* Bone, 1994. **15**(3): p. 355-9.
244. Ottmann, O.G. and L.M. Pelus, *Differential proliferative effects of transforming growth factor-beta on human hematopoietic progenitor cells.* J Immunol, 1988. **140**(8): p. 2661-5.
245. Cui, W., D.J. Fowles, S. Bryson, E. Duffie, H. Ireland, A. Balmain, and R.J. Akhurst, *TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice.* Cell, 1996. **86**(4): p. 531-42.
246. Engle, S.J., J.B. Hoying, G.P. Boivin, I. Ormsby, P.S. Gartside, and T. Doetschman, *Transforming growth factor beta1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis.* Cancer Res, 1999. **59**(14): p. 3379-86.
247. Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo, *TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders.* Cell, 2000. **103**(2): p. 295-309.
248. Oft, M., K.H. Heider, and H. Beug, *TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cells invasiveness and metastasis.* Curr Biol, 1998. **8**: p. 1243-1252.
249. Dumont, N. and C.L. Arteaga, *Transforming growth factor-beta and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor-beta.* Breast Cancer Res, 2000. **2**(2): p. 125-32.
250. Liotta, L.A. and W.G. Stetler-Stevenson, *Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation.* Cancer Res, 1991. **51**: p. 5054-5059.
251. Pepper, M.S., *Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity.* Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(1): p. 21-43.
252. Torre-Amione, G., R.D. Beauchamp, and H. Koeppen, *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**: p. 1486-1490.
253. Kim, S.J., Y.H. Im, S.D. Markowitz, and Y.J. Bang, *Molecular mechanisms of inactivation of TGF-beta receptors during carcinogenesis.* Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 159-68.
254. Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R.S. Fan, E. Zborowska, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and et al., *Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability.* Science, 1995. **268**(5215): p. 1336-8.
255. Parsons, R., L.L. Myeroff, B. Liu, J.K. Willson, S.D. Markowitz, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer.* Cancer Res, 1995. **55**(23): p. 5548-50.

256. Lu, S.L., M. Kawabata, T. Imamura, Y. Akiyama, T. Nomizu, K. Miyazono, and Y. Yuasa, *HNPCC associated with germline mutation in the TGF-beta type II receptor gene*. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 17-8.
257. Knaus, P.I., D. Lindemann, J.F. DeCoteau, R. Perlman, H. Yankelev, M. Hille, M.E. Kadin, and H.F. Lodish, *A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(7): p. 3480-9.
258. Kaneko, H., S. Horiike, M. Taniwaki, and S. Misawa, *Microsatellite instability is an early genetic event in myelodysplastic syndrome but is infrequent and not associated with TGF-beta receptor type II gene mutation*. *Leukemia*, 1996. **10**(11): p. 1696-9.
259. Molenaar, J.J., B. Gerard, C. Chambon-Pautas, H. Cave, M. Duval, E. Vilmer, and B. Grandchamp, *Microsatellite instability and frameshift mutations in BAX and transforming growth factor-beta RII genes are very uncommon in acute lymphoblastic leukemia in vivo but not in cell lines*. *Blood*, 1998. **92**(1): p. 230-3.
260. Rooke, H.M., M.R. Vitas, P.S. Crosier, and K.E. Crosier, *The TGF-beta type II receptor in chronic myeloid leukemia: analysis of microsatellite regions and gene expression*. *Leukemia*, 1999. **13**(4): p. 535-41.
261. Chen, T., D. Carter, L. Garrigue-Antar, and M. Reiss, *Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer*. *Cancer Res*, 1998. **58**(21): p. 4805-10.
262. Chen, T., E.G. de Vries, H. Hollema, H.A. Yegen, V.F. Vellucci, H.D. Strickler, A. Hildesheim, and M. Reiss, *Structural alterations of transforming growth factor-beta receptor genes in human cervical carcinoma*. *Int J Cancer*, 1999. **82**(1): p. 43-51.
263. Wang, J., W. Han, E. Zborowska, J. Liang, X. Wang, J.K. Willson, L. Sun, and M.G. Brattain, *Reduced expression of transforming growth factor beta type I receptor contributes to the malignancy of human colon carcinoma cells*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(29): p. 17366-71.
264. Wagner, M., J. Kleeff, M.E. Lopez, I. Bockman, J. Massaue, and M. Korc, *Transfection of the type I TGF-beta receptor restores TGF-beta responsiveness in pancreatic cancer*. *Int J Cancer*, 1998. **78**(2): p. 255-60.
265. Kang, S.H., Y.J. Bang, Y.H. Im, H.K. Yang, D.A. Lee, H.Y. Lee, H.S. Lee, N.K. Kim, and S.J. Kim, *Transcriptional repression of the transforming growth factor-beta type I receptor gene by DNA methylation results in the development of TGF-beta resistance in human gastric cancer*. *Oncogene*, 1999. **18**(51): p. 7280-6.
266. Schieman, W.P., W.M. Pfeifer, E. Levi, M.E. Kadin, and H.F. Lodish, *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): p. 2854-61.
267. DeCoteau, J.F., P.I. Knaus, H. Yankelev, M.D. Reis, R. Lowsky, H.F. Lodish, and M.E. Kadin, *Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(11): p. 5877-81.

268. Pasche, B., Y. Luo, P.H. Rao, S.D. Nimer, E. Dmitrovsky, P. Caron, L. Luzzatto, K. Offit, C. Cordon-Cardo, B. Renault, J.M. Satagopan, V.V. Murty, and J. Massague, *Type I transforming growth factor beta receptor maps to 9q22 and exhibits a polymorphism and a rare variant within a polyalanine tract*. *Cancer Res*, 1998. **58**(13): p. 2727-32.
269. Pasche, B., et al., *TbetaR-I(6A) is a candidate tumor susceptibility allele*. *Cancer Res*, 1999. **59**(22): p. 5678-82.
270. Hata, A., Y. Shi, and J. Massague, *TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads*. *Mol Med Today*, 1998. **4**(6): p. 257-62.
271. Goggins, M., M. Shekher, K. Turnacioglu, C.J. Yeo, R.H. Hruban, and S.E. Kern, *Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas*. *Cancer Res*, 1998. **58**(23): p. 5329-32.
272. Grady, W.M., L.L. Myeroff, S.E. Swinler, A. Rajput, S. Thiagalingam, J.D. Lutterbaugh, A. Neumann, M.G. Brattain, J. Chang, S.J. Kim, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, J.K. Willson, and S. Markowitz, *Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers*. *Cancer Res*, 1999. **59**(2): p. 320-4.
273. Hata, A., R.S. Lo, D. Wotton, G. Lagna, and J. Massague, *Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4*. *Nature*, 1997. **388**(6637): p. 82-7.
274. Xu, J. and L. Attisano, *Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(9): p. 4820-5.
275. Zhu, Y., J.A. Richardson, L.F. Parada, and J.M. Graff, *Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer*. *Cell*, 1998. **94**(6): p. 703-14.
276. Kleeff, J., T. Ishiwata, H. Maruyama, H. Friess, P. Truong, M.W. Buchler, D. Falb, and M. Korc, *The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer*. *Oncogene*, 1999. **18**(39): p. 5363-72.
277. Kleeff, J., H. Maruyama, H. Friess, M.W. Buchler, D. Falb, and M. Korc, *Smad6 suppresses TGF-beta-induced growth inhibition in COLO-357 pancreatic cancer cells and is overexpressed in pancreatic cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **255**(2): p. 268-73.
278. Kretzschmar, M., *Transforming growth factor-beta and breast cancer: Transforming growth factor-beta/SMAD signaling defects and cancer*. *Breast Cancer Res*, 2000. **2**(2): p. 107-15.
279. Montserrat, E. and C. Rozman, *Chronic lymphocytic leukemia: present status*. *Ann Oncol*, 1995. **6**(3): p. 219-35.
280. Rozman, C. and E. Montserrat, *Chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(16): p. 1052-7.
281. Giles, F.J., S.M. O'Brien, and M.J. Keating, *Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation*. *Semin Oncol*, 1998. **25**(1): p. 117-25.
282. Kay, N.E., E.A. Ranheim, and L.C. Peterson, *Tumor suppressor genes and clonal evolution in B-CLL*. *Leuk Lymphoma*, 1995. **18**(1-2): p. 41-9.
283. Dohner, H., K. Fischer, M. Bentz, K. Hansen, A. Benner, G. Cabot, D. Diehl, R. Schlenk, J. Coy, S. Stilgenbauer, and et al., *p53 gene deletion predicts for poor survival and non-*

- response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias.* Blood, 1995. **85**(6): p. 1580-9.
284. Dohner, H., S. Stilgenbauer, A. Brenner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz, and P. Lichter, *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.* N Engl J Med, 2000. **343**(26)(Dec 28): p. 1910-1916.
285. Martoglio, B. and B. Dobberstein, *Signal sequences: more than just greasy peptides.* Trends Cell Biol, 1998. **8**(10): p. 410-5.
286. Chen, T., J. Triplett, B. Dehner, B. Hurst, B. Colligan, J. Pemberton, J.R. Graff, and J.H. Carter, *Transforming growth factor-beta receptor type i gene is frequently mutated in ovarian carcinomas.* Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4679-82.
287. Piek, E., A. Moustakas, A. Kurisaki, C.H. Heldin, and P. ten Dijke, *TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells.* J Cell Sci, 1999. **112**(Pt 24): p. 4557-68.
288. Massague, J., J. Andres, L. Attisano, S. Cheifetz, F. Lopez-Casillas, M. Ohtsuki, and J.L. Wrana, *TGF-beta receptors.* Mol Reprod Dev, 1992. **32**(2): p. 99-104.
289. Paterson, I.C., J.B. Matthews, S. Huntley, C.M. Robinson, M. Fahey, E.K. Parkinson, and S.S. Prime, *Decreased expression of TGF-beta cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma.* J Pathol, 2001. **193**(4): p. 458-467.
290. Ruppert, R., E. Hoffmann, and W. Sebald, *Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity.* Eur J Biochem, 1996. **237**(1): p. 295-302.
291. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
292. Young, R.A. and R.W. Davis, *Efficient isolation of genes by using antibody probes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(5): p. 1194-8.
293. Boyd, F.T. and J. Massague, *Transforming growth factor-beta inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kDa membrane receptor.* J Biol Chem, 1989. **264**(4): p. 2272-8.
294. Aruffo, A. and B. Seed, *Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8573-7.
295. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
294. Hart, P.J., S. Deep, A.B. Taylor, Z. Shu, C.S. Hinck and A.P. Hinck, *Crystal structure of the human TGF- β type II receptor extracellular domain in complex with TGF- β 3.* Zur Veröffentlichung eingereicht, 2001.

VII. Zusammenfassung

Transforming growth factor- β (TGF- β) reguliert eine Vielzahl zellulärer Funktionen, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Über membrangebundene Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren werden TGF- β Signale durch Phosphorylierung an Smad-Proteine, die intrazellulären Signaltransduktoren, weitergeleitet, die im Kern die Transkription spezifischer Gene modulieren.

Obwohl die drei TGF- β Isoformen, TGF- β 1, - β 2 und - β 3, äußerst homologe Proteine sind, unterscheiden sich die Phänotypen ihrer Genknockouts stark. Variabilität und Spezifität können auf vielerlei Arten und Ebenen der TGF- β Signalübertragung erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wird eine alternativ gespleißte Variante des TGF- β Typ II Rezeptors (T β RII), T β RII-B, charakterisiert. Dieser Rezeptor ist, im Gegensatz zum bisher bekannten T β RII, in der Lage alle drei TGF- β Isoformen hochaffin zu binden und in Abwesenheit eines unterstützenden Typ III Rezeptors (T β RIII) Signale über den Smad-Pathway weiterzuleiten. T β RII-B ist außerdem fähig ligandenabhängig mit den verschiedenen TGF- β Rezeptortypen zu Oligomerisieren. Erste Hinweise auf Besonderheiten der TGF- β 2 Bindung an T β RII-B wurden mittels verschiedener zellbiologischer Ansätzen gewonnen. Aus Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression des Rezeptors geht hervor, daß T β RII-B, im Vergleich zu T β RII, ein distinktes Expressionsmuster aufweist und v.a. in TGF- β 2-beeinflußten Geweben nachgewiesen werden kann. In diesen Erkenntnissen spiegelt sich die Bedeutung dieses Rezeptors für eine TGF- β Isoform-spezifische Signalübertragung wider.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von TGF- β und seinen Rezeptoren bei der Entstehung von Tumoren. B-Zellen einiger Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (B-CLL), der häufigsten Form adulter Leukämie in westlichen Ländern, zeigen Resistenz gegenüber TGF- β -vermittelter Wachstumsinhibierung und ein verändertes Expressionsmuster der TGF- β Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche. In dieser Arbeit wird die Identifizierung und Charakterisierung zweier Mutationen innerhalb der putativen Signalpeptidsequenz des TGF- β Typ I Rezeptors (T β RI) in B-Zellen TGF- β resistenter CLL-Patienten beschrieben. Hierbei handelt es sich um einen Aminosäure-Austausch (L12Q) und eine ‚in-frame‘ Alanin-Deletion (A8) innerhalb einer aus 9 Alaninen bestehenden

Sequenz. Es konnte gezeigt werden, daß diese Mutationen zwar keinen Einfluß auf Oberflächenexpression und Komplexbildungseigenschaften des T β RI haben, jedoch TGF- β stimulierte Reporter-geninduktion verringern, was eine kausale Beziehung bei der Entwicklung TGF- β resistenter B-CLL-Zellen vermuten läßt. Ein Auftreten von Mutationen innerhalb der 9-Alanin-Sequenz des T β RI korreliert mit TGF- β Insensitivität von B-CLL Zellen. Obwohl noch weitere Studien benötigt werden, um den präzisen molekularen Mechanismus zu verstehen, der zu TGF- β Resistenz in B-CLL Zellen führt, kann spekuliert werden, daß T β RI Mutationen das Voranschreiten von B-CLL und evtl. anderen Tumorarten unterstützen. Gezieltes Screenen nach T β RI Signalpeptidsequenz Mutationen könnte demnach als prognostischer Indikator für Tumorprogression eingesetzt werden.

VII. Summary

Transforming growth factor- β (TGF- β) regulates a variety of cellular functions like proliferation, differentiation and apoptosis. It signals through membrane-bound serine/threonine kinase receptors, which upon stimulation phosphorylate Smad proteins, the intracellular signaltransducers, and thereby trigger their nuclear translocation and transcriptional activity.

Although the three mammalian TGF- β isoforms, TGF- β 1, - β 2 and - β 3, are highly homologous proteins, the phenotypes of their genknockouts reveal striking differences. Variability and specificity can be achieved on different levels of the TGF- β signaltransduction. In this work an alternatively spliced variant of the TGF- β type II receptor (T β RII), T β RII-B, is characterized, which in contrast to T β RII binds and mediates signaling of all TGF- β isoforms. This signaling occurs via the Smad pathway and is independent of any supporting type III receptor (T β RIII). Therefore interaction and oligomerization of T β RII-B with the TGF- β isoforms as well as the different TGF- β receptor types was analyzed in detail. Furthermore we defined the characteristics of TGF- β 2 binding to T β RII-B. Expression studies demonstrate that T β RII-B expression is restricted to cells originating from tissues where the TGF- β 2 isoform has a predominant role. All that reflects the importance of this receptor splice-variant in TGF- β isoform-specific signaling.

The second part of this work focuses on the role of TGF- β and its receptors in tumor development. B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the most common lymphoid cancer in Western societies, and is also currently incurable. B-cells from some B-CLL patients are resistant to the growth inhibitory effects of TGF- β and show a different expression pattern of TGF- β receptors at their cell surface. In this work the identification and characterization of two mutations within the putative signal sequence of the *t β rI* gene in B-cells from TGF- β resistant B-CLL patients is described. Thereby a single aminoacid substitution (L12Q) is accompanied by an 'in frame' single alanine deletion within an 9-alanine stretch. It could be shown that this mutations do not mediate the apparent loss of functional T β RI in TGF- β resistant B-CLL, but they attenuate reporter gene induction stimulated by TGF- β , suggesting a causal relationship in the development of TGF- β resistant B-CLL. The appearance of mutations within the 9-alanine stretch of the T β RI correlated with and predicted for B-CLL patient insensitivity to TGF- β . Although more studies are needed to ascertain

the precise molecular mechanism leading to TGF- β resistance in B-CLL cells, it is tempting to speculate that these T β RI mutations may promote the progression of B-CLL and other cancers from their indolent to active states. This suggests that screening for T β RI signal sequence mutations can be employed as a prognostic indicator of B-CLL patient sensitivity to TGF- β .

Schriftenverzeichnis

Publikationen:

Rotzer, D., Roth, M., Lutz, M., Lindemann, D., Sebald, W. und Knaus, P. (2001) *Type III TGF- β receptor-independent signalling of TGF- β 2 via T β RII-B, an alternatively spliced TGF- β type II receptor*. EMBO J., 2001. **20**: p 480-490.

Schiemann, W.P.*, Rotzer, D.*, Pfeifer, W., Levi, E., Wang, Z., Haliotis P., Rai, K.R., Knaus, P. und Kadin, M. *TGF- β resistant B-cells from chronic lymphocytic leukemia patients contain recurrent mutations in the signal sequence of TGF- β type I receptor*. 2001. Zur Publikation eingereicht.

Veröffentlichte Abstracts:

Rotzer, D., Roth, M., Lutz, M., Sebald, W. und Knaus, P. *Identifizierung und Charakterisierung eines TGF β -2 Rezeptors im Osteoblasten*. Osteologie, 2000. **9**, Suppl.1,94.

Rotzer, D., Roth, M., Lutz, M., Lindemann, D., Sebald, W. und Knaus, P. *Type III TGF- β eceptor-independent signaling of TGF- β 2 via T β RII-B, an alternatively spliced TGF- β type II receptor*. Millenium Meeting Signal Transduction (STS), 2000. p.112.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Diana Rotzer
Geboren am: 27.05.1972 in Donauwörth
Familienstand: ledig

Bildungsweg:

1978 – 1982	Grundschule Donauwörth
1982 – 1991	Gymnasium Donauwörth (humanistisch-naturwissenschaftlich)
Juli 1991	Abitur
1992 – 1998	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Studienschwerpunkte: Pflanzenphysiologie, Biochemie, Humangenetik
März 1997	Diplomprüfung
1997 – 1998	Diplomarbeit am Institut für physiologische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bei Prof. Dr. W. Sebald. Thema: <i>"Mutationen in den Genen für die Rezeptoren von TGFβ: ein genereller Mechanismus der Tumorgenese?"</i>
1998 - 2001	Dissertation am Institut für physiologische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bei Prof. Dr. W. Sebald. Thema: <i>"Biologische Charakterisierung der Rezeptoren für Transforming Growth Factor-β"</i>
Juli – Dez. 1998	Aufenthalt am Whitehead Institut des Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (MA), USA.

Anstellungen:

1997-1998	Studentische Hilfskraft
1998-2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg angefertigt.

Bei allen, die am Entstehen dieser Arbeit direkt oder indirekt beteiligt waren, möchte ich mich hier bedanken:

Prof. Dr. Sebald danke ich für seine Unterstützung und die Möglichkeit die Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen.

Dr. Gert Pflugfelder möchte ich für die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät danken.

Dr. Petra Knaus, die mir das Thema überlassen hat und in deren Gruppe diese Arbeit fertiggestellt wurde, möchte ich hervorheben. Für ihre engagierte Betreuung, Unterstützung und Motivation, für ein immerzu offenes Ohr und ständige Diskussionsbereitschaft vielen Dank!

Mein Dank gilt auch Prof. Harvey Lodish, in dessen Labor am ‚Whitehead Institute‘ ich arbeiten durfte und freundlichst aufgenommen wurde, sowie meinem dortigen Betreuer Bill Schiemann.

Marion Lutz und Martin Roth danke ich für die Mithilfe am ‚Typ II-B-Projekt‘.

Ein Dankeschön, für ihre Hilfe und Diskussionsbereitschaft, an alle ehemaligen und jetzigen Kollegen/innen aus Labor 313. Hierbei seien Tanja Lutz und Yvonne Kehl hervorgehoben, die sich um all die Dinge kümmer(te)n, die das Arbeiten im Labor erst möglich machen.

Wolfgang Hädelt danke ich für die Durchführung von RT-PCR Experimenten und DNA-Sequenzierungen.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise Sebald, Hoppe und Conzelmann möchte ich herzlich für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft danken, v.a. Dr. Joachim Nickel, Sascha Keller, Markus Haake und Alexandra Will möchte ich hier nennen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig, und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel, angefertigt wurde. Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Würzburg, den

Diana Rotzer