

Die Rolle von Fussel-15, Fussel-18 und TANGO in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
Der Universität Regensburg



vorgelegt von
Stephanie Arndt
aus Pfaffenhofen an der Ilm
Mai 2007

Promotionsgesuch eingereicht am 21 Juli 2004

Die Arbeit wurde angeleitet von Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ralph Witzgall

1. Gutachter (1. Prüfer): Prof. Dr. Stephan Schneuwly

2. Gutachterin (2. Prüferin): Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff

3. Prüferin: Prof. Dr. Charlotte Förster

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	1
2	<i>Zusammenfassung</i>	4
Teil I		6
3	<i>Einleitung Teil I</i>	6
3.1	Die Transforming Growth Factor-β (TGF-β) Superfamilie	6
3.2	Signaltransduktion der TGF-β Superfamilie	6
3.2.1	Rezeptoren und Rezeptoraktivierung der TGF- β Superfamilie	6
3.2.2	Intrazelluläre Signalweiterleitung durch Smad Proteine	8
3.2.3	Regulation der TGF- β vermittelten Signaltransduktion	12
3.3	Biologische Funktionen der TGF-β Superfamilie	15
3.4	Die Rolle von TGF-β/BMP in neuro-physiologischen Prozessen	16
3.5	Die Beteiligung von TGF-β/BMP an Entwicklungsprozessen	17
3.6	Die Rolle von TGF-β in patho-physiologischen Prozessen	18
3.6.1	Die Rolle von TGF- β in der physiologischen Wundheilung	18
3.6.2	Die Rolle von TGF- β bei Erkrankungen mit vermehrter Bindegewebsneubildung	19
3.7	Die Rolle von TGF-β in tumor-biologischen Prozessen	21
3.7.1	Die Rolle von TGF- β bei Entstehung und Wachstum von Tumoren	21
3.7.2	Defekte der TGF- β Signalkaskade während der Tumorigenese	21
4	<i>Ergebnisse Teil I</i>	24
4.1	Identifikation von zwei neuen Ski/Sno homologen Proteinen	24
4.2	Expression von Fussel-15 und Fussel-18	26
4.2.1	Expressionsnachweis in humanen Geweben	26
4.2.2	Expressionsmuster in murinen Geweben	26
4.3	Lokalisation von Fussel-15 und Fussel-18	27
4.3.1	Lokalisation von Fussel-15 in den Purkinjezellen des Kleinhirns	27
4.3.2	Lokalisation von Fussel-18 in der Granularschicht des Kleinhirns	28
4.3.3	Neuronale Lokalisation von Fussel-18	29
4.3.4	Lokalisation von Fussel-15 und 18 innerhalb der Zelle	30
4.4	Interaktion von Fussel-15 und Fussel-18	31
4.4.1	Interaktion von Fussel-15 mit Smad1, Smad2 und Smad3	32
4.4.2	Interaktion von Fussel-18 mit Smad2 und Smad3	32
4.5	Funktion von Fussel-15 und Fussel-18	33
4.5.1	Fussel-15 als negativer Regulator des BMP-Signalwegs	33
4.5.2	Fussel-18 als negativer Regulator des TGF- β -Signalwegs	35
4.6	Die Rolle von Fussel-15 in der physiologischen Wundheilung	36
4.6.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> Kontraktionsmodells	36
4.6.2	<i>In vitro</i> Expression von Fussel-15 im Verlauf der Wundheilung	37
4.6.3	<i>In vitro</i> Expression von TGF- β s und BMPs im Verlauf der Wundheilung	38

4.7	Regulatorische Funktion von Fussel-15 in der Wundheilung.....	38
4.7.1	Modulation der Fussel-15 Expression durch Knockdown	39
4.7.2	Modulation der Fussel-15 Expression durch Überexpression.....	40
4.7.3	Inhibierung des BMP Signalwegs durch Fussel-15 in humanen Fibroblasten	40
4.8	Fussel-15 bei Erkrankungen mit vermehrter Bindegewebsneubildung..	41
4.8.1	Veränderte Fussel-15 Expression in Keloid und Sklerodermie	41
4.8.2	Veränderte Expression von Fussel-15 in Keloid und Sklerodermie nach exogener Inhibierung des BMP Signalwegs durch Noggin	43
4.8.3	Veränderte Expression von BMP6 in Keloid Fibroblasten.....	44
5	<i>Diskussion Teil I.....</i>	45
Teil II.....		56
6	<i>Einleitung Teil II.....</i>	56
6.1	Die MIA Familie.....	56
6.1.1	Die Rolle von MIA im malignen Melanom	57
6.1.2	Die spezifische Rolle von MIA2 in der Leber.....	59
6.1.3	Die Entdeckung von TANGO und Vordaten.....	60
7	<i>Ergebnisse Teil II.....</i>	61
7.1	TANGO als Tumorsuppressor des malignen Melanoms	61
7.1.1	Reduktion von TANGO während der Melanomprogression	61
7.1.2	Expression von TANGO in verschiedenen Nävus Formen	63
7.1.3	Funktionelle Relevanz von TANGO im malignen Melanom	65
7.2	TANGO als Tumorsuppressor im Kolon- und Leber-Karzinom	70
7.2.1	Reduktion von TANGO im Kolon- und heptozellulären Karzinom.....	70
7.2.2	Mögliche Rolle von TANGO in Kolon- und Lebertumoren	74
7.3	Die Beteiligung von TANGO am Migrationsprozess von Monozyten.....	75
7.3.1	Induktion von TANGO nach Adhäsion von Monozyten.....	76
7.3.2	Ko-Lokalisation von TANGO und Integrin alpha X (CD11c).....	78
7.3.3	Einfluss von TANGO auf das Zell-Attachment	80
7.3.4	Einfluss von TANGO auf den Migrationsprozess	82
8	<i>Diskussion Teil II.....</i>	83
9	<i>Materialien und Methoden Teil I und II.....</i>	90
9.1	Materialien	90
9.1.1	Allgemeine Materialien.....	90
9.1.2	Geräte	91
9.1.3	Bakterienstämme	92
9.1.4	Säugerzelllinien	92
9.1.5	Vektoren	93
9.1.6	Primer.....	94
9.2	Medien, Antibiotika und Puffer	95
9.2.1	Medien zur Anzucht von E.coli und Säugerzellkulturen	95
9.2.2	Antibiotika.....	95
9.2.3	Puffer und Lösungen.....	95
9.3	Methoden	98
9.3.1	Allgemeine Methoden	98

9.3.1.1	Arbeiten mit Escherichia coli	98
9.3.1.2	Isolierung von Plasmid DNA (Mini- und Maxipräparation).....	98
9.3.2	DNA und RNA Methoden	99
9.3.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	99
9.3.2.2	Gelelektrophorese von DNA.....	99
9.3.2.3	Isolierung und Reinigung von DNA	100
9.3.2.4	Isolierung von RNA aus Säugerzellen und Geweben	100
9.3.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	100
9.3.2.6	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	100
9.3.2.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	100
9.3.2.8	Quantitative RT-PCR.....	101
9.3.2.9	Sequenzierung	101
9.3.3	Protein Methoden.....	102
9.3.3.1	Rekombinante Herstellung von biotinyliertem TANGO	102
9.3.3.2	Herstellung von Gesamtproteinlysaten	102
9.3.3.3	Herstellung von Proteinfraktionen	102
9.3.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	103
9.3.3.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	103
9.3.3.6	Proteindetektion mittels Western Blot	103
9.3.3.7	Silberfärbung im SDS-Gel	104
9.3.3.8	Seldi-Toff Massenspektrometrie.....	104
9.3.3.9	Ko-Immunpräzipitation	105
9.3.3.10	Immunhistochemie	105
9.3.3.11	Immunfluoreszenz	106
9.3.3.12	<i>In situ</i> Hybridisierung an Maus Embryonen.....	107
9.3.4	Zellkulturmethoden.....	108
9.3.4.1	Auftauen von Zellen	108
9.3.4.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	108
9.3.4.3	Anzucht von humanen primären Melanozyten	108
9.3.4.4	Einfrieren von Zellen	109
9.3.4.5	Stabile und transiente Transfektion von Zellen	109
9.3.4.6	Invasionsassay (Boydenkammer)	109
9.3.4.7	Migrationsassay (Boydenkammer).....	110
9.3.4.8	Scratchassay (Wundheilungsassay)	111
9.3.4.9	Attachmentassay.....	111
9.3.4.10	Extravasationsassay	111
9.3.4.11	Kollagenkontraktion	112
9.3.4.12	Luciferase Reportergen Assay	112
9.3.4.13	Anchorage-Independent Growth Assay	113
9.3.4.14	Statistische Auswertung	113
10	Abkürzungsverzeichnis.....	114
11	Abbildungsverzeichnis.....	115
12	Publikationsverzeichnis	118
13	Literaturverzeichnis	119
14	Danksagung.....	127

2 Zusammenfassung

Diese Promotionsarbeit besteht aus zwei voneinander unabhängigen Themen und wurde deshalb in zwei Teile gegliedert. Der erste Teil beschreibt die Charakterisierung von zwei neuen Molekülen, die am Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Signalweg beteiligt sind, der zweite Teil befasst sich mit dem Molekül TANGO und dessen Beteiligung an der Krebsentstehung und Funktion bei der Migration von Blutzellen.

Im Teil I wird die Identifizierung, Expression und die funktionelle Rolle von zwei bislang unentdeckten Proteinen, die der Ski Familie zuzuordnen sind, beschrieben. Auf Grund ihrer Funktion und chromosomal Lokalisation haben wir ihnen die Namen Fussel-15 (**F**unctional **s**mad **m**odifying **s**uppressing **e**lement on **c**hromosome **15**) und Fussel-18 (**F**unctional **s**mad **m**odifying **s**uppressing **e**lement on **c**hromosome **18**) zugeteilt. Wir konnten zeigen, dass diese neuen Proteine, wie es bereits für die Ko-Repressoren des TGF- β Signalwegs, Ski und Sno, bekannt war, inhibitorische Eigenschaften auf Signaltransduktionen besitzen. Es hat sich herausgestellt, dass Fussel-18 den Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Signalweg und Fussel-15 den Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signalweg negativ beeinflussen können. Diese inhibitorische Wirkung auf die Signalwege der TGF- β Superfamilie läuft über eine Bindung an bestimmte Smad Moleküle ab, wodurch die Transkription definierter Zielgene beeinflusst werden kann. Die Ko-Repressoren Ski und Sno werden in verschiedenen Tumoren unter anderem auch im malignen Melanom fehlreguliert und so hofften wir mit Fussel-15 und Fussel-18 auf zwei neue Kandidatengene der Melanomentstehung. Da die TGF- β Superfamilie neben tumorbiologischen Prozessen an vielen anderen Vorgängen u.a. bei Entwicklungsprozessen, neuro-physiologischen oder neuro-pathologischen Prozessen beteiligt ist, sollte ein ausgedehntes Expressions-Screening zeigen, ob Fussel-15 und Fussel-18 möglicherweise auch anderweitig eine Rolle spielen könnten. Dabei stellte sich heraus, dass diese zwei neuen Proteine ein ganz spezifisches Expressionsmuster hauptsächlich in neuronalen Strukturen des Kleinhirns und Rückenmarks aufzeigten. Für Fussel-15 ließ sich zudem eine Expression in Fibroblasten der frühen Wundheilung und eine Fehlregulation dieses Proteins in Krankheiten mit überschießender Matrixproduktion, wie es bei Keloid und zirkumskripter Sklerodermie der Fall ist, feststellen. Diese Ergebnisse werden im Ergebnis Teil I beschrieben und wurden zum Großteil bereits veröffentlicht.

Im Teil II wird ein MIA homologes Protein mit dem Namen TANGO untersucht. TANGO wurde bereits in der Arbeitsgruppe als Gen mit sehr breitem Expressionsspektrum beschrieben. Es wird in allen Geweben exprimiert mit Ausnahme von Zellen des Blutsystems. Meine Aufgabe war es, die Rolle dieses Gens im Hinblick auf Funktion und

Regulation genauer zu erforschen. Dabei zeigte sich, dass dieses Molekül als Tumorsuppressor wirkt und in Tumoren, die besonders weit fortgeschritten waren, bzw. in Metastasen, nicht mehr exprimiert wird. In frühen Erkrankungsstadien und in Kontrollgeweben war TANGO jedoch detektierbar. In Zellkulturexperimenten konnten wir zeigen, dass die Konzentration von TANGO die Ausbreitungstendenz und damit die Streuung der Krebszellen beeinflusst. Tumoren, in denen das Suppressorgen aktiviert ist, neigen weniger stark zur Metastasenbildung. Des Weiteren konnten wir an anderen besonders bösartigen Tumoren, wie dem Kolon- und dem hepatozellulären Karzinom in Zellkulturexperimenten zeigen, dass durch die Zugabe von rekombinantem TANGO die Migrationsfähigkeit dieser Tumorzellen reduziert werden kann.

Um die Funktion dieses Moleküls auch in normalen, nicht tumorösen, Zellen zu analysieren, haben wir uns auf Zellen des Blutsystems spezialisiert, die die einzigen Zellen sind, welche per se kein TANGO produzieren. Dabei zeigte sich, dass durch Adhäsion dieser Zellen, wie es z.B. beim Einwanderungsprozess von Monozyten ins Gewebe der Fall ist, TANGO induziert wird. Zusätzlich konnten wir in *in vitro* Versuchen zeigen, dass TANGO mit dem leukozytenspezifischen Integritin CD11c interagiert, den Kontakt zur Matrix reduziert und somit die Transmigration von Blutzellen beschleunigt werden kann.

Die Ergebnisse, welche zu diesem Thema im Rahmen meiner Promotion entstanden sind, werden im Ergebnis Teil II beschrieben und wurden bereits ebenfalls veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Zusammenfassend konnte im Hinblick auf Expression, Funktion und Regulation zu den Proteinen beider Themen ein entscheidender Beitrag geleistet werden, der viele neue Fragestellungen und Therapiemöglichkeiten eröffnet.

Teil I

3 Einleitung Teil I

3.1 Die Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Superfamilie

Der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) gehört zu einer Familie von 40 strukturell ähnlichen Polypeptidwachstumsfaktoren, zu denen TGF- β , Activin, Inhibin, Nodal, Myostatin, Bone Morphogenetic Proteine (BMP), Growth/Differentiation Factor (GDF) und anti-Müllerian Hormon (AMH) zählen (Miyazawa et al. 2002). Diese regulieren eine Vielfalt zellulärer Prozesse wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Motilität. Der Prototyp TGF- β kam zu seiner Bezeichnung, weil er als Faktor entdeckt wurde, der in Fibroblasten von Nagern einen transformierten Phänotyp erzeugte (Dennler et al. 2002). BMPs hingegen wurden ursprünglich als Zytokine entdeckt, die Knochen- und Knorpelgewebe *in vivo* induzieren können.

3.2 Signaltransduktion der TGF- β Superfamilie

3.2.1 Rezeptoren und Rezeptoraktivierung der TGF- β Superfamilie

Sämtliche Signale dieser Superfamilie werden über membranständige Glykoproteinrezeptoren (Typ I und Typ II) vermittelt, die beide über Serin/Threonin-Kinase-Aktivität verfügen und spezifisch für die verschiedenen Mitglieder der TGF- β Familie sind (Wrana et al. 1994; Heldin et al. 1997). Es kommt nur zu einer Aktivierung der Signalkaskade, wenn beide Rezeptoren sich durch die Überbrückung mit den Liganden TGF- β bzw. BMP oder anderen Molekülen dieser Superfamilie zu einem Komplex zusammenlagern. Hierbei binden diese Moleküle zunächst an den Typ II Rezeptor und fördern damit die Annäherung des Typ I Rezeptors. Zusätzlich verstärken Zelloberflächenproteine wie Betaglycan als Ko-Rezeptoren des Typ III die Bindung bestimmter Liganden der TGF- β Familie an den Rezeptor Typ I. Erst nach der Zusammenlagerung der Rezeptoren (Typ I und Typ II) wird die Kinaseaktivität des Typ I Rezeptors angeschaltet, um intrazellulär signalwegspezifische Smad Proteine zu phosphorylieren (Qin et al. 2002). Über diese Smad Proteine werden TGF- β bzw. BMP vermittelte Signale letztlich bis in den Zellkern an entsprechende Zielgene übertragen. SARA (Smad anchor for receptor activation) dient dabei als Anker Protein und vermittelt die Annäherung der Rezeptor Smad Moleküle (R-Smads) an den Typ I Rezeptor. Folgende Übersicht vermittelt den Rezeptoraktivierungsprozess.

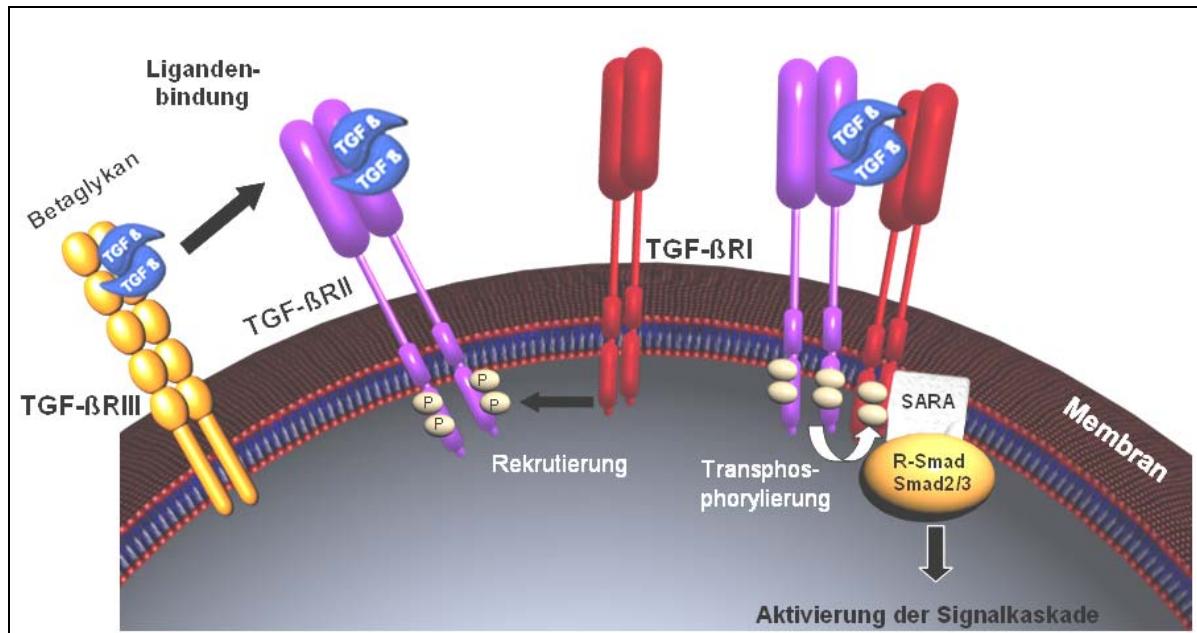


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Ligandenbindung und der Rezeptoraktivierung am Beispiel des TGF- β Signalwegs. Hilfsrezeptoren wie Betaglykan präsentieren TGF- β der TGF- β RII Untereinheit. Nach Ligandenbindung wird die TGF- β RI Untereinheit in einen Komplex mit TGF- β RII rekrutiert. Nachdem beide Rezeptortypen mit dem Liganden interagiert haben, wird das TGF- β RI Homodimer von dem TGF- β RII Homodimer transphosphoryliert. Der somit aktivierte Typ I Rezeptor ist nun in der Lage die Signalkaskade durch Phosphorylierung von R-Smads zu aktivieren. SARA dient dabei als Ankerprotein und transportiert R-Smads in die Nähe der TGF- β RI Untereinheit.

Es wird bereits bei der Ligand-Rezeptor-Interaktion vorgegeben, wie und in welchem Ausmaße die Aktivierung der Signalkaskade stattfinden soll. Durch unterschiedliche Rezeptoren, Rezeptorkombinationen und Rezeptorzusammenstellungen, sowie durch verschiedene Bindungsaffinitäten von Ligand-Rezeptor-Komplexen kann die Signalweiterleitung moduliert werden. Bei Säugetieren sind fünf Typ II (TGF- β RII, ActRII, ActRII-B, BMPRII und AMHRII) und sieben Typ I Rezeptoren (Activin receptor-like kinase Alk1-7) bekannt, die wahlweise miteinander interagieren können. Im Fall der TGF- β Liganden kennt man nur zwei Rezeptorpaare zur Signalübertragung (TGF- β RII und Alk-5 (TGF- β RI) bzw. TGF- β RII und Alk-1). ALK-1 wird speziell in Endothelzellen exprimiert und dient dort als Typ I Rezeptor für TGF- β . Für die Signalübertragung der BMP Liganden stehen vier Typ II Rezeptoren (BMPRII, ActRII, ActRII-B und AMHRII), sowie drei Typ I Rezeptoren (Alk-3, Alk-6 (BMPRI-A, BMPRI-B) und Alk-2) zur Verfügung (Attisano et al. 1992; Rosenzweig et al. 1995; ten et al. 1994; Kawabata et al. 1995). BMP 6 und 7 vermitteln ihre Signale unter anderem über einen spezifischen Typ I Rezeptor (Alk-2) (Aoki et al. 2001). Die BMP-homologen Drosophila-Liganden dpp (decapentaplegic) und gbb (glass bottom boat) besitzen neben zwei Typ II Rezeptoren (punt, wishful thinking) drei verschiedene Typ I Rezeptoren, thick veins (tkv), baboon (babo) und saxophone (sax) (Penton et al. 1994; Brummel et al. 1994). Weiterhin existiert im humanen System ein Typ II Rezeptor für AMH (anti-Müllerian-Hormone), AMHRII, an welchen auch BMPs binden können (di et al. 1994).

Activin Typ II und Typ IIB Rezeptoren (ActRII und ActRIIB) sind spezielle Rezeptoren für Activin. Es können jedoch auch Nodal und BMP Liganden daran binden. Der Typ I Rezeptor ALK-4 bindet Activin und Nodal, wohingegen ALK-7 nur Nodal binden kann (Reissmann et al. 2001). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die bekannten Rezeptor-Typen der TGF- β Superfamilie und die Liganden, die an diese Rezeptoren binden können.

Typ II Rezeptor	Ligand	Typ I Rezeptor
TGF- β RII	TGF- β (1-3)	Alk-5 (TGF- β RI) Alk-1 (TGF- β RI in Endothelzellen)
BMPRII ActRII ActRII-B AMHRII	BMP (2-15)	Alk-3 (BMPRI-A) Alk-6 (BMPRI-B)
ActRII ActRII-B	BMP (6/7)	Alk-2 (ActRI-A) Alk-3 (BMPRI-A)
ActRII ActRII-B	Nodal	Alk-7 Alk-4
punt (<i>Drosophila</i>) wishful thinking (<i>Drosophila</i>)	Dpp (<i>Drosophila</i>) Gbb (<i>Drosophila</i>) Activin (<i>Drosophila</i>)	tkv (<i>Drosophila</i>) sax (<i>Drosophila</i>) baboon (<i>Drosophila</i>)
AMHRII	AMH	
ActRII ActRII-B	Activine	Alk-4 (ActRI-B)

Tabelle 1 Liganden der TGF- β Superfamilie und ihre bindenden Rezeptoren. Durch verschiedene Kombinationen der Rezeptoruntereinheiten ergeben sich zahlreiche mögliche Rezeptorkomplexe, die für unterschiedliche Signalweiterleitungen sorgen. Mit aufgenommen wurden die Liganden und Rezeptoren von *Drosophila* (modifiziert nach (Derynck und Zhang 2003)).

3.2.2 Intrazelluläre Signalweiterleitung durch Smad Proteine

Der Name der Smad-Proteine leitet sich von den sie kodierenden Genen ab, die in genetischen Studien an *Drosophila* und *C. elegans* erstmals identifiziert wurden (Sekelsky et al. 1995; Derynck und Zhang 1996). Das *Drosophila* Gen wird als Mad (Mother against decapentaplegic), das Gen in *C. elegans* als Sma (Small body size) bezeichnet. Die Kombination dieser beiden Bezeichnungen bildet den Namen „Smad“. Diese Smad-Proteine leiten die Signale vom Serin/Threonin Rezeptor bis in den Kern weiter (Heldin et al. 1997; Moustakas et al. 2001). Strukturell und funktionell unterscheidet man drei Unterfamilien der Smad Proteine, denen allen eine ähnliche, stark konservierte Grundsequenz zu eigen ist. Folgender phylogenetische Stammbaum stellt das Verwandtschaftsverhältnis der Smad Moleküle dar. Zudem sind in der Abbildung die homologen Smad Moleküle von *Drosophila* (Mad, Medea und Dad) und *C. elegans* (Smad-4) dargestellt, um das enge Verwandtschaftsverhältnis dieser mit den humanen Smads aufzuzeigen.

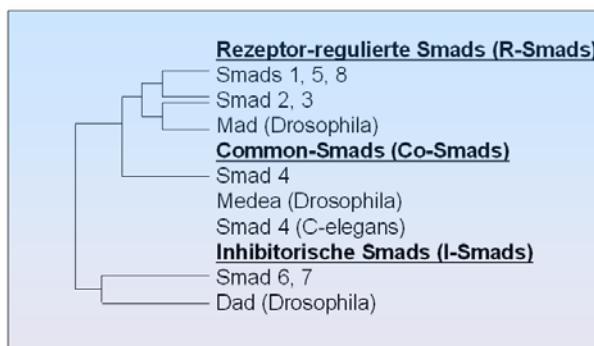


Abbildung 2 Verwandtschaftsverhältnis der humanen R- Co- und I-Smad Moleküle inklusive der homologen Smad Moleküle in *Drosophila* und *C.elegans* (modifiziert nach (Massagué 2000)).

Die Rezeptor-regulierten Smad-Proteine (R-Smads, Smad 1, 2, 3, 5 und 8) interagieren direkt mit dem durch die zuvor beschriebenen Mechanismen aktvierten Typ I Rezeptor. Smad 2 und Smad 3 zählen dabei zu den TGF- β aktvierten R-Smad Molekülen und Smad 1, 5 und 8 zu denen, die durch BMP Liganden aktviert werden. Erst nach Phosphorylierung durch den Rezeptor können die R-Smads die zytoplasmatischen kooperativen Smad Proteine (Co-Smads, Smad 4) binden, die letztendlich der Anlagerung des Smad Komplexes an DNA Promotoren und der Transkriptionsaktivierung dienen. Bei Säugetieren ist bis heute nur Smad 4 als einziges Co-Smad Molekül bekannt, welches ursprünglich als Produkt des Tumor Supressor Gens DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma, locus 4) isoliert wurde. Die dritte Smad Gruppe bilden die inhibitorischen Smad Proteine, zu diesen Smad 6 und Smad 7 zählen. Smad 6 inhibiert hauptsächlich BMP Signalwege, wobei Smad 7 sowohl die TGF- β , Activin als auch die BMP vermittelte Signalweiterleitung verhindern kann. Folgende Abbildung zeigt die Signalweiterleitung vom Rezeptor über signalwegspezifische Smad Moleküle.

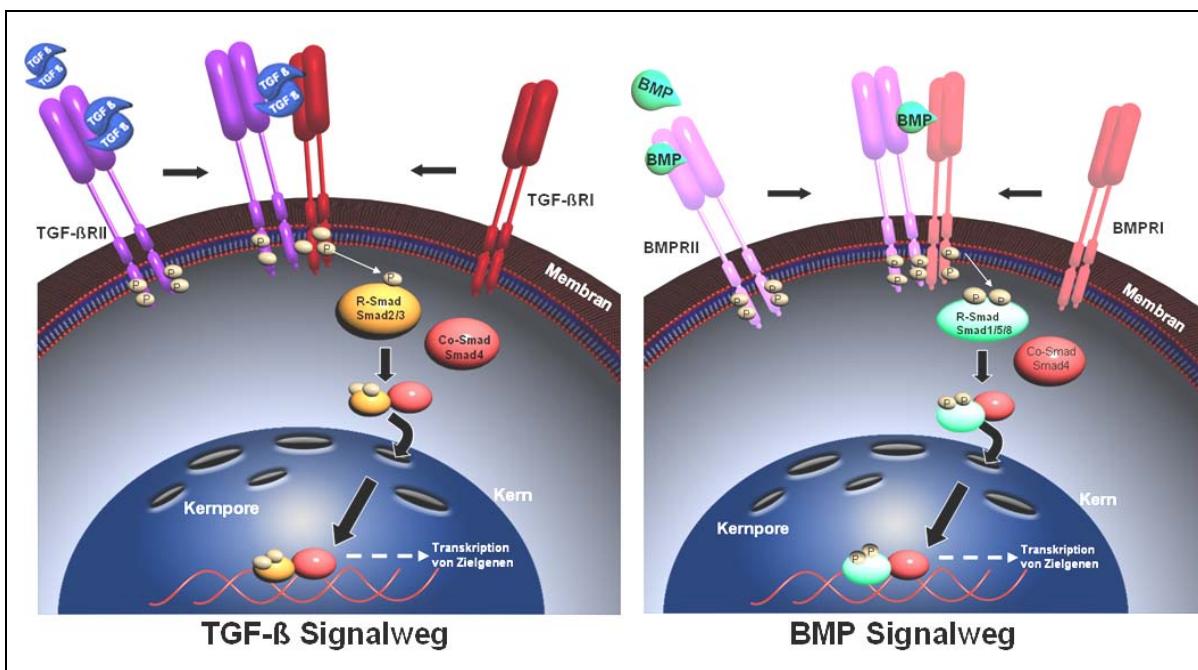


Abbildung 3 TGF- β bzw. BMP Liganden binden an den Rezeptor Typ II (TGF- β RII bzw. BMP-RII), der den Typ I Rezeptor (TGF- β RI bzw. BMP-RI) aktiviert. Der aktivierte Rezeptor phosphoryliert

Rezeptor regulierte Smads (R-Smads: Smad2, 3 bzw. Smad1, 5, 8), die Komplexe mit Smad4 (Co-Smad) bilden. Dieser aktivierte Komplex wandert in den Kern und aktiviert die Transkription von TGF- β bzw. BMP Zielgenen (modifiziert nach (Attisano und Wrana 2002)).

Alle Smad Proteine besitzen konservierte MH-Domänen (Mad homologe Domänen), die für verschiedene Smad Funktionen wichtig sind. Eine sogenannte MH1-Domäne mit DNA-Bindungsstelle liegt bei den R-Smads und Co-Smads am N-Terminus. Die C-terminale MH2-Region existiert bei allen Smads und vermittelt die Fähigkeit, an Rezeptoren zu binden, Oligomere zu formen, mit Ko-Faktoren zu interagieren und die Transkription zu beeinflussen. Solange der TGF- β Signalweg ausgeschaltet ist, interagieren die MH1- und MH2-Domänen eines Smad Proteins miteinander und halten es so in einem inaktiven Zustand. Verknüpft werden die MH1- und MH2-Domänen jeweils durch eine prolinreiche aber nicht konservierte Linkerregion, die viele regulatorische Stellen wie z. B. Erkennungssequenzen für Ubiquitinligasen und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen enthält (Attisano und Wrana 1998; Massague 2000; Derynck und Zhang 2003). Ein schematischer Aufbau der Smad Proteine mit konservierter MH1-, MH2-Domäne und der nicht konservierten Linker Region und ihre Funktionen sind in folgender Abbildung dargestellt.

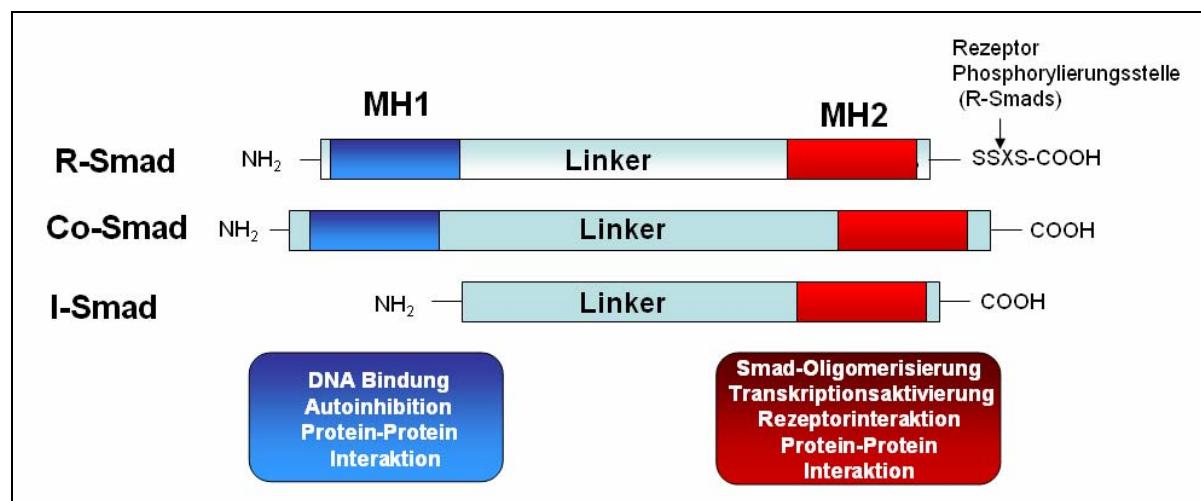


Abbildung 4 Schematischer Aufbau der Smad Proteine mit der konservierten MH1 und MH2 Domäne und der nicht konservierten Linker Region (modifiziert nach (Wrana 2000)).

Der aktivierte TGF- β R I rekrutiert wahlweise die R-Smads, Smad 2 oder Smad 3 und phosphoryliert die beiden letzten Serinreste ihrer am äußersten C-Terminus gelegenen SSXS-Sequenz. Dies induziert eine Konformationsänderung der Proteine, so dass ihre autoinhibitorische MH1-MH2-Domänen-Interaktion aufgehoben wird, wodurch die Smads vom Rezeptor abdissoziieren und oligomere Komplexe mit dem Co-Smad 4 bilden. Es ist noch nicht vollständig erforscht, ob es sich dabei um die Bildung von hetero-trimären oder hetero-dimären Smad Komplexen handelt. Qin et al., vermuten die Bildung eines hetero-trimären Smad Komplexes aus einem Co-Smad (Smad4) Molekül und zwei R-Smad

Molekülen, die dann in den Kern translozieren (Qin et al. 2002; Rich et al. 2001). Da alle über den TGF- β Signalweg aktivierten Smads mit ihrer MH1-Domäne die Nukleotidsequenz CAGAC erkennen und diese nur mit geringer Affinität binden, ist die Interaktion der Smad-Komplexe mit der DNA per se nicht sonderlich selektiv und stabil (Shi et al. 1998). Deshalb rekrutieren die Smad-Komplexe DNA-bindende Ko-Faktoren, mit deren Hilfe sowohl die Affinität zur DNA als auch die Spezifität der Erkennung regulatorischer Elemente in Zielgenen gesteigert werden. Zu diesen Ko-Faktoren gehören u.a. die als reine Adapter fungierenden Proteine FAST (forkhead activin signal transducer) und Mixer sowie verschiedene andere als Transkriptionsfaktoren bekannte Proteine wie z.B. AP-1/Jun-Fos oder TFE3 (transkription factor E3) (Massague und Chen 2000). Neben diesen Ko-Faktoren assoziieren die R/Co-Smad-Komplexe auch noch mit transkriptionellen Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren. Zu den bekannten Transkriptionsaktivatoren gehört CBP/p300 (CREB-binding protein, CREB steht für cyclic AMP-regulated enhancer-binding protein). Die Ko-Repressoren schließen u.a. TGIF (TG3-interacting factor), c-ski (Sloan-Kettering proto-oncogene) und SnoN (Ski-related novel gene N) ein (Wotton et al. 1999). Im Rahmen meiner Untersuchungen konnten wir zwei weitere Ko-Repressoren, Fussel-15 und Fussel-18 (Functional smad suppressing element on chromosome 15/18) identifizieren, die später genauer beschrieben werden. Je nachdem welche Ko-Faktoren, Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren in einer Zelle vorliegen, kann die durch TGF- β hervorgerufene Genantwort in Abhängigkeit von Zellkontext und Zelltyp sehr unterschiedlich ausfallen. Die nachfolgende Tabelle 2 gibt einen Überblick über bekannte Ko-Faktoren, Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren und deren Einfluss auf die Signalwege der TGF- β Superfamilie.

Name	Smad Bindung	Interaktionsdomäne	Funktion	Referenz
APC (anaphase promoting protein)	Smad 2, 3	MH2	Ubiquitin Ligase	Stroschein et al., 2001
ATF-2	Smad 3, 4	MH1	Transkriptions- Aktivator	Sano et al., 1999
BRCA2	Smad 2, 3	MH1, 2	Tumor-Suppressor	Preobrazhenska et al., 2002
Dab2	Smad 2, 3	MH2	Signalmolekül (Zytosol)	Hocevar et al., 2001
Evi-1	Smad 3	MH2	Co-Repressor (rekruiniert HDAC)	Kurokawa et al., 1998)
FAST 1	Smad 2, 3	MH2	Transkriptions-Aktivator	Chen et al., 1997
Fussel-18	Smad 2, 3	MH2	Co-Repressor	Arndt et al., 2005
Fussel-15	Smad 1, 2, 3	MH2	Co-Repressor	Arndt et al., 2007
Hoxc-8	Smad 4, 6	MH2	Transkriptions-Repressor	Shi et al., 1999
Jab1	Smad 4	MH2, Linker	Co-Aktivator für AP-1	Wan et al., 2002
c-Jun	Smad 2, 3	MH1	Transkriptions-Aktivator	Zhang et al., 1998
Mixer	Smad 2	MH2	Transkriptionsaktivator	Germain et al., 2000
c-Myc	Smad 2, 3	MH2	Transkriptions-Aktivator	Feng et al., 2002
OAZ	Smad 1	MH2	DNA-Bindeprotein	Hata et al., 2002
P300/CBP	Smad 2, 3	MH2	Co-Aktivator	Feng et al., 1998
SARA	Smad 2, 3	MH2	Adapter-Protein	Tsukazaki et al., 1998
c-Ski	Smad 2, 3, 4 (schwach mit Smad 1, 5)	MH2	Co-Repressor (rekruiniert HDAC)	Akiyoshi et al., 1999
SnoN	Smad 2, 3, 4	MH2	Co-Repressor (rekruiniert HDAC)	Stroschein et al., 1999
Smurf 1	Smad 1, 5, 6, 7	Linker	Ubiquitin Ligase	Zhu et al., 1999
Smurf 2	Smad 1, 2, 3	Linker	Ubiquitin Ligase	Lin et al., 2000
TFE3	Smad 3, 4	MH1	Transkriptions-Aktivator	Hua et al., 1999
TGIF	Smad 2, 3 (schwach mit Smad 1)	undefiniert	Co-Repressor	Wotton et al., 1999
TRAP-1	Smad 4	MH1	TGF- β RI-assoziiertes Protein	Wurthner et al., 2001

Tabelle 2 Übersicht über ausgewählte Smad interagierende Proteine, deren Bindung an die Smad Domäne, inklusive Funktion. Mit dargestellt wurden Fussel-15 und Fussel-18, zwei Ko-Repressoren, deren Charakterisierung Teil meiner Promotion darstellt (modifiziert nach (Miyazawa et al. 2002)).

3.2.3 Regulation der TGF- β vermittelten Signaltransduktion

Auf Grund der zentralen Stellung der Smad Proteine bei der TGF- β Signaltransduktion ist es nicht verwunderlich, dass ihre Aktivität auf mehreren Stufen geregelt wird. Nachfolgend sollen einige dieser Regulationsmöglichkeiten beispielhaft vorgestellt werden. Eine wichtige Rolle spielen die I-Smads, welche die Signaltransduktion durch R- und Co-Smads unterbrechen können. Smad 7 vermittelt seine inhibierende Wirkung auf den TGF- β /Activin Signalweg hauptsächlich durch Interaktion mit dem aktivierte Typ I Rezeptor, wodurch eine Phosphorylierung von Smad 2 bzw. Smad 3 und somit deren Aktivierung verhindert wird (Nakao et al. 1997; Hayashi et al. 1997). Daneben kann es zu einer Interaktion von Smad 7 und Smurf 1 bzw. Smurf 2, zwei E3 Ubiquitinligasen kommen. Smad 7 wirkt dabei als Adapter für Smurf und bewirkt die Rekrutierung an die Typ I Rezeptoruntereinheit, worauf anschließend durch Smurf die Rezeptordegradation bewirkt wird (Kavsak et al. 2000; Ebisawa et al. 2001). Eine weitere Regulationsmöglichkeit erfolgt über die direkte Ubiquitinierung und Degradation von R-Smads durch Smurf1/2. So führt deren Aktivierung zu einer Degradation der Smads und/oder der aktivierte Typ-I-Rezeptoren (Zhu et al. 1999; Kavsak et al. 2000; Ebisawa et al. 2001).

Die inhibierende Wirkung von Smad 6 auf den BMP Signalweg erfolgt ebenfalls auf mehrere Arten. So ist Smad 6 in der Lage aktiviertes Smad 1 kompetitiv zu binden und somit die Ausbildung eines aktiven Smad 1/Smad 4-Komplexes zu verhindern (Hata et al. 1998a). Eine weitere Möglichkeit durch die Smad 6 den BMP Signalweg hemmt, erfolgt durch Bindung von Smad 6 an den aktivierte Typ I Rezeptor, wodurch eine weitere Aktivierung von R-Smads verhindert wird (Imamura et al. 1997). Während die R- und Co-Smads in den meisten Zellen kontinuierlich exprimiert vorliegen, ist die Expression der I-Smads streng geregelt. Sie ist u.a. durch extrazelluläre Faktoren beeinflussbar und kann z.B. auch durch TGF- β selbst induziert werden, womit ein autoinhibitorischer Rückkopplungsmechanismus ausgelöst wird (Massague und Chen 2000; Stopa et al. 2000). Folgende Übersicht zeigt, wie I-Smads auf den BMP bzw. TGF- β Signalweg einwirken können.

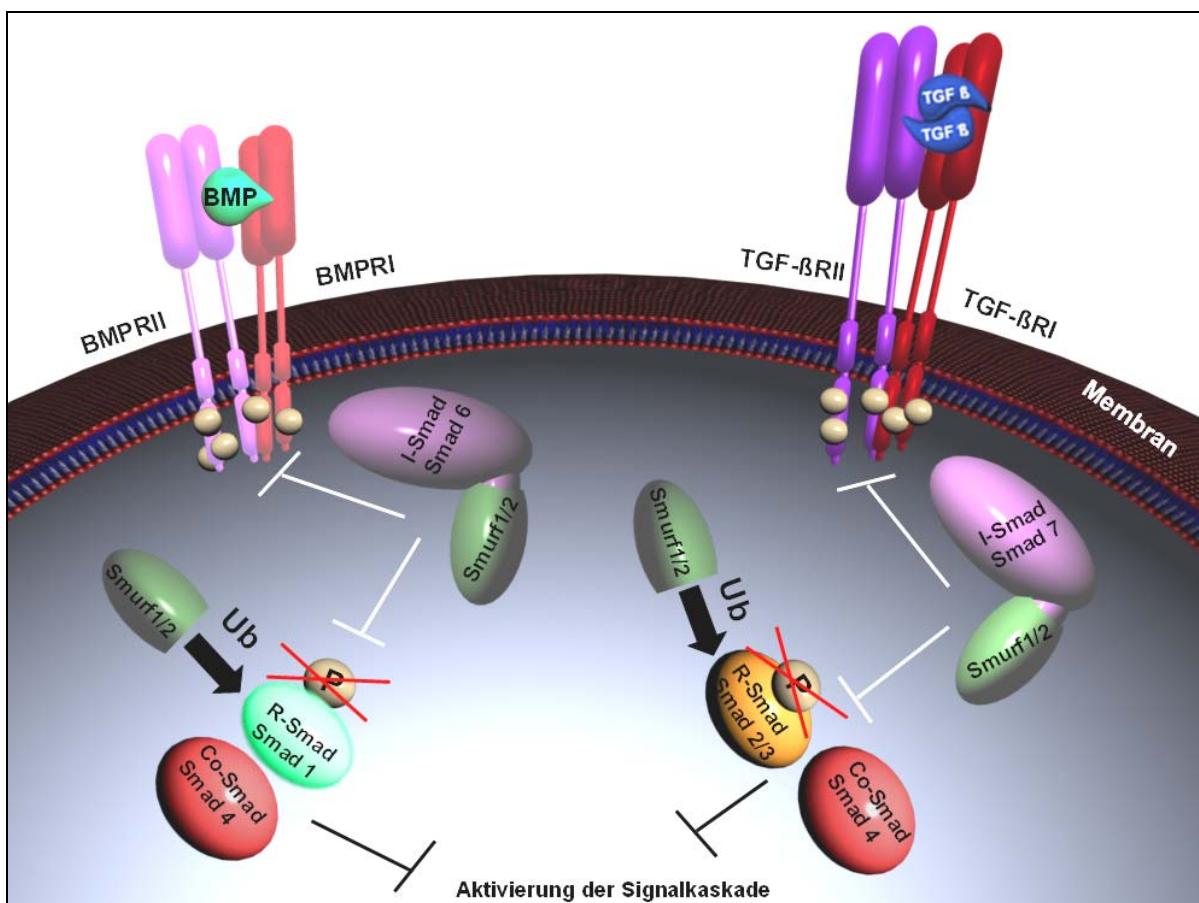


Abbildung 5 Inhibition der BMP bzw. der TGF- β Signalkaskade durch inhibierende Smad Moleküle (I-Smads). Smad 6 bzw. Smad 7 können dabei durch Bindung an den Rezeptor (BMPRI bzw. TGF- β RI) die Phosphorylierung von Smad 1 bzw. Smad 2/3 verhindern, zusammen mit Smurf 1/2 (E3 Ubiquitinligasen) die Degradation von BMPRI bzw. TGF- β RI bewirken oder durch direkte Bindung an R-Smads die Bindung von Co-Smads verhindern. Smurf 1/2 bewirkt kontinuierlich durch Bindung an R-Smads die Ubiquitinierung und Degradation von R-Smads.

Des Weiteren ist die Regulation der Smad Aktivität in ein komplexes Netz anderer Signalwege eingebettet, zu denen z.B. die MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) gehören. So verhindern MAP-Kinasen durch Phosphorylierung der Linkerregion der R-

Smads die Ausbildung des R-/Co-Smad Komplexes bzw. die Akkumulation dieses Komplexes im Zellkern (Kretzschmar et al. 1999; Funaba et al. 2002). Von Bedeutung ist ebenfalls die Regulation der vom R-/Co-Smad-Komplex rekrutierten Ko-Faktoren. So fungieren z.B. TFE3, ATF-2 oder p300 als Ko-Aktivatoren und TGIF, c-Ski und SnoN als Ko-Repressoren, deren Regulation wiederum Einfluss auf die Aktivierung der Zielgene hat.

Wie Ski und SnoN die TGF- β Signalkaskade regulieren können soll nun genauer beschrieben werden, da diese Moleküle im Rahmen meiner Dissertation eine Rolle spielen.

Ski wurde ursprünglich als das Produkt eines retroviralen Onkogens (*v-ski*) identifiziert, welches eine Transformation von Fibroblasten in Hühner Embryos hervorruft (Akiyoshi et al. 1999). Das zelluläre Gegenstück, c-Ski, und das verwandte **SnoN** (Ski-related novel gen) Protein haben die Funktion transkriptioneller Ko-Repressoren. Diese binden an den aktivierte Smad Komplex im Kern, rekrutieren zusätzlich den N-CoR (nuklear- Ko-Repressor), welcher direkt an mSin3A bindet. N-CoR/mSin3A interagiert mit HDAC (Histon Deacetylase), wodurch es zu einer Transkriptionsunterdrückung verschiedener Gene kommt (Liu et al. 2001; Stroschein et al. 1999). Die Interaktion von Smads mit Ski und SnoN wird unter basalen Bedingungen beobachtet und verschwindet während den ersten Stunden der TGF- β Stimulation. Der Abbau wird über eine TGF- β induzierte Degradation durch Proteasomen vermittelt (Liu et al. 2001). Eine Überexpression von Ski führt dazu, dass diese Zellen der Wachstumsinhibition durch TGF- β entkommen, da Ski durch seine Bindung die Konformation des aktiven Smad Komplexes zerstören kann und somit Zielgene wie das Tumorsuppressorgen p15 oder p21 an der Transkription verhindert werden (Poser und Bosserhoff 2004). Eine solche Überexpression von Ski wurde von Fumagalli et al., für das maligne Melanom gezeigt (Fumagalli et al. 1993). Studien in unserer Arbeitsgruppe zeigten ebenfalls, dass Ski und Sno an der Entstehung des Malignen Melanoms beteiligt sind (Poser et al. 2005).

Die folgende Abbildung zeigt in einer Gegenüberstellung den TGF- β Signalweg in normalen und in Ski-überexprimierenden Zellen.

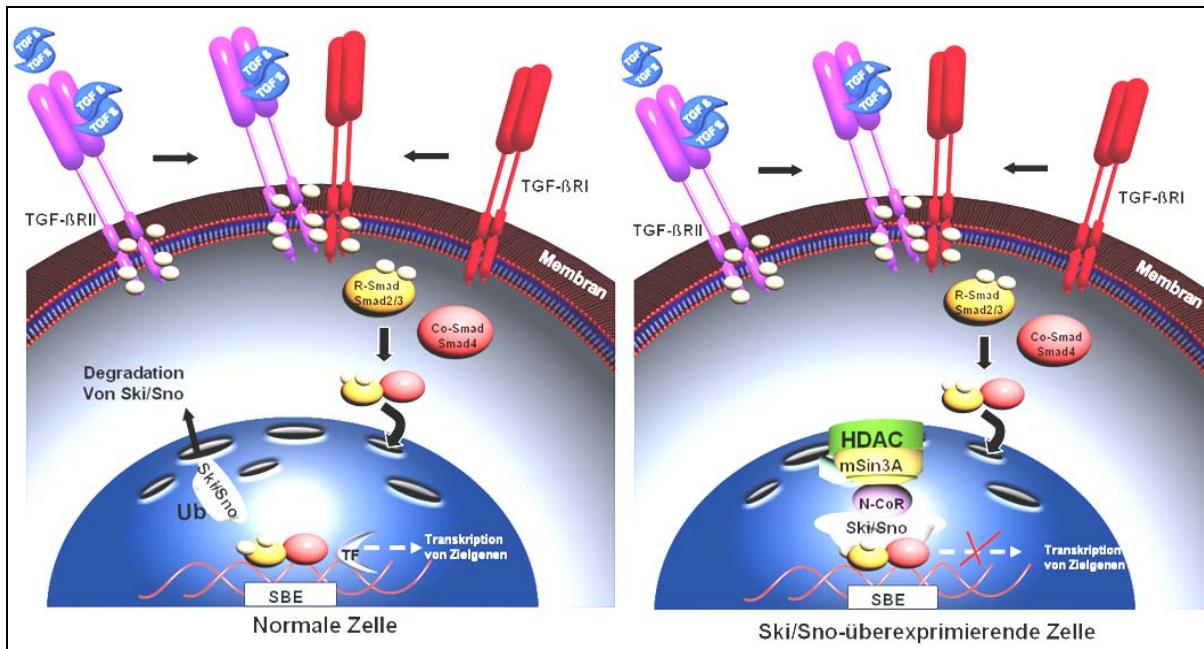


Abbildung 6 TGF- β Signalweg in normalen und in Sik/Sno-überexprimierenden Zellen. In normalen Zellen wird endogenes Sik/Sno in Antwort auf TGF- β ubiquitiniert und dem Proteasom zur Degradation zugänglich gemacht. In Zellen, die Sik bzw. Sno überexprimieren, kommt es zu überschüssigem Sik bzw. Sno, welches nicht vollständig abgebaut wird und in Folge an den aktivierte Smad Komplexe im Kern binden kann. Sik und Sno rekrutieren zudem den Transkriptions-inhibierenden-Komplex (N-CoR/mSin3A/HDAC), was sich in einer Inhibition von TGF- β induzierbaren Genen auswirkt.

3.3 Biologische Funktionen der TGF- β Superfamilie

TGF- β ist einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren mit Einfluss auf Proliferation, Differenzierung, Funktion und Apoptose von Zellen (Glick et al. 1993; Motyl et al. 1998; Guo und Kyprianou 1999). Die essentielle Rolle von TGF- β zeigte sich in Untersuchungen bei denen TGF- β bzw. Komponenten der TGF- β Signaltransduktion deletiert wurden. Tiere, bei denen das TGF- β 1 Gen deletiert wurde, zeigten embryonale Letalität bzw. starben spätestens 4 Wochen nach ihrer Geburt und wiesen in allen Organen eine massive Infiltration von Makrophagen und T-Zellen auf. Daneben konnten bei diesen Tieren nekrotische Veränderungen und Läsionen in allen Organen beobachtet werden (Kulkarni et al. 1993). Die Deletion des TGF- β Typ II Rezeptors, bzw. Deletionen von Smad 2 oder Smad 4 führten ebenfalls zu embryonaler Letalität (Weinstein et al. 1998; Sirard et al. 1998). Smad 5 Null Mutanten zeigten Defekte in der Angiogenese (Yang et al. 1999). Im Gegensatz dazu sind Smad 3 defiziente Mäuse überlebensfähig (Ashcroft et al. 1999; Zhu et al. 1998) und zeigen verschiedene Phänotypen, unter anderem Defekte in der Antwort von T-Zellen und eine beschleunigte Wundheilung (Ashcroft et al. 1999; Zhu et al. 1998; Yang et al. 1999). Veränderungen der TGF- β Expression im adulten Organismus werden mit zahlreichen Krankheitsbildern wie Arteriosklerose (McCaffrey 2000), Fibrosen (Bedossa et al. 1995; Bedossa et al. 1995), und autoimmunen Erkrankungen (Chen et al. 1999; Horwitz et al. 1999) in Verbindung gebracht. Im adulten Organismus spielt TGF- β und Activin auch eine

wichtige Rolle bei Vorgängen des Wundheilungsprozesses (Hubner et al. 1996) und kann mit dem Krankheitsbild von Keloid (überschießende Wundheilung) und systemischer Sklerose (Bindegewebsvermehrung) in Verbindung gebracht werden. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang auch die Entstehung und Entwicklung von Krebs. Veränderungen der TGF- β Expression und/oder Mutationen bei Komponenten des TGF- β Signalweges können in Krebszellen nicht nur zu einer Resistenz gegenüber der antiproliferativen Wirkung von TGF- β führen (Knaus et al. 1996; Hata et al. 1998b), sondern auch zu einer beschleunigten malignen Transformation (Bottinger et al. 1997) und einer Hemmung der Immunabwehr (Botti et al. 1998; Letterio und Roberts 1998; Ashcroft et al. 1999). Daneben beschleunigt TGF- β auch die Tumorangiogenese (Wikstrom et al. 1998; Breier et al. 2002) und die epidermale-mesenchymale Transition von Tumorzellen. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Funktionen der TGF- β Superfamilie.

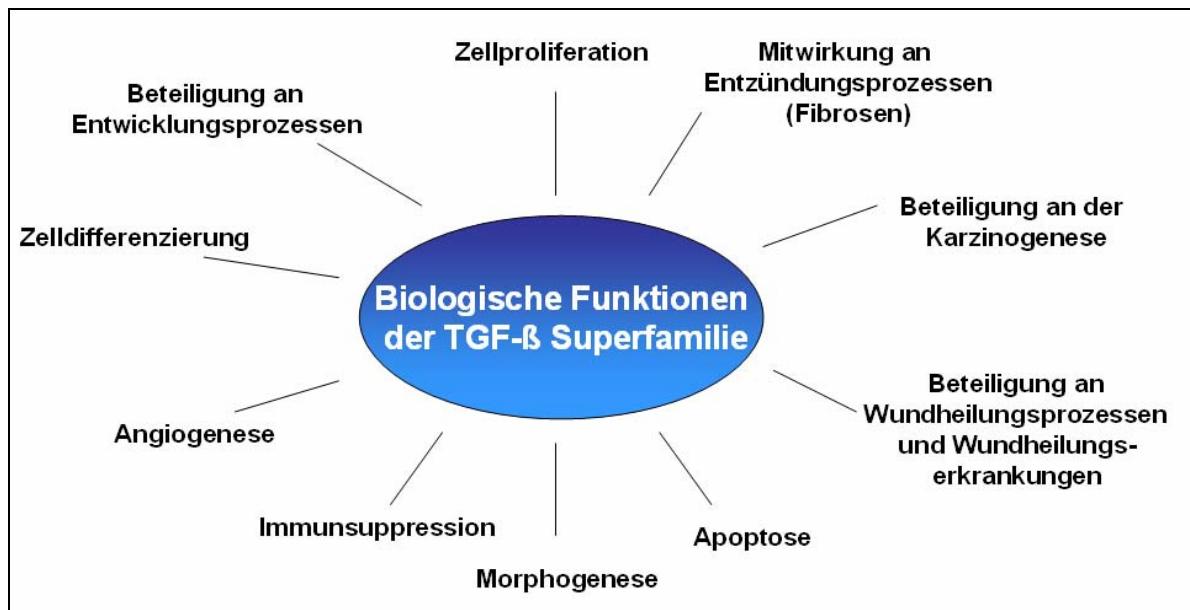


Abbildung 7 Allgemeine biologische Funktionen der TGF- β Superfamilie

3.4 Die Rolle von TGF- β /BMP in neuro-physiologischen Prozessen

Neben den gerade erwähnten biologischen Funktionen der TGF- β Familie, spielen Mitglieder von TGF- β auch verschiedene Rollen im Gehirn. Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist TGF- β 1 an der Entstehung vieler neurologischer Erkrankungen beteiligt und hat in den letzten Jahren als wichtiger Regulator von neurophysiologischen Prozessen deshalb große Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Dass TGF- β und seine Rezeptoren an Entwicklungsvorgängen des Nervensystems beteiligt sind, wird an TGF- β knockout Mäusen deutlich, welche schwere Schädigungen in der Kortikalentwicklung und verstärkten neuronalen Zelltod aufzeigen (Brionne et al. 2003). Es wird allgemein angenommen, dass TGF- β im Gehirn neuroprotektive und anti-apoptotische Funktionen übernimmt (Vivien und

Ali 2006). Kommt es jedoch in bestimmten Gehirnregionen zu einer Überexpression von TGF- β 1 und TGF- β 2 kann dies Schlaganfälle fördern (Wiessner et al. 1993; Krupinski et al. 1996). Auch bei der Entstehung von Alzheimer spielt TGF- β eine entscheidende Rolle. Etliche Daten zeigen, dass TGF- β im Plasma von Alzheimerpatienten abnimmt (De et al. 2002; Mocali et al. 2004), jedoch im Gehirn-Parenchym dieser Patienten ansteigt (Vivien und Ali 2006). Für die TGF- β Rezeptoren konnte ebenfalls ein Expressionsanstieg im Gehirn von Alzheimerpatienten nachgewiesen werden (Lippa et al. 1998; Flanders et al. 1998).

3.5 Die Beteiligung von TGF- β /BMP an Entwicklungsprozessen

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) wurden ursprünglich aus demineralisierten Knochenextrakten isoliert und konnten in Nagetieren die Bildung von ektopischem Knorpel und Knochen aus Bindegewebe hervorrufen (Chen et al. 2004). Die Wirkung der BMPs ist jedoch nicht auf osteoinduktive Prozesse beschränkt. Neben ihrer Beteiligung an der Musterbildung in der embryonalen Entwicklung und an Differenzierungsprozessen sind BMPs an der Entwicklung nahezu aller Organe involviert (Hogan 1996; Wozney 1998; Zhao 2003). In der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren und auch wirbellosen Tierarten kontrollieren BMPs fundamentale Prozesse in der frühen embryonalen Musterbildung und Organogenese. Insbesondere für die Determinierung der dorso-ventralen Körperachse sind diese Proteine von zentraler Bedeutung (Yamamoto und Oelgeschlager 2004). Viele Untersuchungen zur Rolle von TGF- β bzw. BMP in Entwicklungsprozessen wurden an den Modellorganismen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*, des Zebrafisches und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Genetische Studien an *Xenopus laevis*, haben gezeigt, dass BMPs für die Ausbildung bestimmter ventraler, mesodermaler (Blut, Nieren) und ektodermaler (Haut) Strukturen notwendig sind und gleichzeitig die Ausbildung anderer dorsaler, mesodermaler (Chorda, Muskelgewebe) und ektodermaler (zentrales Nervensystem) Strukturen hemmen. Zudem wurde die Funktion von Chordin und Noggin, zwei sezernierte BMP-Antagonisten in *Xenopus* identifiziert und charakterisiert (Smith und Harland 1992; Sasai et al. 1994; Piccolo et al. 1996). Chordin und Noggin binden direkt an BMP und hemmen dessen Interaktion mit BMP Rezeptoren (De Robertis 1995; Piccolo et al. 1996). Chordin und Noggin werden spezifisch in der dorsalen Urmundlippe, auch bekannt unter dem Namen Spemann-Organisator, exprimiert. Die lokale Sezernierung von BMP-Inhibitoren vom Spemann-Organisator etabliert im Embryo einen BMP-Aktivitätsgradienten, der die Determinierung embryonaler Grenzen entlang der zukünftigen dorso-ventralen Körperachse im Ektoderm wie auch im Mesoderm ermöglicht (Smith und Harland 1992; Sasai et al. 1994) (Abbildung 8).

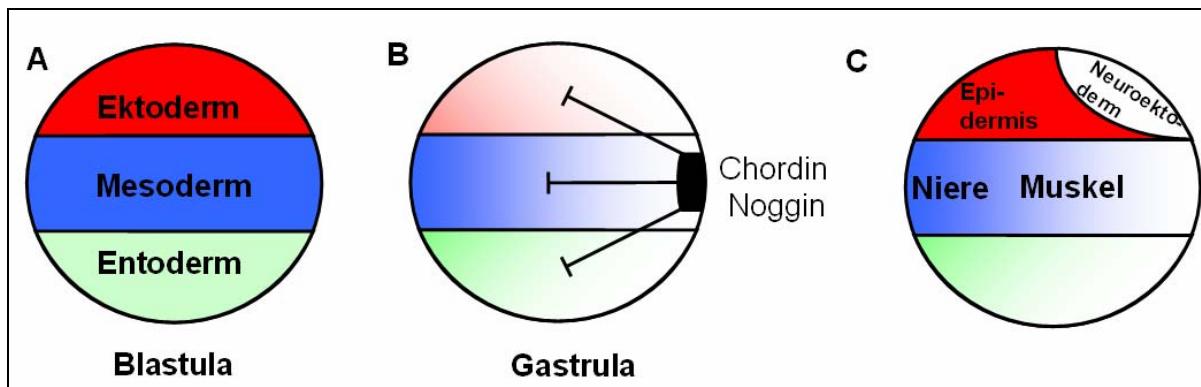


Abbildung 8 Der BMP Signalgradient und frühe embryonale Musterbildung. A, Im frühen *Xenopus* Embryo ist die BMP Aktivität in den zukünftigen drei Keimblättern gleichmäßig vorhanden. B, Durch die Expression von sezernierten BMP Antagonisten (Chordin, Noggin) im Spemann-Organisator wird ein BMP-Aktivitätsgradient entlang der zukünftigen dorso-ventralen Körperachse etabliert. Dieser ist durch Farbschattierungen schematisch dargestellt. C, Der BMP-Aktivitätsgradient führt zur Determinierung von dorsalem Ektoderm (Neuroektoderm) und Mesoderm (z.B. Muskelgewebe) bei niedriger BMP-Aktivität und zu ventralem Ektoderm (Epidermis) und Mesoderm (z.B. Nieren) bei hoher BMP-Aktivität (modifiziert nach (Yamamoto und Oelgeschlager 2004)).

Auch in Säugetieren spielen die Mitglieder der TGF- β Superfamilie eine entscheidende Rolle während Entwicklungsprozessen. So zeigen z.B. transgene Mäuse mit Mutationen in BMP 5 skeletale Abnormitäten auf, waren jedoch überlebensfähig, während eine vollständige Deletion von BMP 2 oder BMP 4 zum Absterben der Föten führte (Zhang und Bradley 1996; Selever et al. 2004). Für die normale Entwicklung von Augen und Nieren ist BMP 7 unerlässlich, wie in knockout Mäusen gefunden wurde. Diese Tiere wurden mit verkümmerten Augen, und Nierenfehlbildungen geboren und überlebten durch die schwer beeinträchtigte Nierenfunktion nur kurze Zeit. Studien zeigen sogar, dass BMP 7 vor Nierenschäden bedingt durch Diabetes, schützt (Wang et al. 2005). Mäuse mit einem vollkommenen Verlust der Smad 2 oder Smad 4 Funktion („loss of function“ Mutationen), zeigten Defekte bei der Induktion des Mesoderms und bei der Ausbildung der anterior-posterior Achse (Tremblay et al. 2000). Zusammengefasst sind eine Reihe von Molekülen der TGF- β Superfamilie als Vermittler von Differenzierungsvorgängen in verschiedenen Entwicklungsabschnitten zu finden, wo sie zentrale Rollen übernehmen.

3.6 Die Rolle von TGF- β in patho-physiologischen Prozessen

3.6.1 Die Rolle von TGF- β in der physiologischen Wundheilung

Die kutane Wundheilung wird durch ein komplexes Zusammenspiel von zellulären und extrazellulären Komponenten ermöglicht. In einem durch drei Phasen unterteilten Prozess entsteht zuerst eine physiologische Entzündung (Reinigungsphase), dann die Bildung von Granulationsgewebe (proliferative Phase) und schließlich die Kollagensynthese mit Narbenbildung und Gewebemodellierung (reparative Phase) (Slemp und Kirschner 2006). An

einer regelrechten Wundheilung ist ein breites Spektrum an Zytokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt. Ebenso vielfältig sind daher auch die Mediatoren, die an der Entstehung von Wundheilungserkrankungen beteiligt sein können. Eine Schlüsselrolle in der Wundheilung spielt die TGF- β Superfamilie (Massague und Weis-Garcia 1996). TGF- β existiert in der Haut in den 3 Isoformen TGF β -1, -2 und -3 mit jeweils unterschiedlichen Funktionen während der Wundheilung (Roberts 1998). TGF β -1 und -2 vermitteln Fibrose und Narbenbildung, während TGF β -3 die Bildung von Narben zu hemmen scheint (Shah et al. 1994). Fibroblasten wandern TGF- β -stimuliert in das Wundareal, proliferieren, bewirken die Wundrandkontraktion zum besseren Verschluss und sezernieren Matrixmoleküle wie Kollagen und Fibronectin zur Gewebsrekonstruktion (Bennett und Schultz 1993). Die Rolle von BMP Molekülen ist im Prozess der Wundheilung jedoch noch weitgehend ungeklärt, obwohl diesen eine wichtige Funktion in unterschiedlichen fibrosierenden Erkrankungen zugeschrieben wird (Zeisberg et al. 2003b).

Die genaue Aufklärung der physiologischen Bedeutung von TGF- β und BMP in der Wundheilung ist für die Entwicklung neuer spezifischer Arzneistoffe von Bedeutung. So könnten TGF-Agonisten bei hyperproliferativen Hauterkrankungen wie Psoriasis (Schuppenflechte) und TGF-Antagonisten bei der Wundheilung einsetzbar sein. Entsprechendes gilt für Wirkstoffe, die den TGF- β Stoffwechsel modifizieren oder den TGF- β Signalweg beeinflussen. Hierbei ist an Substanzen zu denken, die Rezeptoren stimulieren bzw. inhibieren, oder an solche, die Smad-Proteine modulieren. Die Vielzahl von Eingriffsmöglichkeiten auf den verschiedenen Stufen der Signalkaskade von TGF- β eröffnet vielversprechende Perspektiven bei der Suche nach neuen Wirkstoffen. Durch ein ausgedehntes Expressionsscreening von Fussel-15 und Fussel-18 im Rahmen meiner Untersuchungen, stellte sich heraus, dass Fussel-15 in der physiologischen Wundheilung und in Erkrankungen mit pathologisch vermehrter Bindegewebsneubildung eine Rolle spielen. Untersuchungen dazu werden im Ergebnisteil I beschrieben.

3.6.2 Die Rolle von TGF- β bei Erkrankungen mit vermehrter Bindegewebsneubildung

Es sind verschiedene Erkrankungen bekannt, bei denen Moleküle der TGF- β Superfamilie eine Rolle spielen. Im Folgenden wird das Krankheitsbild und die Rolle von TGF- β in zwei Erkrankungen mit pathologisch vermehrter Bindegewebsneubildung geschildert. Es handelt sich dabei um Keloid und zirkumskripte Sklerodermie, auf die ich näher eingehen möchte, da sich meine Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation mit diesen Erkrankungen beschäftigen.

Das **Keloid** ist ein durch überschießendes Wachstum von Fibroblasten und Matrixablagerungen entstehender, die Haut überragender gutartiger Tumor, der nach

Verletzungen, Operationen oder auch spontan auftreten kann und als ein gestörter Heilungsprozess im Sinne einer überschießenden Narbenbildung anzusehen ist (Abbildung 9). Im Gegensatz zur hypertrophen Narbe, bei der die überschießende Bindegewebsproliferation auf den Bereich des Traumas beschränkt bleibt, greifen Keloide über diesen Bereich hinaus. Eine Entfernung des Keloids ist klinisch problematisch. Oft kommt es nach der operativen Entfernung zu einer erneuten und sogar stärkeren Bildung des Keloids, daher wird vor allem die lokale medikamentöse Therapie mit Kortikosteroiden eingesetzt, deren Wirkung auf einer Reduzierung der Kollagenproduktion in den Fibroblasten beruht (Al-Attar et al. 2006).

Die Ursachen der Keloidbildung sind noch nicht komplett erforscht, eine genetische Disposition erscheint jedoch sicher. Einige Studien gaben Hinweise auf die Rolle der TGF- β Signaltransduktion in Keloid-Patienten (Slemp und Kirschner 2006; Tuan und Nicter 1998). Keloidfibroblasten exprimieren hohe Spiegel an TGF β -1 und TGF β -2 im Vergleich mit Fibroblasten aus normaler Haut. Hohe Spiegel an TGF- β mRNA und Protein in Keloiden sind mit der exzessiven Kollagensynthese und Matrixvermehrung assoziiert (Peltonen et al. 1991). Die TGF- β 3 Expression hingegen ist in normalen und Keloid-Fibroblasten gleich (Lee et al. 1999). Yu et al. zeigten eine verminderte Expression der inhibitorischen Smads (Smad 6 und Smad 7) in Keloid-Fibroblasten im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten (Yu et al. 2006).



Abbildung 9 Verschiedene Patienten mit Keloid zeigen typische wulstartige Wucherungen, die über den Narbenrand hinauswachsen (Abbildungen PD Dr. S. Karrer und dermis.net)

Bei der **Sklerodermie** handelt es sich auch um eine Erkrankung beruhend auf einer Bindegewebsvermehrung. Das Spektrum der Sklerodermie Erkrankungen wird von der progressiven systemischen und der zirkumskripten Sklerodermie gebildet. Während bei der progressiven systemischen Sklerodermie (PSS) auch ein Befall der inneren Organe eintritt, läuft die zirkumskripte Sklerodermie (ZS) ohne Beteiligung innerer Organe nur an der Haut ab (Abbildung 10). Es kommt hierbei zu einer Überproduktion von Kollagen durch aktivierte Fibroblasten, was zu einer bindegewebigen Verhärtung umschriebener Hautareale führt. Eine Heilung der Sklerodermie ist zur Zeit noch nicht möglich. Der Erkrankungsfortschritt kann mit zytostatischen und immunsuppressiven Medikamenten verlangsamt, manchmal

auch aufgehalten werden. Die Ursache der Sklerodermie ist nicht genau bekannt, bis heute sind genetische Faktoren und autoimmunologische Prozesse beschrieben worden. Auch hier wird vermutet, dass eine Fehlregulation des TGF- β Signalwegs ursächlich für die verstärkte Produktion von Kollagenen und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix sein könnte (Querfeld et al. 1999; Sonnyal et al. 2007; Pannu et al. 2006).



Abbildung 10 Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie (ZS) zeigen bindegewebige Verhärtungen umschriebener Hautareale, die zu erheblichen Funktionseinschränkungen führen können, wenn sie z.B. über Gelenken lokalisiert sind (Abbildungen PD. Dr. S. Karrer und dermis.net).

3.7 Die Rolle von TGF- β in tumor-biologischen Prozessen

3.7.1 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 Bildung von Tumoren inhibiert. In späteren Stadien geht diese suppressorische Wirkung jedoch häufig verloren, wodurch ein Fortschreiten des Tumorwachstums, die Einwanderung von tumorigen Zellen ins Gewebe und Metastasierung begünstigt werden (Engle et al. 1999). In einer Vielzahl von Tumoren kommt es zu einem Verlust der TGF- β vermittelten Wachstumsinhibition der Zellen (Massague et al. 2000). Dies kann sowohl auf einer Fehlregulation von Zellzyklus-Effektoren (cdk-Inhibitoren, cdks, Cycline, c-myc usw.) beruhen, wodurch eine Unterbrechung der Zellen in G_1 verhindert wird (Donovan und Slingerland 2000), als auch auf Mutationen in einzelnen Komponenten des TGF- β Signalweges. Häufige Ursache ist zudem eine Inaktivierung oder verstärkte Expression von Komponenten der TGF- β Signalkaskade. Durch Letzteres ist eine funktionierende TGF- β Signalübertragung nicht mehr möglich (Massague und Wotton 2000).

3.7.2 Defekte der TGF- β Signalkaskade während der Tumorigenese

Das Entwickeln einer Resistenz gegenüber TGF- β stellt ein Schlüsselereignis für das Fortschreiten der Tumorentstehung dar. Zellulärer Sensitivitätsverlust 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 entweder verstärkt oder inaktiviert vor oder sind ganz verloren gegangen. Verantwortlich hierfür sind z.B. Genmutationen, Repression oder Überexpression der Transkription und Auftreten von DNA-Methylierung an CG-reichen Regionen vornehmlich im Promotorbereich (Kim et al. 2000).

Untersuchungen zeigten, dass TGF- β in den frühen Phasen der Tumorentwicklung zur Tumorentstehung beiträgt, indem es seinen antiproliferativen Effekt überwiegend auf die Zellen des umgebenden Gewebes ausübt, weniger auf die Tumorzellen selbst. Dadurch wird die Tumorentstehung begünstigt (Akhurst und Balmain 1999). Tumorzellen weisen in fortgeschrittenen Stadien eine erhöhte Sekretion von TGF- β auf. Das in diesem Stadium tumoreigene Zytokin scheint den Zellen einen Selektionsvorteil zu verschaffen, indem es die Angiogenese induziert, ihnen hilft, die Immunabwehr zu umgehen und zusätzlich Invasion und Metastasierung erleichtert (Akhurst und Balmain 1999; Reiss 1999). Die wachstumshemmende Wirkung auf die umgebenden Zellen, die durch TGF- β beeinflussbar sind, fördert die weitere Selektion von malignen Zellen und damit die Progression des Tumors in Richtung entdifferenzierter Stadien.

Auch die veränderte Regulation von Ko-Repressoren wie Ski und SnoN spielen in der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle. Einerseits werden Ski und SnoN als Onkogene betrachtet, da eine Überexpression von c-Ski bzw. Sno zu einer onkogenen Transformation von Hühner-Embryo Fibroblasten führt (Colmenares und Stavnezer 1989), andererseits zeigten Studien von Shinagawa et al., dass Ski und SnoN in einigen Zelltypen auch als Tumorsuppressoren fungieren können (Shinagawa et al. 2000; Shinagawa et al. 2001). Eine Überexpression von Ski und SnoN konnte in vielen Tumor-Zelllinien vom Melanom, Brust-, Speiseröhren-, Lungen-, Prostata- sowie dem Magenkrebs nachgewiesen werden (Nomura et al. 1989; Fumagalli et al. 1993; Reed et al. 2001; Imoto et al. 2001; Zhang et al. 2003). Eine Fehllokalisierung von Ski sowie eine verstärkte Expression führt dabei zur malignen Transformation. Ski wird in normalen Hautzellen oder Zellen früher Tumorstadien hauptsächlich im Kern gefunden, wo es über Ubiquitinierungsprozesse dem Proteasom zum Abbau zugänglich gemacht wird. In fortgeschrittenen Melanomzellen konnte Ski jedoch verstärkt im Zytoplasma detektiert werden (Reed et al. 2001).

Der molekulare Mechanismus von Ski und Sno in der Tumorentstehung ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass Ski und SnoN verschiedene Aspekte von Zellwachstum bis hin zu Differenzierungsprozessen regulieren können. So führt z.B. eine Überexpression von Xski (Xenopus Ski) in Xenopus Embryonen zu einer zell-autonomen Induktion einer zweiten Neuralachse (Amaravadi et al. 1997), und bei Ski knockout Mäusen ließen sich diverse Defekte im zentralen Nervensystem und bei der Entwicklung der

Skelettmuskulatur beobachten (Berk et al. 1997). Abhängig von der Zelle und von der Aktivität anderer intrazellulärer Signalwege, können Ski und SnoN entweder die Transformation von Zellen fördern oder unterdrücken. In einer Studie, bei der es galt, die molekularen Mechanismen von Ski und SnoN im malignen Melanom zu untersuchen, gelang es zwei weitere Ski/SnoN homologe Proteine zu identifizieren, deren Expression und funktionelle Rolle im Rahmen meiner Untersuchungen nun beschrieben werden.

4 Ergebnisse Teil I

Ein Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe ist die Untersuchung von Expressions- und Regulationsmechanismen im malignen Melanom. Im Rahmen dieser Untersuchungen spielt auch die Aufklärung des TGF- β Signalwegs und damit assoziierter Moleküle eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Studien gelang es uns zwei neue Moleküle zu identifizieren, deren Expression, Regulation und Funktionsanalyse Aufgabe meiner Promotion darstellt und im folgenden Ergebnisteil I beschrieben wird.

4.1 Identifikation von zwei neuen Ski/Sno homologen Proteinen

Mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) konnten wir zwei neue Ski homologe Klone identifizieren. Diese kodieren für zwei unbekannte Proteine, denen wir auf Grund ihrer Funktion den Namen Fussel-15 und Fussel-18 (**Functional smad suppressing element on chromosome 15 bzw. 18**) zuschrieben. Die Zugangsnummern der Ski-, SnoN- und Fussel-Proteine können folgender Tabelle entnommen werden.

Gen	Spezies	Zugangsnummer (BLAST)
Ski	Mensch	NM003036
	Maus	NM011385
SnoN	Mensch	X15219
	Maus	U36203
Fussel-15	Mensch	AY669507
Fussel-18	Mensch	AY669508

Tabelle 3 Zugangsnummern im BLAST des NCBI von Ski, SnoN, Fussel-15 und Fussel-18.

Die Struktur der einzelnen Ski-Familienmitglieder zeigt die nachfolgende schematische Übersicht (Abbildung 11). Hervorgehoben wurde der homologe Bereich, bestehend aus einer Ski konservierten homologen Region und der sogenannten SAND Domäne. SAND steht für Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEA-F-1 und ist ein evolutionär konserviertes Sequenzmotif, welches in vielen Kernproteinen vorkommt. Diese SAND Domäne enthält eine Interaktionsschleife (I-loop), die für die Bindung an die DNA benötigt wird. Vier Aminosäuren-Reste, Cys₂ und His₂ bilden eine Zinkfingerstruktur, welche für die Stabilität des Proteins verantwortlich ist. Diese vier Aminosäuren-Reste sind zwischen allen Ski-Familienmitgliedern identisch, was Hinweis auf eine konservierte Funktion gibt (Wu et al. 2002). Ski, SnoN und

Fussel-15 besitzen am C-Terminus eine Dimerisierungsdomäne, welche bei Fussel-18 nicht gefunden werden konnte. Dadurch ist Fussel-18 mit 296 Aminosäuren (aa) auch deutlich kleiner als c-Ski mit 728, SnoN mit 684 und Fussel-15 mit 867 Aminosäuren.

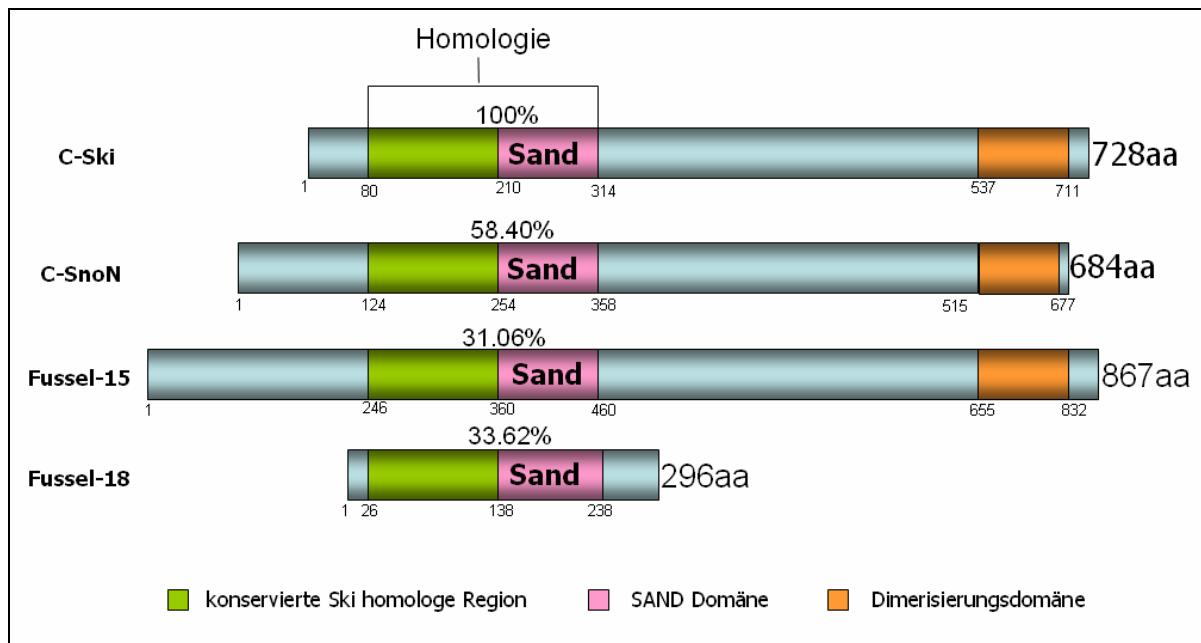


Abbildung 11 Strukturelle Organisation der Ski Familie. Darstellung wichtiger Regionen/Domänen, die bei c-ski, SnoN und Fussel-15/18 konserviert sind. Erläuterungen siehe Text.

Zusätzlich wurde ein „Homologie Baum“ auf Proteinsequenzebene angefertigt um Verwandtschaftsverhältnisse der Ski Familienmitglieder genauer darzustellen. Abbildung 12 zeigt einen Vergleich der Homologiedomäne von humanem Ski, SnoN, Fussel-15 und Fussel-18. Dabei stellte sich heraus, dass beide Fussel-Proteine in diesem Bereich zu 91% identisch sind, Ski und SnoN zu 58% Homologien aufwiesen und diese zu den Fussel-Proteinen eine Unterfamilie mit einer Homologie von 36% bilden.

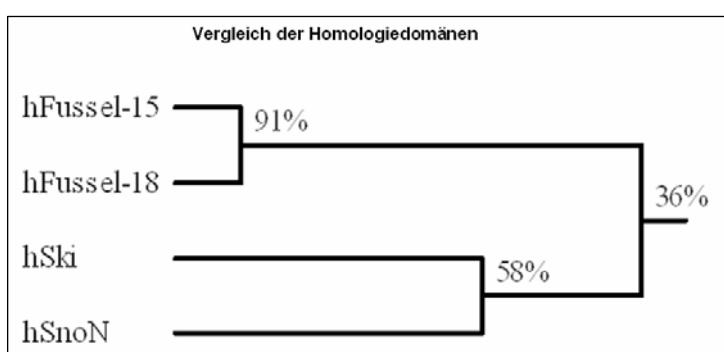


Abbildung 12
Vergleich der Homologiedomänen der humanen Ski Familienmitglieder zur Darstellung des Verwandtschaftsverhältnisses. Die Fussel-Proteine bilden dabei eine Unterfamilie mit 91% Homologie; die Ski/SnoN Proteine bilden eine weitere Unterfamilie mit 58% Homologie. Die beiden Unterfamilien sind zu 36% miteinander homolog.

4.2 Expression von Fussel-15 und Fussel-18

4.2.1 Expressionsnachweis in humanen Geweben

Expressionsstudien auf mRNA Ebene mit verschiedenen humanen Geweben zeigten, dass Fussel-15 nur im adulten Cerebellum (Kleinhirn) exprimiert wurde. Für Fussel-18 konnter man zusätzlich zu einer Expression im Cerebellum eine Expression im adulten Rückenmark und im Hoden feststellen (Abbildung 13). Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Im Gegensatz zu den homologen Genen Ski und Sno, welche in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden, und möglicherweise eine eher allgemeine Funktion besitzen, könnten Fussel-15 und Fussel-18 auf Grund ihrer spezifischen Expression an gezielten regulatorischen Funktionen beteiligt sein.

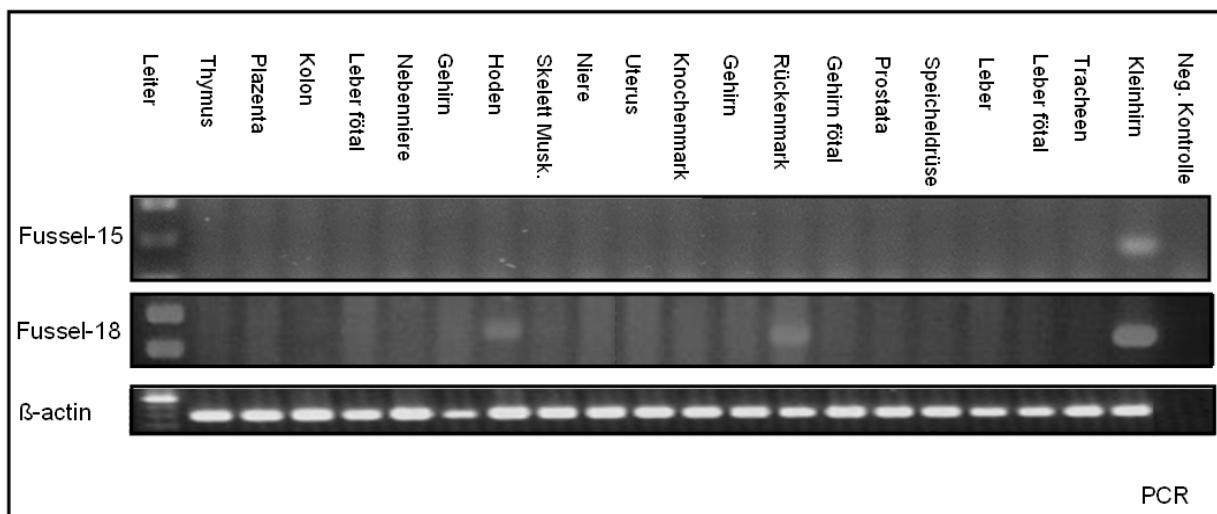


Abbildung 13 Die Expressionsanalyse von Fussel-15 und Fussel-18 an verschiedenen embryonalen und adulten humanen Geweben zeigte eine spezifische Expression von Fussel-15 und Fussel-18 im Kleinhirn. Für Fussel-18 ergab sich zudem eine Expression im Hoden und im Rückenmark.

4.2.2 Expressionsmuster in murinen Geweben

Um die spezifische Expression von Fussel-15 und Fussel-18 in menschlichen Geweben zu bestätigen und die Expression während der Vertebratenentwicklung und im adulten Organismus genauer zu analysieren, wurden zudem *in situ* Hybridisierungen an Maus Embryonen und adulten Mäusen angefertigt. Diese Versuche führte auf Grund langjähriger Erfahrung und Kompetenz auf diesem Gebiet PD Dr. Markus Moser (MPI, München) durch. Die spezifische neuronale Expression von Fussel-15 und Fussel-18 im Kleinhirn konnte durch whole mount *in situ* Hybridisierungen isolierter embryonaler Gehirne und durch radioaktive *in situ* Hybridisierungen an embryonalen Schnitten und an Gehirnschnittpräparaten von postnatalen und adulten Mäusen bestätigt werden (Arndt et al. 2005; Arndt et al. 2007). Dabei lokalisierte man Fussel-15 bereits während der Embryonalentwicklung (Embryonalstadium E13) im Cerebellum und im Rückenmark. An

sagitalen und horizontalen Schnitten durch das Rückenmark konnte Fussel-15 zudem an dorsalen sensorischen Teilen des Rückenmarks detektiert werden. Zudem zeigten *in situ* Hybridisierungen an sagitalen Schnitten postnataler Gehirne Fussel-15 unter anderem in ausgewählten Zellen des sich entwickelnden Cerebellums, bei welchen es sich hauptsächlich um migratorische Vorläuferzellen der Purkinjezellen handelt.

Whole mount *in situ* Hybridisierungen und radioaktive *in situ* Hybridisierungen an Schnitten von murinen Embryonen ließen für Fussel-18 ein ähnliches neuronal spezifisches Expressionsmuster erkennen, wie es bereits für Fussel-15 beschrieben wurde. Fussel-18 konnte jedoch schon im Entwicklungsstadium E11 in Bereichen lokalisiert werden, die später das Kleinhirn bilden. Zusätzlich zeigte sich Fussel-18 im Entwicklungsstadium E13 im dorsalen Neuralrohr. Whole mount *in situ* Hybridisierungen von isolierten Gehirnen des E15 Stadiums zeigten Fussel-18 in der Organanlage des Cerebellums und dem Rückenmark. Abbildungen und ausführliche Darstellung der geschilderten Expression von Fussel-15 und Fussel-18 während der Maus Embryogenese und im adulten Gehirn befinden sich in den entsprechenden Veröffentlichungen (Arndt et al., 2005; Arndt et al., 2007).

4.3 Lokalisation von Fussel-15 und Fussel-18

4.3.1 Lokalisation von Fussel-15 in den Purkinjezellen des Kleinhirns

Durch die Expressionsanalysen embryonaler Mäuse ergaben sich erste Hinweise auf die Lokalisation von Fussel-15 in Zellen des sich entwickelnden Cerebellums, bei welchen es sich um migratorische Vorläuferzellen der Purkinjezellen handelte. Aus diesem Grund wurden Immunfluoreszens-Untersuchungen an Paraffinschnitten des humanen Cerebellums durchgeführt, um die Expression auch dort genauer zu analysieren. Es zeigte sich eine spezifische Expression von Fussel-15 in den Purkinjezellen des humanen Cerebellums (Abbildung 14 A), die in der negativ Kontrolle (Abbildung 14 B) nicht detektiert werden konnte. Purkinjezellen sind spezifische Nervenzellen, die Informationen vom Cerebellum weiterleiten. Diese Zellen besitzen die Kontrolle über die Feinmotorik. Purkinjezellen sind besonders große Nervenzellen mit birnenförmigen Zellkörpern, die in der sogenannten Purkinjezellenschicht eingelagert sind und deren verzweigte Dendriten sich bis in die Molekularzellenschicht des Kortex und in die weiße Substanz des Cerebellums erstrecken (Abbildung 15). Eine Fussel-15 Expression ließ sich in den Zellkörpern als auch in den Dendriten dieser Zellen finden (Abbildung 14 A; Pfeile). Zur Bestätigung der Spezifität der Fussel-15 Expression in den Purkinjezellen untersuchten wir die Schnitte immunhistochemisch mit einem neuronalen Differenzierungsmarker (Tubulin- β III) (Abbildung 14 C), der spezifisch die Purkinjezellen des humanen Cerebellums färbt.

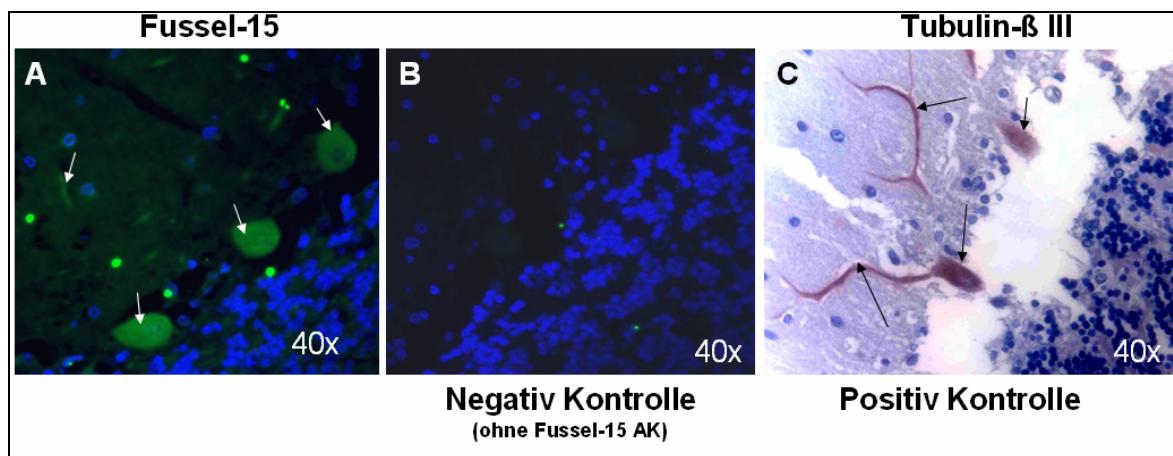


Abbildung 14 (A) Immunfluoreszenz zeigt die Fussel-15 Lokalisation in den Zellkörpern und Dendriten von Purkinjezellen (Pfeile). (B) Negativ Kontrolle ohne Inkubation mit dem Fussel-15 Antikörper. (C) Immunhistochemie zeigt die Tubulin- β III Lokalisation (Purkinjezell-spezifischer Marker).

4.3.2 Lokalisation von Fussel-18 in der Granularschicht des Kleinhirns

Immunhistochemie (Abbildung 15 A/B) und Immunfluoreszenz (Abbildung 15 C/D) an Paraffinschnitten des humanen Cerebellums zeigten für Fussel-18 eine punktförmige Expression in den sogenannten Glomeruli der Granularzellschicht des Cerebellums (Abbildung 15 A/C). Die Spezifität der Färbung wurde durch Verdrängung des Fussel-18 Antikörpers mit dem entsprechenden Peptid bewiesen (Abbildung 15 B/D). Die Granularzellschicht ist komplex und besteht aus Glomeruli, die wiederum aus Klustern von Granularzellendendriten, Moosfaserenden, auch bezeichnet als „Moosfaser-Rosetten“, und Golgizellaxonen gebildet werden. Purkinjezellaxone erstrecken sich ebenfalls in die Granularzellschicht. Zusätzlich sind auch einige Astrozyten und Gliazellen in der Granularzellschicht lokalisiert.

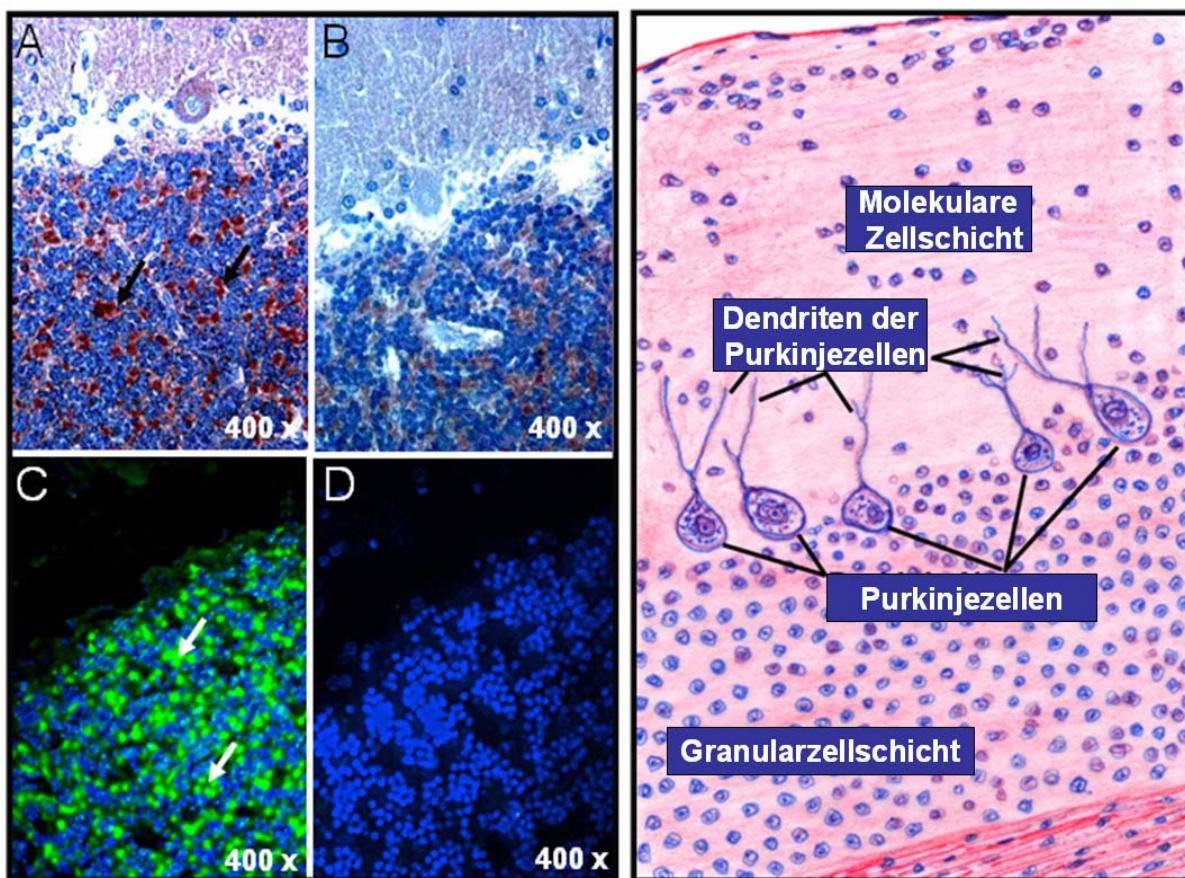


Abbildung 15 Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz von Fussel-18 (A bzw. C) und Peptidverdrängung (B bzw. D) zeigen eine spezifische Lokalisation von Fussel-18 in der Granularzellschicht des Cerebellums. Rechts ist ein schematischer Aufbau der einzelnen Schichten des Cerebellums dargestellt.

4.3.3 Neuronale Lokalisation von Fussel-18

An Hand der Immunhistologie- und Immunfluoreszenz-Färbungen von Fussel-18 an humanen Cerebellum Paraffinschnitten konnte eine Lokalisation von Fussel-18 in der Granularzellschicht festgestellt werden. Da sich in dieser Zellschicht, wie gerade angesprochen, verschiedene Zelltypen neuronaler, als auch glialer Herkunft befinden, wurden Ko-Färbungen mit verschiedenen Markern durchgeführt, um den Zelltyp zu bestimmen, in dem Fussel-18 lokalisiert ist. Dazu wurden Serienschnitte des humanen Cerebellums angefertigt und immunhistochemisch mit neuronalen- (Synaptophysin), glialen- (glial fibrillary acidic protein; GFAP) und Filament-Markern (Neurofilament; NF) gefärbt.

Dabei zeigte sich für GFAP und Fussel-18 ein unterschiedliches Expressionsmuster, womit wir eine Expression von Fussel-18 in Astrozyten oder Gliazellen ausschließen konnten (Abbildung 16 D-F). Der Neurofilamentmarker (NF) detektiert alle Neurofilamente. Auch hier konnten wir keine Übereinstimmung mit Fussel-18 erkennen (Abbildung 16 G-I). Synaptophysin ist ein integrales Membran Glykoprotein, welches in präsynaptischen Vesikeln von Neuronen vorkommt. Das Expressionsmuster von Synaptophysin in der Granularzellschicht (Abbildung 16 J-L) entspricht dem der Fussel-18 Färbung (Abbildung 16

A-C), weshalb wir von einer Fussel-18 Expression in neuronalen Elementen („cerebellar glomerulus“) der Granularzellschicht ausgingen. Diese Ergebnisse wurden durch den Pathologen Dr. Thomas Schubert, Institut für Pathologie, Uni-Klinikum Regensburg bestätigt.

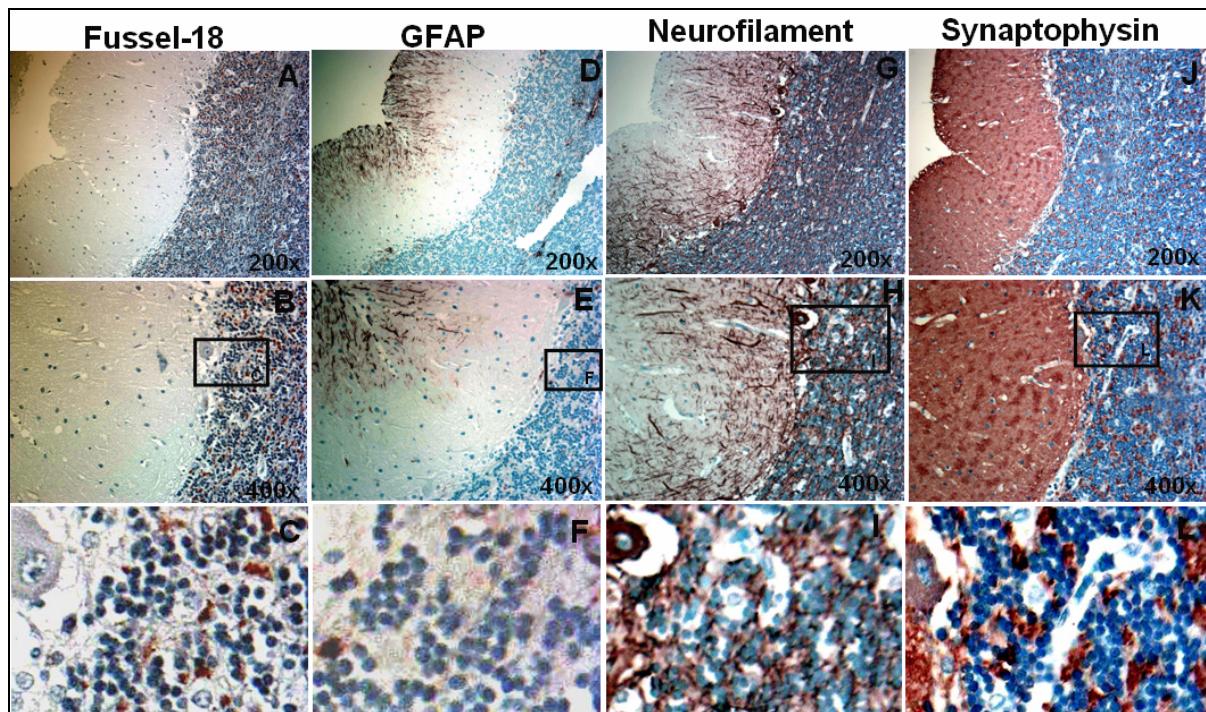


Abbildung 16 Die Untersuchung zur Lokalisation von Fussel-18 in der internen Granularzellschicht mit verschiedenen Markern ergab ein identisches Expressionsmuster von Fussel-18 und Synaptophysin, was eine neuronale Lokalisation von Fussel-18 in der Granularzellschicht vermuten lässt (Erläuterungen siehe Text).

4.3.4 Lokalisation von Fussel-15 und 18 innerhalb der Zelle

Für die Fussel-15 und Fussel-18 homologen Proteine Ski und SnoN ist bekannt, dass sie als Ko-Repressoren wirken und im Zellkern an den aktivierte Smad Komplex binden können, um die Transkription von verschiedenen TGF- β bzw. BMP Zielgenen zu verhindern. Für uns stellte sich deshalb die Frage, an welcher Stelle Fussel-15 bzw. Fussel-18 innerhalb der Zelle lokalisiert sind und ob, eine Ko-Repressor Funktion dieser Moleküle auf Grund der Lokalisation überhaupt möglich sein kann. Erste Hinweise auf eine zytoplasmatische Lokalisation von Fussel-15 zeigten die Färbungen der Purkinjezellen (Abbildung 14 A). Eine Kern-Lokalisation ließ sich jedoch an diesen Gewebeschnitten nicht feststellen. Da dieser Zelltyp nicht in Kultur gehalten werden kann, um die Expression von Fussel-15 in den einzelnen Zellfraktionen (Kern, Zytoplasma, Zytoskelett und Membran) nachweisen zu können, untersuchten wir die Lokalisation von Fussel-15 in anderen Zelltypen (293T Nierenepithelzellen, 3T3 Maus-Fibroblasten) durch transiente Transfektion von einem Fussel-15 bzw. Fussel-18 Expressions-Vektorkonstrukt. Dabei stellte sich heraus, dass nach der Transfektion Fussel-18 und Fussel-15 vorwiegend im Zellkern lokalisiert sind (Abbildung 17). Mittels der Zellfraktionierungsmethode (siehe 9.3.3.3) konnte jedoch nachgewiesen

werden, dass zusätzlich zu einer Lokalisation im Kern, Fussel-18 in der Zytoszoma- und Fussel-15 in der Zytoskelett-Fraktion lokalisiert waren (Daten nicht aufgeführt).

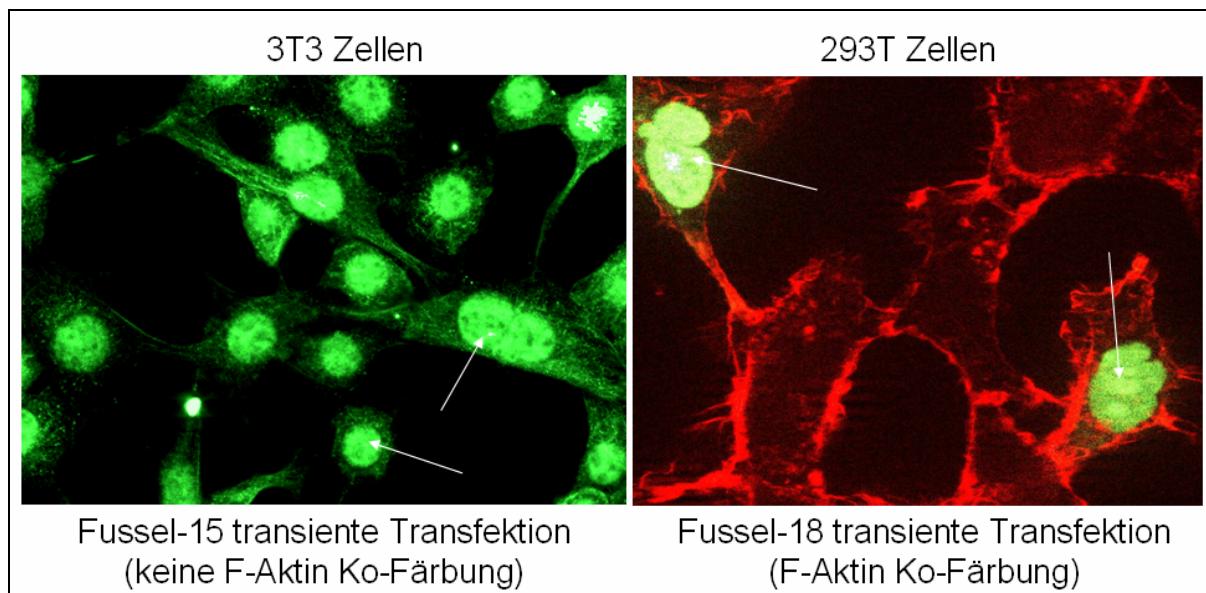


Abbildung 17 Lokalisation von Fussel-15 in 3T3 (Maus Fibroblasten) und Fussel-18 in 293 (humane Nierenepithelzellen) im Zellkern nach transiente Transfektion der Zellen mit einem Fussel-15 bzw. Fussel-18 Expressionsplasmids.

Die Lokalisation von Fussel-15 bzw. Fussel-18 im Kern gab uns Hinweise auf eine potentielle Funktion dieser Proteine als Ko-Repressoren, wie es für die Familienmitglieder Ski und SnoN der Fall ist. Blockiert man in 3T3 Zellen (Maus Fibroblasten) den BMP-Signalweg mit Hilfe von Noggin, einem exogenen Inhibitor des BMP-Signalwegs, so zeigte sich interessanter Weise Fussel-15 nicht mehr im Kern lokalisiert, sondern außerhalb des Kerns am Zytoskelett (Abbildung 18).

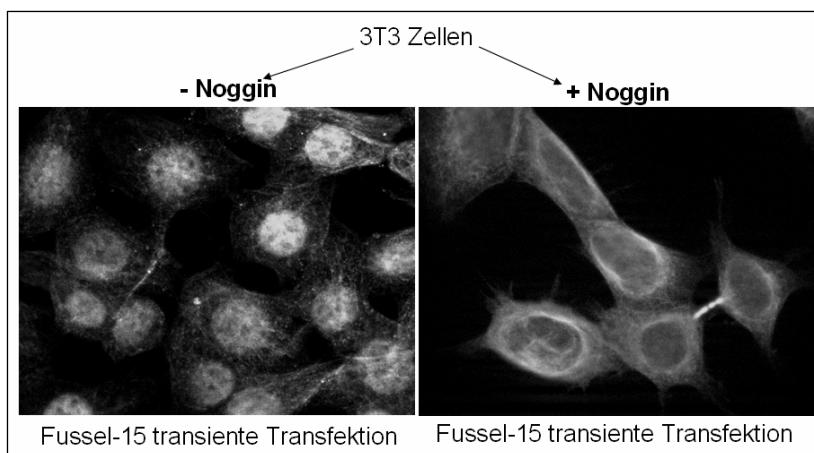


Abbildung 18 Im aktiven Zustand des BMP Signalwegs liegt Fussel-15 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert vor. Nach einer Stimulation mit dem exogenen BMP Inhibitor Noggin, konnte keine Translokation von Fussel-15 in den Kern verfolgt werden. Fussel-15 ist dann verstärkt um den Zellkern und am Zytoskelett lokalisiert.

4.4 Interaktion von Fussel-15 und Fussel-18

In Analogie zu Ski und Sno, von denen aus der Literatur bekannt war, dass sie mit bestimmten Smad Molekülen interagieren (siehe 3.2.3), untersuchten wir, ob auch die neuen

Familienmitglieder, Fussel-15 und Fussel-18, eine Interaktion mit Smad Molekülen eingehen können.

4.4.1 Interaktion von Fussel-15 mit Smad1, Smad2 und Smad3

Zum Nachweis, ob Fussel-15 eine Interaktion mit Smad Molekülen eingehen kann, führten wir Ko-Immunpräzipitationsexperimente durch. Um die Bindungskapazität von Proteinen an Fussel-15 zu erhöhen, ko-transfizierten wir Mel Im Zellen transient mit einem pCMX-PL2-Fussel-15-Flag und Smad1, Smad2 bzw. Smad3 Plasmid. Zur Kontrolle transfizierten wir die Zellen mit pCDNA3-Flag-ski und einem pCMX-PL2-Flag Leervektor. Die Melanomzelllinie Mel Im wurde deshalb verwendet, da sie in unserem Labor als sehr gut transfizierbare Zelllinie gilt und TGF- β - bzw. BMP-Signale als stark aktiv gezeigt werden konnten. Abbildung 19 zeigt eine Interaktion von Fussel-15 mit Smad1 (Abbildung 19 A), Smad2 (Abbildung 19 B) und Smad3 (Abbildung 19 C). Übereinstimmend mit den Daten, die für Ski bereits bekannt waren, konnten wir jeweils eine Interaktion von Ski mit den entsprechenden Smads, Smad1, Smad2 und Smad3 bestätigen.

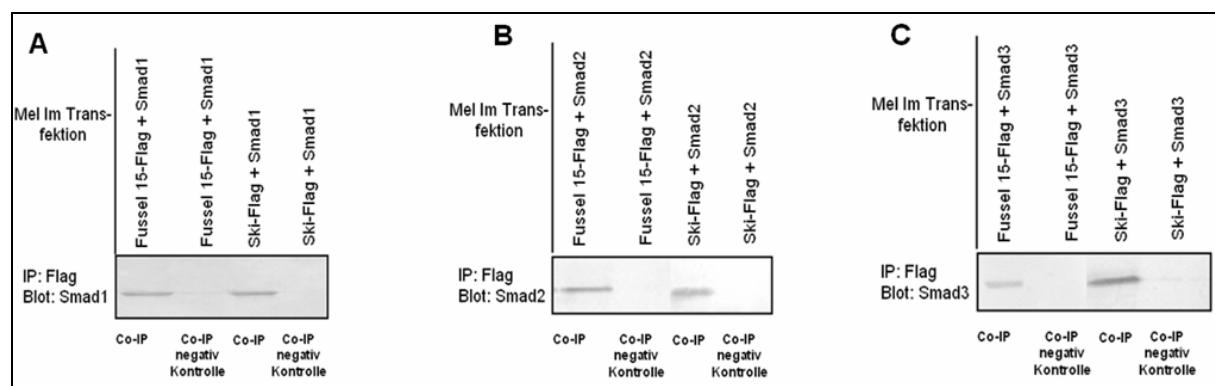


Abbildung 19 Mittels Ko-Immunpräzipitation (Co-IP) und anschließender Detektion dieser Proben durch Western Blot mit entsprechenden Antikörpern (Smad1, Smad2; Smad3 bzw. Ski) konnte eine Interaktion mit Fussel-15 bestätigt werden.

4.4.2 Interaktion von Fussel-18 mit Smad2 und Smad3

In Analogie zu Fussel-15 haben wir mögliche Smad Interaktionspartner für Fussel-18 untersucht. Abbildung 20 demonstriert eine Interaktion von Fussel-18 mit Smad2 (Abbildung 20 A) und Smad3 (Abbildung 20 B). Auch hier zeigte sich in den jeweiligen Kontrollexperimenten die Interaktion zwischen Ski und Smad2 bzw. Ski und Smad3, wie sie bereits von Akiyoshi et al., beschrieben wurde (Akiyoshi et al. 1999). Eine Interaktion mit Smad1 konnte für Fussel-18 jedoch nicht festgestellt werden (Daten nicht aufgeführt).

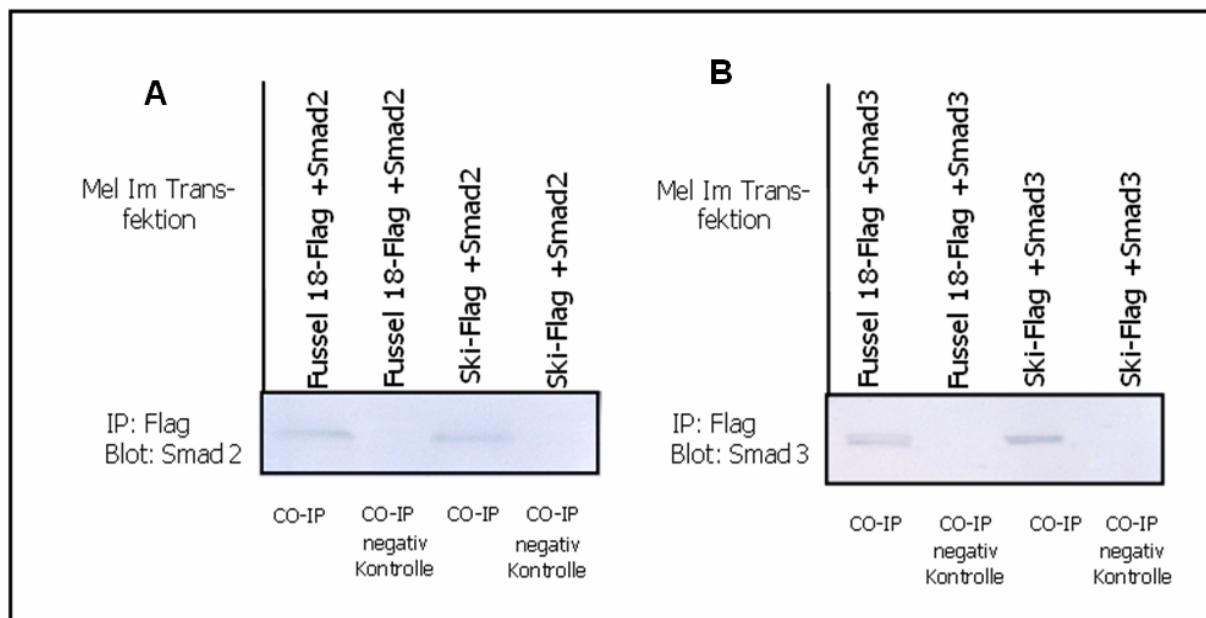


Abbildung 20 Mittels Ko-Immunpräzipitation (Co-IP) und anschließender Detektion dieser Proben durch Western Blot mit entsprechenden Antikörpern (Smad2, Smad3 bzw. Ski) konnte eine Interaktion mit Fussel-18 bestätigt werden.

4.5 Funktion von Fussel-15 und Fussel-18

4.5.1 Fussel-15 als negativer Regulator des BMP-Signalwegs

Es wurde beschrieben, dass Ski bzw. SnoN nur indirekt über eine Interaktion mit Smad2/3 bzw. Smad4 an die DNA binden können, um somit die Transkription von Zielgenen zu beeinflussen (Liu et al. 2001). Die Bindung der Smads an die DNA erfolgt an die CAGA Sequenz, eine Sequenzfolge im sogenannten „Smad Binding Element“ (SBE) der DNA. Wir spekulierten, dass Fussel-15 und Fussel-18 in ähnlicher Weise, wie es für Ski und Sno beschrieben wurde, mit Smad Molekülen interagieren könnten, um als Ko-Repressoren den TGF- β bzw. BMP Signalweg zu beeinflussen. Da unsere Ko-Immunpräzipitationsversuche zeigten, dass Fussel-15 sowohl mit TGF- β spezifischen Smads (Smad2 und Smad3) als auch mit BMP spezifischen Smads (Smad1) interagieren kann, untersuchten wir den Einfluss von Fussel-15 auf beide Signalwege. Es konnte dabei jedoch keine signifikante Regulation in der Aktivität des (CAGA)₉-Luc Konstruktet durch Fussel-15 nach der Aktivierung des Signalweges durch TGF- β beobachtet werden (Abbildung 21). Durch diese Ergebnisse wurde ausgeschlossen, dass Fussel-15 an inhibitorischen Prozessen des TGF- β Signalwegs beteiligt sein kann.

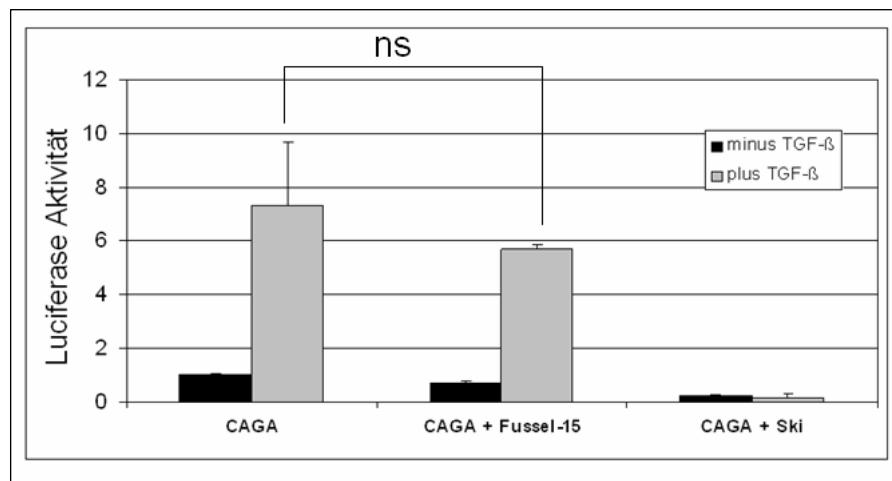


Abbildung 21
Luciferase Aktivitätsmessung. Keine signifikanten (ns) Unterschiede in der Aktivität des durch TGF- β aktivierten CACA-Luc Konstrukts durch Fussel-15. Zur Kontrolle wurde der bereits bekannte reprimierende Effekt von Ski auf das CAGA-Luc Konstrukt nach TGF- β Aktivierung bestätigt.

Als nächstes überprüften wir, ob Fussel-15 den BMP Signalweg über eine Interaktion mit den BMP spezifischen Smad Molekülen beeinflussen kann. Luo publizierten, dass Ski nicht nur nach TGF- β -, sondern auch nach BMP-Stimulierung an den aktivierte Smad Komplex im Kern bindet und bestimmte BMP Zielgene durch Zerstörung des aktiven Smad Komplexes beeinflussen kann (Luo 2004). Um dies in Analogie für Fussel-15 zu beweisen, beobachteten wir den Einfluss von Fussel-15 auf den BMP Signalweg (BMP-RE = BMP responsive element) nach Aktivierung des Signalwegs durch rekombinantes BMP. Wie in Abbildung 22 dargestellt ist, konnte eine signifikante Reduktion in der Aktivierung des BMP responsive elements (BMP-RE) durch Fussel-15 nach BMP2 Aktivierung beobachtet werden. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Luo konnte die Aktivität des BMP-RE-Luc Konstrukts nach BMP2 Aktivierung durch Ski ebenfalls inhibiert werden. Auffällig ist zudem, dass Fussel-15 wie auch Ski ohne Stimulation der Zellen mit BMP2 einen gewissen reprimierenden Effekt auf den BMP Signalweg ausüben können. Die Ursache dafür könnte eine bereits vorhandene Grundaktivität des Signalwegs, ausgelöst durch BMP Moleküle im Medium, sein.

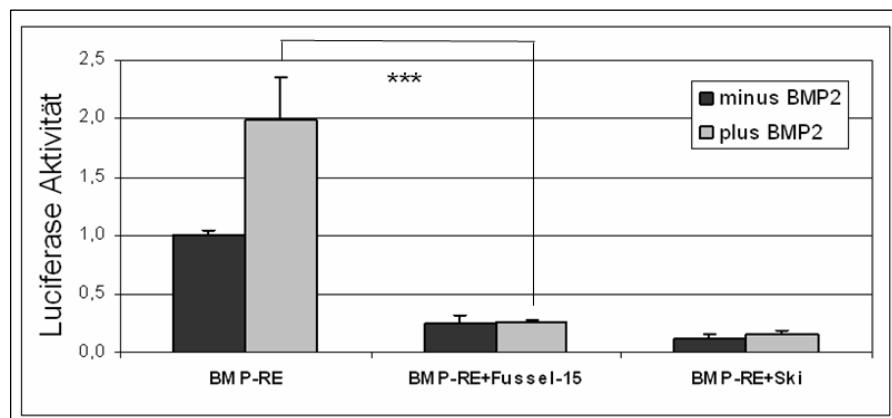


Abbildung 22
Luciferase Aktivitätsmessung. Es zeigte sich eine signifikante Inhibition in der Aktivität des durch BMP2 aktivierte BMP-RE-Luc Konstrukts durch Fussel-15 bzw. Ski.

4.5.2 Fussel-18 als negativer Regulator des TGF- β -Signalwegs

Da wir für Fussel-18 keine Interaktion mit BMP- regulierenden Smad Molekülen feststellen konnten, untersuchten wir deshalb nur den Einfluss von Fussel-18 auf den TGF- β Signalweg. Dabei zeigte sich ein deutlicher inhibitorischer Effekt von Fussel-18 auf das (CAGA)₉-Luc Konstrukt nach TGF- β Stimulation, was eine inhibitorische Funktion von Fussel-18 auf den TGF- β Signalweg bestätigte. Für Ski konnten wir auch in diesem Experiment die bereits bekannte Inhibition des (CAGA)₉-Luc Konstruktes nach TGF- β Aktivierung nachweisen (Abbildung 23).

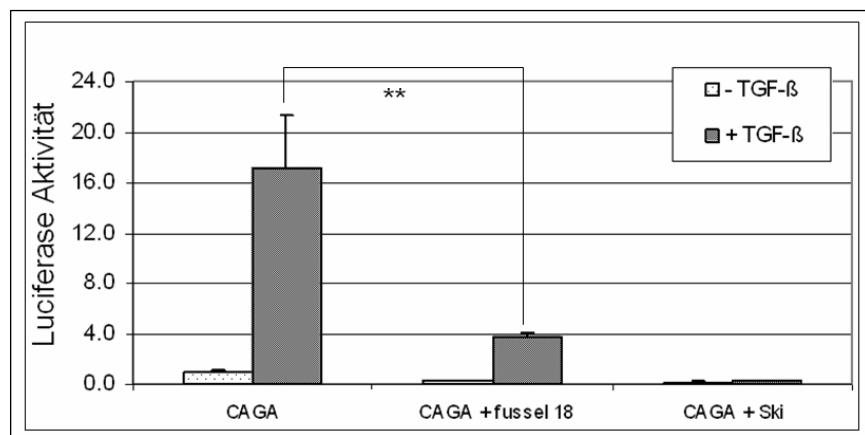


Abbildung 23

Luciferase Aktivitätsmessung. Es zeigte sich eine signifikante Inhibition in der Aktivität des durch TGF- β aktivierte CAGA-Luc Konstrukts durch Fussel-18 bzw. Ski.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Fussel-15 den BMP Signalweg und Fussel-18 den TGF- β Signalweg über entsprechende Signalweg-spezifische Smad Moleküle negativ regulieren können. Diese Ergebnisse werden in folgender Abbildung 24 nochmals veranschaulicht.

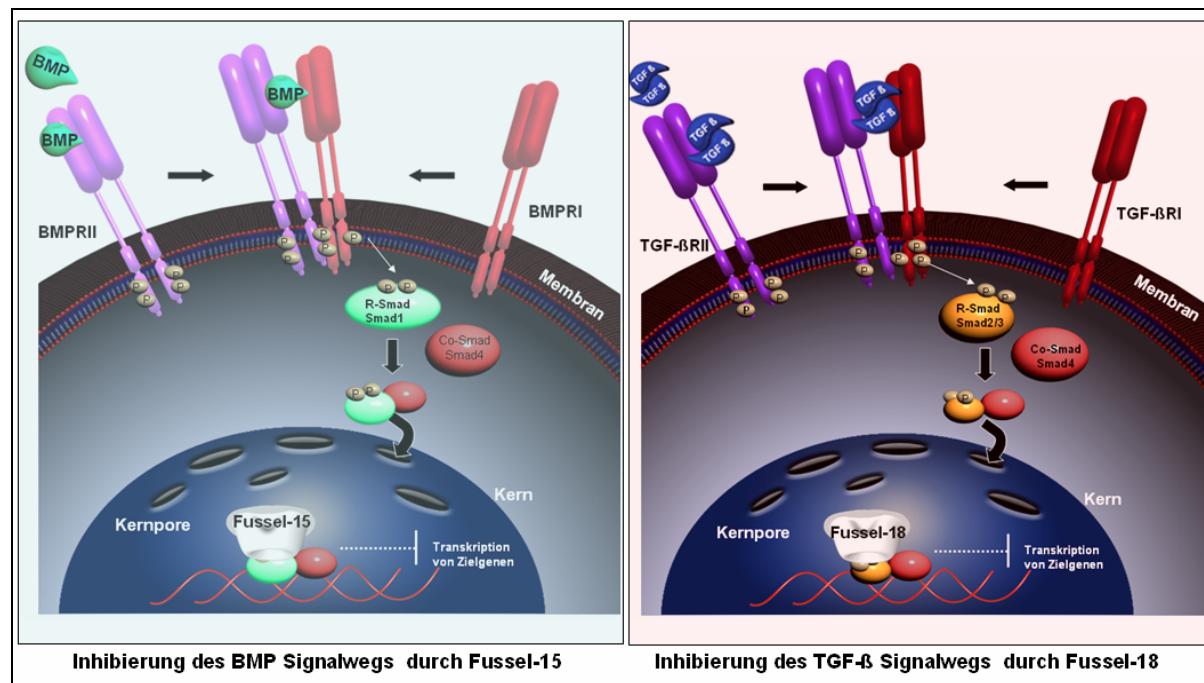


Abbildung 24 Inhibierung des TGF- β bzw. BMP-Signalwegs durch Fussel-18 bzw. Fussel-15. Durch die Bindung von Fussel-Protein an den aktiven Smad Komplex im Zellkern, kann die Transkription von Zielgenen verhindert werden.

4.6 Die Rolle von Fussel-15 in der physiologischen Wundheilung

Durch ein ausgedehntes Expressions-Screening, unter anderem in pathologischen Prozessen, konnten wir Fussel-15 sehr spezifisch in Fibroblasten der frühen Wundheilung detektieren, wohingegen weder eine Expression in Fibroblasten gesunder Haut noch in Fibroblasten der späten Wundheilung zu finden war (Abbildung 25). Dies ließ uns vermuten, dass Fussel-15 möglicherweise mit fibrotisierenden Vorgängen in Zusammenhang gebracht werden kann, in welchen auch TGF- β eine Rolle spielt.

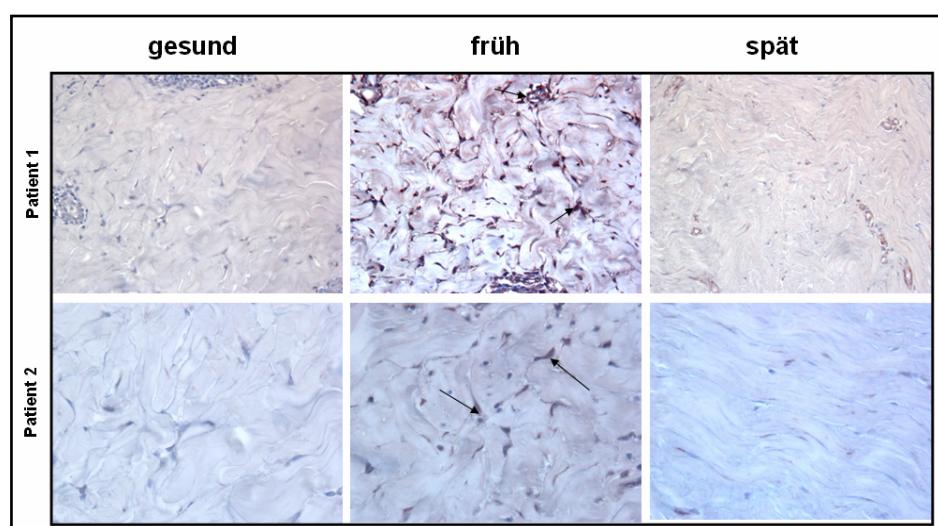


Abbildung 25

Nachweis der Fussel-15 Expression in Fibroblasten der frühen Wundheilung im Vergleich zu gesunder Dermis und später Wundheilungs-Phase, in welcher keine Fussel-15 Expression detektiert werden konnte.

TGF- β ist unter dermatologischen Gesichtspunkten auch deshalb besonders interessant, da dieses Molekül nicht nur antiproliferativ und differenzierend auf epidermale Zellen wirken kann, sondern auch die Wundheilung fördert. Außerdem erhöht TGF- β die immunologischen Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die beim Heilungsprozess eine entscheidende Rolle spielen. Umso spannender war es für uns, die Rolle von Fussel-15 in diesem Prozess aufzuklären, da in der Dermotherapie Wirkstoffe gesucht werden, die den TGF- β Stoffwechsel modifizieren oder den TGF- β Signalweg beeinflussen.

4.6.1 Etablierung eines *in vitro* Kontraktionsmodells

Um die funktionelle Rolle von Fussel-15 im Prozess der Wundheilung näher zu charakterisieren, haben wir ein so genanntes Wundheilungskontraktionsmodell als Grundlage zur Untersuchung von Fussel-15 etabliert. Dieses Modell wurde ursprünglich von Bell et al., beschrieben und ist als solches akzeptiert, um die Vorgänge der Wundheilung zu analysieren (Kollagenkontraktionsmodell bzw. *in vitro* Wundheilungsmodell) (Bell et al. 1979). Hierbei wird die Kontraktion und Organisation von Rattenschwanzkollagen durch die Zugabe von humanen Fibroblasten verursacht. Die Kontraktion wird zu verschiedenen

Zeitpunkten durch Bestimmung des Durchmessers erfasst und photographisch dokumentiert. Zusätzlich wird aus den Kontraktionspellets RNA bzw. Protein zur Analyse verschiedener Molekülexpressionen gewonnen oder diese werden für immunhistologische Nachweise fixiert. Folgende Abbildung 26 beschreibt das Prinzip des Kollagenkontraktionsmodells. Eine genaue Anleitung dazu befindet sich im Methoden Teil unter 9.3.4.11.

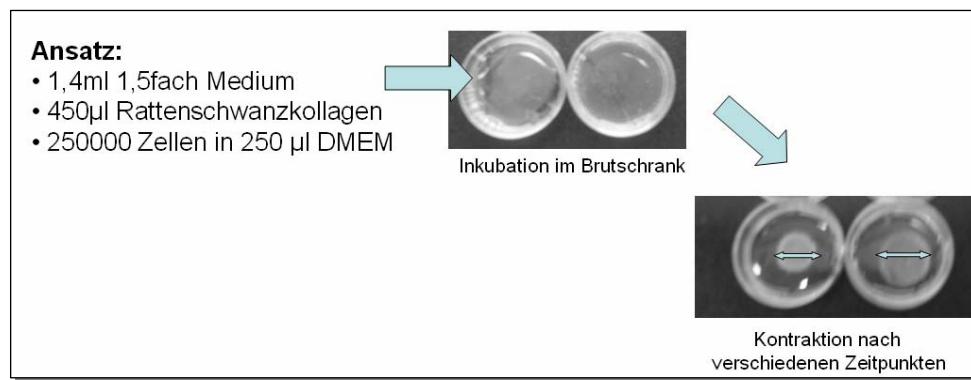


Abbildung 26

Durch das 3D-Wundheilungsmodell können Veränderungen in der Kontraktion von Fibroblasten vermessen und anschließend molekular untersucht werden.

4.6.2 *In vitro* Expression von Fussel-15 im Verlauf der Wundheilung

Nach 0, 2, 4 und 8 Stunden wurde RNA aus den Kontraktionspellets gewonnen und die Expression von Fussel-15 untersucht. Es zeigte sich, dass Fussel-15 nach 2 Stunden stark induziert wurde, dann aber im weiteren Verlauf wieder verloren geht (Abbildung 27). Diese Ergebnisse bestätigten die zuvor gewonnenen *in vivo* Daten (Abbildung 25) und gaben uns erneut Hinweis darauf, dass Fussel-15 in sehr frühen Stadien der Wundheilung eine Rolle spielt.

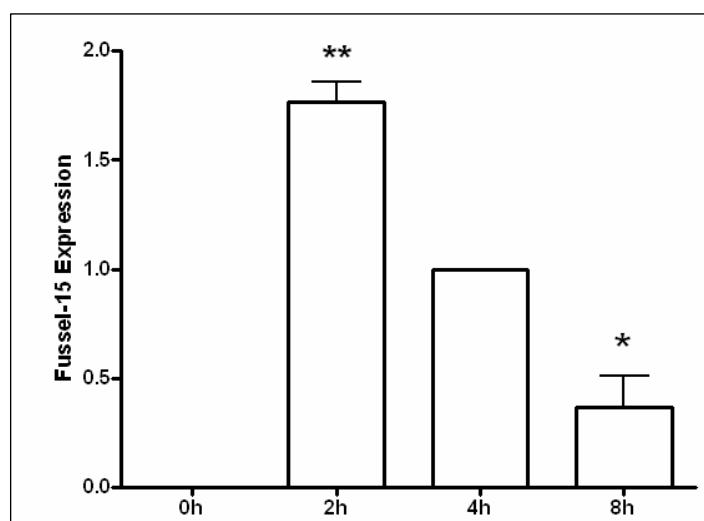


Abbildung 27 Die Expression von Fussel-15 im Wundheilungsmodell wird nach 2h stark induziert und nimmt dann im Verlauf der nächsten 6h wieder ab

4.6.3 *In vitro* Expression von TGF- β s und BMPs im Verlauf der Wundheilung

Um den induzierbaren Effekt von Fussel-15 zu frühen Zeitpunkten (nach 2h) im Kollagenkontraktionsmodell beurteilen zu können, kontrollierten wir deshalb die Expression verschiedener BMP- bzw. TGF- β -Moleküle während des Kontraktionsprozesses und fanden folgenden Zusammenhang. TGF- β 1 und TGF- β 2 scheinen ebenfalls zu frühen Zeitpunkten induziert zu werden, wohingegen BMP2, BMP4, BMP6 und TGF- β 3 erst zu späteren Zeitpunkten ihr Induktionsmaximum erreichen (Abbildung 28). Es lässt sich deshalb vermuten, dass Fussel-15 über TGF- β 1/2 positiv und über BMPs negativ reguliert werden kann. Möglich wäre jedoch auch ein regulatorischer Effekt von Fussel-15 auf TGF- β s.

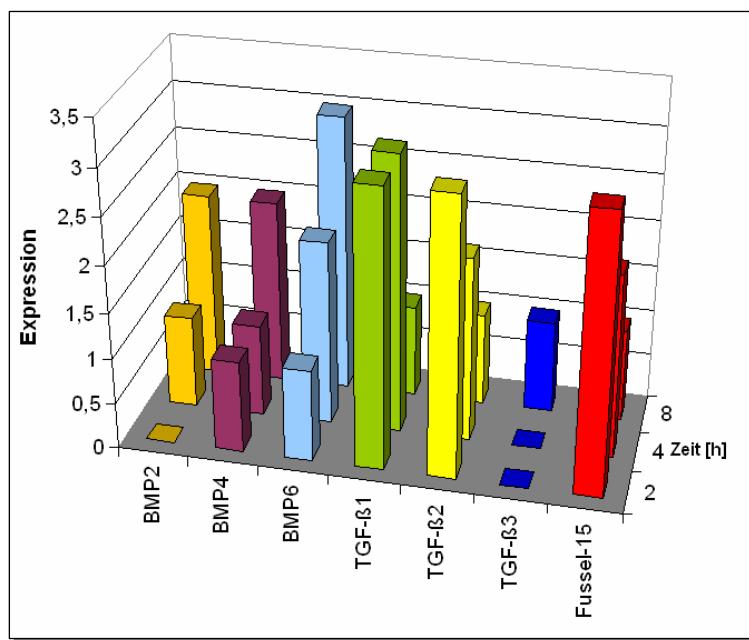


Abbildung 28 Expressionsstatus von Fussel-15 und verschiedenen BMPs bzw. TGF- β s im Verlauf der Kollagenkontraktion.

4.7 Regulatorische Funktion von Fussel-15 in der Wundheilung

Um herauszufinden, welche regulatorische Rolle Fussel-15 in der Wundheilung spielt bzw. um festzustellen, wie Fussel-15 reguliert wird, wurden Fussel-15 „Knockdown“- und Überexpressionsexperimente im Wundheilungsmodell etabliert um den Einfluss von Fussel-15 auf das Kontraktionsverhalten von Fibroblasten zu untersuchen. Zudem wurde kontrolliert, ob der inhibitorische Effekt von Fussel-15 auf den BMP Signalweg, wie er in 3T3 Mausfibroblasten und 293T Nierenepithelzellen von uns nachgewiesen werden konnte, auch in humanen Fibroblasten erzielt wird.

4.7.1 Modulation der Fussel-15 Expression durch Knockdown

Bisherige Ergebnisse zeigten, dass Fussel-15 in normalen Fibroblasten der Haut nicht exprimiert wird sondern *in vivo* erst nach Verletzung bzw. im *in vitro* Wundheilungsmodell erst nach anfänglicher Kontraktion induziert wird. Die Idee war deshalb, die Induktion von Fussel-15 in der frühen Wundheilung durch siRNA zu hemmen, um anschließend die Funktion von Fussel-15 analysieren zu können. Zur Etablierung der siRNA Technik wurden humane Fibroblasten mit Hilfe eines humanen dermalen Fibroblasten Nukleofektor Kits der Firma Amaxa (siehe 9.3.4.5) durch transiente Transfektion eines Fussel-15 Expressionsplasmids und mit zwei verschiedenen Fussel-15 siRNAs ko-transfiziert. Dabei ergab sich eine Reduktion der Fussel-15 Expression um mehr als 50% durch siRNA1 im Vergleich zu einer Alexa Fluor Kontroll siRNA (Abbildung 29), weshalb siRNA1 für weitere Versuche verwendet wurde.

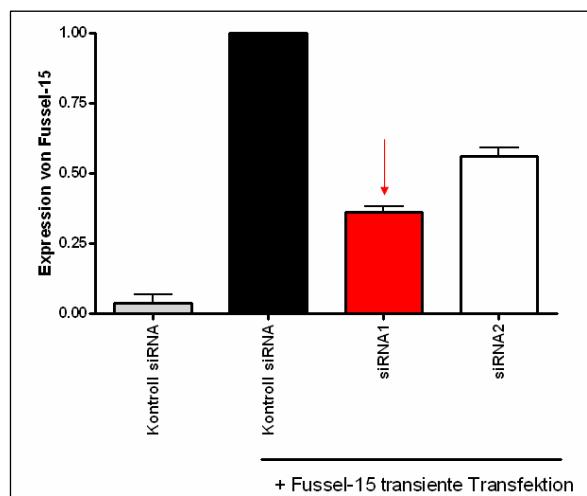


Abbildung 29 Knockdown von Fussel-15 in Fussel-15 transfizierten Fibroblasten durch siRNAs. siRNA1 zeigte dabei eine Reduktion von Fussel-15 um mehr als 50% und wurde deshalb für weitere Versuche verwendet.

Die siRNA transfizierten Fibroblasten wurden dann im *in vitro* Wundheilungsmodell vergleichend zu Kontroll-transfizierten Fibroblasten untersucht. Dabei trat eine verzögerte Kontraktion durch Fussel-15 siRNA nach 8 stündiger Kontraktion im Vergleich zu einer Kontroll siRNA auf (Abbildung 30).

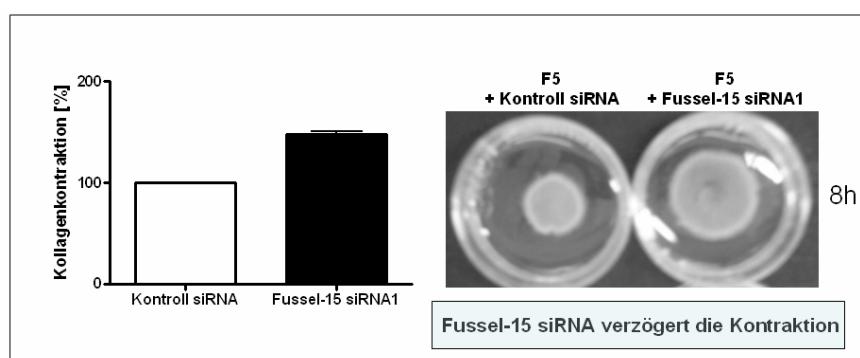


Abbildung 30
Kontraktion von Fibroblasten im Kollagenkontraktionsmodell. Durch eine Fussel-15 siRNA Transfektion kommt es zu einer verzögerten Kontraktionsfähigkeit der Fibroblasten.

4.7.2 Modulation der Fussel-15 Expression durch Überexpression

In Analogie zu den Fussel-15 „Knockdown“ Versuchen wurde eine Überexpression von Fussel-15 durch Transfektion eines Fussel-15 Expressionsplasmids in Fibroblasten durchgeführt.

Die transfizierten Zellen wurden dann in das Kontraktionsmodell eingesetzt und die Kontraktion im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Fibroblasten beobachtet (Abbildung 31). Es stellte sich heraus, dass durch eine Fussel-15 Überexpression die Kontraktion der Fibroblasten beschleunigt wurde.

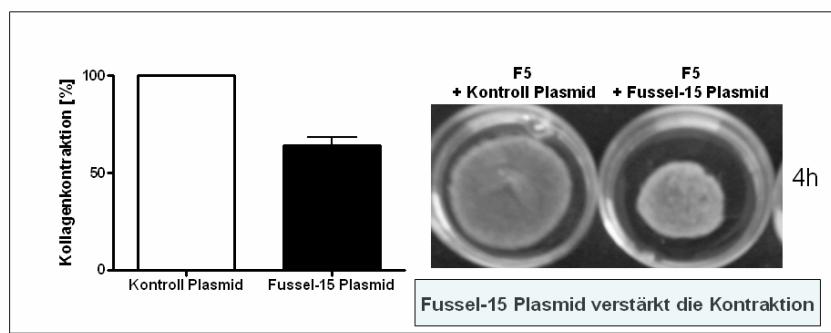


Abbildung 31

Kontraktion von Fibroblasten im Kollagenkontraktionsmodell. Durch eine Fussel-15 Überexpression kommt es zu einer verstärkten Kontraktionsfähigkeit der Fibroblasten.

4.7.3 Inhibierung des BMP Signalwegs durch Fussel-15 in humanen Fibroblasten

In Analogie zu den Untersuchungen zur Regulation von Fussel-15 (4.5.1) untersuchten wir, welchen Einfluss Fussel-15 speziell in humanen Fibroblasten hat. Wie in Abbildung 32 dargestellt ist, ergab sich eine signifikante Reduktion auf das aktive BMP-Responsive Element (BMP-RE) durch Fussel-15. Zudem konnte in Fibroblasten in Analogie zu den Untersuchungen in 293T Nierenepithelzellen (siehe Abbildung 21) keine Inhibierung durch Fussel-15 auf den TGF- β Signalweg beobachtet werden (Daten nicht aufgeführt).

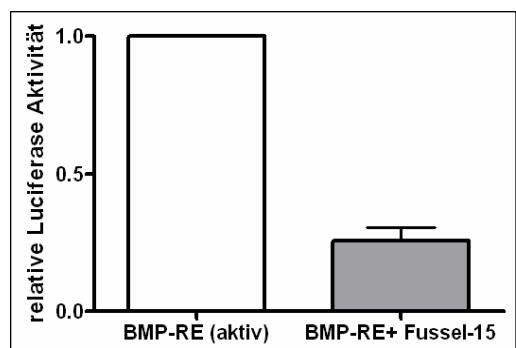


Abbildung 32 Inhibierung des aktiven BMP-Responsive Elements (BMP-RE) durch Fussel-15 in humanen Fibroblasten.

Auf mRNA Ebene zeigte sich zudem im 3D Kollagenkontraktionsmodell, dass durch Zugabe von BMPs (bisher getestet mit BMP2, BMP6, BMP7), die Expression von Fussel-15 in der Kontraktion reprimiert werden kann, wohingegen die Zugabe von Noggin, die Expression von Fussel-15 stark ansteigen lässt (Abbildung 33).

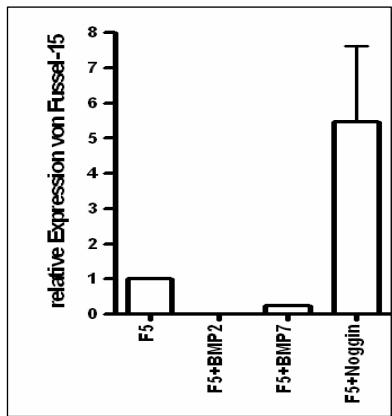


Abbildung 33 Expression von Fussel-15 in F5 Fibroblasten nach Stimulation mit BMP2 bzw. BMP7 und nach Behandlung mit dem BMP-Inhibitor Noggin.

4.8 Fussel-15 bei Erkrankungen mit vermehrter Bindegewebsneubildung

4.8.1 Veränderte Fussel-15 Expression in Keloid und Sklerodermie

Um die Expression von Fussel-15 in Keloid-Patienten und Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie (ZS) im Verlauf des Krankheitsprozesses bestimmen zu können, haben wir isolierte Fibroblasten von entsprechenden Patienten in dem *in vitro* Wundheilungsmodell verwendet. Diese wurden uns von Prof. Dr. Hein (Dermatologie, TU München) zur Verfügung gestellt. Wurden diese Zellen ins Kontraktionsmodell eingesetzt, zeigte sich im Vergleich zu normalen Fibroblasten (F5) eine deutlich geringere Kontraktionsfähigkeit nach 8 Stunden (Abbildung 34 A). Beobachtete man die Expression von Fussel-15 in diesen Proben zu verschiedenen Zeitpunkten, so traten deutliche Unterschiede zur Kontrolle (F5) auf. Bei ZS- und Keloid-Fibroblasten war die Expression von Fussel-15 im experimentellen Verlauf stark verzögert (Abbildung 34 B).

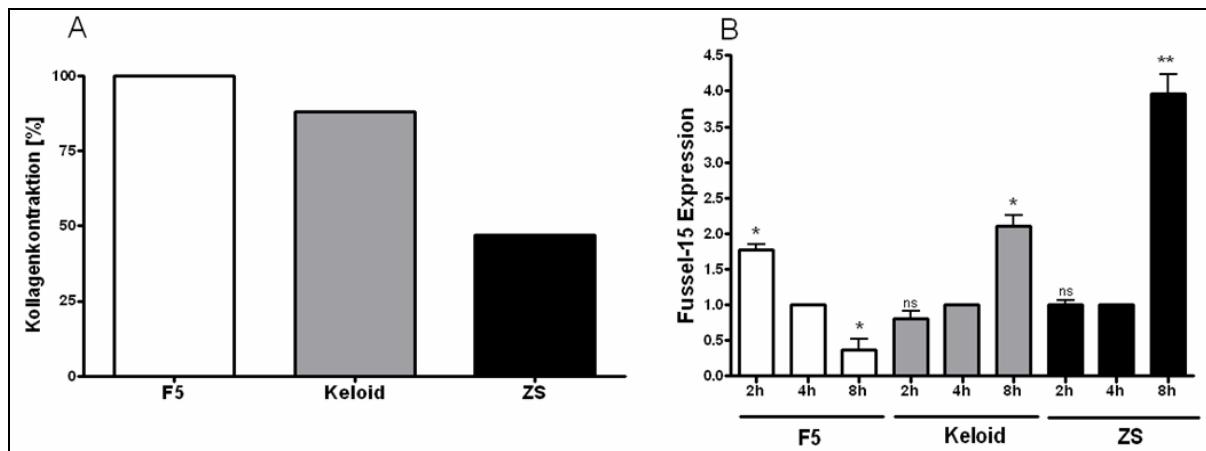


Abbildung 34 Veränderungen in der Kollagenkontraktion (A) und verändertes Expressionsmuster (B) von Fussel-15 in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten (ZS) im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten (F5) (ns, nicht signifikant; *, p<0,05).

Die hier dargestellten *in vitro* Experimente, die deutliche Unterschiede zwischen gesunden Fibroblasten und den verwendeten Keloid- und ZS-Fibroblasten zeigen, sind zudem ein Hinweis, dass Eigenschaften dieser Zellen in Zellkultur erhalten bleiben und dieses Modell deshalb als repräsentatives Zellkulturmodell verwendet werden kann, um die Rolle von Fussel-15 in Keloid und ZS zu untersuchen. Dieser auf mRNA Ebene soeben dargestellte Expressionsverlauf von Fussel-15 während der Kontraktion im Wundheilungsmodell, lässt sich auch deutlich in den entsprechenden Fibroblasten erkennen. Dazu wurden die Kontraktionspellets nach vollendeter Kontraktion (nach 8h) fixiert, in Paraffin gegossen und immunhistochemisch auf ihre Fussel-15 Expression untersucht. Es zeigte sich dabei deutlich, dass normale Fibroblasten zu diesem Zeitpunkt (entspricht späte Wundheilung) kaum Fussel-15 exprimierten, Fibroblasten aus Sklerodermie- und Keloid-Patienten jedoch sehr stark Fussel-15 positiv waren (Abbildung 35), wodurch unsere *in vivo* Daten nochmals bestätigt wurden, die zeigten, dass Fussel-15, in normalen Fibroblasten, nur in der frühen Wundheilung exprimiert wird.

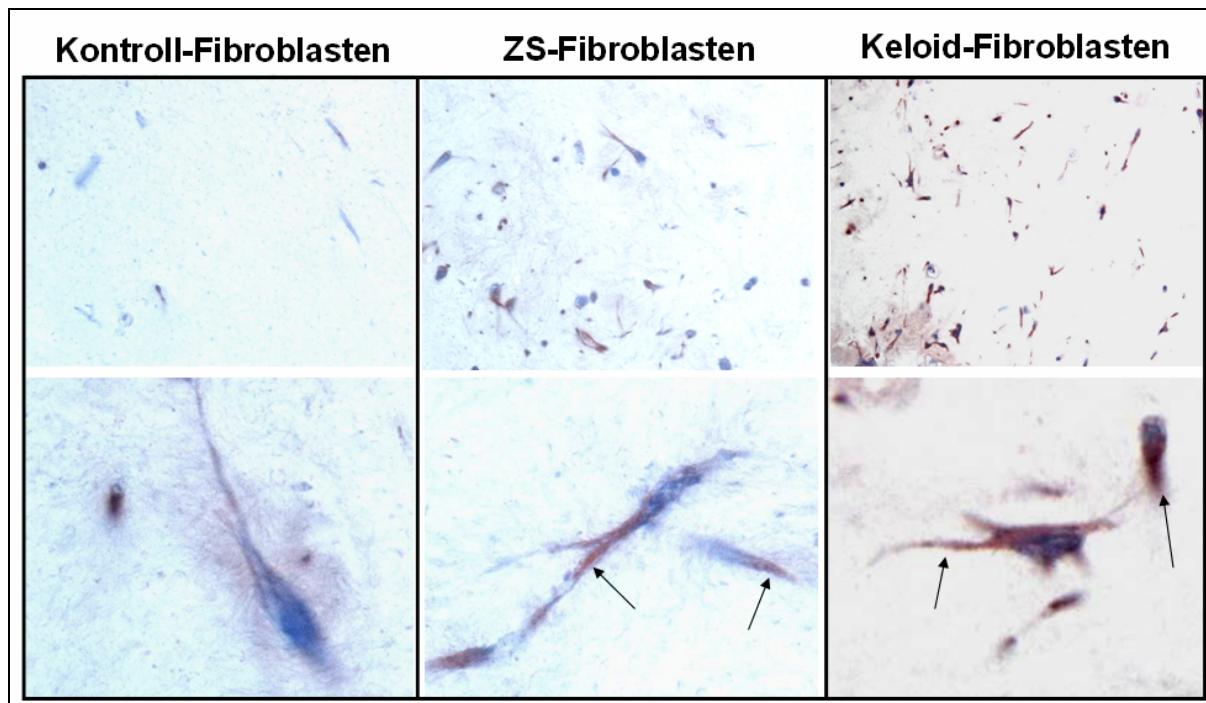


Abbildung 35 Immunhistochemische Untersuchung von Kontroll-Fibroblasten und Fibroblasten von ZS- und Keloid-Patienten auf ihre Fussel-15 Expression nach vollständiger Kontraktion im Wundheilungsmodell. Eine Expression von Fussel-15 konnte dabei nur in den Fibroblasten der Patienten detektiert werden.

Um die Expressionsergebnisse von Fussel-15 *in vivo* zu bestätigen, analysierten wir immunhistochemisch Hautgewebe verschiedener Patienten auf ihre Fussel-15 Expression. Dabei waren in gesunder Haut (Kontrollgewebe) keine positiv gefärbten Fibroblasten zu erkennen. Bei Hautproben von Patienten mit ZS, konnten wir jedoch die Expression von

Fussel-15 in Fibroblasten nachweisen. Auch die Fussel-15 Färbung an Paraffinschnitten von Keloid-Patienten ließ, entsprechend dem *in vitro* Modell, eine starke Färbung von aktivierte Fibroblasten erkennen (Abbildung 36).

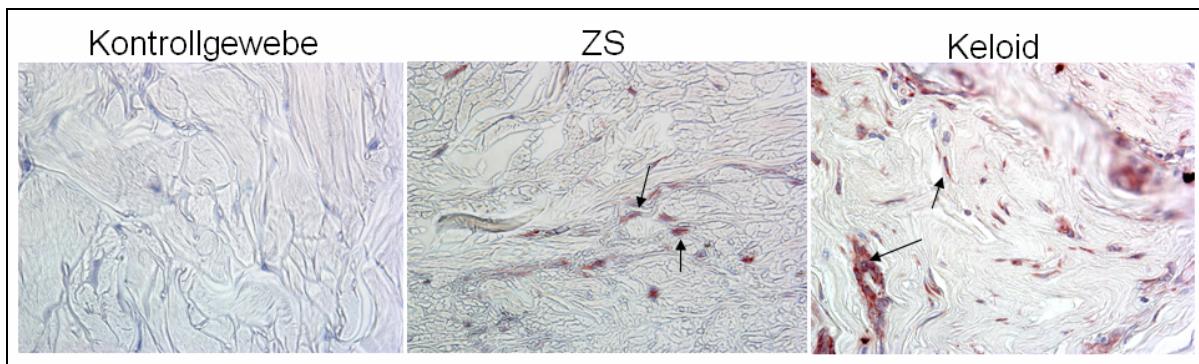


Abbildung 36 Immunhistochemische Färbung von Fussel-15 an Paraffinschnitten von Keloid- und ZS-Patienten zeigten eine sehr starke Expression von Fussel-15 in aktivierte Fibroblasten (Pfeile) im Vergleich zu Fibroblasten aus Kontrollgewebe.

4.8.2 Veränderte Expression von Fussel-15 in Keloid und Sklerodermie nach exogener Inhibierung des BMP Signalwegs durch Noggin

Inhibiert man den BMP Signalweg mit einem exogenen Inhibitor (Noggin), der verhindert, dass es zur Aktivierung der Signalkaskade durch BMP Liganden kommt, konnte in normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) ein Expressionsanstieg von Fussel-15 beobachtet werden. In Keloid- und ZS Fibroblasten war ein Expressionsanstieg nach Behandlung der Zellen mit Noggin jedoch nicht nachzuweisen (Abbildung 37).

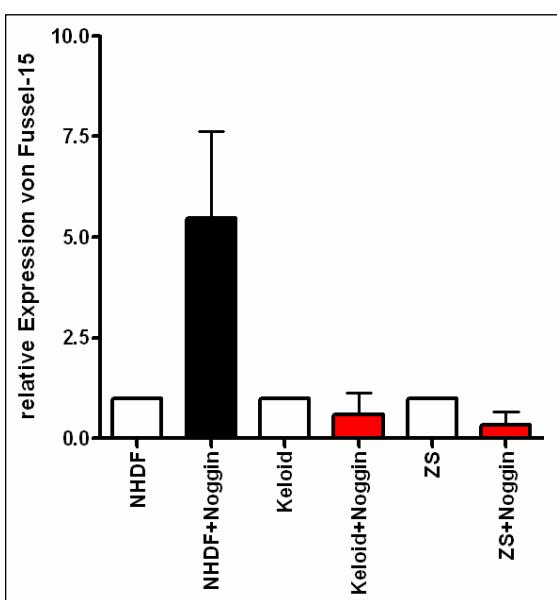


Abbildung 37 Expression von Fussel-15 in normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) nach Noggin Behandlung im Vergleich zu Keloid- und ZS- Fibroblasten.

4.8.3 Veränderte Expression von BMP6 in Keloid Fibroblasten

Um mögliche Regulationsunterschiede zwischen normalen Fibroblasten und ZS- bzw. Keloid-Fibroblasten während der Kollagenkontraktion festzustellen, verglichen wir die Expression verschiedener Moleküle der TGF- β bzw. BMP Familie in normalen Fibroblasten mit der Expression in ZS- und Keloid-Fibroblasten. Dabei erkannte man, dass in Keloid Fibroblasten die Induktion von BMP6 fehlreguliert ist (Abbildung 38).

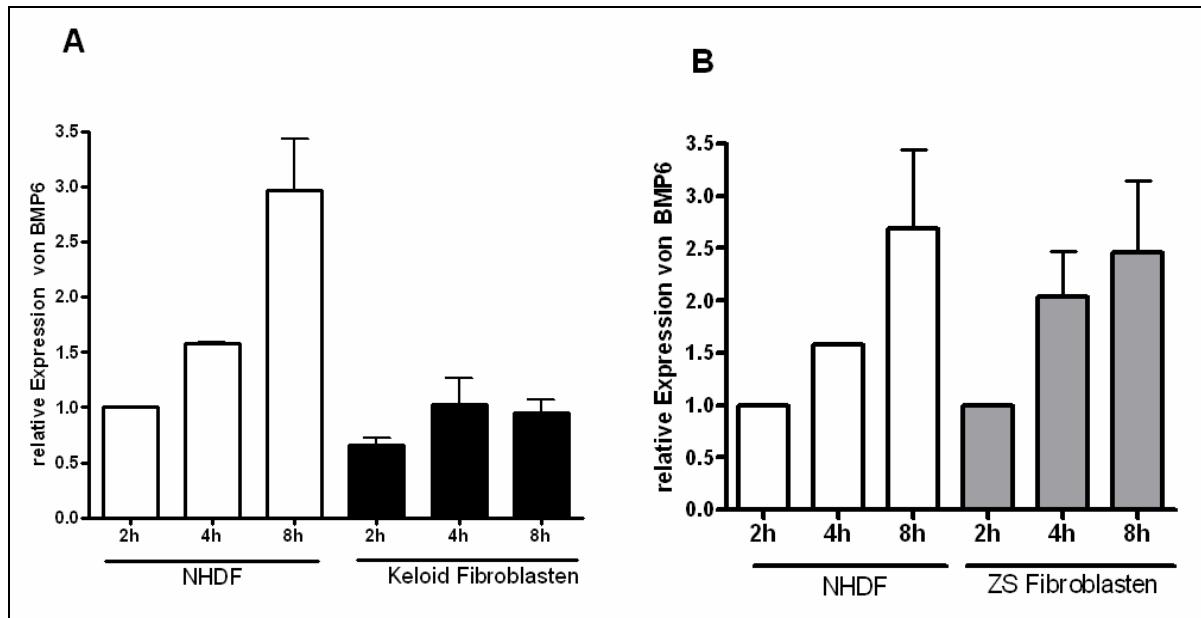


Abbildung 38 Expression von BMP6 im Verlauf der Kollagenkontraktion. In normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) nimmt die Expression von BMP6 im Verlauf der Kontraktion stark zu. Bei Keloid Fibroblasten konnte kein signifikanter Anstieg in der BMP6 Expression beobachtet werden (A). Bei ZS Fibroblasten hingegen ist der Expressionsanstieg von BMP6 vergleichbar den Kontrollfibroblasten NHDF (B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Fussel-15 in der frühen Wundheilung induziert wird. Durch Fussel-15 „Knockdown“- und Überexpressionsexperimente konnten wir zeigen, dass Fussel-15 am Kontraktionsprozess beteiligt ist, da durch das Ausschalten von Fussel-15 in Fibroblasten die Kontraktion des Kollagens sehr viel langsamer abläuft und durch eine Überexpression von Fussel-15 die Kontraktion im Vergleich zur Kontrolle stark beschleunigt werden kann. Zudem hat sich gezeigt, dass in zwei verschiedenen Erkrankungen mit pathologisch vermehrter Bindegewebsneubildung die Expression und die Regulation von Fussel-15 verändert vorliegt und deshalb davon ausgegangen werden kann, dass Fussel-15 zur Pathogenese dieser Erkrankungen beitragen könnte. Wie es genau zu einer veränderten Regulation von Fussel-15 in diesen Erkrankungen kommt, muss in Folgearbeiten untersucht werden. Hypothesen dazu werden im Diskussionsteil erläutert.

5 Diskussion Teil I

Fussel-15 und Fussel-18, zwei neue Ko-Repressoren, die den TGF- β bzw. den BMP Signalweg negativ regulieren können

In diesem Projektteil wurde die Identifizierung, Expression und die funktionelle Rolle von zwei bislang unentdeckten Proteinen bearbeitet. Auf Grund meiner Untersuchungen hat sich gezeigt, dass diese neuen Moleküle als Ko-Repressoren des Transforming Growth Factor- β (TGF- β) bzw. des Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signalwegs wirken und durch die Bindung an bestimmte Smad Moleküle im Zellkern die Transkription verschiedener Zielgene beeinflussen können. Diese Eigenschaft und die chromosomale Lage der Proteine war die Grundlage für ihre Namensgebung, „Functional smad suppressing element on chromosome 15“ (Fussel-15) und „Functional smad suppressing element on chromosome 18“ (Fussel-18). Abbildung 39 soll die Rolle dieser Moleküle im BMP bzw. TGF- β Signalweg nochmals in Erinnerung rufen.

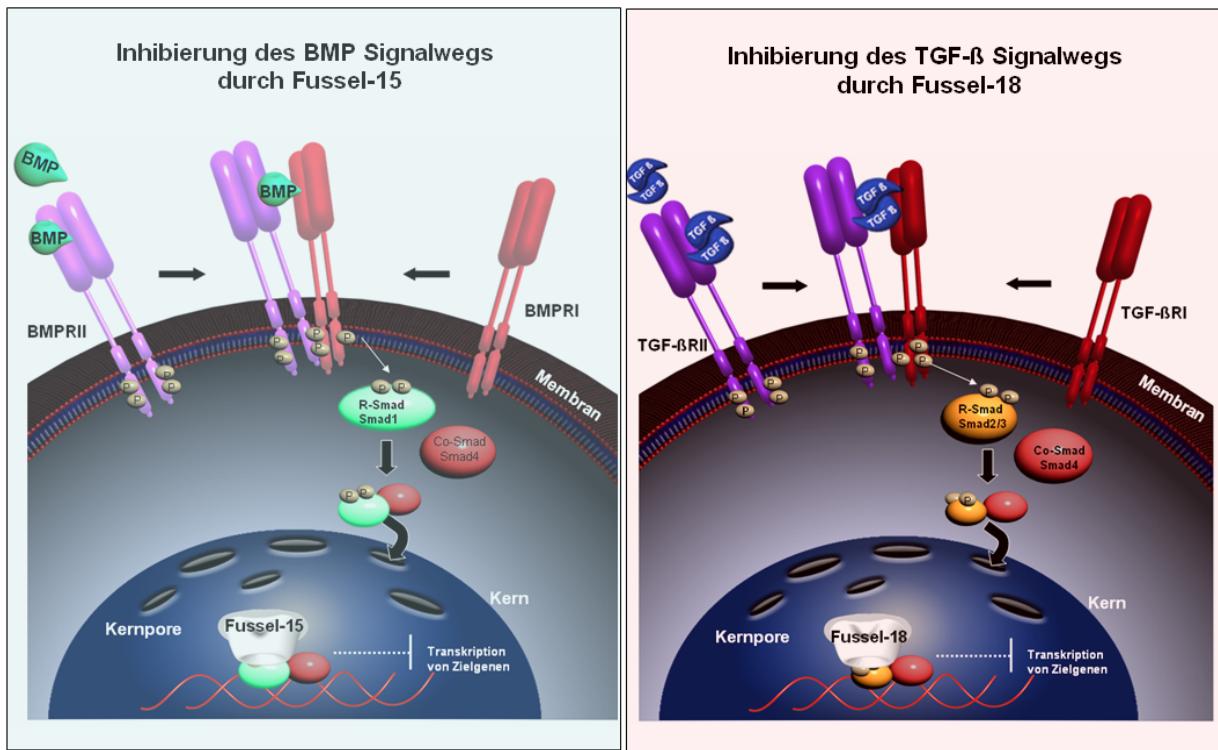


Abbildung 39 Übersicht über die Funktion von Fussel-15 und Fussel-18 im BMP- bzw. TGF- β -Signalweg (siehe dazu auch 4.5).

Die Ko-Repressoren Fussel-15 und Fussel-18 sind in ihrer Struktur und Funktion zu Ski und SnoN sehr ähnlich. Die Rolle von Ski und SnoN während der Tumorentwicklung (Fumagalli et al. 1993; Reed et al. 2001; Imoto et al. 2001; Zhang et al. 2003) und der Vertebraten

Entwicklung (Amaravadi et al. 1997; Berk et al. 1997) ist seit längerer Zeit bekannt. Ski wurde als das Produkt eines retrovirusalen Oncogens (v-ski) identifiziert, welches Transformation von Fibroblasten in Hühner Embryonen und Muskel-Hypertrophie in Mäusen hervorruft (Li et al. 1986). Wir konnten zeigen, dass Fussel-15 und Fussel-18 in Analogie zu Ski und SnoN ebenfalls die Funktion transkriptioneller Ko-Repressoren besitzen. Das humane c-Ski, und das verwandte SnoN Protein interagieren im Kern mit Smad3 und Smad4 und hemmen somit als Ko-Repressoren den TGF- β vermittelten Signalweg. Für Ski ist zudem eine Interaktion mit BMP-spezifischen Smad Komplexen (Smad1-Smad4 und Smad5-Smad4) bekannt, wodurch die BMP Signalkaskade inhibiert werden kann (Wang et al. 2000). Neben Ski, Sno und den Fussel Proteinen gibt es noch weitere Moleküle, die der Ski Familie zuzuordnen sind. Zu diesen zählen die murinen Ko-Repressoren Corl1 und Corl2 und das humane Gegenstück LBXCOR1 (Mizuhara et al. 2005). Zudem gelang es uns mit einem Datenbankvergleich ein Fussel homologes Protein (CG11093) in *Drosophila melanogaster* zu identifizieren, welches momentan in einer weiteren Studie in Kooperation mit Prof. Dr. Stephan Schneuwly (Lehrstuhl für Zoologie und Entwicklungsbiologie, Universität Regensburg) untersucht wird. Nachfolgende Abbildung 40 gibt eine Übersicht über die Ski Familie.

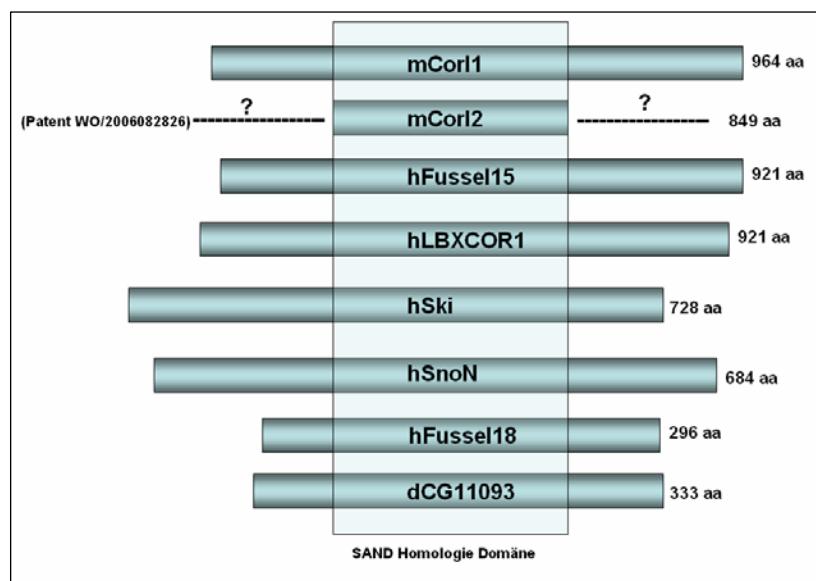


Abbildung 40 Schematischer Überblick über die Ski Familienmitglieder. M (murin), h (human), d (*Drosophila melanogaster*). Die Sequenz von mCorl2 ist patentiert und in der Genomdatenbank nicht komplett verfügbar.

Ein Merkmal dieser Ski Familienmitglieder ist die sogenannte SAND Homologie Domäne, deren Name sich aus den Anfangsbuchstaben der Kernproteine **S**p100, **A**IRE-1, **N**ucP41/75 und **D**EAf-1 zusammensetzt. Die SAND Domäne ist ein evolutionär konserviertes Sequenzmotif vieler Kernproteine, die bei chromatin-abhängigen transkriptionellen Regulationsprozessen beteiligt sind. In dieser SAND Domäne befindet sich eine sogenannte Interaktionsschleife (I-loop). Über diese I-loop findet der direkte Kontakt an die DNA statt. Nachfolgende Abbildung 41 zeigt einen Vergleich der Homologiedomänen der Ski Familie.

Dargestellt ist die SAND Domäne, in welcher die sogenannte I-loop Sequenz enthalten ist. Proteine der Ski Familie können nicht direkt an die DNA binden. Sie wirken als Ko-Repressoren und inhibieren über die Bindung an Smad4 die Transkription verschiedener TGF- β bzw. BMP Zielgene. Für die Bindung an Smad4 können Ski und SnoN jedoch dieselbe Interaktionsschleife (I-loop) in ihrer SAND Domäne nutzen (Luo 2004). Sequenzvergleiche zeigten, dass diese Interaktionsschleife (I-loop) auch bei Fussel-15 und Fussel-18 vorhanden ist. Deshalb gingen wir in Analogie zu Ski und SnoN von einer entsprechenden Interaktion der Fussel-Proteine mit Smad4 aus.

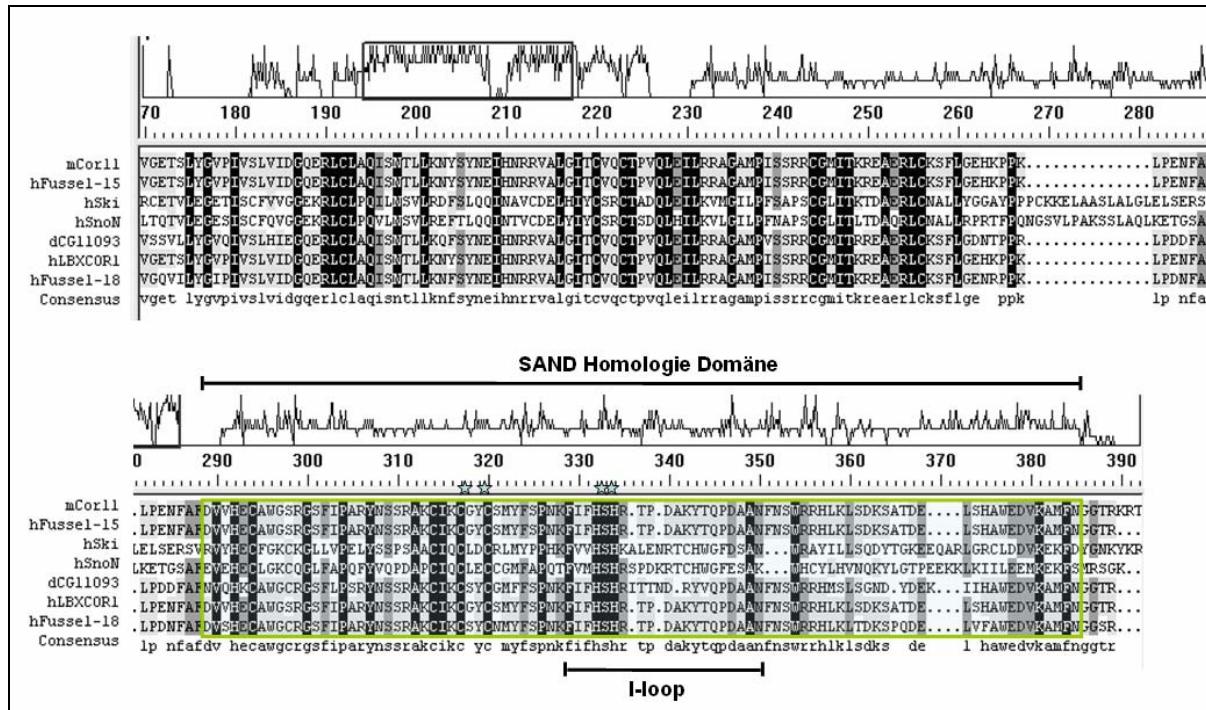


Abbildung 41 Vergleich der Aminosäurenssequenz der Ski Familienmitglieder. Dargestellt ist die SAND Homologie Domäne, in welcher die sogenannte I-loop Sequenz enthalten ist. Aminosäuren, welche bei allen Familienmitgliedern konserviert vorliegen, wurden in weißer Schrift auf schwarzem Hintergrund dargestellt.

Es konnte jedoch von Luo et al., nachgewiesen werden, dass Ski nicht nur mit Smad4 im Kern interagiert und somit die Transkription von verschiedenen Zielgenen beeinflussen kann, sondern auch eine Bindung mit den phosphorylierten R-Smads (Smad2/3 (TGF- β spezifisch) und Smad1/5/8 (BMP spezifisch)) möglich ist (Luo 2004). Diese potentielle Bindungsfähigkeit zwischen verschiedenen R-Smads und den Fussel-Proteinen untersuchten wir mittels Ko-Immunpräzipitation. Dabei zeigte sich für Fussel-18 eine Interaktion mit den TGF- β spezifischen R-Smads, Smad2 und Smad3 (Abbildung 20). Für Fussel-15 ergab sich zudem eine Interaktion mit dem BMP spezifischen R-Smad, Smad1 (Abbildung 19). Luciferaseaktivitätsmessungen bestätigten einen starken inhibierenden Effekt von Fussel-15 auf den BMP Signalweg (Abbildung 22) und nur einen relativ geringen inhibierenden Effekt von Fussel-18 auf den TGF- β Signalweg (Abbildung 21). Diese Ergebnisse ließen uns

vermuten, dass die Interaktion zwischen Fussel-15 und den TGF- β spezifischen R-Smad Molekülen möglicherweise zu schwach ist, um den TGF- β Signalweg erfolgreich zu inhibieren. Affinitätsstudien könnten unsere Vermutungen klären. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Fussel-15 den BMP Signalweg und Fussel-18 den TGF- β Signalweg negativ regulieren kann.

Fussel-15, Fussel-18 und deren neuronale Expression

Für Ski und SnoN ist bekannt, dass sie in geringen Mengen in nahezu allen adulten und embryonalen Geweben exprimiert werden (Nomura et al. 1989; Pearson-White 1993). Zu einer Überexpression von Ski und SnoN kommt es lediglich in bestimmten Geweben und Zelltypen während definierten Stadien der Embryonalentwicklung und in einigen Tumorarten (Lyons et al. 1994; Namciu et al. 1995; Zhang et al. 2003; Poser et al. 2005). Um die genaue Expression von Fussel-15 und Fussel-18 ausfindig zu machen, screenten wir eine Vielzahl humaner und muriner Gewebe aus embryonalen und adulten Entwicklungsstadien. Auf mRNA Ebene zeigte sich dabei für Fussel-15 eine spezifische Expression im Kleinhirn (Cerebellum). Für Fussel-18 ergab sich zusätzlich zu einer Expression im Cerebellum eine Expression im Rückenmark und im Hoden (Abbildung 13). Die Expression von Fussel-15 im Hoden wurde nicht weiter verfolgt, da aus anderen Studien bekannt ist, dass die Genexpression dort relativ unspezifisch sein kann. Unser Fokus richtete sich deshalb auf die sehr spezifische Expression von Fussel-15 und Fussel-18 im Kleinhirn. Um die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen von Fussel-15 und Fussel-18 besser diskutieren zu können, wird das Kleinhirn und dessen wesentliche Strukturen kurz beschrieben werden.

Die Kleinhirnrinde lässt sich in drei Schichten einteilen, die jeweils verschiedene Zelltypen enthalten: Die **Molekularzellschicht** (Stratum moleculare) befindet sich dabei ganz außen und besteht aus Sternzellen, Korbzellen gefolgt von einer **Purkinjezellschicht** (Stratum purkinjense) mit Purkinjezellen und der **Granularzellschicht** (Stratum granulosum) mit Körnerzellen und Golgizellen (Abbildung 42).

Die kleinhirntypische Zelle ist die Purkinjezelle, die als einzige aus der Kleinhirnrinde herausprojiziert. Sie hat einen klassischen birnenförmigen Zellleib mit einem basalen Axon und einem apikalen Primärdendriten, der sich baumartig verzweigt. Die Dendriten ziehen weit in die Molekularzellschicht bis kurz unter die Kleinhirnoberfläche und gehen eine Vielzahl synaptischer Verbindungen mit anderen Neuronen innerhalb und außerhalb des Kleinhirns ein. Die andere typische Zelle der Kleinhirnrinde ist die Granularzelle. Die kleinen, runden Zellkörper liegen dicht und in großer Zahl in der Granularzellschicht. Das Axon verläuft nach außen in die Molekularzellschicht, spaltet sich dort T-förmig auf und verläuft als Parallelfaser längs der Kleinhirnwundungen und somit senkrecht durch die Dendritenbäume der Purkinjezellen. Die basalen Dendriten der Granularzellen bilden mit den basalen Axonen

der Golgizellen kleine Geflechte in der Granularzellschicht, die „Glomerula cerebellaria“, an denen auch die extracerebellaren Moosfasern enden. Moosfasern entstammen dem Rückenmark und enden an den „Glomerula cerebellaria“, wo sie die Granularzellen und somit indirekt die Purkinjezellen erregen. Ihren Namen erhalten die Moosfasern aus ihrer Verbindung mit den „Glomerula cerebellaria“, die die Granularzellschicht der Kleinhirnrinde im mikroskopischen Bild wie einen vermoosten Rasen erscheinen lassen. Folgende Abbildung 42 stellt die drei Schichten der Kleinhirnrinde mit den wichtigsten Strukturen dar.

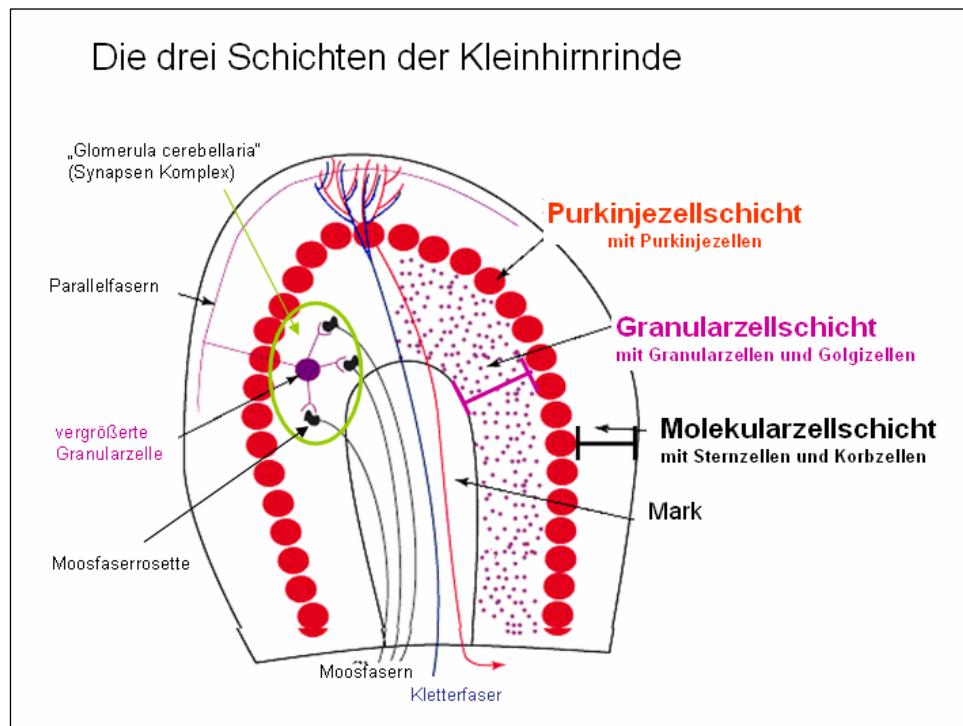


Abbildung 42

Die drei Zellschichten der Kleinhirnrinde und die wichtigsten Zell- und Fasertypen (modifiziert nach thalamus. wustl.edu/course/cerebell.html). Ausführliche Beschreibung im Text.

Mittels *in situ* Hybridisierungen an Mäusen verschiedener embryonaler und adulter Stadien und mittels Immunhistochemie an humanen Gehirnschnittpräparaten konnten wir die Expression von Fussel-15 und Fussel-18 im Kleinhirn genau bestimmen. Dabei zeigte sich für Fussel-15 eine Expression in den Zellkörpern und dendritischen Fortsätzen der Purkinjezellen im Kleinhirn (Abbildung 14). Für Fussel-18 ließ sich ein punktförmiges Expressionsmuster in der sogenannten „Glomerula cerebellaria“ in der Granularzellschicht des Kleinhirns feststellen (Abbildung 15). In diesen Bereich der Granularzellschicht enden auch die Moosfasern mit ihren sogenannten Moosfaserrosetten, die ihren Ursprung im Rückenmark haben. Wir konnten an whole mount *in situ* Hybridisierungen isolierter embryonaler Mausgehirne Fussel-18 bereits in der Organanlage des Cerebellums und des Rückenmarks erkennen (Arndt et al. 2005). Diese frühe Expression von Fussel-18 im Rückenmark lässt einen Zusammenhang mit den Ursprüngen der Moosfasern vermuten. Jede einzelne Moosfaserrosette nimmt über die Dendriten der Granularzellen Kontakt zu diesen Zellen auf. Wir vermuten, dass das punktförmige Expressionsmuster der

Paraffinschnitte in Abbildung 15 möglicherweise mit den Moosfaserrosetten in der Granularzellschicht korreliert. Für eine Bestätigung unserer Hypothese müssen jedoch weitere Untersuchungen folgen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Fussel-15 und Fussel-18 zwei neue Ski Familienmitglieder sind, die spezifisch im Nervensystem exprimiert werden.

Weshalb diese Proteine so spezifisch exprimiert werden und welche Funktion ihnen im Gehirn zugesprochen werden kann, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Da sowohl Fussel-15 als auch Fussel-18 während der Entwicklung der Maus schon in sehr frühen embryonalen Entwicklungsstadien in neuronalen Strukturen exprimiert werden (Arndt et al. 2005; Arndt et al. 2007), ist eine Rolle dieser Moleküle in Entwicklungsvorgängen denkbar. Bekanntermaßen haben in diesen Vorgängen Moleküle der TGF- β und BMP Signalkaskade eine große Bedeutung. Wir konnten zudem zeigen, dass Moleküle beider Signalwege (Smad1-7, TGF- β 1-3, BMPRIA, BMPRIIB, BMPR2, BMP2, BMP7 ect.) im Cerebellum exprimiert werden (Arndt et al. 2005). Andere Gruppen untersuchten bereits die Expression der TGF- β Isoformen im Zentralen Nervensystem (Dobbertin et al. 1997; Jones et al. 1998; Vivien et al. 1998; Zhu et al. 2000; de Sampaio e Spohr TC et al. 2002; Mittaud et al. 2002) und fanden essentielle Funktionen dieser Moleküle bei der Regulation des Zellzyklus, bei frühen Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen und bei der Regulation des Überlebens neuronaler Zellen (Pratt und McPherson 1997; Bottner et al. 2000; Unsicker und Strelau 2000). Über die Regulation der TGF- β Signalkaskade im Gehirn ist jedoch noch sehr wenig bekannt. Ein entscheidender Hinweis, dass dieser Signalweg in der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielt, kam 2003 von Zhou et al.. Diese Gruppe stellte eine knockout Maus her, bei welcher das Smad4 Protein nur im Gehirn ausgeschaltet wurde. Diese Mäuse entwickelten im Kleinhirn eine verminderte Anzahl von Purkinjezellen und hatten Probleme mit der Feinmotorik (Zhou et al. 2003). Über die Rolle von Smad Molekülen bei der Entwicklung und der Funktion des Gehirns ist jedoch allgemein sehr wenig bekannt, und so ist es schwierig, über mögliche Funktionen von Fussel-15 und Fussel-18 im Gehirn zu spekulieren. Da das Kleinhirn und dort speziell die Purkinjezellen für die Koordination der Feinmotorik verantwortlich sind, und Smad4 knockout Mäuse motorische Probleme aufzuzeigen, könnte vermutet werden, dass Fussel-15 und Fussel-18 möglicherweise bei der Regulation der Feinmotorik eine Rolle spielen, zudem Fussel-15 spezifisch in den Purkinjezellen exprimiert wird, welche bei den Smad4 knockout Mäusen betroffen sind. Eindeutige Hinweise auf die Funktion von Fussel-15 bzw. Fussel-18 in neuronalen Geweben könnten knockout Mäuse geben. Die Herstellung von knockout Mäusen ist jedoch sehr aufwändig. Deshalb haben wir beschlossen, die Funktion von Fussel zuerst in *Drosophila melanogaster* zu untersuchen. Die Fruchtfliege ist seit fast 100 Jahren ein beliebtes Labortier. Die Fliegen sind klein und lassen sich einfach züchten. Sie entwickeln sich in 10

Tagen vom Ei zur Fliege und vermehren sich rasant. Zudem ist das neuronale System von *Drosophila melanogaster* bereits bestens erforscht und die Herstellung von knockout Fliegen gestaltet sich schneller und einfacher als bei der Maus. Sequenzanalysen zeigten, dass es in *Drosophila* nur ein Fussel homologes Gen gibt. Dieses Gen (CG11093) liegt auf Chromosom 4 und wurde bislang noch nicht untersucht. In Kooperation mit Prof. Dr. Stephan Schneuwly (Lehrstuhl für Zoologie und Entwicklungsbiologie, Universität Regensburg) laufen bereits Vorarbeiten zur Herstellung von CG11093 knockout Fliegen. Erste Untersuchungen an embryonalen whole mounts von *Drosophila melanogaster* zeigten eine Expression von CG11093 in den Chordotonalorganen. Chordotonalorgane sind interne Streckrezeptoren und wichtige Bestandteile des Peripheren Nervensystems von *Drosophila melanogaster* (Diplomarbeit von Stephanie Esslinger, in Kooperation mit Prof. Dr. Stephan Schneuwly, Lehrstuhl für Zoologie und Entwicklungsbiologie, Universität Regensburg).

Dem Dpp (Decapentaplegic) Signalweg, welcher im humanen System dem BMP Signalweg entspricht, wird eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Peripheren Nervensystems von *Drosophila melanogaster* zugeschrieben (Rusten et al. 2002). Zudem wurde aufgeführt, dass das Dpp Zielgen Spalt an der Entwicklung der Chordotonalorgane beteiligt ist (Rusten et al. 2002), in denen, nach unseren Untersuchungen, auch CG11093 spezifisch exprimiert wird. Mit der Herstellung einer CG11093 knockout Fliege soll in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden, ob CG11093, als Ko-Repressor des Dpp Signalwegs, z.B. Einfluss auf das Zielgen Spalt hat und ob, durch den Verlust von CG11093, Veränderungen in der Anordnung oder der Anzahl der Chordotonalorgane zu beobachten sind. Wir erhoffen uns, mit den Untersuchungen von Fussel-15 am Modellsystem *Drosophila melanogaster*, die Funktion dieses Moleküls im Nervensystem zu verstehen.

Fussel-15, ein neuer Regulator der Wundheilung?

Interessanterweise konnten wir durch ein ausgedehntes Expressionsscreening bei physiologischen Prozessen eine starke Expression von Fussel-15 in Fibroblasten der frühen Wundheilung feststellen (Abbildung 25). Diese Ergebnisse bestätigten sich *in vitro* in einem Wundheilungskontraktionsmodell (Abbildung 27). Der TGF- β Familie wird im Wundheilungsprozess eine wesentliche Rolle zugeschrieben (siehe auch 3.6.1). Wir vermuteten deshalb, dass auch Fussel-15 hier einen wichtigen Regulator darstellen könnte. Weitere Untersuchungen zeigten ferner, dass die Expression von Fussel-15 in Fibroblasten von Keloid und Sklerodermie Patienten fehlreguliert ist. Fussel-15 wird dort, im Gegensatz zu normalen Fibroblasten, auch zu späten Zeitpunkten noch stark exprimiert (Abbildung 34B, Abbildung 35). Das klinische Bild dieser entzündlichen Erkrankungen ist seit langem bekannt, die Pathogenese jedoch noch nicht geklärt. Während bei der normalen Wundheilung die zeitlich begrenzte Aktivierung von Fibroblasten den Ersatz des zugrunde

gegangenen Gewebes durch Bildung einer kollagenreichen Matrix zum Ziel hat, kommt es bei diesen Erkrankungen durch eine Dysregulation der Fibroblastenfunktionen zu einer nicht-zielgerichteten, überschießenden Kollagensynthese. Klinische Beobachtungen haben gezeigt, dass Keloide und Sklerodermie gehäuft familiär auftreten. Bisher konnten jedoch noch keine genetischen Veränderungen mit den Erkrankungen in direkten Zusammenhang gebracht werden. Untersuchungen zeigten, dass Störungen in der Signaltransduktion von TGF- β zur Bildung von Keloiden und Sklerodermie beitragen können (siehe auch 3.6.2). Über die Rolle von BMPs in der Wundheilung ist bisher jedoch noch nichts bekannt.

Unser Ziel ist es zu klären, welche Funktion Fussel-15 in der normalen Wundheilung besitzt und welche Ursachen und Auswirkungen die Fehlregulation von Fussel-15 bei der überschießenden Wundheilung in Keloiden und der Sklerodermie hat. Aus den Ergebnissen, die bereits während meiner Promotion zu diesem Thema entstanden sind, leiteten sich folgende Hypothesen ab:

1. Fussel-15 spielt eine wichtige regulatorische Rolle in der Wundheilung.
2. Bei ZS und Keloid kommt es zu einer Fehlregulation von Fussel-15.

Es sollen nun die bereits vorhandenen Ergebnisse und Hypothesen zur Rolle von Fussel-15 in der Wundheilung diskutiert und ein Ausblick auf die geplanten Versuche gegeben werden.

Abbildung 43 fasst dazu die bisherigen Ergebnisse in einer Übersicht zusammen.

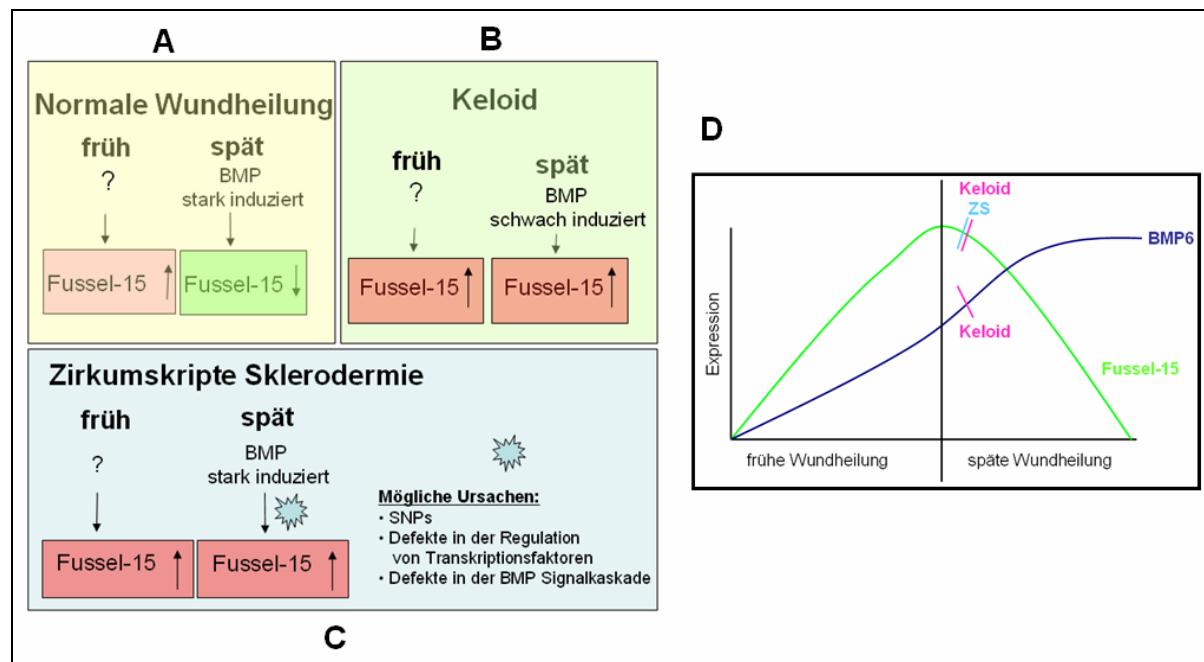


Abbildung 43 Übersicht über den Expressionsstatus von Fussel-15 in der normalen Wundheilung (A) und in Keloid (B) bzw. Zirkumskripter Sklerodermie (C). Expressionsstatus von Fussel-15 und BMP6 in der frühen und späten Wundheilung (D). Details im Text.

In der normalen Wundheilung wird Fussel-15 in frühen Stadien des Heilungsprozesses induziert (Abbildung 43 A, D). Der Induktor, welcher für den Anstieg der Fussel-15 Expression verantwortlich ist, konnte jedoch noch nicht ermittelt werden. In späten Stadien der Wundheilung kommt es zu einer Abnahme von Fussel-15 (Abbildung 43 A, D). Gleichzeitig konnten wir jedoch eine Induktion von BMPs (hauptsächlich BMP6) feststellen (Abbildung 43 D). Durch die Zugabe von Noggin bzw. Chordin (exogene Inhibitoren des BMP Signalwegs) konnte die Abnahme von Fussel-15 zu späten Zeitpunkten der Wundheilung im *in vitro* Kontraktionsmodell verhindert werden (Abbildung 37). Deshalb nehmen wir an, dass die Abnahme von Fussel-15 in der späten Wundheilung über BMP zu Stande kommt. Da wir zudem zeigen konnten, dass Fussel-15 in Fibroblasten den BMP Signalweg inhibieren kann (Abbildung 32), vermuten wir, dass Fussel-15 zu frühen Zeitpunkten der Wundheilung den BMP Signalweg als Ko-Repressor in Fibroblasten inhibiert. Zu späten Zeitpunkten, wenn ein gewisser Schwellenwert von bestimmten BMPs (hauptsächlich BMP6) überschritten wird, wird Fussel-15 über BMPs reprimiert (Abbildung 43 D). Wie die starke Induktion von BMPs in der späten Phase der Wundheilung zu Stande kommt, ist jedoch noch nicht bekannt.

Andere Studien zeigten in verschiedenen Tiermodellen, dass endogenes BMP7 in Mäusen mit akuten und chronischen Nierenfibrosen vermindert exprimiert vorliegt und durch die Zugabe von exogenem BMP7 die Progression der Fibrose aufgehalten werden konnte (Vukicevic et al. 1998; Hruska et al. 2000; Zeisberg et al. 2003a; Kalluri und Zeisberg 2003). Der zu Grunde liegende Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt.

Eine verminderte Expression, wie es für BMP7 in der Nierenfibrose beobachtet werden konnte, zeigte sich für BMP6 in Keloid (Abbildung 43 B). Wir glauben deshalb, dass möglicherweise bestimmte Schwellenkonzentrationen von bestimmten BMPs vorhanden sein müssen, um Fussel-15 inhibieren zu können (Abbildung 43 D). In Keloid könnte es zu einer veränderten Expression von Fussel-15 kommen, da die Schwellenkonzentration von BMP6, welche nötig ist, um Fussel-15 zu inhibieren, unseren *in vitro* Experimenten zu folge, nicht erreicht wird. Weitere Experimente sollen zeigen, ob in Analogie zu BMP7 in der Nierenfibrose, durch die Zugabe von exogenem BMP6 in Keloid, Fussel-15 erfolgreich inhibiert werden könnte. Falls Fussel-15 in Keloid durch die Zugabe von exogenem BMP6 inhibiert wird, wäre dies ein potentieller Therapieansatz für die Behandlung von Keloiden. Solloway et al., haben BMP6 knockout Mäuse generiert (Solloway et al. 1998). Diese weisen Probleme bei der Verknöcherung des Brustbeins auf. Es wurde jedoch noch nicht untersucht, ob diese Mäuse nach Verletzungen vermehrt Bindegewebe produzieren, wie es bei Keloid der Fall ist. Falls Untersuchungen zeigen, dass bei diesen Mäusen eine gestörte Wundheilung auftritt, könnten sie uns als *in vivo* Wundheilungsmodell dienen. Da nach unseren bisherigen Ergebnissen BMP6 für die späte Wundheilungsphase essentiell ist, vermuten wir, dass diese BMP6 knockout Tiere, in Analogie zu Patienten mit Keloid,

vermehrt Bindegewebe produzieren. Behandlungen dieser Mäuse mit exogenem BMP6 könnte dann zeigen, ob BMP6 die vermehrte Kollagensynthese reduzieren kann.

Bei der zirkumskripten Sklerodermie (ZS) ließ sich im Gegensatz zu Keloid eine starke Induktion von BMP6 nachweisen (Abbildung 43 C, D). Es konnte aber ebenfalls, wie es bei Keloid beobachtet wurde, keine Reduktion von Fussel-15 festgestellt werden (Abbildung 43 C, D). Wir gehen deshalb davon aus, dass der Mechanismus, der für die Fehlregulation von Fussel-15 in ZS verantwortlich ist, eine andere Ursache haben muss. Im Gegensatz zu Keloid, wo der Schwellenwert von bestimmten BMPs nicht erreicht wird, welcher nötig ist, um Fussel-15 zu inhibieren (Abbildung 38 A), könnte die Fehlregulation von Fussel-15 in ZS auf molekularer Ebene mehrere Ursachen haben. Neben Polymorphismen („SNPs“) im Fussel-15 Promotor, könnten Fehlregulationen von Transkriptionsfaktoren aber auch Veränderungen in der Regulation von anderen Molekülen der TGF- β oder der BMP Signalkaskade in Betracht kommen. Untersuchungen dazu werden im Anschluss an meine Promotion folgen. Es konnten jedoch bereits drei potentielle regulatorische Bereiche im Fussel-15 Promoter bestimmt werden, in denen bekannte SNPs (= single nucleotide polymorphism) zur Entstehung bzw. zum Verlust von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen führen. Ein möglicher SNP Lokus liegt dabei interessanterweise an einer Smad Bindestelle. Mittels Sequenzierung sollen diese Bereiche vergleichend in gesunden Spendern und ZS-Patienten untersucht werden. Möglicherweise würde ein Verlust dieser Smad Bindestelle in ZS erklären, weshalb Fussel-15 über BMP6 nicht mehr reprimiert werden kann und somit im Kontraktionsprozess zu späten Zeitpunkten noch stark exprimiert wird.

Zusammenfassend hoffen wir, dass uns diese Ergebnisse und die Untersuchungen, die in Zukunft folgen werden, dabei helfen, die Rolle von Fussel-15 in der Wundheilung zu verstehen. Es hat sich gezeigt, dass nicht nur der TGF- β Signalweg in der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielt, sondern auch der BMP Signalweg für die Wundheilung wichtig ist, welcher in diesem Zusammenhang bisher noch nicht untersucht wurde. Zudem hoffen wir mit unseren molekularen Untersuchungen zu ZS und Keloid einen Beitrag leisten zu können, um die Ursachen der Krankheiten besser zu verstehen, da die Heilung dieser bis heute noch nicht möglich, bzw. die Chancen einer erfolgreichen Behandlung nur sehr gering sind. Die hohe Rezidivrate beim Keloid macht operative Eingriffe sehr schwierig. Umso wichtiger ist es, neue, möglichst schonende Behandlungsmethoden zu entwickeln. Deshalb sind Untersuchungen dieser Krankheiten auf molekularer Ebene besonders wichtig, um mögliche Genmutationen oder Regulationsveränderungen daran beteiligter Gene festzustellen. Diese Erkenntnisse könnten dann dazu beitragen, neue Medikamente für eine gezielte Therapierung zu entwickeln. Darüber hinaus könnte die Aufklärung der Signalkaskaden von BMP bzw. TGF- β sowie deren physiologische Bedeutung in der normalen Wundheilung inklusive deren Veränderungen in Wundheilungserkrankungen, für die Entwicklung neuer

spezifischer Arzneistoffe von Bedeutung sein. So wären z.B. TGF-Agonisten bei hyperproliferativen Hauterkrankungen, TGF-Antagonisten bei der Wundheilung denkbar. Entsprechendes gilt für Wirkstoffe, die den TGF- β /BMP-Stoffwechsel modifizieren oder die Signalwege beeinflussen. Die Vielzahl von Eingriffsmöglichkeiten auf den verschiedenen Stufen der Signalkaskade eröffnet viel versprechende Perspektiven bei der Suche nach neuen Wirkstoffen. In Folgestudien werden zudem erste Aspekte einer möglichen therapeutischen Beeinflussung der Fussel-15 Expression durch z.B. BMP6 Applikation untersucht. Hierzu sind Untersuchungen am *in vitro* Modell und an gesunder Haut (Material wird aus dem Sicherheitsabstand bei Operationen des malignen Melanoms gewonnen) geplant. Wesentlich ist hierbei die Fragestellung, ob ein späteres Eingreifen über topische Applikation (Cremes oder ähnliches) möglich ist.

Teil II

6 Einleitung Teil II

6.1 Die MIA Familie

Neben MIA (Melanoma Inhibitory Activity), welches spezifisch im Knorpel exprimiert wird und im malignen Melanom eine Rolle spielt, wurden kürzlich weitere MIA Familienmitglieder charakterisiert. Dazu gehört das MIA-homologe Protein OTOR (MIAL, FPD), welches sehr spezifisch im Auge und Innenohr exprimiert wird. Zwei weitere MIA-homologe Proteine sind MIA-2 und TANGO. Expressionsanalysen zeigten eine Leber-spezifische Expression von MIA-2, wohingegen TANGO ubiquitär exprimiert wird mit Ausnahme von Zellen des hämatopoetischen Systems. Bei allen MIA Familienmitgliedern handelt es sich um sezernierte Moleküle mit einer SH3-Domänen Struktur. Diese Domäne war bislang nur für zytoplasmatische Proteine beschrieben und dient unter anderem zur Interaktion mit anderen Proteinen. Folgende Tabelle 4 gibt eine kurze Übersicht über die MIA Familie.

	MIA	OTOR	MIA2	TANGO
Akzessionsnummer	GI3927997	GI13654075	GI7708219	US Patent, WO 00/12762
Chromosom	19q13	20p11	14q13	1q42
Homologie zu MIA (Proteinsequenz)	100%	45,3%	34,3%	36,4%
konservierte Strukturmotive	SH3 Domäne, konservierte Cysteine	SH3 Domäne, konservierte Cysteine	SH3 Domäne, konservierte Cysteine	SH3 Domäne, konservierte Cysteine
sezerniertes Protein	ja	ja	ja	ja
Molekulargewicht	11kDa	15kDa	60kDa	14kDa
Expression	Knorpel, Melanomzellen	Auge, Innenohr	Leber	in allen Geweben; nicht in Zellen des hämatopoetischen Systems
Regulation in Tumoren	Im Melanom verstärkt exprimiert Diagnostischer Marker für das Maligne Melanom	unbekannt	In Lebertumoren vermindert exprimiert	unbekannt

Tabelle 4 Überblick über die MIA Familie.

Ein Hauptfokus unserer Arbeitsgruppe liegt auf der Erforschung des Proteins MIA (melanoma inhibitory activity). Im Rahmen dieser Studien wurden in unserer Gruppe zwei weitere homologe Proteine, MIA2 und TANGO, entdeckt (Bosserhoff et al. 2003a; Bosserhoff et al. 2004). Die funktionelle Charakterisierung von TANGO war Aufgabe meiner Promotion und folgt im Ergebnisteil II. Lediglich das vierte homologe Protein OTOR, auch bekannt unter dem Namen MIA-L (MIA-like) wurde von anderen Gruppe identifiziert und charakterisiert (Rendtorff et al. 2001; Cohen-Salmon et al. 2000; Robertson et al. 2000). Nachfolgend soll kurz über die Rolle von MIA im Melanom, über die Funktion von MIA2 in der Leber und über die Entdeckung und Expression von TANGO berichtet werden.

6.1.1 Die Rolle von MIA im malignen Melanom

Das maligne Melanom (Schwarzer Hautkrebs) ist ein bösartiger Tumor, der von Pigmentzellen (Melanozyten) ausgeht und sich überwiegend an der Haut manifestiert.



Abbildung 44 Beispiele für maligne Melanome.

1. knotiges Melanom
 2. oberflächlich spreitendes Melanom
 3. Melanom unter dem Fingernagel
 4. oberflächlich spreitendes Melanom
- (Klinik für Dermatologie u. dermatol. Allergologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Weltweit ist eine Zunahme des malignen Melanoms zu beobachten. Frühzeitig diagnostizierte Melanome können operativ meist erfolgreich entfernt werden. Charakteristisch für diesen Tumor ist jedoch eine frühe Tendenz zur Metastasierung was eine ungünstige Prognose zur Folge hat. Das maligne Melanom ist etwa für 90 % der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich. Über die molekularbiologischen Veränderungen bei der Entstehung von Melanomen aus Melanozyten ist noch relativ wenig bekannt. Auf dem Weg vom Melanozyt zur Melanomzelle wird die Proliferations- und Apoptose-Kontrolle außer Kraft gesetzt, so dass es zu einer unkontrollierten Vermehrung von Melanomzellen kommen kann. Damit es zur Metastasierung dieser Tumorzellen kommen kann, müssen weitere Faktoren, die für die Beweglichkeit, das Attachment, die Matrixdegradation oder für die Immunabwehr wichtig sind, verändert sein. MIA (melanoma inhibitory activity), ein Protein, das ausschließlich in Melanomzellen und nicht in Melanozyten exprimiert wird (Blesch et al. 1994; Bosserhoff et al. 1996), gilt bei der Regulation der Melanomprogression dabei als Schlüsselprotein. Ursprünglich wurde das Protein aus der Melanomzelllinie HTZ19 isoliert

und aufgereinigt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Hirnmetastase mit sehr langsamer Progression (Bogdahn et al. 1987). Auf Melanomzellen *in vitro* wirkt MIA stark proliferationshemmend (Blesch et al. 1994; Bogdahn et al. 1989). Diese Eigenschaft gab ihm auch den Namen „*melanoma inhibitory activity*“. Folgestudien, in denen die Funktion von MIA genauer untersucht wurden, zeigten jedoch, dass MIA bei der Melanomentwicklung und Progression beteiligt ist (Bosserhoff et al. 2003b; Stoll et al. 2000; Stoll et al. 2001; Stoll et al. 2003). Das MIA-Gen im Menschen liegt auf Chromosom 19 (q13.32-q13.33). MIA wird als Präprotein synthetisiert und enthält 131 Aminosäuren. Es wird aus der Zelle über eine Signalpeptidsequenz von 24 Aminosäuren hinaustransportiert. Das reife Protein besteht aus 107 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 11 kDa.

Analysen zur Protein-Protein-Wechselwirkung durch Ko-Immunopräzipitation zeigten, dass dieses sezernierte Molekül an Fibronectin und Laminin binden kann und dadurch auf diesen Matrixmolekülen die Bindungsstellen der Zelloberflächenmoleküle (Integrine) maskieren kann (Bosserhoff et al. 2003b; Stoll et al. 2001). Neue Studien beweisen, dass MIA dabei direkt mit Integrin alpha4 beta1 und alpha5 beta1 interagieren kann und somit die Bindung zwischen diesen Integrinen und Fibronectin blockiert (Bauer et al. 2006). Die Sekretion von MIA ermöglicht Melanomzellen daher das Ablösen von der umgebenden Matrix und führt so zu einer gesteigerten Mobilität dieser Zellen (Abbildung 45). Dadurch wird schließlich die Metastasierung von Melanomzellen begünstigt.

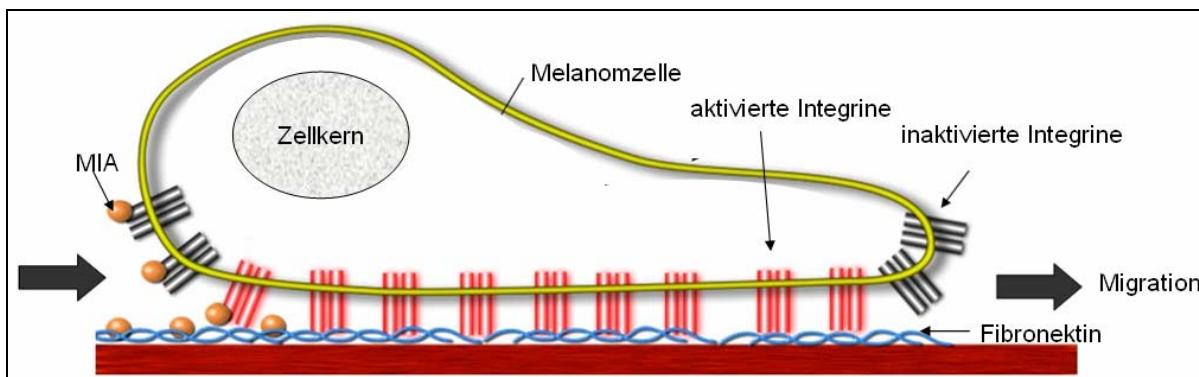


Abbildung 45 Die Funktion von MIA während der Zellwanderung. MIA interagiert mit Fibronectin und Integrinen. Dabei führt die Inhibition der Integrin-Matrix Bindung und die Inhibition der Integrin Aktivität durch MIA zur Zellmigration (modifiziert nach (Bosserhoff 2005)).

Als Tumormarker werden im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten zirkulierende Moleküle benutzt, deren Auftreten bzw. Konzentrationsänderung in Beziehung mit der Entstehung und dem Wachstum von malignen Tumoren steht. Im Vergleich zwischen Haut, melanozytären Nävi (Muttermalen), primären Melanomen und Melanommetastasen korreliert der Anstieg der MIA-Expression mit der Progression der Erkrankung. MIA-Serumwerte können dabei mit Hilfe eines quantitativen, nicht radioaktiven ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) gemessen werden. Dieser Nachweis auf MIA-Expression im Serum wird seit einiger Zeit

erfolgreich bei Patienten mit malignen Melanomen durchgeführt, um die Prognose, die Metastasierung und das Ansprechen der Therapie dieser Patienten zu verfolgen.

6.1.2 Die spezifische Rolle von MIA2 in der Leber

MIA2 wurde erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe als MIA homologes Protein entdeckt (Bosserhoff et al. 2003a). Im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern weist MIA2 am C-Terminus eine verlängerte Proteinsequenz von 422 Aminosäuren auf, die bisher bei keinen bekannten Proteinen gefunden wurde und dessen Funktion auch noch nicht weiter analysiert worden ist. Im Ganzen ist MIA2 522 Aminosäuren lang und besitzt wie alle Mitglieder der MIA Familie eine Signalpeptidsequenz zur Sezernierung in den extrazellulären Bereich. Es konnte nachgewiesen werden, dass MIA2 sehr spezifisch in der Leber exprimiert wird, und dass diese leberspezifische Expression auf einer HNF-1 Bindestelle im MIA2 Promotor beruht. HNF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in der Leber, dem Verdauungstrakt, der Bauchspeicheldrüse und der Niere exprimiert wird und für die Regulation vieler Gene insbesondere der Leber, verantwortlich ist. Eine Mutation an dieser Bindestelle führt z.B. zu einem kompletten Verlust der Promotor Aktivität in der Leberzelllinie HepG2. Weitere Bindestellen im MIA2 Promotor sind Konsensus Bindestellen für Smads und STAT3. Entsprechend dieser Bindestellen konnte gezeigt werden, dass die Liganden IL-6 (STAT3 Kaskade) und TGF-β (Smad Kaskade) die Transkription von MIA verstärken können. IL-6 und TGF-β werden unter anderem für die Leberregeneration benötigt. Sie sind für die verstärkte Expression verschiedener Gene verantwortlich, die während der Leberregeneration notwendig sind (Cressman et al. 1996; Kovalovich et al. 2000; Streetz et al. 2001). Beide Zytokine werden daher in chronischen Lebererkrankungen vermehrt exprimiert. Zudem hat sich herausgestellt, dass auch MIA2 in Lebergeweben von Hepatitis C Patienten verstärkt exprimiert wird. Dabei sind die MIA2 Expressionswerte bei Patienten mit schwerwiegender Fibrose oder starker Zirrhose signifikant höher als bei Patienten mit schwacher Fibrose oder leichter Zirrhose. MIA2 könnte deshalb als potentiell neues akute Phase Protein Verwendung finden, da die Expression mit der Stärke der Fibrose korreliert. In Leberzellen hingegen kommt es zu einer verminderten Expression von MIA2 im Vergleich zu Lebernormalgewebe (Hellerbrand et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MIA2 sehr spezifisch in der Leber exprimiert wird. In entzündlichen Lebererkrankungen wie Fibrose oder Zirrhose steigt die Expression von MIA2 mit Zunahme der Erkrankung stark an, in Tumoren hingegen kommt es im Vergleich zu normalem Lebergewebe zu einer verminderten Expression. Man kann deshalb davon ausgehen, dass MIA2 verschiedene Funktionen besitzt. Zum einen wirkt MIA2 als Tumorsuppressor, zum anderen spielt MIA2 bei Entzündungsprozessen eine wesentliche Rolle. Weitere Studien müssen deshalb durchgeführt werden, um die genaue Funktion und

Regulation der MIA2 Expression in der Leberfibrose bzw. in der Karzinogenese zu verstehen.

6.1.3 Die Entdeckung von TANGO und Vordaten

TANGO wurde, ebenfalls wie MIA2, in unserer Arbeitsgruppe als neues MIA homologes Molekül entdeckt (Bosscherhoff et al. 2004). Die humane TANGO Sequenz wurde jedoch schon früher gefunden und von einer anderen Gruppe patentiert (US Patent WO 00/12762). Der Name wurde in Übereinstimmung mit dem Patent, von dem es bis heute jedoch keine Referenz gibt, beibehalten. TANGO liegt auf Chromosom 1q42, besteht aus 103 Aminosäuren und besitzt zusätzlich, wie alle MIA Homologen, eine sekretorische Signalsequenz. Im Gegensatz zu den anderen MIA Familienmitgliedern, ist TANGO das einzige Protein, welches ein sehr breites Expressionsmuster aufweist (Bosscherhoff et al. 2004). Ist die Expression der anderen Mitglieder meist auf wenige Organe beschränkt, konnte TANGO fast in allen Geweben nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellt dabei das Blutsystem dar. Blutzellen exprimieren im nicht-adhärenen Zustand kein TANGO. Meine Aufgabe war es, die funktionelle Rolle von TANGO zu erforschen. Dabei sollte zum einen festgestellt werden, ob TANGO, in Analogie zu MIA und MIA2 auch eine Rolle in Tumoren spielt, zum anderen sollte untersucht werden, welche Funktion TANGO in nicht tumorösen Geweben hat.

7 Ergebnisse Teil II

In Analogie zu MIA bzw. MIA2, für die eine Rolle bei der Progression des malignen Melanoms bzw. eine Funktion in Leberkarzinosen bereits bekannt ist, sollte geklärt werden, ob TANGO auch dort eine Rolle spielt. Unsere ersten Untersuchungen im Hinblick auf einen vergleichbaren Einfluss von TANGO in der Tumorigenese wurden am malignen Melanom durchgeführt. Anschließend folgten Analysen an weiteren Tumoren wie dem Kolon- und Leberkarzinom.

7.1 TANGO als Tumorsuppressor des malignen Melanoms

7.1.1 Reduktion von TANGO während der Melanomprogression

Neun humane Melanom Zelllinien (Abbildung 46) wurden auf die Expression von TANGO mittels quantitativer RT-PCR analysiert und mit normalen humanen primären Melanozyten (NHEMs) verglichen. Dabei zeigte sich eine starke Reduktion von TANGO in allen Melanom Zelllinien im Vergleich zu den NHEMs. In den Zelllinien, die aus Metastasen des malignen Melanoms stammen (Mel Im, SK Mel 3, SK Mel 28 und HTZ19) war die Expression von TANGO jedoch sehr viel stärker reduziert als in Zelllinien aus primären Melanomen (Mel Ei, HMB2, Mel Ho, Mel Wei und Mel Juso).

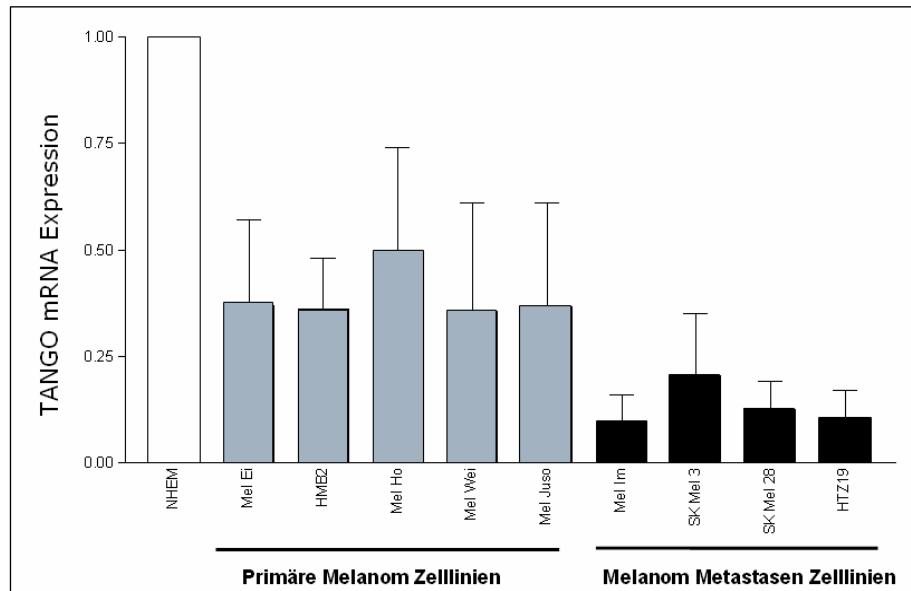


Abbildung 46

Expression von TANGO in Melanom Zelllinien auf mRNA Ebene im Vergleich zu normalen humanen epithelialen Melanozyten (NHEM). Zelllinien aus Melanom Metastasen zeigen dabei eine stärkere Reduktion von TANGO als Zelllinien aus primären Melanomen.

Auf Protein-Ebene konnte keine Expression in den Melanom Zelllinien detektiert werden im Vergleich zu vier NHEM Proben von verschiedenen Spendern (Abbildung 47). Der Grund dafür ist vermutlich die zu geringe Sensitivität des TANGO Antikörpers und die geringen Mengen an TANGO Protein, die in den Tumor Proben vorhanden sind.

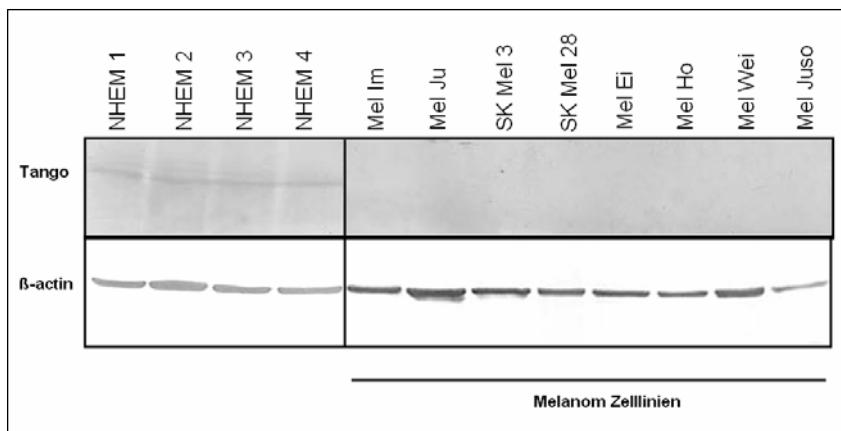


Abbildung 47 Expression von TANGO in Melanom Zelllinien auf Protein-Ebene im Vergleich zu vier verschiedenen Melanozyten (NHEMs) von verschiedenen Spendern. β -Aktin dient als Ladekontrolle.

Um die Reduktion von TANGO auch an verschiedenen Tumorgeweben *in situ* zu bestätigen, wurde RNA nach Mikrodissektion von Melanomgewebeproben isoliert und mittels quantitativer RT-PCR im Vergleich zu normaler Haut (Basalzellschicht) analysiert. Es wurde eine Reduktion von TANGO in allen Melanomgeweben im Vergleich zu Zellen aus der Basalzellschicht beobachtet (Abbildung 48). Eine besonders starke Reduktion von TANGO konnte jedoch in den Fernmetastasen festgestellt werden, wohingegen die Proben aus primären malignen Melanomen nur einen sehr geringen Rückgang der TANGO Expression verzeichneten, was uns vermuten ließ, dass eine starke Reduktion von TANGO mit der Metastasierung korreliert.

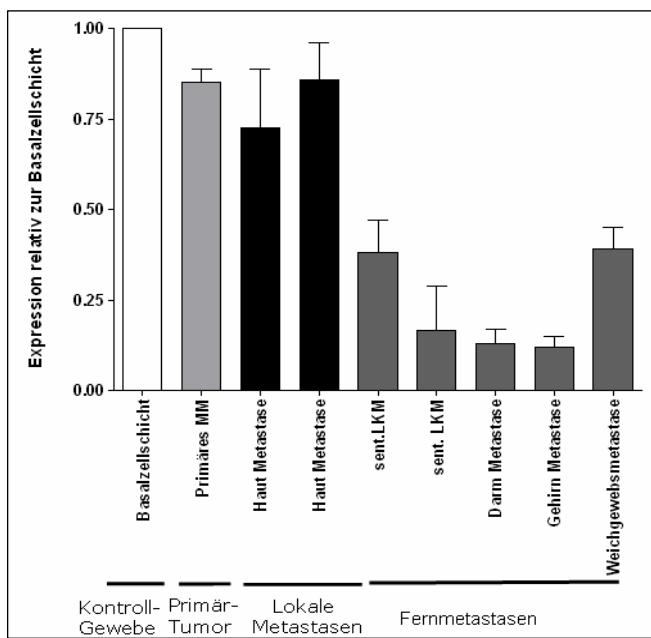


Abbildung 48 Expression von TANGO im Primärtumor, Lokalen- und Fernmetastasen zeigen eine Reduktion von TANGO im Vergleich zur Basalzellschicht. Eine verstärkte Reduktion von TANGO ist in den Fernmetastasen zu erkennen.

Immunhistologische Untersuchungen an Paraffinschnitten von Melanom Patienten bestätigten ebenfalls die Reduktion von TANGO im Vergleich zur Expression von TANGO in normaler Haut. In primären Tumoren und in der invasiven Tumorfront kam es dabei zu einer

Reduktion von TANGO, wo hingegen in Melanom Metastasen die Expression von TANGO nicht mehr detektierbar war (Abbildung 49).

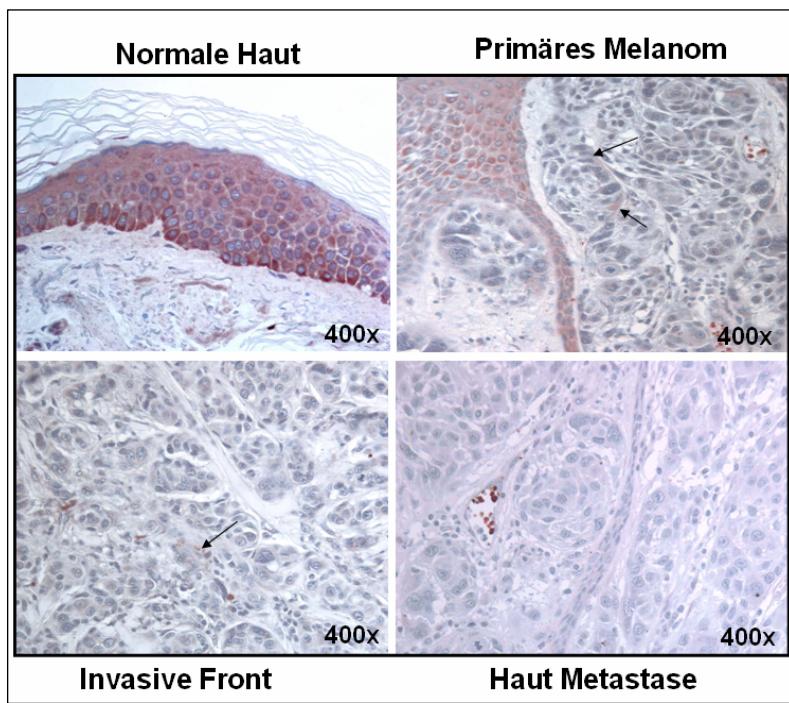


Abbildung 49

Immunhistochemie von TANGO an Geweben von Melanom Patienten zeigt eine Reduktion von TANGO im Vergleich zur normalen Haut.

7.1.2 Expression von TANGO in verschiedenen Nävus Formen

Als Nächstes wurde die Expression von TANGO in verschiedenen Nävi untersucht. Ein Nävus ist die allgemeine Bezeichnung für eine umschriebene, gutartige Fehlbildung der Haut, bei der normale Zellen oder Gewebe vermehrt, vermindert oder etwas ungleichmäßig vorkommen. Die häufigsten Fehlbildungen sind die bräunlich eingefärbten Nävi der pigmentbildenden Zellen (Pigmentnävi), die durch die umgangssprachlichen Begriffe wie „Muttermal“ oder „Leberfleck“ weitläufig bekannt sind. Sie stellen aber nur eine bestimmte Unterart der Nävi dar.

Es gibt noch viele andere, seltener Arten von Nävi, die nicht aus pigmentbildenden Melanozyten oder Nävuszellen bestehen, sondern aus Blutgefäßzellen, Bindegewebzellen, Drüsenzellen oder anderen Zellen, und dementsprechend einen völlig anderen Aspekt haben. Die Pigmentnävi lassen sich in verschiedene Subgruppen einteilen. Es gibt melanozytäre Nävi (aus normalen Melanozyten), epidermale melanozytäre Nävi (in der Epidermis), dermale melanozytäre Nävi (in der Dermis), Nävuszellnävi (aus Nävuszellen) und Nävi aus atypischen Melanozyten bzw. atypischen Nävuszellen. Zu den epidermalen melanozytären Nävi zählen z.B. Leberflecken oder Altersflecken. Zu den tiefer gelegenen dermalen Nävi gehören der Mongolenfleck oder der sogenannte Blaue Nävus. Zu den Nävuszellnävi gehören der Junktionsnävus, der Compound Nävus, oder der Spitznävus. Nävuszellnävi werden nicht von Melanozyten gebildet, sondern aus Nävuszellen, einer

Zellart, die den Melanozyten sehr ähnlich ist, und ebenfalls braunes Pigment (Melanin) bilden kann. Sie unterscheiden sich aber von den Melanozyten durch ihre kugelige bis spindelige Form und Anordnung in typische Nester. Außerdem können sie ihr Pigment nicht mehr an die umliegenden Hautzellen abgeben, da ihnen die dafür benötigten Dendriten fehlen. Je tiefer sie in die Dermis absinken, desto eher verlieren sie ihre Fähigkeit zur Melaninsynthese.

Zu den atypischen Nävuszellen zählt z.B. der dysplastische Nävus. Im Gegensatz zu den anderen derartigen Hautveränderungen kommt es hier zu einer Vermehrung von atypischen Zellen mit unregelmäßigem Aussehen. Dysplastische Nävi gelten als Vorläufer des oberflächlich spreitenden Melanoms.

Nävuszellnävi werden im jugendlichen Alter erworben und machen eine typische Entwicklung durch, wobei nicht zwingend alle Stadien durchlaufen werden müssen. Am Ende seiner Entwicklung bildet sich der Nävuszellnävus auch häufig wieder vollständig zurück (ausgenommen dermale Nävi des späten Erwachsenenalters).

Nach ihrer Lage in den Schichten der Haut werden die Nävuszellnävi (NZN) in die folgenden drei Unterarten eingeteilt (entsprechend den Stadien ihrer Entwicklung).

1. Stadium: Junktionsnävus

Im ersten Stadium wächst ein NZN genau an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis (die so genannte Junktionszone) zu einer scharf begrenzten, punktförmigen, braunen oder schwarzen Hautveränderung. Die ersten Junktionsnävi entstehen im Laufe der Kindheit.

2. Stadium: Compound-Nävus

Im nächsten Stadium wandert der NZN etwas tiefer in die Dermis hinab und dehnt sich somit in beide Hautschichten (Epidermis und Dermis) aus, wodurch die gesamte Veränderung dicker wird und vermehrt erhabene und knotige Anteile aufweist. Die Oberfläche der Läsion kann zerklüftet erscheinen. Die Pigmentierung wird in der Regel etwas unregelmäßiger und heller. Der Übergang zu Compound-Nävi findet in der Regel während der Pupertät statt.

3. Stadium: Dermaler Nävus

Im letzten Stadium der Entwicklung nimmt der NZN eine große, runde, halbkugelige Gestalt an. Seine Nävuszellen sind vollständig in die Dermis abgesunken. Meist hat er sein braunes Pigment verloren und ist mit einigen Haaren besetzt. Gegen Ende der Entwicklung kommt es zunehmend zu einer bindegewebigen Umwandlung. Die großen, kosmetisch oft störenden dermalen Nävi treten typischerweise im frühen Erwachsenenalter auf.

Da Personen, die eine hohe Anzahl von Nävuszellnävi haben und dysplastische Nävuszellnävi besitzen, ein erhöhtes Risiko tragen, im Verlaufe ihres Lebens an einem malignen Melanom zu erkranken, war es für uns von Bedeutung die Expression von TANGO bereits in diesen Vorstadien des malignen Melanoms zu untersuchen.

Eine geringfügige Reduktion von TANGO zeigte sich dabei bereits schon in verschiedenen Formen pigmentierter, gutartiger Nävi (Compound Nävus, Junctionaler Nävus, Blauer Nävus) und atypischer Nävi (verschiedene dysplastische Nävi) (Abbildung 50) im Vergleich zur normalen Haut (Abbildung 49). Die Reduktion in verschiedenen Pigmentnävi war jedoch weniger stark wie wir es zuvor für das Melanom nachweisen konnten. Interessanterweise beobachteten wir beim Blauen Nävus eine stark positive TANGO Färbung sowohl in epithelialen als auch in dermalen Bereichen, wohingegen in verschiedenen dysplastischen Nävi, die zu den atypischen Nävi zählen, eine geringere TANGO Expression in der Dermis (gestrichelter Pfeil) gegenüber der Epidermis (schwarzer Pfeil) detektiert werden konnte.

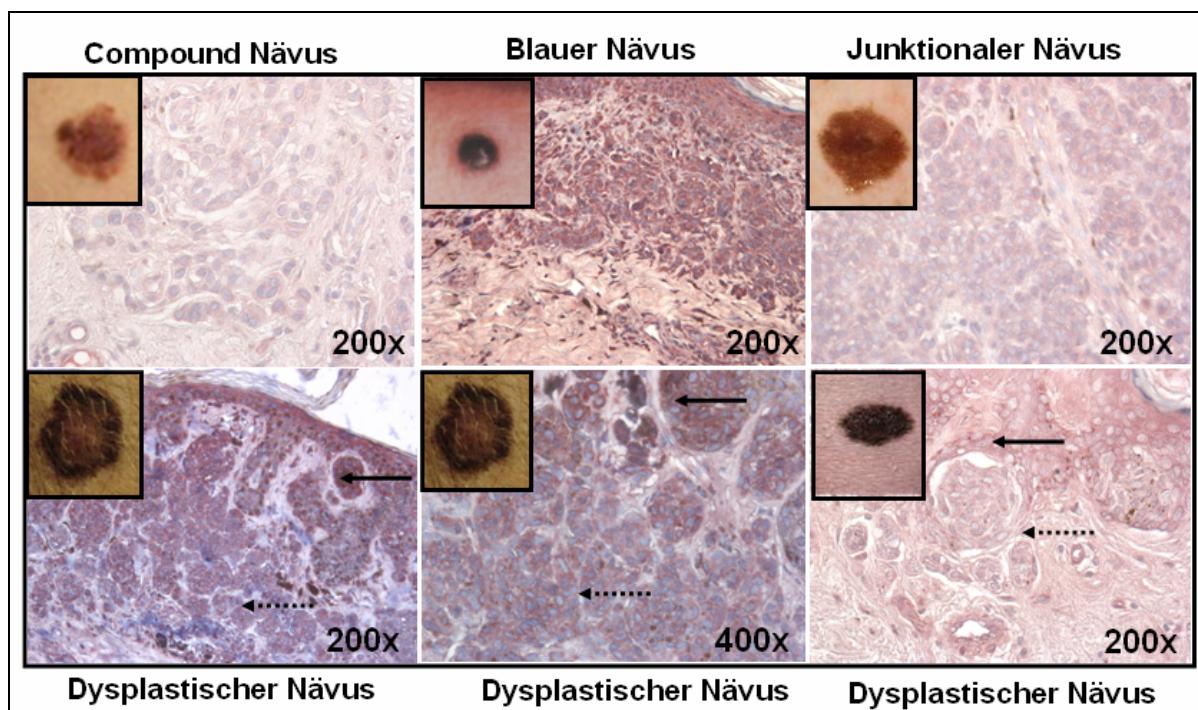


Abbildung 50 Immunhistochemie von TANGO an verschiedenen Nävus Formen. TANGO konnte in allen untersuchten Pigmentnävi detektiert werden, wobei im Vergleich zur normalen Haut eine leichte Abnahme von TANGO im Nävus zu erkennen war. Dysplastische (atypische) Nävi weisen in dermalen Bereichen eine schwächere TANGO Expression auf als in epidermalen Bereichen.

7.1.3 Funktionelle Relevanz von TANGO im malignen Melanom

Um die funktionelle Rolle von TANGO im Melanom zu analysieren, stellten wir die Expression von TANGO in Tumorzellen durch stabile Transfektion in Mel Im Melanomzellen wieder her. Eine erfolgreiche Re-Expresson von TANGO in den Zellklonen K1, K3 and K5 wurde durch quantitative RT-PCR verifiziert (Abbildung 51), wohingegen keine Unterschiede der TANGO Expression in kontroll-transfizierten Mel Im Zellen (mock1), im Vergleich zu normalen Mel Im Zellen, zu finden waren. Die Expressionsstärke von TANGO, gemessen in normalen humanen epithelialen Melanozyten (NHEMs) und normalen humanen Keratinozyten, wurde hinzugefügt um den Unterschied in der TANGO Expression zwischen

normalen Zellen, Melanom Zellen und TANGO re-exprimierenden Melanom Zellen darzustellen.

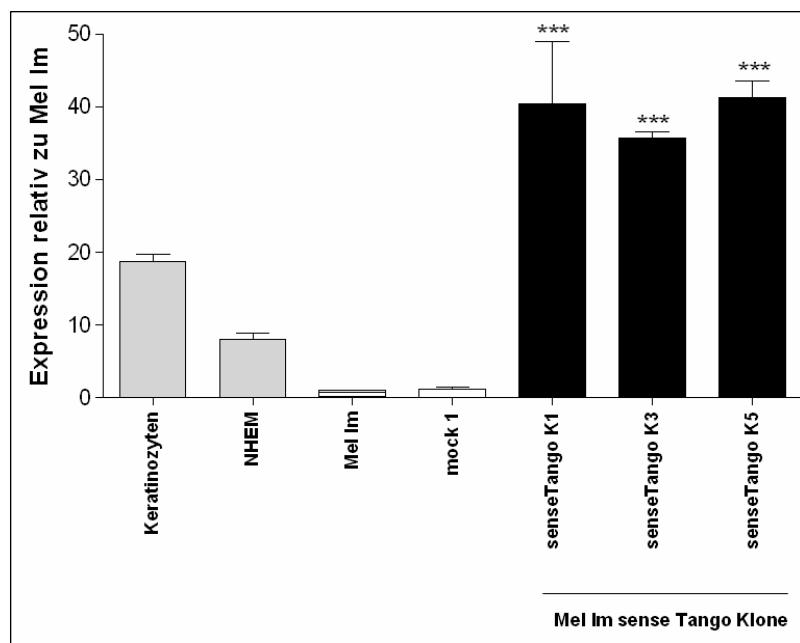


Abbildung 51 Re-Expression von TANGO in sense TANGO Klonen auf mRNA Ebene. Durch stabile Transfektion eines TANGO Expressionskonstrukts in die Melanomzelllinie Mel Im konnte eine starke Re-Expression von TANGO erzielt werden.

Auf Protein Ebene konnte die TANGO Re-Expression in den Zellklonen ebenfalls bestätigt werden im Vergleich zu der parentalen Mel Im Zelllinie und der mock-transfizierten Mel Im Kontrolle, in denen keine TANGO Expression detektiert werden konnte (Abbildung 52).

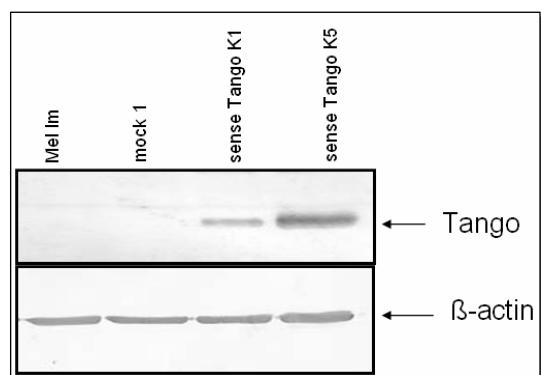


Abbildung 52 Re-Expression von TANGO in stabilen TANGO Zellklonen auf Protein Ebene. β -Aktin dient als Ladekontrolle.

Um die funktionelle Relevanz von TANGO zu studieren, wurden verschiedene funktionelle Tests mit den TANGO re-exprimierenden Zellklonen durchgeführt. Mit einem sogenannten „Anchorage-Independent Growth Assay“ wurde das matrixunabhängige Wachstumsverhalten der Zellklone bestimmt (siehe unter 9.3.4.13). Es folgten Invasions- (siehe unter 9.3.4.6) und Migrationsassays (siehe unter 9.3.4.7) um das Tumorpotential dieser Zellklone genauer zu analysieren. Die Durchführung dieser Assays wird in den erwähnten Kapiteln im Methodenteil beschrieben.

Zuerst untersuchten wir mittels eines „Anchorage-Independent Growth Assays“ ob, das Tumorpotential von Melanomzellen durch TANGO beeinflussbar ist. Wie in Abbildung 53

gezeigt, führt eine Re-Expression von TANGO in den senseTANGO Klonen K1, K3 und K5 zu einem verminderten Koloniendurchmesser, im Vergleich zur parentalen Mel Im Zelllinie bzw. zur mock1 Kontrolle. Im Verlauf der zehntägigen Inkubation dieser Versuchsreihe änderte sich nur der Durchmesser der Kolonien zwischen Kontrollgruppe und den Klonen, die Anzahl der Kolonien blieb identisch. Dies zeigte, dass durch TANGO die Fähigkeit von Tumorzellen matrix-unabhängig zu wachsen, signifikant vermindert wurde.

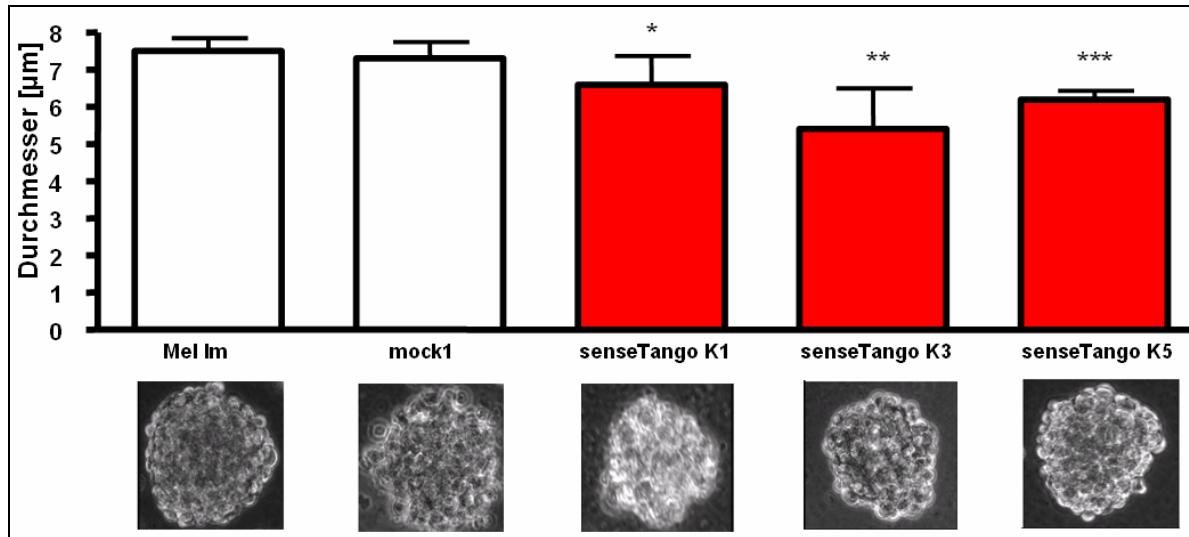


Abbildung 53 “Anchorage Independent Growth Assay” zur Bestimmung des matrix-unabhängigen Wachstumsverhaltens der TANGO re-exprimierenden Zellklone.

Des Weiteren wurde der Einfluss der TANGO Re-Expression auf das Migrationsverhalten der Zellen analysiert. Wie in Abbildung 54 gezeigt, stellen die TANGO re-exprimierende Klonen im Vergleich zu den Kontrollen ein reduziertes Migrationsverhalten dar, welches mittels eines Gelatine-beschichteten Boydenkammerassays bestimmt wurde.

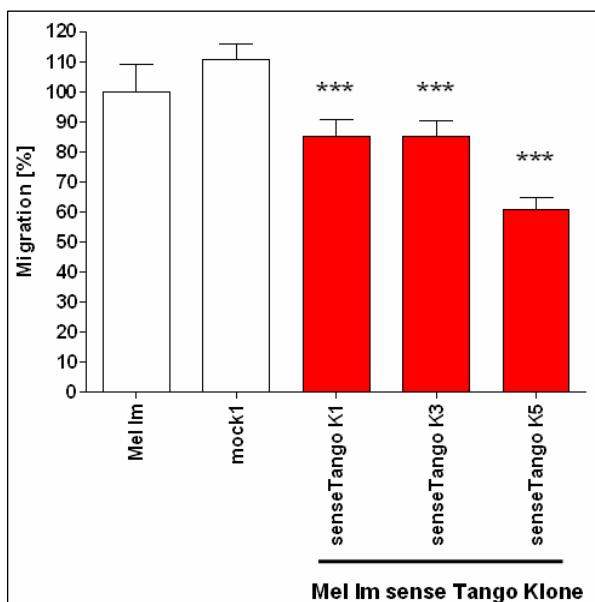


Abbildung 54 Migrationsassay der sense TANGO Klonen. Die TANGO re-exprimierenden Zellklone zeigen im Vergleich zu der Ursprungszelllinie Mel Im und der mock1 Kontrolle ein signifikant vermindertes Migrationsverhalten auf.

Um das Migrationsverhalten von Zellen zu bestimmen, wurde zusätzlich ein weiterer Test durchgeführt, ein sogenannter Wundheilungsassay, auch Scratchassay, genannt. Hierbei beobachtet man die Zeit der Zellen, die sie benötigen, um nach einem „Scratch“ in der Zellkulturschale wieder in dieses Areal einzuwandern. Ebenso wie wir es für das Migrationsverhalten der Klone mittels Boydenkammerassay zeigen konnten, ergab sich auch hier ein verlangsamtes Migrationsverhalten der sense TANGO Klone im Vergleich zu den Kontrollen Mel Im und mock1 (Abbildung 55).

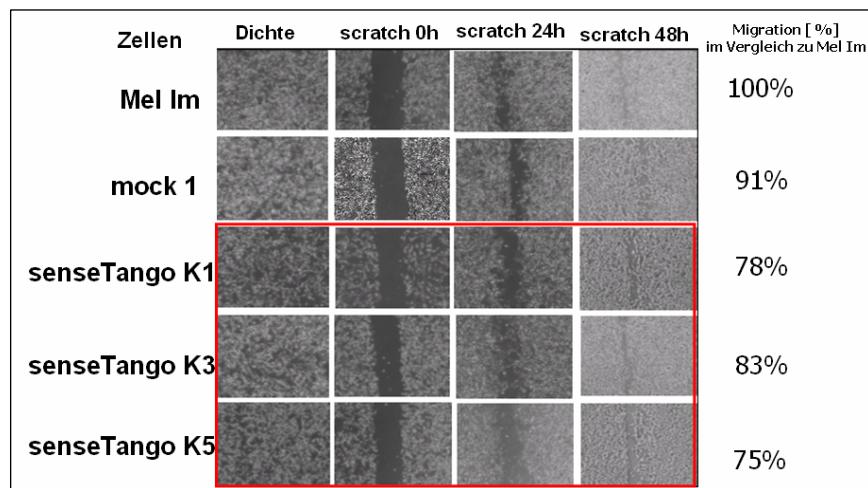


Abbildung 55

Scratchassay der sense TANGO Klone. Es zeigte sich eine verlangsamte Migrationsfähigkeit der sense TANGO Klone im Vergleich zu den Kontrollen Mel Im und mock1.

Zusätzlich wurde der Einfluss der TANGO Re-Expression auf das Invasionsverhalten der Zellen analysiert. Die TANGO re-exprimierenden Klone zeigten dabei im Vergleich zu den Kontrollen ein stark reduziertes Potential durch das Matrikel in einem Boydenkammerassay zu invadieren (Abbildung 56).

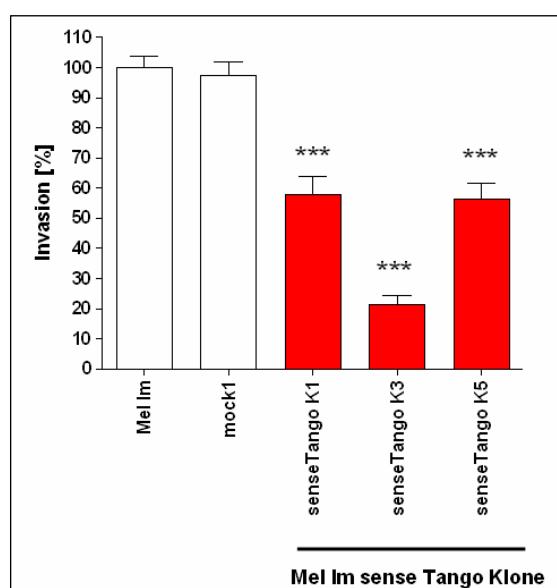


Abbildung 56 Invasionsassay der sense TANGO Klone. Die TANGO re-exprimierenden Zellklone zeigen im Vergleich zu der Ursprungszelllinie Mel Im und der mock1 Kontrolle ein deutlich verminderter Invasionsverhalten auf.

Zusätzlich generierten wir antisense Mel Im Zellklone mit einem Verlust von TANGO im Vergleich zur ursprünglichen Mel Im Zelllinie, bei der TANGO noch detektierbar war (Arndt und Bosserhoff 2006). Durch den kompletten Knockdown von TANGO sollte die Auswirkung auf die Tumorprogression nochmals bestätigt werden. Wir erwarteten zudem Information über die funktionelle Relevanz von TANGO zu bekommen.

Die antisense TANGO Zellklone K2, K7, K8 und K10 wurden in denselben funktionellen *in vitro* Assays analysiert, wie sie für die sense Klone verwendet wurden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die wir mit den sense TANGO Klonen erhalten haben, zeigten die antisense TANGO Klone eine sehr viel stärkere Invasions- und Migrationskapazität im Vergleich zu den parentalen Mel Im Zellen bzw. zur mock2 Kontrolle. Wundheilungsassays der antisense TANGO Klone ließen ebenfalls ein höheres Potential zur Migration in das zellfreie Areal erkennen.

Um den exogenen Einfluss von TANGO auf die Tumorzellen genauer bestimmen zu können, stellten wir rekombinantes TANGO Protein her. Dazu wurde TANGO (ohne Signalsequenz) in den prokaryontischen Expressionsvektor pIVEX2.3-MCS (Roche) kloniert. Dieses Expressionsplasmid wurde dann in das *Rapid Translation System (RTS, Roche)* eingesetzt. Dies ist ein zellfreies, auf *E.coli* basierendes, *in vitro* Protein Transkriptions-/Translationssystem mit welchem große Mengen an Protein synthetisiert werden können (siehe 9.3.3.1). Mit diesem rekombinanten Protein wurden in einem weiteren Scratchassay die antisense TANGO Zellklone behandelt, nachdem in die konfluent wachsenden Zellen ein „Scratch“ gezogen wurde. Im Vergleich zum unbehandelten Assay (schwarze Balken), zeigten die antisense TANGO Zellklone nach einer Behandlung mit rekombinantem TANGO ein deutlich geringeres Potential zur Migration (graue Balken) (Abbildung 57).

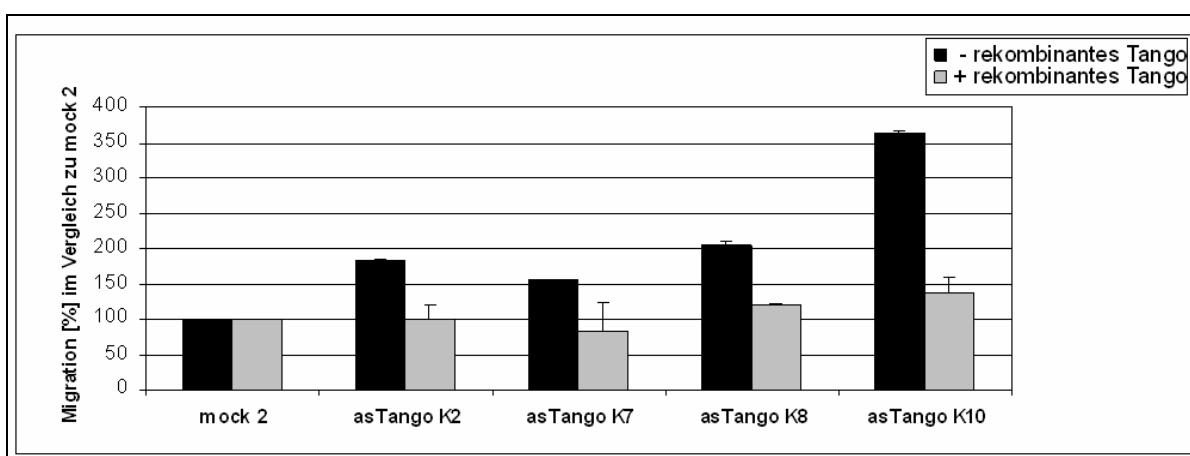


Abbildung 57 Verminderte Migrationsfähigkeit der antisense TANGO Mel Im Zellklone unter dem Einfluss von rekombinantem TANGO.

7.2 *TANGO als Tumorsuppressor im Kolon- und Leber-Karzinom*

Das **Kolonkarzinom** (Darmkrebs) ist eine der häufigsten Tumorerkrankung in Deutschland. Es entsteht meist aus Drüsenzellen des Darms, die zunächst gutartige Polypen entwickeln, die im Laufe der Zeit entarten. Es ist inzwischen nachgewiesen worden, dass bestimmte Nahrungsmittel und Ernährungsgewohnheiten Risikofaktoren für das Kolonkarzinom darstellen, umgekehrt jedoch andere Verhaltensweisen positive Auswirkungen auf das Risiko haben. Zu den Risikofaktoren gehört ein hoher Konsum von tierischen Fetten. Des Weiteren sind Übergewicht und Bewegungsmangel aber auch Nikotin- und erhöhter Alkoholkonsum Risikofaktoren. Liegt bei einem Verwandten ersten Grades ein Kolonkarzinom vor, so ist das Risiko der nachfolgenden Generationen ebenfalls erhöht. Beim Kolonkarzinom handelt es sich meistens um sogenannte Adenokarzinome (maligne Tumore aus Drüsengewebe), selten finden sich andere Tumorformen. Jeweils ein Viertel der Dickdarmtumoren befinden sich im Anfangsteil des Dickdarms, der aufsteigenden Darmschlinge und dem quer verlaufenden und absteigenden Dickdarm. 50 % finden sich im sogenannten Sigma. Das Kolonkarzinom setzt Metastasen in die regionalen Lymphknoten, die Leber, die Lunge, seltener in andere Organe.

Das **hepatzelluläre Karzinom** (HCC) ist ein vom Lebergewebe ausgehender maligner Tumor. In unseren Breiten ist das Leberzellkarzinom mit einer Erkrankungshäufigkeit von 2 : 100.000 Einwohnern relativ selten. Das primäre Leberzellkarzinom manifestiert sich meist zwischen dem 50. und dem 70. Lebensjahr. Als sekundäre Leberzellkarzinome bezeichnet man solche Karzinome, die sich als Metastasen anderer Tumore, beispielsweise von Darm-, Lungen- oder Brusttumoren, in der Leber bilden. Das HCC entwickelt sich in aller Regel aus einer Leberzirrhose, vor allem wenn sie hervorgerufen wird durch eine Hepatitis B- oder Hepatitis C-Infektion, chronischem Alkoholschaden der Leber oder einer Hämochromatose (erbliche Stoffwechselstörung).

Nachdem wir für TANGO im malignen Melanom eine Tumorsuppressor Funktion festgestellt haben, stellte sich die Frage, ob TANGO nicht auch in anderen Tumoren eine Rolle spielt. Da das Kolonkarzinom eines der häufigsten Tumore ist, und für das hepatzelluläre Karzinom bereits bekannt war, dass MIA2, ein TANGO homologes Protein, dort vermindert exprimiert wird, entschieden wir uns, diese beiden Tumorarten auf die Expression von TANGO zu untersuchen um festzustellen, ob TANGO möglicherweise eine allgemeine Tumorsuppressorfunktion besitzt.

7.2.1 Reduktion von TANGO im Kolon- und hepatzellulären Karzinom

Drei hepatzelluläre Zelllinien (HepG2, Hep3B und PLC) und sechs Kolon-Tumor Zelllinien (HT29, LoVo, CaCo-2, HCT116, SW480 und SW48) wurden auf die Expression von TANGO mittels quantitativer RT-PCR untersucht und mit primären humanen Hepatozyten (PHH) und

normalen Kolon epithelialen Zellen (CEC) verglichen (Abbildung 58). Dabei konnte eine starke Reduktion von TANGO auf mRNA Ebene in allen untersuchten hepatozellulären Tumorzellen im Vergleich zu PHH festgestellt werden.

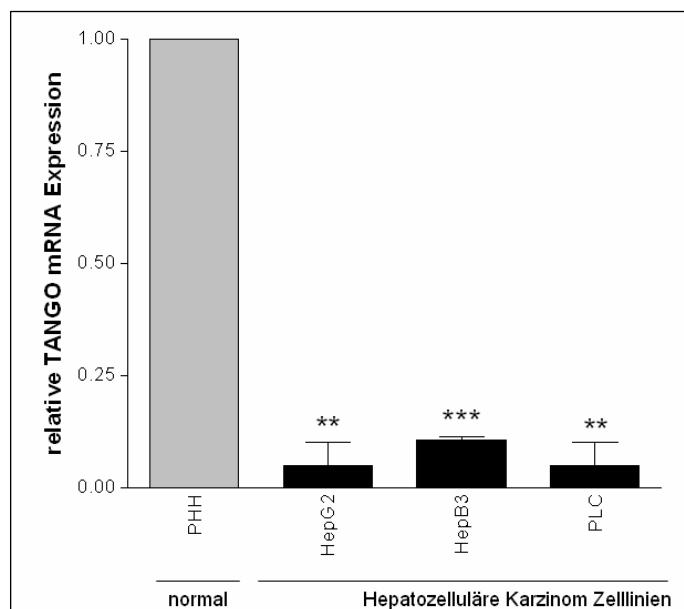


Abbildung 58 Expression von TANGO in hepatozellulären Karzinom Zelllinien im Vergleich zu normalen primären humanen Hepatozyten (PHH).

Für das Kolonkarzinom zeigte sich ebenfalls eine verminderte Expression von TANGO im Vergleich zu normalen CECs. Die Zelllinie HT29M3 ist eine modifizierte HT29 Zelllinie, die eher dem normalen Kolon Zelltyp entspricht als der Tumorzelllinie HT29. Die TANGO Expression dieser modifizierten HT29 Zelllinie wurde mit in die Analyse der TANGO Expression aufgenommen, um herauszufinden, ob dort eine vermehrte Expression von TANGO zu erkennen ist. Erwartungsgemäß exprimierte diese Zelllinie mehr TANGO als die Kolon-Tumorzelllinie HT29 (Abbildung 59).

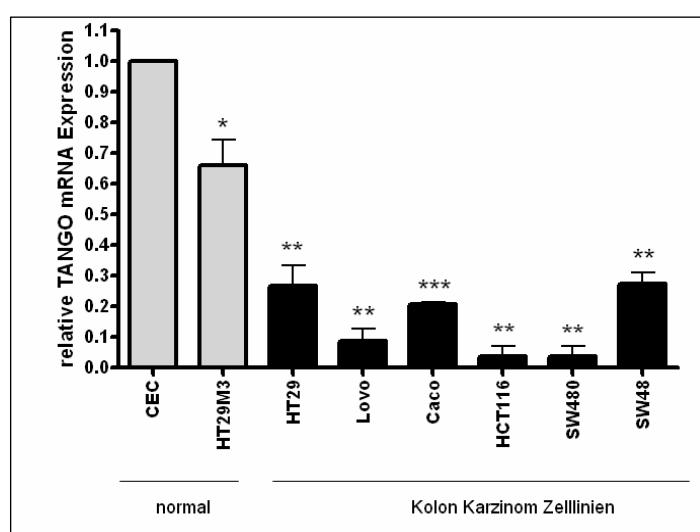


Abbildung 59 Expression von TANGO in Kolon Karzinom Zelllinien.

Um die TANGO Expression in Tumoren auch auf Protein-Ebene zu analysieren, untersuchten wir Tumorzelllinien im Vergleich zu isolierten primären Zellen mittels Western Blot. Dazu wurden jeweils 40µg Proteinlysat der Lebertumorzellen (HepG2, Hep3B und PLC) auf das SDS-Gel geladen und anschließend mittels TANGO Antikörper detektiert. Es war entsprechend der mRNA Daten, ein Rückgang der TANGO Expression in allen untersuchten Tumorzellen im Vergleich zu normalen primären humanen Hepatozyten (PHH) zu beobachten (Abbildung 60).

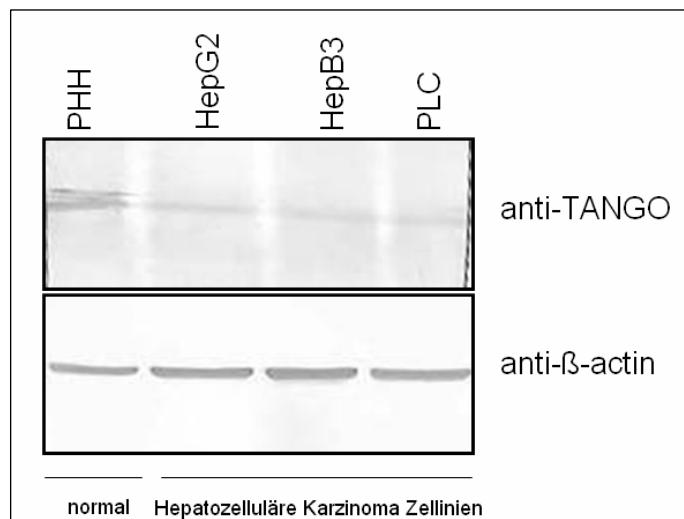


Abbildung 60 Expression von TANGO in Leber Karzinomzelllinien auf Protein Ebene.

In gleicher Weise wurde die Expression von TANGO in den Kolon-Karzinomzelllinien auf Protein-Ebene untersucht und mit normalen intestinalen epithelialen Zellen (IEZs) verglichen. Dabei zeigte sich ebenfalls, wie zuvor auf mRNA Ebene gezeigt, ein Expressionsverlust in allen analysierten Kolon-Karzinomzelllinien im Vergleich zu den normalen IEZs aus zwei verschiedenen Spendern (Abbildung 61).

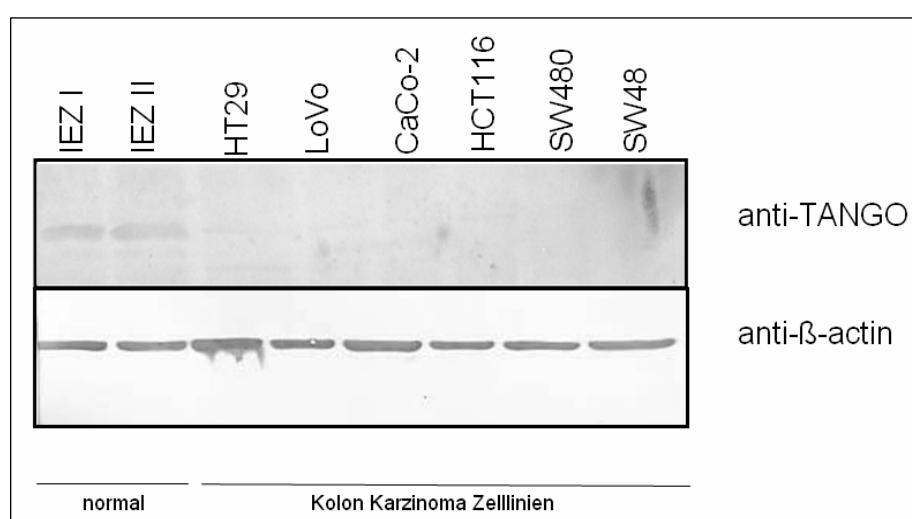


Abbildung 61
Expression von TANGO in Kolon-Karzinomzelllinien auf Protein-Ebene.

Um die Expression von TANGO zusätzlich in verschiedenen Geweben zu bestimmen, wurde RNA aus tumorösem Gewebe und angrenzendem Leber Normalgewebe von zehn HCC Patienten (P1-P10) isoliert. Anschließend wurde die TANGO mRNA Expression in diesen Proben mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Alle Lightcycler Läufe wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander wiederholt und der Mittelwert davon verwendet. Das jeweilige Normalgewebe wurde auf eins gesetzt und die Expression des entsprechenden Tumorgewebes im Verhältnis dazu bestimmt. Es ergab sich auch hier eine Reduktion von TANGO in acht von zehn analysierten Tumorproben im Vergleich zu den entsprechenden Leber Normalgeweben (Abbildung 62).

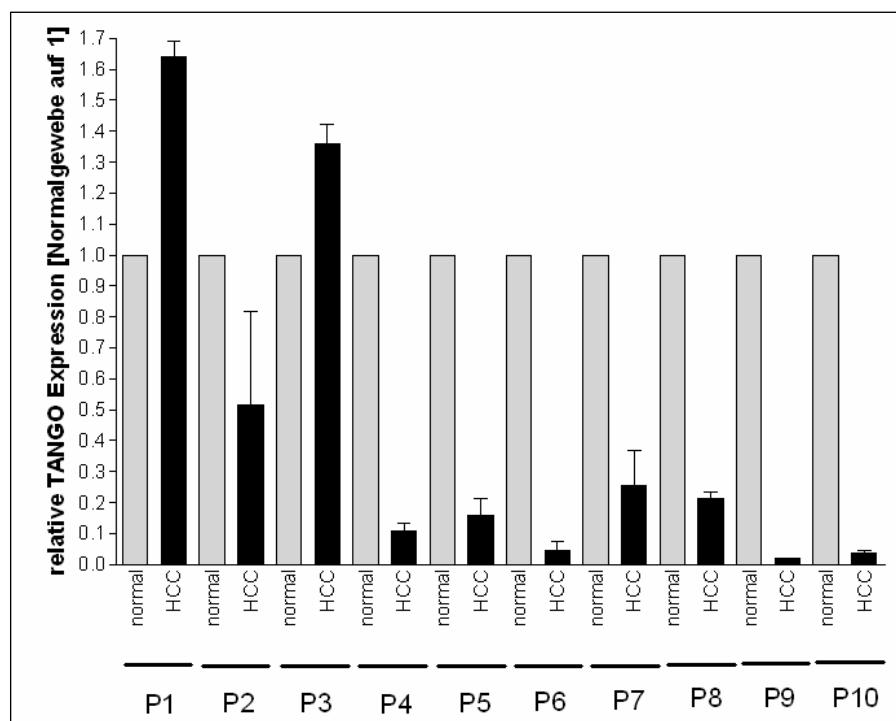


Abbildung 62

Expression von TANGO *in situ* in verschiedenen HCC-Geweben versus entsprechenden Normalgeweben.

Immunhistochemische Auswertungen von Paraffinschnitten verschiedener Patienten mit Leber- (Abbildung 63 A) und Kolon-Tumoren (Abbildung 63 B) ergaben ebenfalls eine TANGO Reduktion in den Tumorgeweben im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben.

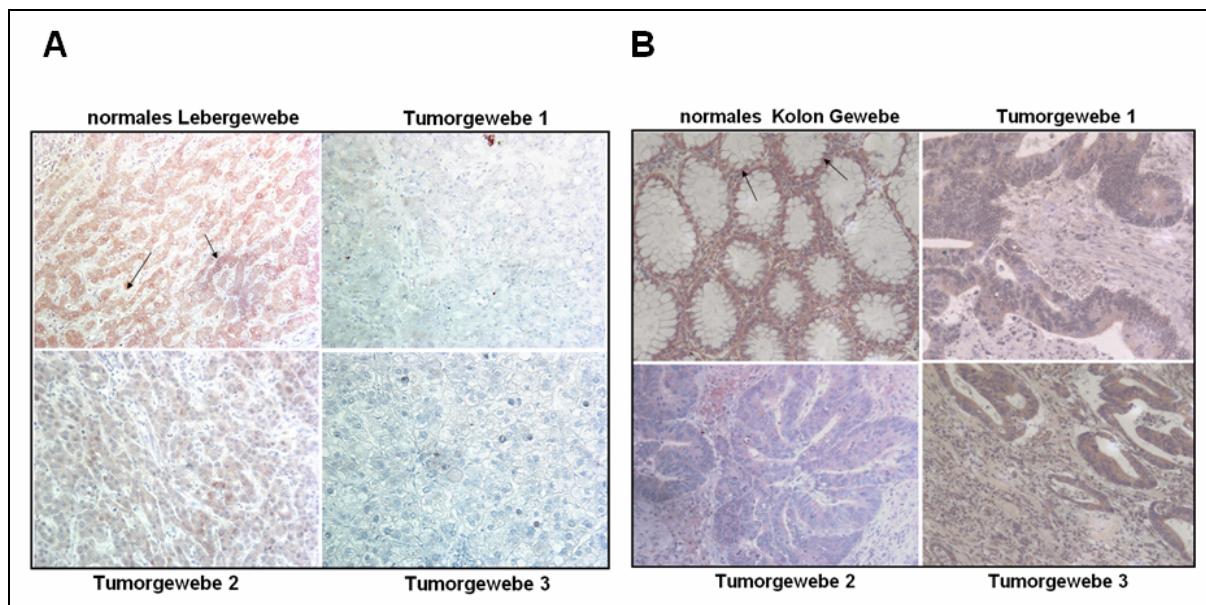


Abbildung 63 Immunhistologie von TANGO an verschiedenen Leber-Tumorgeweben versus Leber-Normalgewebe (A) und an verschiedenen Kolon-Tumorgeweben versus Kolon-Normalgewebe (B).

7.2.2 Mögliche Rolle von TANGO in Kolon- und Lebertumoren

Um die funktionelle Rolle von TANGO *in vitro* in den Tumorzellen zu bestimmen, behandelten wir diese mit rekombinantem TANGO Protein und untersuchten den Einfluss dieser exogenen TANGO Zugabe auf das Migrations- und Invasionsverhalten der Leber- und Kolon Tumorzellen. Wie in Abbildung 64 dargestellt, führte die exogene Zugabe von TANGO ins untere Kompartiment der Boydenkammer zu einer stark reduzierten Fähigkeit von Leber Tumorzellen (HepG2 und Hep3B) und Kolon Tumorzellen (CaCo-2, SW48 und SW480) im Boydenkammer Invasionsassay durch das Matrikel zu wandern im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

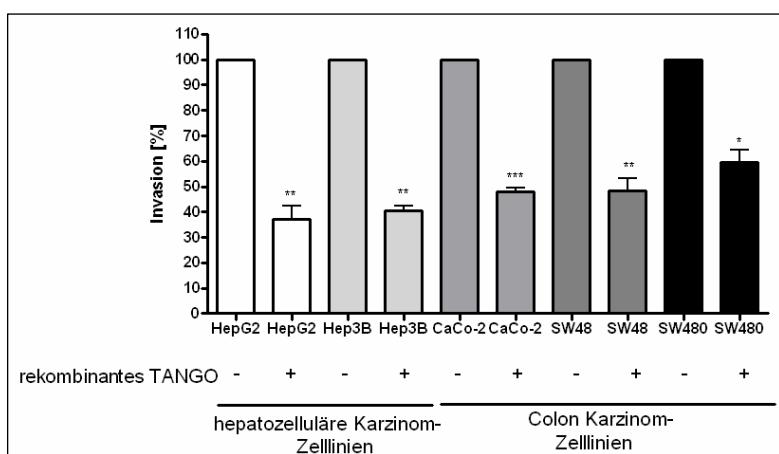


Abbildung 64 Boydenkammer Invasionsassay. Durch die Zugabe von rekombinantem TANGO kam es zu einer verminderten Invasivität aller untersuchten Tumorzelllinien.

Entsprechend zeigten die TANGO behandelten Tumorzellen im Gelatine beschichteten Boydenkammer Migrationsassay eine schwächere Fähigkeit durch die Filter zu wandern als die unbehandelten Tumorzellen (Abbildung 65). Dies belegt eindeutig, dass TANGO, als

Tumorsuppressor, Prozesse, wie verstärkte Migration und Invasion, wie sie von Tumorzellen ausgelöst werden, verhindern kann.

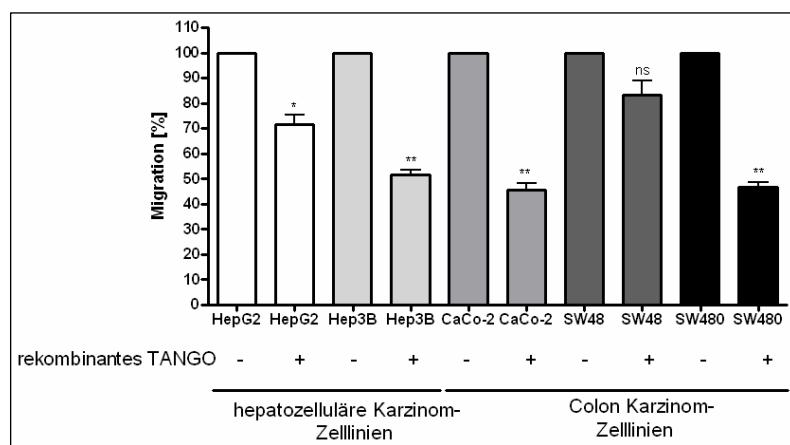


Abbildung 65 Boydenkammer Migrationsassay. Durch die Zugabe von rekombinantem TANGO kam es zu einer verminderten Migrationsfähigkeit aller untersuchten Tumorzelllinien.

7.3 Die Beteiligung von TANGO am Migrationsprozess von Monozyten

Nachdem wir die Rolle von TANGO in verschiedenen Tumoren untersucht hatten, stellte sich die Frage, welche Funktion TANGO in nicht-tumorösen Geweben haben könnte, da TANGO bis auf die Zellen des Blutsystems in allen Geweben detektiert werden konnte. Wir vermuteten, dass TANGO auf Grund des weitläufigen Expressionsmusters eine allgemeine Funktion besitzen muss. Unsere Überlegung, weshalb TANGO im Gegensatz zu allen anderen Zellen in Blutzellen nicht vorkommt, richtete sich dabei auf den Adhäsionszustand. Blutzellen, wie Monozyten oder Leukozyten, zirkulieren mit dem Blut durch den ganzen Körper und verlassen die Blutbahn nur dort, wo sie für die Immunabwehr benötigt werden, wie z.B. in der Nähe von Entzündungsherden. Dazu "rollen" sie an den Wänden der Blutgefäße entlang, um diese systematisch nach Stoppsignalen abzusuchen. Dieses Leitsystem beruht auf einer Vielzahl von Botenstoffen und Adhäsionsmolekülen, die sich komplementär sowohl auf den Blutzellen als auch an den Wänden der Blutgefäße befinden. Treffen Blutzellen auf solche Stoppsignale, werden die starken Adhäsionsmoleküle in den Blutzellen aktiviert. Die „rollende Adhäsion“ kommt zu ihrem Ende und die Blutzellen drängen sich durch die Zellen der Blutgefäße in das umliegende Gewebe. Die schwachen bzw. die starken Bindungen der „rollenden Adhäsion“ beruhen auf Adhäsionsmolekülen der Selektin- bzw. der Integrin-Familie.

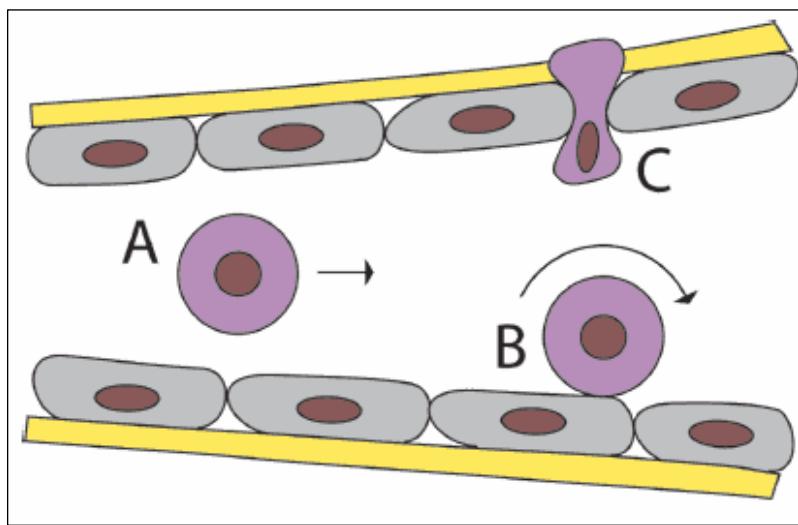


Abbildung 66 Zirkulation von Blutzellen durch die Blutbahn. (A) Blutzellen werden mit dem Blutstrom durch die Blutgefäße getragen. (B) Durch die Anwesenheit schwacher Adhäsionsmoleküle (im wesentlichen Selektin-Rezeptoren auf den Blutzellen) kommt es zur "rollenden Adhäsion" auf den Wänden der Blutgefäße. Dieser Mechanismus erlaubt es den Blutzellen, die Wände der Blutgefäße nach Stoppsignalen abzusuchen. (C) Eventuell vorhandene Stoppsignale aktivieren dann stärkere Adhäsionsmoleküle (Integrin-Rezeptoren) auf den Blutzellen, die diese schließlich zum Halten bringen. Die Blutzellen verlassen daraufhin die Blutbahn in das umgebende Gewebe, indem sie sich zwischen den Zellen der Blutgefäße hindurchquetschen. (Bild: Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, München).

vorhandene Stoppsignale aktivieren dann stärkere Adhäsionsmoleküle (Integrin-Rezeptoren) auf den Blutzellen, die diese schließlich zum Halten bringen. Die Blutzellen verlassen daraufhin die Blutbahn in das umgebende Gewebe, indem sie sich zwischen den Zellen der Blutgefäße hindurchquetschen (Bild: Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, München).

Um festzustellen, ob TANGO in diesem Prozess der Adhäsion möglicherweise eine Rolle spielen könnte, untersuchten wir die Expression von TANGO in Monozyten unter adhärenten und nicht-adhärenen Bedingungen.

7.3.1 Induktion von TANGO nach Adhäsion von Monozyten

Frisch isolierte Blut Monozyten (D0), Monozyten, die Zell-Zell Kontakte für einen (N1) und zwei Tage (N2) eingehen konnten, und Monozyten, die mit Teflon Zell-Substrat Kontakte für einen Tag (A1) eingehen konnten, exprimierten auf mRNA Ebene kein TANGO. Ein Expressionsanstieg von TANGO trat bei adhärenten Monozyten nach zweitägiger Inkubation auf Teflon (A2) auf. Die TANGO Expression stieg nach siebentägiger Inkubation auf Teflon (A7) oder auf Zellkulturschalen (Daten nicht gezeigt) noch weiter an. Interessanterweise wurde TANGO nicht exprimiert, wenn wir frisch isolierte Monozyten für einen Tag (R1) in einer Rollerflasche in Suspension hielten und die Monozyten durch das ständige Rollen der Flasche sowohl von einer Ausbildung von Zell-Zell als auch von Zell-Substrat Kontakten abhielten. Zusätzlich gaben wir in einem weiteren Experiment den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (M-CSF) zu den Zellen, die in den Rollerflaschen für einen (R1+) bzw. für sieben Tage (R7+) gehalten wurden. Die exogene Zugabe von M-CSF führt gewöhnlich zu einer Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, auch wenn diesen Zellen keine Möglichkeit zur Adhäsion gegeben wird. Diese künstlich eingeleitete Differenzierung der Monozyten führte jedoch zu keiner Expressionszunahme von TANGO, weshalb wir davon ausgingen, dass TANGO wahrscheinlich über Adhäsion reguliert sein könnte (Abbildung 67).

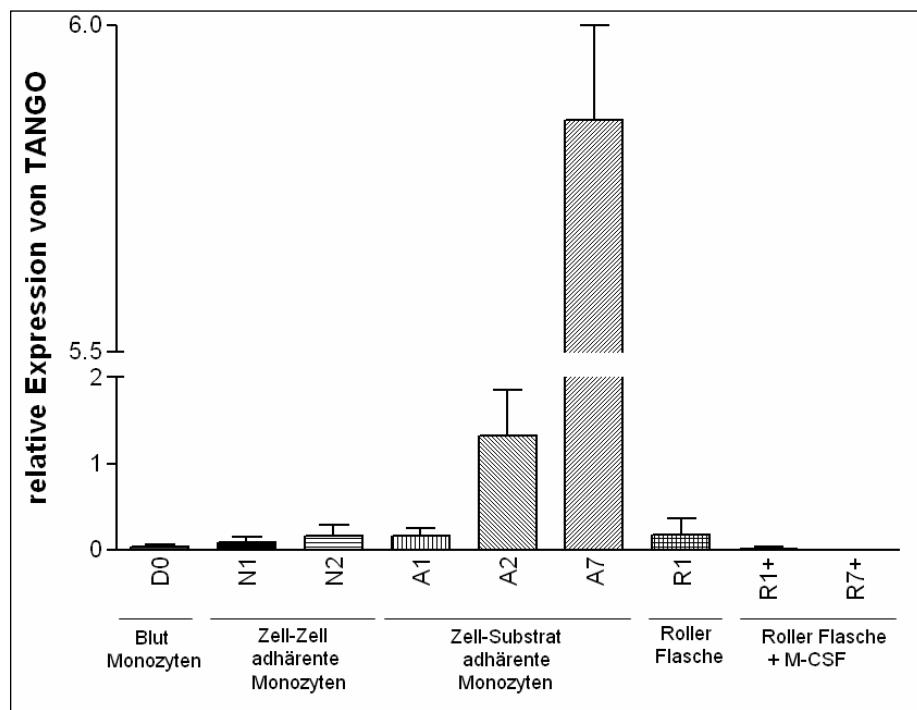


Abbildung 67

Expression von TANGO in Monozyten unter adhärenen und nicht-adhärenen Bedingungen.

Diese Annahme wurde weiter durch die Tatsache gestärkt, dass nach einer siebentägigen adhärenen Inkubation von Monozyten auf Teflon (A7) und anschließender eintägiger Inkubation dieser sorgfältig abtrypsinierten Zellen im Suspensionszustand in einer Rollerflasche (A7 → R1) die Expression von TANGO auf mRNA Ebene (Abbildung 68 A) und Protein Ebene (Abbildung 68 B) im Vergleich zum adhärenen Zustand (A7 → A1) verloren ging. Aus diesen Daten lässt sich deshalb schließen, dass TANGO nur induziert wird, sobald Blutzellen adhärieren.

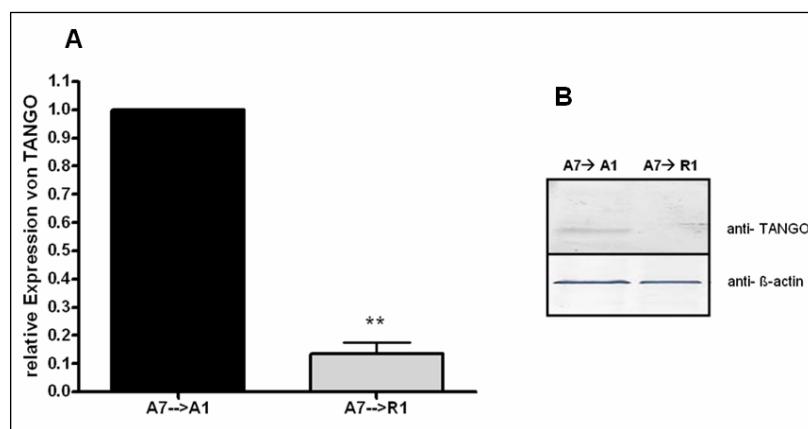


Abbildung 68 Expression von TANGO im adhärenen (A7 → A1) und nicht adhärenen (A7 → R1) Zustand von Monozyten auf mRNA (A) und Protein-Ebene (B).

Interessanterweise konnten wir keine Expression von TANGO in dendritischen Zellen finden, die *in vitro* aus Monozyten generiert wurden (Abbildung 69). Zusammenfassend zeigten unsere Daten bisher, dass die Expression von TANGO mit der Adhäsion von Monozyten einher geht und TANGO offensichtlich eine Rolle bei der Adhäsion von Makrophagen übernimmt, aber nicht am Differenzierungsprozess von Dendritischen Zellen beteiligt ist.

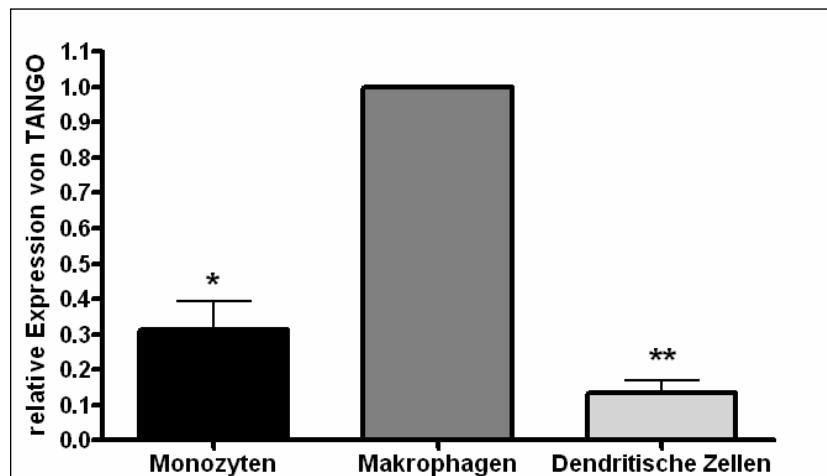


Abbildung 69 Expression von TANGO während der Monozytendifferenzierung.

Um die Funktion von TANGO genauer zu studieren, untersuchten wir die Regulation von TANGO zusätzlich in den prä-monozytären Zelllinien HL-60, U937 und THP-1, welche basal, entsprechend den primären Monozyten kaum TANGO exprimierten. Einen Anstieg in der TANGO Expression konnten wir erst nach Stimulation dieser Zellen mit Phorbol Myristat Acetat (PMA) beobachten, was die ursprünglich in Suspension wachsende Zellen adhärieren lässt (Abbildung 70).

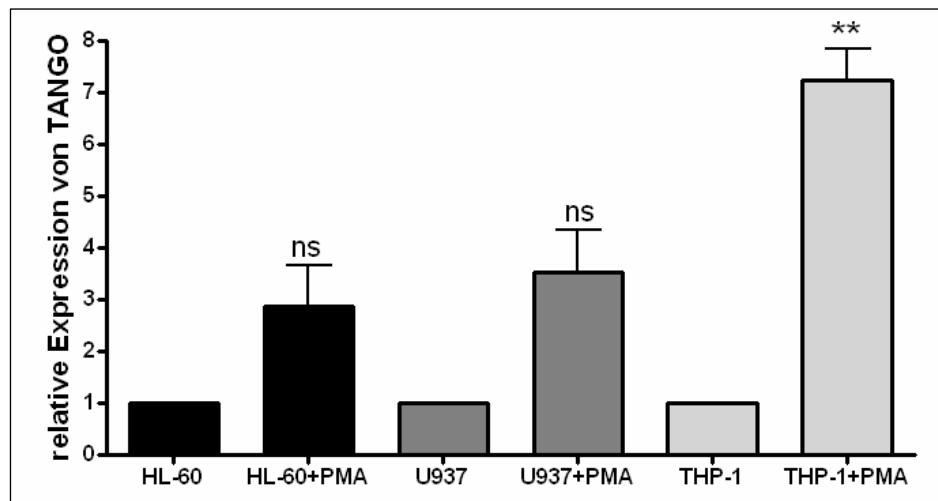


Abbildung 70
Expression von TANGO in verschiedenen monozytären Zelllinien nach PMA Stimulation und damit einhergehender Adhäsion.

7.3.2 Ko-Lokalisation von TANGO und Integrin alpha X (CD11c)

Um die funktionelle Relevanz von TANGO nach dem Zellattachment zu verstehen, suchten wir nach möglichen Interaktionspartnern. Dazu wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit anschließender Silber Färbung (Abbildung 71 A) bzw. Coomassie Färbung (Abbildung 71 B) durchgeführt. Dabei zeigte sich ein spezifisches Bandenmuster. Diese Banden, mit 1, 2, 3 und 4 markiert, wurden sehr sorgfältig ausgeschnitten, entfärbt und anschließend mit Trypsin verdaut. Die trypsinisierten Produkte wurden direkt auf NP20 Chips gespottet und mittels SELDI-Toff Massenspektrometrie vermessen. Die genaue Durchführung ist unter

9.3.3.8 beschrieben. Die Massen der einzelnen Peptidfragmente wurden mittels einem ProteinChip Lesegerät bestimmt und daraus mit Hilfe allgemein zugänglicher Proteindatenbanken das entsprechende Protein ermittelt. Die Fragmentgrößen der vier dargestellten Banden auf dem Coomassie Gel bzw. dem Silbergel erwiesen sich dabei als Fragmente von Integrin CD11c, auch Integrin alpha X genannt. Um das Ergebnis der SELDI-Toff Analyse zu bestätigen, analysierten wir die entsprechenden Ko-Immunpräzipitationslysate mittels Western Blot unter Verwendung eines CD11c spezifischen Antikörpers, der gegen die extrazelluläre Domäne dieses Integrins gerichtet ist. Dabei detektierten wir erneut die gleichen vier Banden (Abbildung 71 C), was eine spezifische Interaktion von TANGO mit Integrin CD11c sicherstellte. Zur Spezifitätskontrolle der Ko-Immunpräzipitation inkubierten wir jeweils das HL-60 Zelllysat ohne rekombinantes biotinyliertes TANGO.

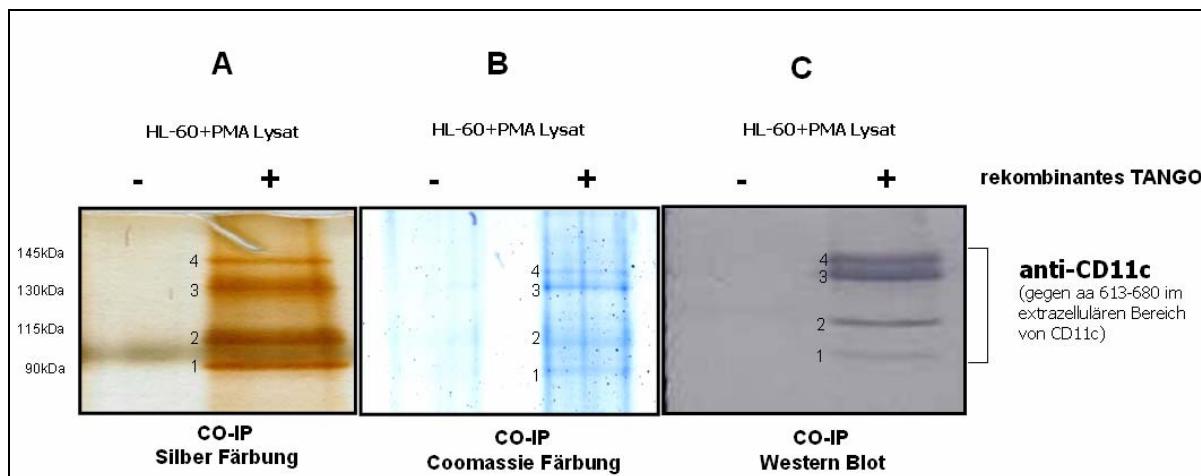


Abbildung 71 Ko-Immunpräzipitation zum Nachweis der TANGO-Integrin CD11c Interaktion über Silber Färbung (A), Coomassie Färbung (B) und über den direkten anti-CD11c Antikörpernachweis (C).

Zusätzlich konnte die Interaktion zwischen TANGO und CD11c nochmals mit Hilfe einer Ko-Immunofluoreszenzfärbung bewiesen werden. Dazu wurde die prä-monozytäre Zelllinie HL-60 nach Behandlung mit PMA und Stimulation mit rekombinantem TANGO Protein zugleich mit einem anti-TANGO und anti-CD11c Antikörper inkubiert. Zur Detektion von TANGO kam ein Fitc-markierter Sekundärantikörper zur Anwendung (Abbildung 72 II), zur Detektion von CD11c ein Texas Red markierter Sekundärantikörper (Abbildung 72 III). In Abbildung 72 IV ist die Überlagerung von TANGO und CD11c zu erkennen. An den Randbereichen der Zelle, an welchen die Zelle mit der Nachbarzelle Kontakt aufnimmt, konnte die Ko-Lokalisation von TANGO und CD11c beobachtet werden. Abbildung 72 I zeigt die Kernfärbung (Dapi).

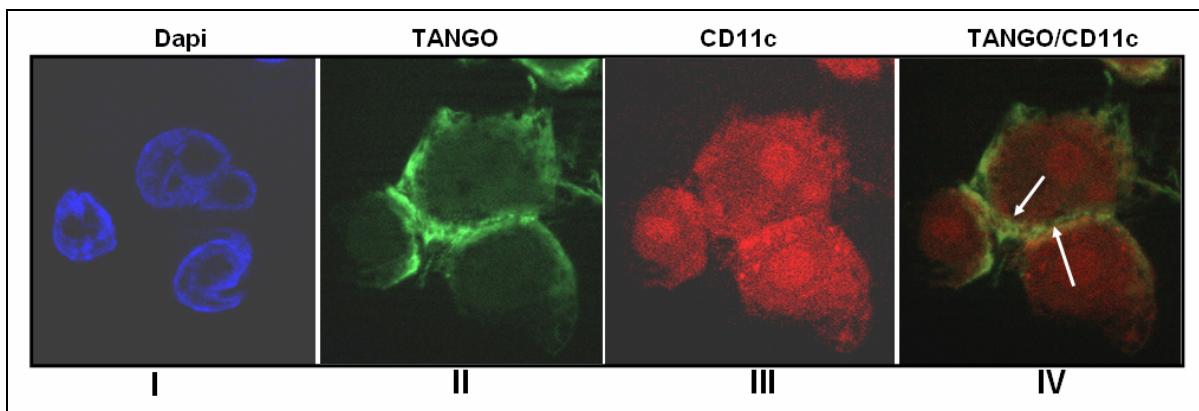


Abbildung 72 Ko-Immunfluoreszenz zeigt eine Interaktion von TANGO und CD11c im Overlay (Pfeile in IV). I, Dapi Kernfärbung; II, TANGO Färbung (Fitc); III, CD11c Färbung (Texas Red).

Als nächstes untersuchten wir, unter welchen Umständen TANGO und Integrin CD11c miteinander interagieren. Miller et al., hat bereits beschrieben, dass die Expression von CD11c in verschiedenen prä-monozytären Zelllinien durch PMA induziert werden kann (Miller et al. 1986). Wir konnten diese Ergebnisse für die prä-monozytären Zelllinien HL-60, U937 und THP1 auf mRNA Ebene (Abbildung 73 A) und Protein Ebene (Abbildung 73 B) bestätigen.

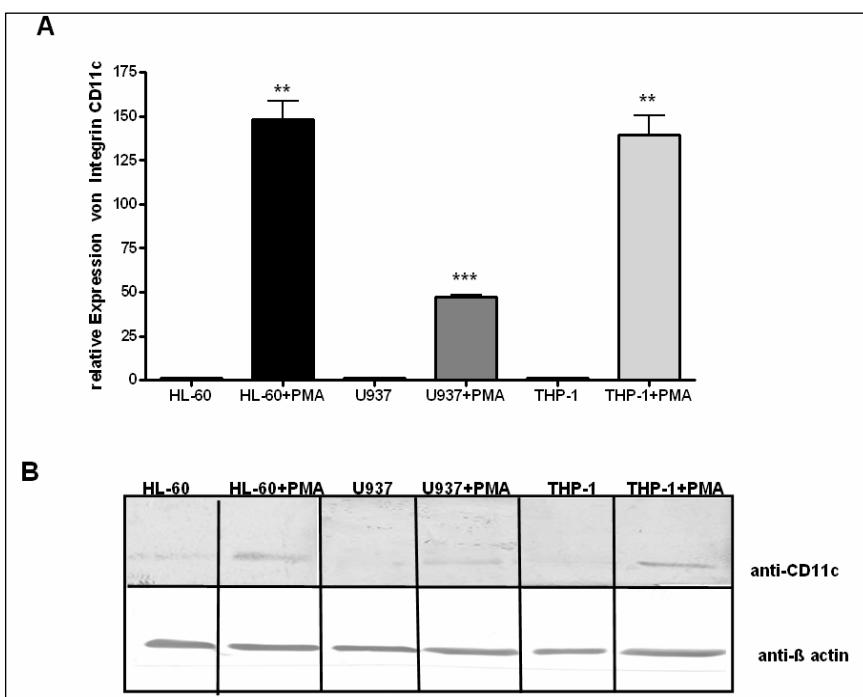


Abbildung 73 Expression von Integrin CD11c in verschiedenen monozytären Zelllinien nach Inkubation mit PMA auf mRNA Ebene (A) und Protein-Ebene (B). Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

7.3.3 Einfluss von TANGO auf das Zell-Attachment

Ergebnisse der bisherigen Expressionsanalysen ließen uns vermuten, dass TANGO in Prozessen nach der Adhäsion involviert sein könnte. In einem weiteren Experiment inkubierten wir prä-monozytäre HL-60 Zellen mit rekombinantem TANGO in normalen 6-Well

Zellkulturplatten. Dabei konnten wir kein Attachment dieser Zellen an die Zellkulturschale erkennen. Diese Zellen blieben in Suspension (Daten nicht gezeigt). Als nächstes verwendeten wir 6-Well Platten, die mit Fibrinogen (beschrieben als Ligand von CD11c), oder mit einer konfluenten Schicht aus humanen epithelialen Zellen (HMECs) vorbeschichtet wurden (siehe dazu auch 9.3.4.9), um zu beobachten ob TANGO Einfluss auf das zelluläre Attachment von monozytären Zellen hat. Zuerst untersuchten wir den Einfluss von PMA und anschließend dann den Einfluss von TANGO auf das Zellattachment. Dazu wurden HL-60 Zellen mit CSME gefärbt und das Attachment der fluoreszierenden Zellen in einem Fluoreszenzmessgerät gemessen. Es zeigte sich ein verstärktes Attachment von HL-60 Zellen an Fibrinogen (Abbildung 74 A) und gleichermaßen an HMECs (Abbildung 74 B), nachdem wir diese Zellen mit PMA inkubierten. Nachfolgend inkubierten wir in einem entsprechenden Versuchsaufbau HL-60 Zellen mit rekombinantem TANGO, ohne PMA, und bestimmten erneut die Adhäsion dieser Zellen. Wir erkannten hierbei ein signifikant vermindertes Attachment der TANGO inkubierten HL-60 Zellen, sowohl an Fibrinogen (Abbildung 74 C) als auch an HMECs (Abbildung 74 D) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Inkubierte man die Zellen mit TANGO und zusätzlich mit PMA, ergab sich ein noch stärkerer Adhäsionsrückgang der HL-60 Zellen an Fibrinogen und HMECs (Abbildung 74 E und F).

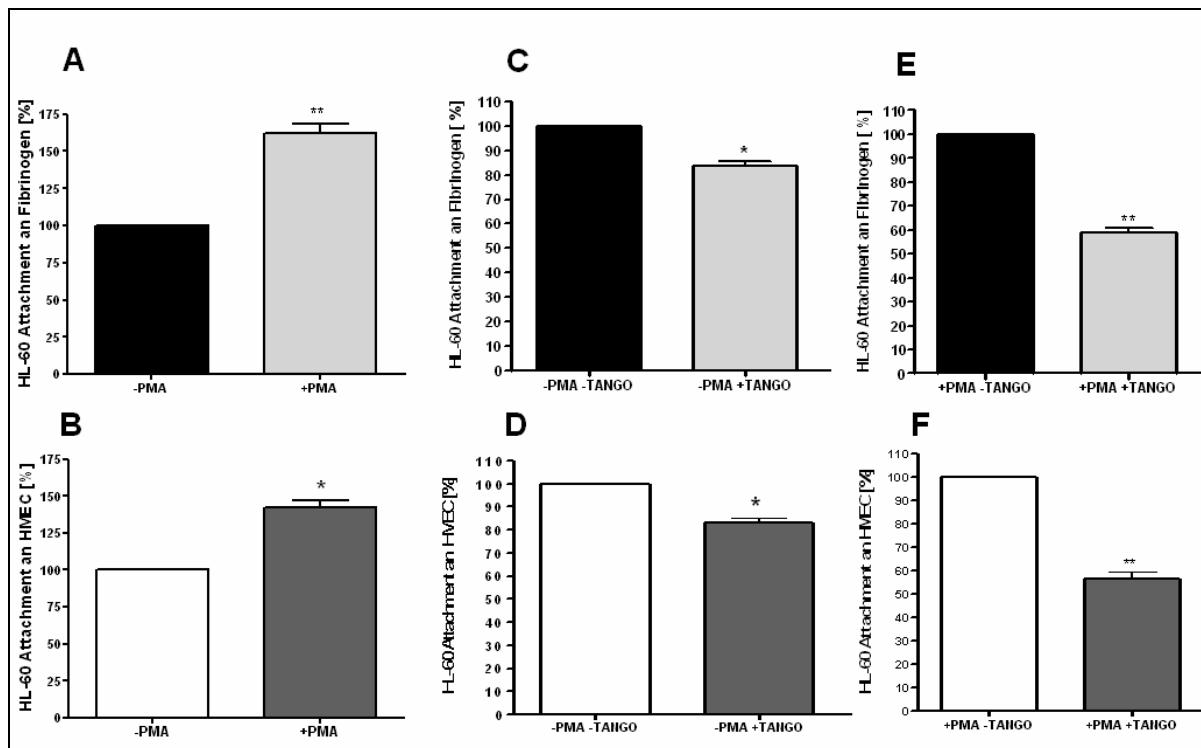


Abbildung 74 HL-60 Zellattachment an Fibrinogen (A,C,E) und HMECs (B,D,F) nach verschiedenen Behandlungen mit TANGO und Phorbol Myristat Acetat, PMA.

Zusammenfassend weisen unsere bisherigen Daten auf eine gleichzeitige Induktion von TANGO und Integrin CD11c nach PMA Behandlung hin. Wir spekulierten deshalb, dass die Induktion von CD11c durch PMA und die gleichzeitige Behandlung mit TANGO für die verminderte Adhäsion der Zellen verantwortlich ist.

7.3.4 Einfluss von TANGO auf den Migrationsprozess

Die Tatsache, dass TANGO das zelluläre Attachment an bestimmte Matrices reduziert, ließ uns eine Beteiligung von TANGO am Migrationsprozess (Extravasation) von Monozyten ins Gewebe vermuten. Damit die Zellen ins Gewebe einwandern können, ist es nötig, dass sie den Kontakt zur Matrix kurzzeitig lösen. Der Extravasationsprozess wurde *in vitro* mit HL-60 Zellen in einem modifizierten Boydenkammer Migrationsassay simuliert. Dazu wurden Membranen mit 5µm Porengröße mit Fibrinogen bzw. mit einer konfluenten Schicht aus HMECs beschichtet (siehe auch 9.3.4.10). Eine Inkubation der HL-60 Zellen mit rekombinantem TANGO zeigte schließlich ein signifikant erhöhtes Migrationspotential durch Fibrinogen (Abbildung 75 A) und durch HMECs (Abbildung 75 B) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Diese Ergebnisse bestätigten unsere Annahme, dass TANGO ein Induktor für die Einwanderung von Blutzellen ins Gewebe sein könnte.

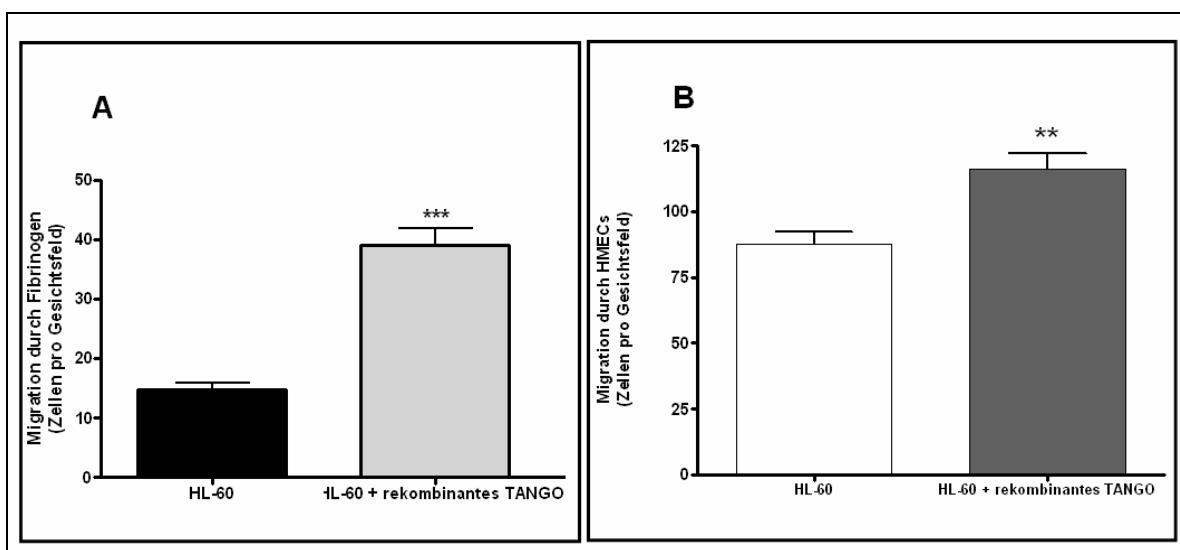


Abbildung 75 Verstärkte Migration von HL-60 Zellen durch eine Schicht aus Fibrinogen (A) bzw. durch Endothelzellen (HMECs) (B) nach Inkubation mit rekombinantem TANGO Protein.

8 Diskussion Teil II

TANGO, ein Tumorsuppressor, der die Entwicklung von bösartigen Tumoren reduzieren kann

In diesem Projektteil sollte die Rolle von TANGO, einem MIA homologen Protein, im Hinblick auf Funktion und Regulation untersucht werden. Dabei konnten wir zeigen, dass TANGO als neues Mitglied der Melanoma Inhibitory Activity (MIA) Gen Familie eine wesentliche Rolle in der Tumorigenese hat. Im Gegensatz zu MIA, welches im malignen Melanom verstärkt exprimiert vorliegt und als diagnostischer Serummarker für das maligne Melanom Verwendung findet, konnten wir TANGO in verschiedenen Tumoren (Melanom, Kolon Karzinom, hepatzelluläres Karzinom) vermindert exprimiert nachweisen. Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation zwischen der Reduktion von TANGO und der Progression des Tumors. Mittels funktioneller Assays konnten wir beweisen, dass TANGO die Rolle eines Tumorsuppressors besitzt. Wird TANGO stark exprimiert, zeigen Tumorzellen eine verminderte Migrations- und Invasionsfähigkeit. Kommt es jedoch zu einer Abnahme von TANGO, nimmt die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen stark zu und auch die Fähigkeit matrixunabhängig zu wachsen, ein Merkmal, welches für metastasierende Zellen von Bedeutung ist. Eine eindeutige molekulare Erklärung, wie TANGO im Prozess der Migration und Invasion involviert ist, ist derzeit noch nicht möglich. In einer Studie über MIA konnte in unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt werden, dass MIA direkt mit den Integrinen alpha4beta1 und alpha5beta1 interagieren kann und somit die Integrinaktivität negativ reguliert (Bauer et al. 2006). Diese Interaktion zwischen den Integrinen und MIA fördert gleichzeitig aber auch den „Detachmentprozess“ von Zellen, d.h. die Zellen können besser migrieren und invadieren (Abbildung 76). So könnte auch TANGO, als MIA homologes Protein, die Aktivität bestimmter Integrine modulieren. Wir vermuten, dass TANGO möglicherweise die Bindung zwischen Integrinen und Proteinen der extrazellulären Matrix verstärkt (Abbildung 76) und deshalb bei Verlust von TANGO dieser Effekt verloren geht. Interaktionsstudien müssen jedoch eine Interaktion zwischen Integrinen und TANGO erst beweisen. Folgende Abbildung zeigt die Wirkungsweise von MIA und die hypothetische Wirkung von TANGO zwischen Zellen und den Makromolekülen der extrazellulären Matrix.

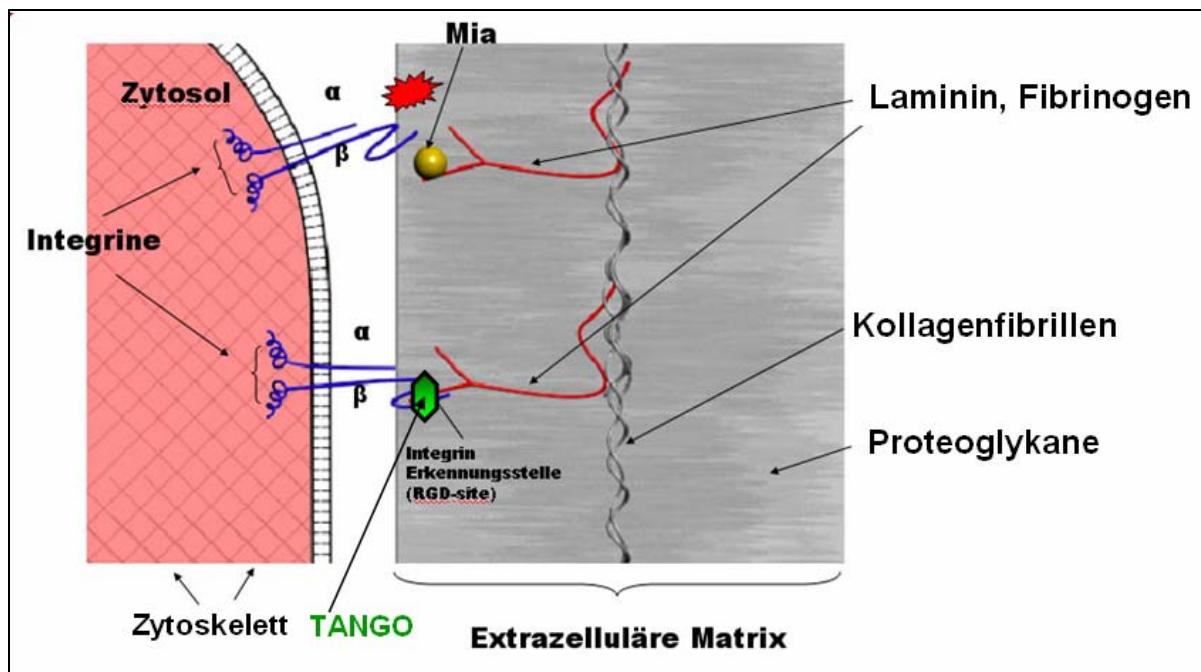


Abbildung 76 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von MIA und der hypothetischen Wirkung von TANGO zwischen Zellen und den Makromolekülen der extrazellulären Matrix (ECM). MIA bindet unter anderem an die RGD-Bindestelle der Proteine der ECM und maskiert sie, so dass diese nicht mehr an die Integrine binden können. Dadurch erfolgt eine Ablösung der Zellen von ihrem Substrat. TANGO könnte in ähnlicher Weise an die Moleküle der ECM binden, wodurch die Bindung zwischen Zelle und ECM jedoch verstärkt würde (modifiziert nach der Doktorarbeit von R. Bauer, 2005).

Wie es jedoch im Tumor zu einer Abnahme der TANGO Expression und somit, unserer Hypothese zu Folge, zu einer Auflösung der Bindung zwischen Integrinen und Molekülen der extrazellulären Matrix kommen kann, bleibt weiter ungeklärt. Studien über epigenetische Veränderungen haben bereits gezeigt, dass das „Silencing“ vieler tumor-assozierter Gene durch DNA-Methylierungen stattfindet (Wada et al. 2004; Versmold et al. 2007; Yang et al. 2007; Ushijima 2007). Wir konnten jedoch keine Korrelation mit dem Verlust von TANGO und einer epigenetischen Veränderung des TANGO Promoters durch Methylierung feststellen (Arndt und Bosserhoff 2006). Eine weitere Möglichkeit der Regulation von TANGO könnte auf transkriptioneller Ebene stattfinden. Es ist bekannt, dass Veränderungen in der Expression bzw. in der Aktivität von Transkriptionsfaktoren oft eine Vielzahl von weiteren Veränderungen anderer Gene mit sich bringen kann. AP-1, AP-2alpha, CREB, CtBP, PAX3, Ski, Snail und STAT sind dabei nur eine kleine Auswahl von Transkriptionsfaktoren, welche in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms eine Rolle spielen (Poser und Bosserhoff 2004). Weitere Studien sollen folgen, um herauszufinden wie TANGO reguliert wird und welche Transkriptionsfaktoren eventuell daran beteiligt sind.

Zusätzlich zu den Primärtumoren und Melanommetastasen untersuchten wir die Expression von TANGO in verschiedenen Nävusformen (Abbildung 50). Hierbei konnten wir im Vergleich zu der Kontroll-Haut bereits eine leichte Reduktion von TANGO erkennen, die aber nicht

davon abhängig war, ob ein Nävus gutartig war oder sich zu einem dysplastischen Nävus entwickelte. Man könnte jedoch im dysplastischen Nävus vermuten, dass die Reduktion von TANGO von der unmittelbaren Umgebung abhängig ist. Tatsächlich scheint eine verminderte Expression von TANGO mit der Lokalisation der Melanozyten in Einklang zu stehen. In Bereichen der Dermis des dysplastischen Nävus konnte TANGO nicht mehr so stark detektiert werden wie in Bereichen der Epidermis. Ähnliche Phänomene wurden bereits für IL-8 publiziert, wo die Mikroumgebung die Expression von IL-8 bestimmt (Gutman et al. 1995). Es ist bekannt, dass Faktoren, die von Fibroblasten produziert werden, die Expression von bestimmten Genen im Melanom beeinflussen können. Dies könnte auch eine Ursache sein, weshalb TANGO im Melanom und auch in anderen Tumoren vermindert exprimiert wird.

Obwohl wir noch nicht verstehen, wie TANGO reguliert wird und wir nur vermuten wie TANGO die Tumorzellen von ihrer Wanderung in benachbartes Gewebe abhalten, wäre die Verwendung von TANGO als diagnostischer Marker für die Progression von Tumoren durchaus denkbar, da die Abnahme der TANGO Expression signifikant mit der Progression der Malignität in verschiedenen von uns untersuchten Tumoren einhergeht. Die Behandlung von Tumorzellen mit rekombinantem TANGO, welches im Rahmen meiner Promotion hergestellt wurde, zeigte zudem, in *in vitro* Untersuchungen, eine Reduktion auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen. Zu untersuchen wäre deshalb an *in vivo* Modellen, ob die exogene Zugabe von TANGO als „Therapeutikum“ gegen Krebs einsetzbar wäre.

TANGO, ein Molekül, das Monozyten bei der Migration hilft

Monozyten spielen eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen, die mit einer Einwanderung dieser Zellen in die betroffenen Gewebeareale einhergehen. Die Rekrutierung und Aktivierung der Monozyten ist ein mehrstufiger Vorgang, der u.a. das „Rollen“, die feste Adhäsion der Monozyten an das Endothel, die transendotheliale Migration (Extravasation), sowie die chemotaktisch gesteuerte Bewegung zum Entzündungsort umfasst (Ley 1996; Muller und Randolph 1999) (siehe auch Abbildung 66). Diese Vorgänge der Monozyten Adhäsion bzw. Migration waren für uns von Interesse, da wir beobachtet hatten, dass TANGO möglicherweise dabei eine Rolle spielen könnte. Unsere Untersuchungen zeigten, dass TANGO weder in primären Monozyten, noch in prä-monozytären Zelllinien exprimiert wird, wenn diese Zellen in Suspension gehalten werden und ihnen keine Möglichkeit zur Adhäsion gegeben wird bzw. wenn ihnen keine chemotaktischen Substanzen wie Lipopolysaccharid (LPS) oder Phorbol Myristate Acetate (PMA) zur Aktivierung zur Verfügung gestellt werden. Wir beobachteten jedoch, dass TANGO nach einer Behandlung mit PMA, welches unmittelbar zu einer Aktivierung und Adhäsion der Zellen führt, induziert

werden konnte. Diese Ergebnisse gaben uns die ersten Hinweise darauf, dass die Expression von TANGO über die Adhäsion reguliert sein könnte. Zudem fanden wir mittels Interaktionsstudien heraus, dass TANGO mit dem leukozyten-spezifischen β 2 Integrin CD11c/CD18, auch bekannt unter dem Namen Integrin alpha X oder p150.95, interagieren kann.

Die leukozytären Adhäsionsmoleküle der β 2-Integrinfamilie LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) und p150/95 (CD11c/CD18) sind für die Extravasation von Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Rahmen akuter inflammatorischer Prozesse essentiell, da sie adhäsive Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln. Die Frage, wie die β 2-Integrin-vermittelte Adhäsion kontrolliert und in den Prozess der ortsgerichteten Migration überführt wird, ist bisher jedoch noch nicht im Detail gelöst. Dennoch ist bekannt, dass die Kommunikation zwischen Monozyten und dem Endothel mittels zweier Mechanismen erfolgt. Das eine Kommunikationssystem wird von löslichen Faktoren wie Zytokinen bereitgestellt, der zweite Mechanismus ist die Interaktion von Zellen über Zellkontakt. Dieser wird über Ligand-Rezeptor-Bindung von Oberflächenmolekülen, den Adhäsionsmolekülen, geregelt. Entsprechend ihrer Struktur werden Adhäsionsmoleküle in verschiedene Familien unterteilt, wozu die Immunglobulin-Superfamilie, die Selektine, die Integrine und weitere gehören. ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1= CD54) ist ein Adhäsionsrezeptor, der konstitutiv auf Endothelzellen und Leukozyten vorkommt und bei Aktivierung der Zelle mit IL-1 oder TNF- α stark hochreguliert wird. Durch starke Bindung an die β 2 Integrine wird die Leukozytenadhäsion bewirkt. Auf Monozyten besitzt ICAM-1 eine Funktion in der Phase des „Rollens“ (Ley 1996). PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1= CD31) ist ein auf Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen induzierbarer Adhäsionsrezeptor, der bei der Bindung von Entzündungszellen am Endothel eine wichtige Rolle spielt. Dabei scheint PECAM-1 insbesondere für die Transmigration von Leukozyten notwendig zu sein. Durch Wechselwirkung mit Integrinen bewirkt PECAM-1 die Leukozytenextravasation. Selektine sind membrangebundene Glykoproteine, die entsprechend ihrer Ursprungszellen in L-(Leukozyten), E-(Endothel) und P-(Plättchen und Endothel) Selektine eingeteilt werden (Bendas et al. 1999). Die Induktion der Selektinexpression durch Entzündungsmediatoren steuert Dauer und Intensität des „Rollens“. Während P-Selektin in Kombination mit L-Selektin in der Frühphase der Entzündung das „Zellrollen“ vermittelt, ist E-Selektin durch seine langsamere Bindungskinetik für die Überleitung zur festen Adhäsion verantwortlich. Innerhalb der Gruppe der Integrine existieren mindestens 15 α - und 8 β -Ketten. Integrine sind Heterodimere, bestehend aus einer nicht kovalent gebundenen α und β Untereinheit und werden abhängig vom Zustand der Aktivierung bzw. Differenzierung unterschiedlich auf Leukozyten exprimiert. Sie können mehr als einen spezifischen Liganden binden und kommen in verschiedenen Aktivierungszuständen vor. β 1-Integrine vermitteln vorwiegend

Zell-Matrix-Adhäsion, $\beta 2$ -Integrine sind für eine Vielzahl immunologischer Vorgänge unentbehrliche Rezeptoren. Sie vermitteln im Rahmen der Entzündung die feste Anhaftung von Lymphozyten und Monozyten an das Endothel. LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen-1 (= CD11a/CD18)) ist ein auf allen Leukozyten konstitutiv vorkommendes Integrin, das durch Bindung seiner Liganden ICAM-1 und ICAM-2 die Leukozytenadhäsion am Endothel vermittelt (Marlin und Springer 1987). Der Mac-1 Rezeptor (= CD11b/CD18) ist ein Heterodimer der $\beta 2$ Integrin Familie, welcher Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten an ICAM-1 der Endothelzellen bewirkt (Sun et al. 2006). Mac-1 ist bei der Adhäsion und Transmigration durch Endothel und Epithel von Bedeutung. P150,95 ist ebenfalls ein Mitglied der Leukozyten-Integrin Familie und wird auf aktivierten Leukozyten exprimiert. Im Vergleich zu LFA-1 und Mac-1, ist p150,95 jedoch funktionell weniger gut charakterisiert. Nachfolgende Skizze (Abbildung 77) zeigt die wichtigsten leukozytären Adhäsionsmoleküle, die am Prozess des „Rollens“ und der Extravasation von Monozyten beteiligt sind.

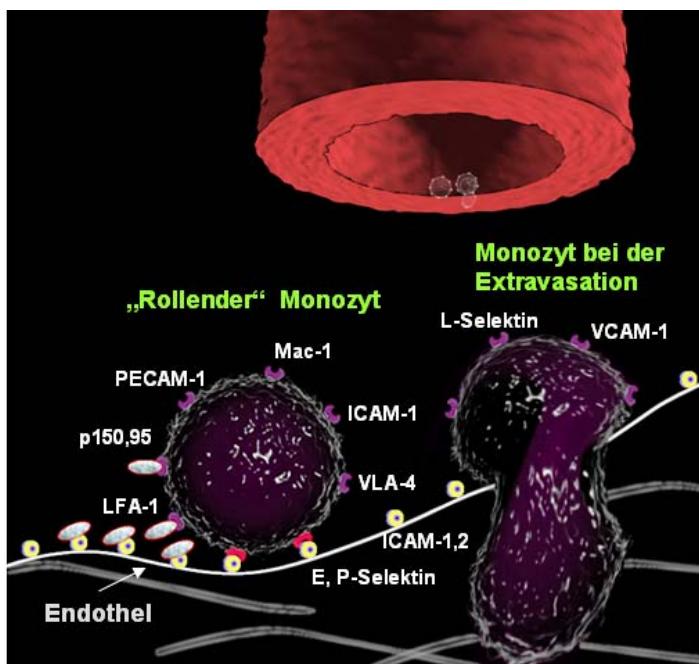


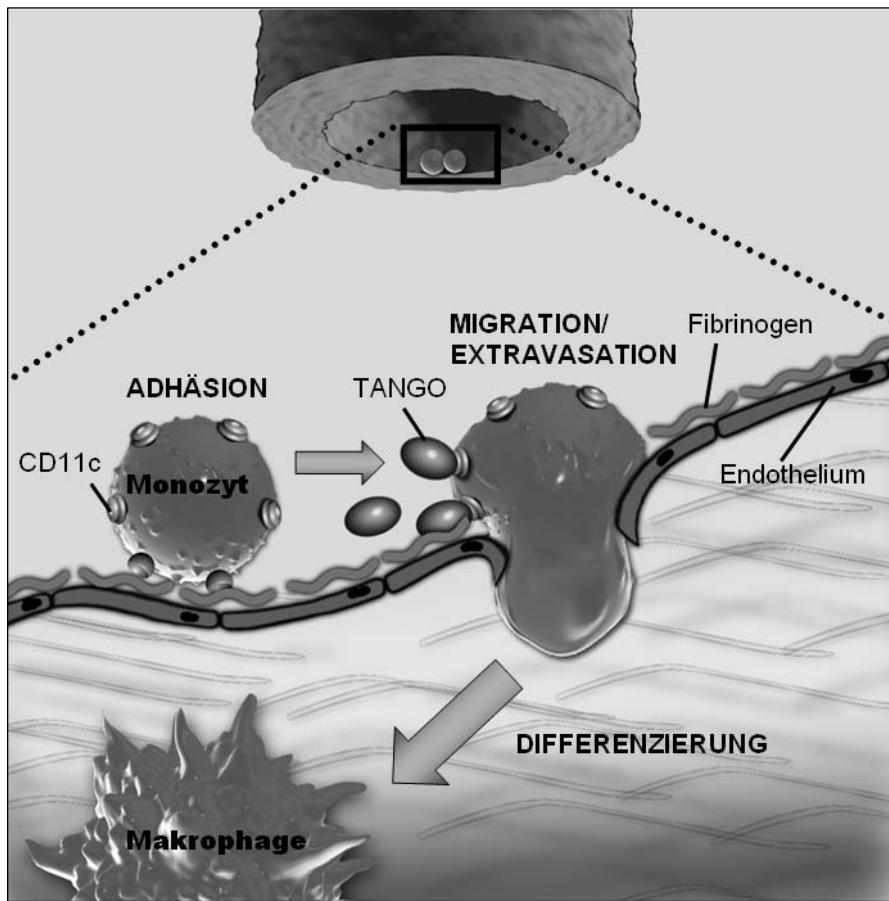
Abbildung 77 Monozyten bewegen sich vorwiegend nahe dem Endothel. Nach einem initialen Kontakt „rollender“ Monozyten kommt es über Selektin vermittelte Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu schwach affinen Bindungen am Gefäßendothel. L-Seliktin bewirkt dabei vorwiegend das Einfangen von Leukozyten aus dem Blutstrom, die Bindungen sind schnell aber instabil (Ley 1996; Luscinskas und Lawler 1994). Auf den Endothelzellen führen Thrombin und Histamin zur Freisetzung von P-Seliktin, die Zytokine IL-1 und TNF α bewirken eine Expression von E-Seliktin. Monozyten binden über eine primär schwache Bindung an P- und E-Seliktin, und versuchen dann, nach einer rollenden Adhäsion in Blutstromrichtung, sich stärker zu fixieren. Die aktivierten

Integrine binden die „rollenden“ Leukozyten fest an das Endothel. Dabei sind z.B. Kontakte wie LFA-1/ICAM-1 wesentlich. Nach Fixation beginnt die transendotheliale Migration. Die Leukozyten werden flach und migrieren durch das Endothel.

Da sich die Interaktion von TANGO mit dem leukozyten-spezifischen $\beta 2$ Integrin CD11c (Integrin alpha X; p150.95) mehrfach bestätigen ließ, fokussierten wir uns auf die Bedeutung dieser Interaktion. Bisherige Studien zeigten, dass CD11c an das Komplement-Fragment iC3b (Malhotra et al. 1986; Bilsland et al. 1994), an Matrixmoleküle wie Fibrinogen (Loike et al. 1991) und an verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, ICAM-2, ICAM-4, VCAM-1 (Blackford et al. 1996; Ihanus et al. 2007; Sadhu et al. 2007), die sich auf den Leukozyten selbst, bzw. auf den Endothelzellen befinden, binden kann. Bevor die Leukozyten in der

Lage sind zu adhären, müssen sie jedoch aktiviert werden. Der molekulare Aktivierungs- bzw. Regulationsmechanismus von CD11c/CD18 ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Deshalb wollten wir wissen, ob TANGO dabei eine Rolle spielen könnte. Dazu untersuchten wir, ob TANGO ein potentieller Ligand für die Aktivierung von CD11c sein könnte und ob, TANGO den Adhäsionsprozess von Monozyten an das Endothel beeinflussen kann. Dazu inkubierten wir prä-monozytäre Zelllinien (HL-60, THP-1, U937), die auf fibrinogenbeschichteten Platten bzw. auf einer konfluenten Schicht aus Endothelzellen (HMECs) ausgesät wurden, mit rekombinantem TANGO. Es konnte dabei eine Adhäsionsabnahme der prä-monozytären Zellen an die Matrix (Fibrinogen bzw. Endothelzellen), bedingt durch TANGO, beobachtet werden (Abbildung 74 C, D). Dies ließ uns annehmen, dass TANGO möglicherweise ein inhibitorischer Ligand für CD11c sein könnte. Inkubierte man diese prä-monozytären Zellen auf der selben Matrix zusätzlich mit PMA, so konnte ein noch stärkerer Adhäsionsverlust beobachtet werden (Abbildung 74 E, F). Miller et al., beschreiben, dass die prä-monozytären Zellen U937 und HL-60 im inaktiven Zustand kein leukozyten-spezifisches Integrin Mac-1 und CD11c sondern nur LFA-1 produzieren (Miller et al. 1986). Nach der Stimulation dieser Zellen mit PMA konnte die Expression von Mac-1 und CD11c induziert werden. Diese Ergebnisse von Miller et al., konnten wir für CD11c bestätigen (Abbildung 73) und ließ uns vermuten, dass die gleichzeitige Induktion von TANGO und CD11c nach Stimulation mit PMA die Ursache für den verstärkten Adhäsionsverlust der prä-monozytären Zellen an die Matrix sein könnte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass TANGO die Bindung zwischen dem Integrin CD11c und dem Matrixadhäsionsmolekül Fibrinogen bzw. zwischen CD11c und Zelladhäsionsmolekülen wie ICAMs oder VCAMs auflöst, was die Abnahme der Adhäsion von diesen prä-monozytären Zellen an Fibrinogen bzw. an die Endothelzellen erklären würde. Eine Abnahme der Zelladhäsion hat meistens eine verstärkte Migrationsfähigkeit zur Folge. Dies ließ sich an modifizierten Boydenkammermigrationsassays auch bestätigen (Abbildung 75). Ein ähnlicher Integrin-inhibierender Mechanismus wurde für das homologe MIA Molekül beschrieben (Bauer et al. 2006) (Abbildung 76).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TANGO mit dem leukozytenspezifischen Integrin CD11c interagieren kann und gleichzeitig mit CD11c nach Adhäsion von Monozyten induziert wird. TANGO löst durch die Bindung an CD11c vermutlich die Adhäsion der Monozyten an die Matrix (Endothel) auf, was somit die Migration (Extravasation) dieser Zellen fördert. Nachfolgende Übersicht (Abbildung 78) stellt hypothetisch die Funktionsweise von TANGO während der Monozytenadhäsion bzw. Migration dar. Es müssen jedoch noch weitere Untersuchungen folgen, um diese Hypothese zu bestätigen.

**Abbildung 78**

Hypothese zur Funktion von TANGO während der Monozyten Extravasation. TANGO interagiert mit dem leukozytenspezifischen Integrin CD11c auf aktivierten Monozyten, löst dadurch die Bindung zwischen CD11c und Adhäsionsmolekülen des Endotheliums auf und fördert somit die Migration (Extravasation) durch das Endothel ins Gewebe.

9 Materialien und Methoden Teil I und II

9.1 Materialien

9.1.1 Allgemeine Materialien

Amersham Bioscience, Braunschweig, Braun, Frankfurt am Main	Streptavidin Sepharose High Performance Aqua injectabile
BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur
Behrens, Hamburg	Agar
BioRad, Richmond, USA	Immun- Blot™ PVDF Membran, Coomassie
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA	SeaKem® LE agarose
Clontech, California, USA	Diverse Primer
DakoCytomation, Dänemark	Streptavidin/HRP, Ziegenserum, AEC-Substrat-System LSAB2 Kit
Invitrogen, California, USA	SuperScript™ II RNAse H ⁻ Reverse Transkriptase, SeeBlue® Plus2 Protein Standard, Ready- Load™ 100 bp und 1kb DNA Leiter, pcDNA3 Vektor, pcDNA3.1/ Lipofectamine PLUS™, Lipofectamine™, Geltrocknungskit, Silverexpress Silver Staining Kit Dapi Eindeckelmedium Vectaschild
Linaris, Wertheim-Bettingen	Sterilfilter
Millipore, Billerica, USA	T4 DNA Ligase, diverse Enzyme
New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	Polykarbonat Membranen für Boydenkammer
Neuro Probe Gaithersburg, MD, USA, Nunc, Wiesbaden	96-well Platten für BCA Messungen
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	DMEM, RPMI, Fötiales Kälberserum, Trypsin, PBS, Penicillin/ Streptomycin
Pierce/Peribo, München	BCA Protein Assay Kit, Fluorescein konjugiertes Neutravidin
Promega, Madison, Wisconsin, USA	Luc-Assay (dual) Reagenz
PromoCell, Heidelberg	Melanozytenmedium Growth Medium M2
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi Kit, Rneasy® Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, Rneasy Shredder
Roche Diagnostics, Mannheim	Diverse Restriktionsenzyme, Taq-Polymerase, Ethidiumbromid, RNase A, RTS Avi-Tag Biotinylierungskit, Lightcycler Kapillaren, Dispase, dN6 Primer, SAP (Phosphatase), Light Cycler Fast Start DNA Master Kit, XTT Reagenz
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x- Konz., Roti® Load 4x, nicht denaturierend, Phenol Chlorophorm
Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Antikörper
Sigma Genosys, Cambridge, England	Primer, Ampicillin, BSA Albumin Bovine, Chloramphenicol, DMEM Medium, DMSO, PMA, SDS, DTT, Ethidiumpromid, IPTG, Tween20, Monoklonaler anti-β-Aktin Antikörper
Stratagene, Heidelberg	XL2- Blue MRF ultrakompetente Zellen
Takara, Japan	Lightcycler Kit
VWR, Darmstadt	Kaiser's Glycerin Gelatine, Schnellfärbelösung 1, 2, 3 für Boydenkammer
Whatman International Ltd, Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier
Zymed Laboratories Inc, San Francisco, USA	NBT/BCIP Substrate Kit

9.1.2 Geräte

Blotapparaturen:

Whatman Biometra, Göttingen Minigel Twin, Fastblot B34

Gelelektrophoreseapparaturen:

BioRad, München Wide Mini Sub[®] Cell GT

Heiz- und Kühlblöcke:

Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Thermomixer comfort, Thermomixer compact

Mikroskope:

Leitz, Wetzlar Labovert FS, Aristoplan
Zeiss, Jena Axiovert 10, ICM 405, Axio Imager Z1

Spannungsgeräte:

BioRad, München Modell 200/2.0 Power Supply, Consort E455
Amersham Pharmacia Biotech, Little Electrophoresis Power Supply 1001,
Chalfont, England Electrophoresis Power Supply 301

Waagen:

Sartorius, Göttingen R160P, L2200S

Zentrifugen:

Eppendorf, Hamburg Centrifuge 5415C, MiniSpin Plus
Heraeus, Hanau Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0
Kisker, Steinfurt Tischzentrifuge

Sonstige Geräte:

Bachofer, Reutlingen UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm
Bühler, Edmund, Tübingen Schüttler SM 25
Heidolph, Kehlheim Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000
Kendro Laboratories, Hanau Herasafe, Sicherheitswerkbank, KS, Zellinkubator
Roche Diagnostic, Mannheim CO2- Auto- Zero
MJ Research, Waltham, USA Lightcycler II, RTS System
Tuttnauer/Systec, Wettenberg Peltier Thermal Cycler PTC- 200
WTW, Weilheim Autoklav 2540 EK
MWG Biotech, Ebersberg pH-Meter pH522
Savant, New York, USA ELISA-Reader Emax
Speedvac Concentrator SC 110

9.1.3 Bakterienstämme

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF'	Ultrakompetente Escherichia Coli
DH5alpha	Ultrakompetente Escherichia Coli speziell für große Fragmente

9.1.4 Säugerzelllinien

Humane Melanomzelllinien:

HMB2	aus einer Melanommetastase
HTZ 19d	aus einer Hirnmetastase eines Melanoms
Mel Ei	aus einem Primärtumor
Mel Ho	DSMZ Nr.: ACC62, aus einem Primärtumor
Mel Im	aus einer Melanommetastase
Mel Ju	aus einer Melanommetastase
Mel Juso	DSMZ Nr.: ACC74, aus einem Primärtumor
Mel Wei	aus einem Primärtumor
Sk Mel 3	ATCC Nr.: HTB-69, aus einer Lymphknotenmetastase eines Melanoms
Sk Mel 28	ATCC Nr.: HTB-72, aus einem Primärtumor

Humane Kolon Zelllinien:

CaCo-2	ATCC-Nr.: HTB-37, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primärem kolorektalem Adenokarzinom
LoVo	ATCC-Nr.: CCL-229, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus Metastase eines kolorektalen Adenokarzinoms
HT29	ATCC Nr.: HTB-38, Humane Kolonkarzinom Zelllinie aus primärem kolorektalem Adenokarzinom
SW48	ATCC-Nr.: CCL-231, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primärem kolorektalem Adenokarzinom
SW480	ATCC-Nr.: CCL-228, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primärem kolorektalem Adenokarzinom
HCT116	ATCC-Nr.: CCL-229, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primärem kolorektalem Karzinom
HT29M3	modifizierte HT29 Kolonkarzinom Zelllinie

Humane Leberzelllinien:

HepG2	(ATCC HB-8065)
PLC	(ATCC CRL-8024)
Hep3B	(ATCC HB-8064)

Humane Blutzelllinien:

HL-60	Human acute myeloid leukemia; DSMZ: ACC 3
THP-1	Human acute monocytic leukemia; DSMZ: ACC 6
U937	Human histiocytic lymphoma; DSMZ: ACC 5

Primäre humane Zellen:

Melanozyten	isoliert aus der Vorhaut
CEC	Primäre humane Kolon epitheliale Zellen
PHH	Primäre humane Hepatozyten
F5	isiolerte Fibroblasten von einem gesunden Spender

NHDF 3F0379	Fibroblasten von gesunden Spendern (Chambrex)
NHDF 9F0889	
Z11M06/2a	isolierte Fibroblasten aus Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie
Z06T02/1b	
Z06C06/1a	
K00C0/1b	isolierte Fibroblasten aus Patienten mit Keloid
K61001/3a	
K06C01/3a	

Sonstige Zelllinien:

293T	Nierenepithelzellen; ATCC CRL-1573
3T3	Swiss albino Mausfibroblasten; DSMZ: ACC 173
HMEC-1	humane microvasculare endotheliale Zelllinie CDC/ EU-HMEC-1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von "Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Georgia, USA)"

9.1.5 Vektoren

Vektoren:

pCMX-PL1	Konstrukt aus pUC19 und CDM8
pCMX-PL2-Flag	Konstrukt aus pUC19 und CDM8 mit Flag Erkennungssequenz
pcDNA3.1	Expressionskonstrukt mit Neomycinkassette
pIVEX 2.3 MCS	Expressionsvektor für RTS Transkriptions-/Translationssystem (Roche)
pCRII-TOPO	TOPO-TA Klonierung zur direkten Insertion von Taq Polymerase amplifizierten PCR Produkten in den Vektor; (Invitrogen)
pRLTK	zur Transfektionskontrolle bei der Durchführung des Luciferase Assays; (Promega); enthält das Renilla Luciferase Gen aus <i>Renilla renifor</i> .
pGL3 basic	besitzt eine modifizierte Kodierungsregion des Luciferase-Gens des Leuchtkäfers <i>Photinus pyralis</i> ; (Promega)
pBluescript II SK	Konstrukt aus pUC19; Phagemid
pCMV6-XL5-FL	Expressionsvektor mit Fussel-15 full-length; über NotI Schnittstellen kloniert
fussel-15	
(CAGA) ₉ -MLP-Luc	(AGCCAGACA) ₉ -MLP-Luc in pGL3-basic Vektor über Xhol und HindIII; zur Verfügung gestellt von Steven Dooley
pBMP-RE-Luc	BMP-Responsive Element in pGL3-basic Vektor; zur Verfügung gestellt von Steven Dooley
Smad1, 2, 3	jeweils in pCMX-PL2; zur Verfügung gestellt von Armin Pscherer; Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
Smad5	in pCMV; zur Verfügung gestellt von Armin Pscherer; Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
Ski	c-Ski (ORF) in pcDNA3-Flag; zur Verfügung gestellt von K. Miyazono, Universität von Tokyo, Japan
pIVEX2.3-TANGO-Avi-tag	Full-length TANGO ohne Signalpeptid in prokaryontischem Expressionsvektor zur Herstellung von rekombinantem biotinyliertem TANGO im RTS System von Roche
senseTANGO	Full-length TANGO in pCMX-PL-1 in sense Orientierung
asTANGO	Full-length TANGO in pCMX-PL-1 in antisense Orientierung
Fussel-15 Homo	Homologiedomäne von Fussel-15 in pcDNA3.1
Fussel-18 Homo	Homologiedomäne von Fussel-18 in pcDNA3.1

9.1.6 Primer

Die Primer wurden von der Firma SIGMA Genosys bzw. von der Firma Clontech synthetisiert. Es wurde eine 100µM Stammlösung der Primer durch Lösen in H₂O hergestellt und bei -20°C gelagert. Für PCR Amplifikationen wurden die Primer jeweils 20µM eingesetzt.

Primer zur Amplifikation und Klonierung von Fussel-15:

Name	forward	reverse
Chr15for1617/Chr15rev1059	5'-caaggacaccgagagcatc-3'	5'-ctaggcaacacgcgg-3'
Chr15for407/Chr15rev1240	5'-caatggctacgaagatggctg-3	5'-ggtcgagtgaaagatgaa-3'
Chr15for108/Chr15rev476	5'-cagaggagttgaacgca-3''	5'-gtatcctcatgcctcgct-3'
Chr15for861/Chr15rev1188	5'-gcagatccaaacaccctc-3	5'-gcacttgatgcacttgc-3'
Chr15for1/Chr15rev394	5'-atgatccaaagagcctgg-3'	5'-cacacaagtgtctgtgg-3'
Chr15for1/Chr15rev476	5'-atgatccaaagagcctgg-3'	5'-gtatcctcatgcctcgct-3'
Chr15for1617/Chr15rev2587	5'-caaggacaccgagagcatc-3'	5'-tgaaggagcagtggcag-3'
Chr15for108/Chr15rev394	5'-cagaggagttgaacgca-3	5'-cacacaagtgtctgtgg-3'
Chr15for1617/Chr15rev2234	5'-caaggacaccgagagcatc-3'	5'-ccatctcgccctgtgtga-3'
Chr15for1617/Chr15rev1768	5'-caaggacaccgagagcatc-3	5'-aggcggaaatttagctgg-3'
Chr15for2454/Chr15rev2587	5'-gtgtaacgaaactcgaccagg-3'	5'-tgaaggagcagtggcag-3'
Chr15for108/Chr15rev476	5'-cagaggagttgaacgca-3	5'-gtatcctcatgcctcgct-3'
fussel15fw4/fussel15re2607	5'-acctatgatccaaagag-3'	5'-ctaggcaacacgcgg-3'

Primer zur Amplifikation und Klonierung von Fussel-18:

Name	forward	reverse
Chr18 for101/Chr18rev617	5'-ccaacctcaaaccaccagg-3'	5'-aagtggctgcgtctggctga-3'
Chr18 for101/Chr18rev623	5'-ccaacctcaaaccaccagg-3'	5'-gagttgaagtggctgcgtc-3'
Chr18 fw380/Chr18rev617	5'-gcaagtcgtccctggcgaaa-3'	5'-aagtggctgcgtctggctga-3'
fussel18fw13/fussel18rev+9	5'-ttctgcggcgaggatgg-3'	5'-tggaaatcataacc-3'
Chr18fw1/Chr18rev891	5'-atggctccagtcgc-3'	5'-tcataaccaaaatgtgtcctc-3'
Chr18 fw380/Chr18rev623	5'-gcaagtcgtccctggcgaaa-3'	5'-gagttgaagtggctgcgtc-3'

Nukleotidsequenz der Fussel-15 siRNA:

Name	Sequenz
siRNA1	AACCCAACCAGGTGGCGAGAdTdT-Überhang
siRNA2	AACCACCCAAGCTGCCGAGAdTdT-Überhang

Primer zur Amplifikation und Klonierung von TANGO:

Name	forward	reverse
Tango for2/Tango rev1	5'-ggctctgaagattcac-3'	5'-atccgtctcatctgtgg-3'
Tango for1/Tango rev1	5'-atgttaatgtaccgcgg-3'	5'-atccgtctcatctgtgg-3'

Primer zur Klonierung von Avi-TANGO (rekombinante Proteinherstellung):

Name	Sequenz
Avi-TANGO FXa fw	mit Nde I Schnittstelle für pIVEX2.3-MCS Klonierung, nach Signalpeptid, Start in Nde I, mit biot. Bindestelle

Sonstige Primer:

Name	forward	reverse
β-Aktin fw/rev	5'-ctacgtggccctggacttcgagc-3'	5'-gatggagccgcccgtccacacgg-3'
TGF-β1 fw/rev	5'-gagatggcaggactctgataacacc-3'	5'-aaagtgtctaggattacaggcgtgagc-3'
TGF-β2 fw/rev	5'-tctagggtggaaatggatacacgaacc-3'	5'-tgttacaaggcatcatcggtgtcg-3'
TGF-β3 fw/rev	5'-ccctgaccatcctgtactatgttggg-3'	5'-gggttagcccaaatccattgcacac-3'
BMP2 fw/rev	5'-gacactgagacgcgttcc-3'	5'-ccatggtcgacacctttagg-3'
BMP3 fw/rev	5'-gcagatattggctggagtgaaatggattatct-3'	5'-agcgcaagactctactgtcatgtttagg-3'
BMP4 fw/rev	5'-gattcccggtccaagctatc-3'	5'-tccatgattctgtacagcc-3'
BMP6 fw/rev	5'-aaggctggcttggaaattgacatcagc-3'	5'-ggtagagcgattacgactctgttgc-3'
BMP7 fw/rev	5'-gccagcgtcaagatagccatttcc-3'	5'-gagcacctgataaacgctgatccgg-3'

9.2 Medien, Antibiotika und Puffer

9.2.1 Medien zur Anzucht von E.coli und Säugerzellkulturen

Luria Bertani Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl Substanzen wurden in dest. H ₂ O gelöst und autoklaviert Für Platten: + 15 g/l Agar Zur Selektion: + 100 µg/ml Ampicillin
DMEM	Dulbecce´s modified eagle´s Medium (Sigma) Zusätze: 10-15 % (v/v) FKS 0.1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin

9.2.2 Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml in dest. H ₂ O (-20°C)
Geneticin- Stammlösung	100 mg/ ml in dest. H ₂ O (-20°C)
Kanamycin-Stammlösung	10 µg/ml in dest. H ₂ O (-20°C)

9.2.3 Puffer und Lösungen

RNase A Lösung 10 mM Tris/ HCl pH 7,0
10 mg/ ml RNase A

Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung):

TAE (50x) 2 M Tris/Acetat pH 8,0
50 mM EDTA

DNA-Agarosegel	1-2% (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 40 % (v/v) Sucrose
Ethidiumbromidlösung	0,04 % in H ₂ O bidest

Lösungen für die Zellkultur:

Einfriermedium	50 ml DMEM (mit 10% FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO
1,5-fach Medium für Kollagenkontraktion	1,94g NaHCO ₃ 389 ml H ₂ O 10 ml Penicillin/Streptomycin 10 ml L-Glutamin 10 g DMEM
1x MEM Nährlösung für „anchorage independent growth assay“	0,25 g DMEM Pulver (bei 2x MEM 0,5 g) 0,88 g Na Bicarbonat in 20 ml Aqua dest. Lösen + 0,25 ml nicht-essentielle Aminosäuren Auf 25 ml mit Aqua dest. Auffüllen pH 7,2 steril filtrieren
0,5% Grundagar	5,4 ml 1x MEM 4,5 ml 2x MEM 3,6 ml FKS 4,5 ml 2% Agar
0,3% Topagar	0,6 ml Grundagar 0,4 ml Zellsuspension (in 1x MEM)

Lösungen für die Plasmidisolierung aus E.coli (Mini-Präparation):

Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	60 ml 5 M NaOAc 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H ₂ O

Lösungen und Gele für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteinauf trennung):

SDS-Page-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
12,5%-Trenngel	31,25 % (v/v) Acrylamid:Bis 40% 37,5 % (v/v) 1 M Tris pH 8,8 0,1 % (v/v) SDS 0,05 % (v/v) APS 0,05 % (v/v) TEMED

4%-Sammelgel	10 % (v/v) Acrylamid:Bis 40% 12 % (v/v) 1 M Tris pH 6,8 0,1 % (v/v) SDS 0,05 % (v/v) APS 0,05 % (v/v) TEMED
--------------	---

Lösung für die Ko-Immunpräzipitation:

Bindungspuffer	150 mM NaCl 20 mM NaPO ₄
----------------	--

Lösungen für Western Blot:

Western Blot-Transferpuffer	10 % (v/v) Methanol 25 mM Tris 190 mM Glycin 80 g/l NaCl 2,0 g/l KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ mit HCl auf pH 7,4 eingestellt
PBS (10x)	3-5 % BSA in PBS; 3-5 % BSA in Milchpulver
Blockierungslösung	

Lösungen für Immunfluoreszenz:

4 % Paraformaldehydlösung	30 ml dH ₂ O 2 g Paraformaldehyd mit 10N NaOH bis Lösung klar wird 16,6 ml 3x PBS pH auf 7,4 eingestellt bei -20°C lagern
Triton-X-100 Lösung	0,1 % Triton-X-100 in PBS
Blockierungslösung	1 % BSA in PBS

Lösung zur Isolation von Gesamtprotein:

RIPA Puffer	50 mM Tris- HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Nonidet® P40 0,5 % Natriumdesoxycholat 0,1 % SDS
-------------	--

9.3 **Methoden**

9.3.1 Allgemeine Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten fanden in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen statt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Lamina durchgeführt. Experimente, bei denen nicht explizit die Reaktionstemperaturen angegeben werden, fanden bei Raumtemperatur statt.

9.3.1.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

9.3.1.1.1 **Kultivierung von Bakterien**

Die Bakterienstämme XL2-Blue bzw. DH5-alpha wurden sowohl auf festen Nährböden als auch in Schüttelkultur kultiviert. Für die Selektion transformierter Bakterien wurde das Medium bzw. die Nährplatte je nach Resistenzgen auf dem Plasmid mit einem Selektionsantibiotikum versetzt (Ampicillin bzw. Kanamycin). Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde ein Klon mit einer sterilen Spitze gepickt, bei Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank, die der flüssigen Kulturen bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm.

9.3.1.1.2 **Transformation von *E.coli***

Zur Transformation kompetenter *E.coli* wurden entsprechende Mengen an Plasmid-DNA zu 100µl kompetenten Zellen gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen für 45-90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock erfolgte eine kurze Abkühlung der Bakterien auf Eis und Zugabe von 500µl LB Medium. Darauf ließ man die Kultur 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln anwachsen. Die transformierten *E.coli* wurden dann eine Minuten bei 2300 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbliebenen Medium wieder resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert.

9.3.1.2 Isolierung von Plasmid DNA (Mini- und Maxipräparation)

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Plasmid **Minipräparation** wurden 3ml steriles LB Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und bei 37°C und 250 rpm über Nacht auf dem Schüttelinkubator herangezogen. 1,5ml der

Schüttelkultur wurden bei 4000 U/ min. abzentrifugiert, das Kulturmedium entfernt und das Bakterienpellet in 100µl der Lösung I (**siehe 9.2.3**) resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden 200µl der Lösung II zur Lyse der Bakterien zugegeben. Dieser Schritt ermöglicht die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA. Proteine wurden durch SDS denaturiert, DNA durch das alkalische Milieu. Um denaturierte Proteine zu entfernen, folgte die Zugabe von 150µl der Lösung III (**siehe 9.2.3**) und eine 3-5-minütige Inkubation auf Eis. Die Sedimentation der dabei präzipitierten Proteine und Membranbestandteile mit der daran anhaftenden chromosomalen DNA erfolgte mittels Zentrifugation bei 13000 U/ min für 5 Minuten. Der Überstand der Zentrifugation wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 900µl 100%igem Ethanol gefällt. Danach wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und 10 Minuten bei 13000 U/ min abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen und das Plasmid- DNA Pellet in der Speedvac Zentrifuge 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 10µl eines RNase Mixes resuspendiert und bei 37°C etwa 20 Minuten geschüttelt, um störende RNA aus dem Präparat zu entfernen.

Für die **Midipräparation** wurden 50ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum angesetzt und mit 50µl Bakteriensuspension aus einer Vorkultur versetzt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Die eigentliche Plasmidisolierung erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen bzw. mit dem Macherey-Nagel Plasmid DNA Purification Nucleo Bond Xtra Midi Kit nach der beiliegenden Isolationsanleitung. Die Plasmid-DNA wurde mit 500µl H₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

9.3.2 DNA und RNA Methoden

9.3.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme erfolgte meist in einem Volumen von 10µl mit etwa 0,5µg Plasmid-DNA, 5U des entsprechenden Enzyms und 1µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffer. Die Ansätze wurden für 1-2 Stunden bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

9.3.2.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Auf trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8-2% Agarose in TAE). Das Anfärben der DNA erfolgte nachträglich in einer Ethidiumbromidlösung (0,04%) für 10-30 Minuten. Die angefärbte DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert. Die Größe der Fragmente

konnte durch die Verwendung eines 100bp bzw. 1kb DNA- Größenstandards bestimmt werden.

9.3.2.3 Isolierung und Reinigung von DNA

Die DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung und Färbung in Ethidiumbromid unter UV-Licht ausgeschnitten. Die anschließende Gelextraktion erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach beiliegendem Protokoll.

9.3.2.4 Isolierung von RNA aus Säugerzellen und Geweben

Die Isolation von RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei geringem Probenmaterial wurde der RNA Isolationskit der Firma Macherey-Nagel verwendet, da mit diesem Kit zugleich RNA- und Protein isoliert werden konnten.

9.3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde mittels UV-Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für optische Dichten < 1 gilt näherungsweise folgender linearer Zusammenhang: 1 OD_{260nm} Einheit = 50µg/ ml dsDNA.

9.3.2.6 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Für die Reverse Transkription wurden 2µl RNA, 4µl First Strand Buffer (5x), 2µl DTT (0,1M), 1µl dNTP (10mM), 1µl dN6 Random Primer , 9µl H₂O für 5 Minuten auf 70°C erhitzt. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 1µl Superscript II dazupipettiert und der Reaktionsmix bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Inaktivierung der Superscript II erfolgte bei 70°C für 10 Minuten mit anschließendem RNase Verdau für 30 Minuten bei 37°C.

9.3.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50µl. Eingesetzt wurde 1x Taq-Polymerase-Puffer, je 1µl forward und reverse Primer (20µM), 1mM dNTPs und 5U Taq-Polymerase. Die Amplifikation der cDNA erfolgte durch unterschiedliche repetitive Zyklen und unterschiedliche Annealingtemperaturen abhängig vom amplifizierenden Gen und der Primerkombination. Das Standardprogramm lautet folgendermaßen: Denaturierung (30s, 94°C), Annealing (1min, 58°C) und Elongation (1min, 72°C).

9.3.2.8 Quantitative RT-PCR

Die Quantifizierung der Expressionsstärke von mRNA wurde in einer quantitativen RT-PCR Reaktion mit Hilfe des LightCycler II Systems von Roche Diagnostics durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem in **9.3.2.6** beschriebenen Protokoll. Die quantitative PCR Reaktion wurde in einem 20µl Ansatz nach Anleitung des TAKARA SYBR Premix Ex Taq Protokolls durchgeführt: 2µl cDNA Template (<100ng), 0,5µl forward Primer (20µM), 0,5µl reverse Primer (20µM), 10µl SYBR Premix Ex Taq (2X) und 7µl dH₂O. Der Versuchsansatz wurde folgendem Standardprogramm mit entsprechenden Variationen im LightCycler II unterzogen:

Initiale Denaturierung:	20°C/ s auf 95°C, 30 s	1 Zyklus
3 Stufen PCR:	20°C/ s auf 95°C, 3-5 s	
	20°C/ s auf 55-65°C, 10-20 s	40 Zyklen
	20°C/ s auf 72°C, 10 s	

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde das Haushaltsgen β- Aktin benutzt. Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

9.3.2.9 Sequenzierung

Sequenziert wurden RT-PCR Produkte nach der Isolierung und Aufreinigung aus Agarosegelen oder Klonierungsprodukten.

3µl dieser Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Konzentration des Produktes zu bestimmen. Dabei wurden pro Sequenzier- PCR Reaktion etwa 1-2µg DNA benötigt. Als Primer für die Sequenzierung wurden die jeweiligen forward und reverse Primer des RT-PCR Produktes oder Primer aus dem Klonierungsvektor verwendet. Die Sequenziertemperatur wurde in Abhängigkeit vom GC Gehalt der Primer gewählt. Dabei wurde zwischen ‚low‘, einem GC Gehalt unter 50%, und ‚high‘, dem GC Anteil im Primer über 50%, unterschieden. Pro Sequenzieransatz wurden 1-2µg DNA, 2µl Primer (3,2µM) und je 1µl Premix (Applied Biosystems, USA) verwendet und mit H₂O auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt. Der Premix enthielt dabei die fluoreszenzmarkierten Nukleotide, spezielle Reaktionspuffer und die Taq- Polymerase. Nach der Sequenzier- PCR Reaktion wurde eine Ethanolfällung des PCR Produktes durchgeführt. Das gefällte Produkt wurde anschließend mit 25µl des Template Suppression Reagents (Applied Biosystems, USA) gelöst, bei 90°C für 2 Minuten denaturiert und nach der Denaturierung auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz in spezielle Genetic Analyzer Cups (Applied Biosystems, USA) überführt und im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA) analysiert.

9.3.3 Protein Methoden

9.3.3.1 Rekombinante Herstellung von biotinyliertem TANGO

Um die Detektion von TANGO in den Versuchen einfacher zu gestalten, wurde das Protein mit Biotin gekoppelt. Zunächst wurde die cDNA von TANGO in den Expressionsvektor pIVEX2.3-MCS (Roche) kloniert. Die Sequenz beinhaltet einen Abschnitt, der für eine Biotinbindestelle kodiert (*Avi-Tag*). Um zu verhindern, dass TANGO sezerniert wird, wurde die dafür verantwortliche Signalsequenz bei der Klonierung nicht eingeschlossen. Die 5'Primer wurden mit einer NdeI-Restriktionsschnittstelle, einer *Avi-Tag*-Sequenz und einer FXa-Schnittstelle hergestellt. Die 3'Primer enthielten ein Stop-Kodon und eine BamHI-Restriktionsschnittstelle. In einer PCR-Reaktion wurde der mit *Avi-Tag* fusionierte, kodierende Teil der TANGO-cDNA ohne Signalsequenz amplifiziert. Das Produkt wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pIVEX2.3-MCS (Roche) kloniert. Dieses Expressionsplasmid wurde dann in das *Rapid Translation System* (RTS, Roche) eingesetzt. Dies ist ein zellfreies, auf *E.coli* basierendes, *in vitro* Protein Transkriptions-/Translationssystem. Mit Hilfe des RTS Systems war es möglich, ausreichend große Proteinmengen von ca. 4µg/µl für funktionelle Assays herzustellen. Die Expression des erzeugten biotinylierten TANGO Proteins konnte mittels Seldi-Toff Massenspektrometrie und mittels Western Blot bestätigt werden. Funktionell bestätigten Boydenkammerassays und Scratchassays die Aktivität des Proteins.

9.3.3.2 Herstellung von Gesamtproteinlysaten

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit dem Zellschaber abgeschabt und in 1ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 4000rpm für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 200µl RIPA Puffer lysiert und danach für 15 Minuten bei 4°C im Schüttelinkubator geschüttelt. Die in Puffer gelösten Proteine konnten dann durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 U/min und 4°C von den nicht-löslichen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Das Proteinextrakt wurde in neue Gefäße überführt und bei -20°C gelagert.

9.3.3.3 Herstellung von Proteinfraktionen

2-3 x 10⁵ Zellen wurden je Well in einer 6-Well Platte ausgesät und am folgenden Tag mit 0,5µg des entsprechenden Plasmids für 24 Stunden transfiziert. Die Proteinisolation der einzelnen Fraktionen (Membran, Zytoplasma, Kern, Zytoskelett) wurden mit dem ProteoExtract Subcellular Proteome Extraktionskit der Firma

Calbiochem (Calbiochem, EMD Biosciences, Darmstadt, Germany) nach Anweisungen des Protokolls durchgeführt.

9.3.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden unter Verwendung des BCA-Protein-Assay Kits (Pierce) bestimmt. Diese basiert auf der alkalischen Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine (Biuret Reaktion), welches mit Bicinchromsäure (BCA) einen lila Farbkomplex bildet, der durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann.

Zu 1µl Gesamtproteinlysat wurden 200µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in eine 96-Well Platte gegeben und ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung bei 562 nm in einem ELISA-Reader konnte die Absorption bestimmt werden, die durch parallele Quantifizierung von BSA-Standards in Proteinkonzentrationen umgerechnet wurden.

9.3.3.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf Polyacrylamid Gelen aufgetrennt. Falls nicht anders angegeben, wurden jeweils 40µg Proteinlysat in 1x Roti-Load 10 Minuten bei 70°C aufgekocht und anschließend bei 0,8mA/cm² durch SDS-PAGE auf 8 % bis 12 % PAA Gelen aufgetrennt.

9.3.3.6 Proteindetektion mittels Western Blot

Um durch SDS-Page aufgetrennte Proteine durch Antikörper nachzuweisen, wurden diese auf PVDF-Membran übertragen und mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1h bei 1,5mA/cm²) auf die Membran geplottet. Die PVDF-Membranen wurden anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, soweit nicht anders beschrieben, für 1 Stunde bei RT in PBS mit 3% BSA inkubiert und über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper in geeigneter Verdünnung (siehe Auflistung) geschwenkt. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Membran mit einem spezifischen, alkalische Phosphatase konjugiertem 2. Antikörper, für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals gewaschen und das Substrat für die alkalische Phosphatase (NBT/BCIP Substrate Kit) zugegeben und 10 Minuten bis zu 5 Stunden inkubiert bis sich eine Farbreaktion zeigte.

Folgende Antikörperkonzentrationen wurden verwendet:

Antikörper	Verdünnung	Firma
TANGO A	1/200	BioGenes GmbH, Berlin

TANGO B	1/200	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-15 A	1/200	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-15 B	1/200	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-18 A	1/200	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-18 B	1/200	BioGenes GmbH, Berlin
Ski H-239	1/1000	Santa Cruz
Sno	1/333	Upstate
Smad1, 2, 3 H-2	1/2000	Santa Cruz
Smad4 H-552	1/2000	Santa Cruz
BMP6	1/500	Santa Cruz
ITGAX; CD11c H-68	1/200	Santa Cruz
Flag M2	10µg/ml	Sigma
Tubulin beta III TU20	1/50	Chemicon
β-Aktin	1/5000	Sigma
anti-Hase (2. AK)	1/4000	Dako
anti-Maus (2. AK)	1/2000	Sigma
anti-Ziege (2. AK)	1/4000	Chemicon

9.3.3.7 Silberfärbung im SDS-Gel

Silberfärbungen im SDS Gel wurden mit dem *Silverexpress Silver Staining Kit* der Firma Invitrogen durchgeführt. Der Mechanismus der Silberfärbung beruht auf der Reduktion von Silbernitrat zu metallischem Silber in Proteinen. Die Banden werden dort im Gel sichtbar, wo Silberpartikel ausfallen. Die Reaktion basiert auf chemischer Basis. Durch Ammoniumhydroxid werden Silber-Diaminkomplexe gebildet. Die Banden werden daraufhin durch Ansäuerung mit Zitronensäure sichtbar gemacht. Bei der Silberfärbung wurde das Gel nach Fixierung und Sensitivierung mit einer Mischung aus Silbernitrat, Ammonium- und Natriumhydroxid angefärbt. Entwickelt wurde die Färbung mit Formaldehyd und Zitronensäure. Nach Abstoppen der Färbereaktion wurde das Gel mit dem Geltrocknungskit von Invitrogen eingeschweisst.

9.3.3.8 Seldi-Toff Massenspektrometrie

Protein Interaktionen wurden mit Hilfe der Seldi-Toff (surface enhanced laser desorption ionization-time of flight) Massenspektrometrie bestimmt. Diese Untersuchungen wurden bei unserem Kooperationspartner Christian Melle (Core Unit Chip Application, Institut für Human Genetik und Anthropologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) durchgeführt.

Dazu wurden 30µl Streptavidin Agarose Beads (Molecular Probes; Eugene, OR) mit PBS gewaschen und anschließend mit 3µl rekombinantem biotinyliertem TANGO in PBS über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Beads nur mit PBS inkubiert. Parallel dazu wurden 5x 10⁶ HL-60 Zellen, welche mit bzw. ohne PMA kultiviert wurden, lysiert. Der Lysepuffer bestand dabei aus folgenden Komponenten: 100 mM Sodium Phosphat pH 7,5, 5 mM EDTA, 2 mM

MgCl₂, 3 mM 2- β -Mercaptoethanol, 0,1 % CHAPS, 500 μ M Leupeptin und 0,1mM PMSF. Anschließend wurde das Zelllysat ebenfalls mit Streptavidin Agarose Beads inkubiert um unspezifische Bindungen zu entfernen. Im Anschluss wurde das gereinigte Zelllysat mit den Streptavidin Agarose Beads, welche mit rekombinantem TANGO inkubiert wurden, vermischt und für 2 Stunden auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die ungebundenen Proteine wurden durch mehrmaliges Waschen mit PBS , 0,5 mM Sodium Chlorid, 0,05 % Triton X-100 und Aqua bidest entfernt. Die gebundenen Proteine wurden durch 30 μ l 50 % Acetonitril/ 0,5 % Trifluoroacetic acid durch vortexen von den Beads gelöst. Die Eluate wurden dann mit der SpeedVac auf 10 μ l Gesamtvolumen aufkonzentriert und auf ein SDS Gel aufgetragen. Im Anschluss wurde das Gel mit Simply Blue Safe Stain (Enhanced Coomassie, Invitrogen) gefärbt. Interessante Gelbanden wurden ausgeschnitten, entfärbt und getrocknet. Im Anschluss wurden diese wieder rehydratiert und mit 10 μ l einer Trypsinlösung (0,02 μ g/ μ l; Promega) über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Überstand des Verdaus wurde direkt auf einen NP20 ProteinChip Array (Ciphergen) aufgetragen und mit dem ProteinChip Reader (Serie 4000, Ciphergen) nach einem automatisiertem Programm vermessen. Ein Standard Protein Mix (all-in-1 peptide standard mix; Ciphergen), welcher Arg8-Vasopressin (1082.2 Da), Somatostatin (1637.9 Da), Dynorphin (2147.5 Da), ACTH (2933.5 Da) und Insulin beta-chain (3495.94 Da) enthält, wurde zur Kalibrierung verwendet. Potentiell mit TANGO interagierende Proteine wurden ermittelt, indem die identifizierten Peptidfragmente in ein öffentlich zugängliches Suchprogramm (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe) eingegeben wurden.

9.3.3.9 Ko-Immunpräzipitation

100 μ g RIPA Zelllysat wurde in 500 μ l Bindungspuffer (20 mM NaPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) mit 30 μ l Streptavidin gekoppelter G-Sepharose über Nacht bei 4 °C vorgereinigt. Nach Zentrifugation (3 Minuten 1600 rpm) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit biotinyliertem TANGO (10 μ g/ml) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde eine Stunde mit 50 μ l Streptavidin-Sepharose inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit Bindungspuffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 20 μ l nicht-reduzierenden Lämmli Puffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Aufgetrennt wurde die Ko-Immunpräzipitation auf 10-12%igen SDS Gelen.

9.3.3.10 Immunhistochemie

Paraffinschnitte von verschiedenen Geweben wurden auf Expression unterschiedlichster Proteine untersucht. Die Schnitte wurden im Wärmeschrank bei

72°C inkubiert, durch Xylol entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Daraufhin folgte die Blockierung in 20 % Ziegenserum/PBS für 1 Stunde gefolgt von der Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4 °C in Ziegenserum. Der Zweitantikörper (LSAB2 DAKO Kit) wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung wurde mittels AEC-Lösung (LSAB2 DAKO Kit) sichtbar gemacht. Anschließend wurde mit Hämalaun gegengefärbt und mit Kaiser's Glycerin Gelatine eingedeckelt.

Folgende Antikörperkonzentrationen wurden verwendet:

Antikörper	Verdünnung	Firma
TANGO A	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
TANGO B	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-15 A	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-15 B	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-18 A	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-18 B	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
Synaptophysin	1/50	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg
GFAP	1/50	Dako
Neurofilament (NF)	1/50	Dako

9.3.3.11 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf sogenannten "Lap Teks" (chamber cover slides) ausgesät. „Lap Teks“ sind Objektträger, bestehend aus 4-8 abnehmbaren Kammern. In diese Kammern werden jeweils 20000-50000 Zellen ausgesät. Nach 24-48 Stunden Inkubation im 37°C Brutschrank wurden die Zellen mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung (250µl pro Kammer) für 15 Minuten fixiert. Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Zellen anschließend durch eine fünfminütige Inkubation mit einer 0,1%-igen Triton-X-100-Lösung permeabilisiert. Dem sorgfältigen Waschen mit PBS folgte das Blockieren des Präparats für 1 Stunde mit 1%-igem BSA/PBS. Daraufhin wurde mit dem primären Antikörper in 1%-igem BSA/PBS je nach Etablierung (siehe Tabelle) für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 Minuten folgte eine einstündige Inkubation mit dem fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper (siehe Tabelle). Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach dem Waschen wurden die Kammern vom Objektträger abgehobelt. Die Kernfärbung erfolgte mit einer DAPI-Lösung, die in dem VectaShield Slide Mounting Medium enthalten ist. Die Fluoreszenzfärbung konnte bei entsprechenden Wellenlängen (siehe Tabelle) am Axio Imager Z1 Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. In dieser Arbeit wurden zur Immunfluoreszenzmessung folgende primäre und sekundäre Antikörper verwendet:

Primäre Antikörper:

Antikörper	Verdünnung für IF	Firma
TANGO	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-15	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
Fussel-18	1/20	BioGenes GmbH, Berlin
Tubulin beta III TU20	1/50	Chemicon
ITGAX; CD11c	1/200	Santa Cruz

Sekundäre Antikörper:

Antikörper mit konjugiertem Farbstoff	Verdünnung	Firma	Ex (nm)	Em (nm)
Fitc (anti-Maus)	1/20	Dako	490	525
Fitc (anti-Hase)	1/30	Dako	490	525
Tritc (anti-Hase)	1/50	Dako	547	572
Tritc (anti-Maus)	1/1500	Dako	547	572
TexasRed (anti-Maus)	1/100000	Abcam	589	615
TexasRed (anti-Hase)	1/10000000	Acris	589	615

9.3.3.12 *In situ* Hybridisierung an Maus Embryonen

Whole mount *in situ* Hybridisierungen an Maus Embryonen und radioaktive *in situ* Hybridisierung mit 33P-markierten cRNA Sonden an embryonalen Paraffinschnitten wurden von Markus Moser (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Als Sonde wurde ein 522bp Fragment des humanen Fussel-18 Gens, auf Grund hoher Sequenzhomologien zum Maus Fussel-18 Gen, verwendet. Das Fragment wurde mit folgenden Primern mittels PCR amplifiziert: Fussel-18 fw 101: 5'-ccaacctcaaaccaccaaccag-3' und Fussel-18 rev 623: 5'-gagttgaagtggctgcgtc-3' und in den pCRII-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Als Sonde für Fussel-15 Hybridisierungen wurde ein 378 bp langes Fussel-15 Fragment aus dem Kleinhirn der Maus mittels PCR amplifiziert, ebenfalls in den pCRII-TOPO Vektor kloniert und anschließend in sense und antisense Orientierung in den pBlue Script (Stratagene, Gebouw, California) umkloniert. Zur Amplifikation wurden folgende Primer verwendet: mfussel-15 fw 673aa: 5'-cctgaaaggacgaaca-3' und mfussel-15 rev 799aa: 5'-catttcttcccgataag-3'.

9.3.4 Zellkulturmethoden

9.3.4.1 Auftauen von Zellen

Für das Auftauen von Zellen wurden 8ml DMEM in einem Falcon vorgelegt und die im 37°C Wasserbad schnell aufgetauten Zellen vom Cryoröhrchen in das Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1200U/min für 5 Minuten abzentrifugiert und in eine T25-iger Kulturflasche, gefüllt mit 5ml DMEM Medium, überführt.

9.3.4.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden, soweit nicht extra darauf hingewiesen, in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren von adhärenten Zellen wurden diese nach dem Waschen mit PBS für 5 Minuten mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert, in DMEM mit 10% FKS aufgenommen und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Suspensionszellen wurden gesplittet, indem 1ml einer vollbewachsenen T75-iger Zellkulturflasche in eine neue Flasche überführt wurde, in die bereits 9ml frisches Medium vorgelegt wurde. Die Inkubation von Suspensionszellen fand in stehenden Zellkulturflaschen statt.

9.3.4.3 Anzucht von humanen primären Melanozyten

Primäre humane Melanozyten wurden frisch aus humanen Vorhäuten isoliert. Dazu wurden diese kurz in Betaisodonna eingelegt, in PBS gewaschen und vom Fettgewebe befreit. Die Vorhäute wurden dann in Dispase II Lösung (1,2U/ml; Roche) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Epidermis von den Vorhäuten abgezogen und in PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) für 15 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde der Trypsinierungsschritt durch Zugabe von DMEM/FKS gestoppt, die gelösten Zellen aus dem Zellverband für 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert und in Keratinozytenmedium (KGM; PromoCell) resuspendiert und ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch Melanozytenmedium (MGM; PromoCell) ersetzt und vorbeugend mit Antimycotikum (15240-013; Gibco) behandelt. Das MGM wurde alle 2-3 Tage gewechselt und die Zellen auf ihren melanozytären Phänotyp hin untersucht. Für RNA-Isolation wurden bevorzugt Zellen aus sehr frühen Passagen (1-4) verwendet, da die Zellen in späteren Passagen ihre melanozytären Eigenschaften verlieren.

9.3.4.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese abtrypsinert, pelletiert und in 5ml DMEM aufgenommen. Pro Cryo-Röhrchen wurden 900µl kaltes Einfriermedium bestehend aus 25ml DMEM (mit 10% FKS und Penicillin/Streptomycin), 15ml FKS und 10ml DMSO vorgelegt und dazu 900µl Zellsuspension pipettiert. Anschließend wurden die Cryo-Röhrchen schnell verschlossen und kurz geschüttelt um beide Medien zu vermischen. Danach wurden sie für 1 Stunde bei -20°C gelagert, bevor sie für eine Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt wurden.

9.3.4.5 Stabile und transiente Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von Zellen wurde die Lipofektamin Methode mit Lipofektamin™ Reagent und Lipofektamin^{Plus} Reagent verwendet. Bei 50-80%iger Konfluenz wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und der Transfektionsansatz zupipettiert. Dieser wurde nach Protokoll und Mengenangaben des Herstellers zusammenpipettiert, wobei standardmäßig 0,5µg an Plasmid- DNA pro Versuchsansatz eingesetzt wurden. Das Transfektionsgemisch wurde nach 4 Stunden durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Ernte weitere 24-48 Stunden inkubiert.

Transfizierte Zellen wurden entweder mit Luciferase-Reportergen-Analysen (**siehe 9.3.4.12**) untersucht zu Gesamtproteinlysaten (**siehe 9.3.3.2**) bzw. zu RNA (**siehe 9.3.2.4**) weiterverarbeitet oder in weiteren Zellkulturexperimenten wie Kollagenkontraktionsassays (**siehe 9.3.4.11**) oder Immunfluoreszensversuche (**siehe 9.3.3.11**), eingesetzt.

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektaminmethode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Das Selektionsantibiotikum wurde anhand des Resistenzgens im Vektor, der in die Zellen eingebracht wurde, ausgewählt. Durch das Selektionsmedium konnten nur Zellen, die den gewünschten Vektor aufgenommen hatten, überleben.

Primäre Fibroblasten lassen sich mit der herkömmlichen Lipofektaminmethode nicht transfizieren. Deshalb wurde zur Transfektion dieser Zellen ein spezieller Kit (Human Dermal Fibroblast (NHDF) Nucleofector Kit, VPD-1001) der Firma Amaxa Biosystems verwendet. Die Transfektion erfolgte hierbei nach Anleitung des Protokolls.

9.3.4.6 Invasionsassay (Boydenkammer)

Der Matrigel Invasions Assay diente zur Untersuchung der Invasivität von verschiedenen Zellen bzw. Zellklonen, die mit antisense oder sense Konstrukten transfiziert wurden. Dazu wurden spezielle Kammern, die sogenannten

Boydenkammern, im unteren Kompartiment mit 210 μ l konditioniertem Medium gefüllt. Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden konfluente Fibroblasten 24 Stunden lang in Medium ohne FKS kultiviert. Dieses Medium wurde anschließend abgenommen, abzentrifugiert und für den Invasions Assay benutzt. Auf das konditionierte Medium im unteren Kompartiment wurde eine Polykarbonat Membran mit 8 μ m Porengröße (Neuro Probe, Inc.) luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Anschließend wurden 52 μ l Matrikel (1:3 verdünnt) auf den Filter pipettiert und die Kammer leicht auf der Tischoberfläche aufgeklopft um das Gel gut zu verteilen. Das Gel wurde zum Gelieren für 15- 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf 300000/ml in DMEM ohne FKS eingestellt und davon je 800 μ l pro Boydenkammer auf den mit Matrikel beschichteten Filter in das obere Kompartiment aufgebracht und vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Filter in einer Hemacolor Schnellfärbung, bestehend aus Fixierlösung (Lösung I), Eosin Färbelösung (Lösung II) und Hämalaun Färbelösung (Lösung III) gefärbt und auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurde die Anzahl der gewanderten Zellen im Mikroskop bestimmt.

9.3.4.7 Migrationsassay (Boydenkammer)

Der Migrationsassay diente zur Bestimmung der Migration verschiedener Zellklone. Dazu wurden Polykarbonat-Membranen mit 8 μ m Porengröße (für Melanom-, Kolon- und Leberzellen) der Firma Neuro Probe verwendet, die zuvor mit Gelatine beschichtet wurden. Für die Herstellung der Gelatinemembranen wurden die Polykarbonat-Filter 20 Minuten in 0,5% Essigsäure bei 50°C langsam gerührt, anschließend über einen Faltenfilter abfiltriert und 2 x mit Aqua bidest gespült. Danach wurden die Filter für 1 Stunde in 5mg/l Gelatine (in Wasser) gekocht, abfiltriert und mit einer Pinzette auf Whatman Papier verteilt. Nach einstündiger Trocknung bei 100°C konnten die Filter für Migrationsassays eingesetzt werden. Die untere Kammer der sogenannten Boydenkammer wurde mit 210 μ l Fibroblasten-konditioniertem Medium gefüllt. Darauf wurde die gelatinebeschichtete Membran luftblasenfrei gelegt. Nach dem Zuschrauben der Kammer wurden 30000 Zellen/ml auf den Filter in die obere Kammer pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden alle noch auf der oberen Seite des Filters sitzenden Zellen vorsichtig abgewischt. Zellen auf der Unterseite des Filters, welche durch den Filter gewandert sind, wurden mit Methanol fixiert, mit einer Hemacolor Schnellfärbung (**siehe 9.3.4.6**) gefärbt und unter dem Mikroskop gezählt.

Für den Migrationstest mit rekombinantem TANGO (siehe 9.3.3.1) wurde zusätzlich 50 ng/ml rekombinantes biotinyliertes TANGO in das untere bzw. in das obere Kompartiment zugefügt.

9.3.4.8 Scratchassay (Wundheilungsassay)

Dieser Test wurde durchgeführt, um die Migrationsfähigkeit der Zellklone zu analysieren. Dazu wurde bei 100%iger Konfluenz der Zellen in einer 6 Well Platte mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze eine definierte Wunde gekratzt. Die anschließende Migration der Zellen im Rahmen der Wundheilung wurde jeweils nach 24 und 48 Stunden fotografiert und gemessen, wobei aus der Geschwindigkeit der Wundheilung deren Halbwertszeit und somit indirekt die Aktivität der Zellproliferation ermittelt werden konnte.

9.3.4.9 Attachmentassay

6 Well Platten wurden mit humanem Fibrinogen (Biocat, 1mg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das überschüssige Fibrinogen wurde entfernt und die Platten wurden für 1 Stunde getrocknet. 3×10^6 HL-60 Zellen/ ml wurden geerntet und 3 x mit PBS gewaschen. 1ml dieser Zellen wurde durch Zentrifugation separiert und mit 500µl PBS und 500µl 2µM CFSE (5-(und-6)-Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) Färbelösung für 4 Minuten im Dunkeln inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden ebenfalls im Dunkeln durchgeführt. Die Färbereaktion wurde durch die Zugabe von 12 ml PBS/ 10 % FKS und der anschließenden Aufnahme des Pellets mit DMEM Medium eingeleitet. Im Anschluss wurden die Zellen auf die mit Fibrinogen beschichteten Platten, bzw. auf Platten, die mit einer konfluenten Schicht aus Endothelzellen (HMEC) beschichtet waren, ausgesät. Daraufhin folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Für verschiedene Assays wurden PMA (50ng/ml) und rekombinantes biotinyliertes TANGO (50ng/ml) ins Medium zugegeben. Am folgenden Tag wurden durch 3 x Waschen mit PBS alle nicht adhärenen HL-60 Zellen weggewaschen. Die Fluoreszenz der adhärenten HL-60 Zellen wurde mit dem Fusion Fluoreszenzmessgerät der Firma Packard Bio Science Company bestimmt. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und 3 x unabhängig voneinander wiederholt.

9.3.4.10 Extravasationsassay

Die Extravasation bzw. die Migration von prä-monozytären Zellen wurde in einem abgeänderten Boydenkammer Migrationsassay bestimmt. Dazu wurden Polycarbonat Filter mit 5µm Porengröße verwendet (Neuro Probe, INC). Die Filter wurden mit Fibrinogen (1 mg/ml; Sigma) oder mit einer konfluenten Schicht aus Endothelzellen (HMEC) beschichtet. Das untere Kompartiment wurde mit Mel Im-konditioniertem

Medium befüllt, welches als Chemoattraktant diente. HL-60 Zellen wurden gewaschen, resuspendiert in FKS freiem DMEM Medium mit einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml und in das obere Kompartiment der Kammer gefüllt. In das obere Kompartiment wurde zusätzlich 50ng/ml rekombinantes TANGO zugegeben. Als Kontrolle diente der Ansatz ohne rekombinantes TANGO. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurden die Filter (drei pro Experiment) gesammelt, und die HL-60 Zellen, welche durch die beschichteten Filter gewandert waren, wurden fixiert, gefärbt und gezählt, wie es bereits **unter 9.3.4.6** beschrieben wurde. Alle Versuche wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

9.3.4.11 Kollagenkontraktion

Zur Kollagenkontraktion wurden unbeschichtete Petrischalen mit 3cm Durchmesser (Greiner 627102) benötigt. Fibroblasten von normalen Spendern bzw. von Keloid- bzw. von Sklerodermie Patienten wurden auf 1Million/ml eingestellt wobei pro Petrischale 250µl Zellsuspension benötigt wurde. Je Petrischale wurde 350µl Rattenschwanzkollagen (BD Bioscience) vorgelegt und mit 1,5ml 1,5fach Medium (**siehe 9.2.3**) durch Schwenken sorgfältig durchmischt. Anschließend wurden die Zellen dazupipettiert, geschwenkt und im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 2 Stunden beginnt sich bereits ein Ring aus organisiertem Kollagen zu bilden, der sich zusammenzieht und nach 8-24 Stunden (abhängig vom Zelltyp) ein Pellet bildet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Durchmesser der Kontraktionsringe vermessen und fotografiert.

9.3.4.12 Luciferase Reportergen Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von sogenannten Reportergen Analysen untersuchen. Dazu wurden $2-3 \times 10^5$ 293T Zellen (Nierenepithelzellen) pro Well in eine 6 Well Platte ausgesät und mit 0,5µg der entsprechenden Plasmid DNA (pcDNA3-FLAG-c-Ski, pCMX-PL2-Flag-fussel-18, pCMV6-XL5-FLfussel-15) mit der Lipofektamin Methode (**siehe 9.3.4.5**) transfiziert. Zusammen mit diesen Plasmiden wurden 0,5µg des Luciferasevektors BMP-RE-Luc bzw. des (CAGA)₉-Luc Vektors (beide zur Verfügung gestellt von Steven Dooley, Universität Mannheim) und 0,1µg des Plasmids pRL-TK (Promega) kotransfiziert. Das Plasmid pRL-TK diente dabei zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Nach vierstündiger Inkubation mit dem Transfektionsmix wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit verschiedenen Liganden (BMP2 (50ng/ml), TGF-β1 (10ng/ml)) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Lyse der Zellen. Anschließend wurde je 50µl des Lysats eines Versuchsansatzes mit den im Kit (Promega Corp., Madison, USA) bereitgestellten

Chemikalien im Luminometer vermesssen. Alle Versuche wurden unabhängig voneinander dreimal wiederholt.

9.3.4.13 Anchorage-Independent Growth Assay

Zur Bestimmung des matrixunabhängigen Wachstumsverhaltens zwischen verschiedenen Zellklonen wurden 3×10^4 Zellen/ml in 6-Well-Platten in DMEM mit 10% FKS und 0,36% Agar (Sigma) in einen 0,72%igen Agar (verdünnt in DMEM mit 10% FKS) eingebettet (**siehe 9.2.3**). Nach einer 10tägigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die entstandenen Kolonien gezählt, fotografiert und die durchschnittliche Größe von 20 Kolonien je Klon bestimmt.

9.3.4.14 Statistische Auswertung

Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwerte inklusive Standardabweichungen oder in Prozentangaben dargestellt. Alle Versuche wurden, soweit nicht extra darauf hingewiesen wird, jeweils in drei unabhängigen Versuchen wiederholt. Signifikanzberechnungen zwischen einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's paired t-test durchgeführt. Ein p Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für die Berechnungen wurde die GraphPad 4 Software (GraphPad software Inc, San Diego, USA) verwendet. *, p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

10 Abkürzungsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen

Amp	Ampicillin
BCA	Bicinchromsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	copy DNA
CEC	Colon Epithelial Cells
CSME	5-(and-6)-carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EST	Expressed Sequence Tag
FKS	Fötales Kälberserum
Fussel-15	Functional smad suppressing element on chromosome 15
Fussel-18	Functional smad suppressing element on chromosome 18
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule
IEZ	Intestinale Epitheliale Zell
IP	Immunpräzipitation
ITGAX	Integrin alpha X
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
mRNA	messenger-RNA
NF	Neurofilament
NZN	Nävuszellnävus
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHH	Primary Human Hepatocytes
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RTS	Rapid Translation System
SBE	Smad Binding Element
SELDI-Toff-MS	Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time of flight-Mass Spectrometry
Ski	Sloan Kettering Virus
Sno	Ski-related novel sequence
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
ZNS	Zentrales Nervensystem

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

- Abbildung 1 Schematische Darstellung der Ligandenbindung und der Rezeptoraktivierung am Beispiel des TGF- β Signalwegs
- Abbildung 2 Verwandschaftsverhältnis der humanen R- Co- und I-Smad Moleküle inklusive der homologen Smad Moleküle in *Drosophila* und *C.elegans*
- Abbildung 3 TGF- β bzw. BMP Signalkaskade
- Abbildung 4 Schematischer Aufbau der Smad Proteine mit der konservierten MH1 und MH2 Domäne und der nicht konservierten Linker Region
- Abbildung 5 Inhibierung der BMP bzw. der TGF- β Signalkaskade durch inhibierende Smad Moleküle (I-Smads)
- Abbildung 6 TGF- β Signalweg in normalen und in Ski-überexprimierenden Zellen
- Abbildung 7 Allgemeine biologische Funktionen der TGF- β Superfamilie
- Abbildung 8 Der BMP Signalgradient und frühe embryonale Musterbildung
- Abbildung 9 Verschiedene Patienten mit Keloid
- Abbildung 10 Verschiedene Patienten mit Zirkumskripter Sklerodermie
- Abbildung 11 Strukturelle Organisation der Ski Familie
- Abbildung 12 Vergleich der Homologiedomänen der humanen Ski Familienmitglieder
- Abbildung 13 Expressionsanalyse von Fussel-15 und Fussel-18 an verschiedenen embryonalen und adulten humanen Geweben
- Abbildung 14 Immunfluoreszens zur Lokalisation von Fussel-15 in den Zellkörpern und Dendriten von Purkinjezellen
- Abbildung 15 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz von Fussel-18
- Abbildung 16 Lokalisation von Fussel-18 in der internen Granularzellschicht
- Abbildung 17 Lokalisation von Fussel-15 in 3T3 Maus Fibroblasten
- Abbildung 18 Lokalisation von Fussel-15 im aktiven und inaktiven Zustand des BMP Signalwegs
- Abbildung 19 Interaktion von Fussel-15 mit Smad1, Smad2 und Smad3
- Abbildung 20 Interaktion von Fussel-18 mit Smad2 und Smad3
- Abbildung 21 Luciferase Aktivitätsmessung zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität des durch TGF- β aktivierten CACA-Luc Konstrukts durch Fussel-15.
- Abbildung 22 Luciferase Aktivitätsmessung zeigt eine signifikante Inhibition in der Aktivität des durch BMP2 aktivierten BMP-RE-Luc Konstrukts durch Fussel-15
- Abbildung 23 Luciferase Aktivitätsmessung zeigt eine signifikante Inhibition in der Aktivität des durch TGF- β aktivierten CAGA-Luc Konstrukts durch Fussel-18
- Abbildung 24 Inhibition des TGF- β bzw. BMP-Signalwegs durch Fussel-18 bzw. Fussel-15
- Abbildung 25 Nachweis der Fussel-15 Expression in Fibroblasten der frühen Wundheilung
- Abbildung 26 Das 3D- Wundheilungsmodell zur Bestimmung der Kontraktion von Fibroblasten
- Abbildung 27 Die Expression von Fussel-15 im Wundheilungsmodell
- Abbildung 28 Expressionsstatus von Fussel-15 und verschiedenen BMPs bzw. TGF- β s im Verlauf der Kollagenkontraktion
- Abbildung 29 Knockdown von Fussel-15 in Fussel-15 transfizierten Fibroblasten durch siRNA
- Abbildung 30 Kontraktion von Fibroblasten im Kollagenkontraktionsmodell nach siRNA

- Abbildung 31 Kontraktion von Fibroblasten im Kollagenkontraktionsmodell nach einer Fussel-15 Überexpression
- Abbildung 32 Inhibierung des aktiven BMP-Responsive Elements (BMP-RE) durch Fussel-15 in humanen Fibroblasten
- Abbildung 33 Expression von Fussel-15 in F5 Fibroblasten nach Stimulation mit BMP bzw. Noggin
- Abbildung 34 Veränderungen in der Kollagenkontraktion (A) und verändertes Expressionsmuster (B) von Fussel-15 in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten (ZS) im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten (F5)
- Abbildung 35 Immunhistochemische Untersuchung von Kontroll-Fibroblasten und Fibroblasten von ZS- und Keloid-Patienten auf ihre Fussel-15 Expression nach vollständiger Kontraktion im Wundheilungsmodell
- Abbildung 36 Immunhistochemische Färbung von Fussel-15 an Paraffinschnitten von Keloid- und ZS-Patienten
- Abbildung 37 Expression von Fussel-15 in normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) nach Noggin Behandlung im Vergleich zu Keloid- und ZS- Fibroblasten
- Abbildung 38 Expression von BMP6 im Verlauf der Kollagenkontraktion
- Abbildung 39 Übersicht über die Funktion von Fussel-15 und Fussel-18 im BMP- bzw. TGF- β - Signalweg
- Abbildung 40 Schematischer Überblick über die Ski Familienmitglieder
- Abbildung 41 Vergleich der Aminosäurensequenz der Ski Familienmitglieder
- Abbildung 42 Die drei Zellschichten der Kleinhirnrinde und die wichtigsten Zell- und Fasertypen
- Abbildung 43 Übersicht über den Expressionsstatus von Fussel-15 in der normalen Wundheilung und in Keloid bzw. ZS
- Abbildung 44 Beispiele für maligne Melanome
- Abbildung 45 Die Funktion von MIA während der Zellwanderung
- Abbildung 46 Expression von TANGO in Melanom Zelllinien auf mRNA Ebene im Vergleich zu normalen humanen epithelialen Melanozyten (NHEM)
- Abbildung 47 Expression von TANGO in Melanom Zelllinien auf Protein-Ebene im Vergleich zu vier verschiedenen Melanozyten (NHEMs)
- Abbildung 48 Expression von TANGO im Primärtumor, Lokalen- und Fernmetastasen
- Abbildung 49 Immunhistochemie von TANGO an Geweben von Melanom Patienten
- Abbildung 50 Immunhistochemie von TANGO an verschiedenen Nävus Formen
- Abbildung 51 Re-Expression von TANGO in sense TANGO Klonen auf mRNA Ebene
- Abbildung 52 Re-Expression von TANGO in stabilen TANGO Zellklonen auf Protein-Ebene
- Abbildung 53 "Anchorage Independent Growth Assay" zur Bestimmung des matrix-unabhängigen Wachstumsverhaltens der TANGO re-exprimierenden Zellklone
- Abbildung 54 Migrationsassay der sense TANGO Klonen
- Abbildung 55 Scratchassay der sense TANGO Klonen
- Abbildung 56 Invasionsassay der sense TANGO Klonen
- Abbildung 57 Verminderte Migrationsfähigkeit der antisense TANGO Mel Im Zellklone unter dem Einfluss von rekombinantem TANGO
- Abbildung 58 Expression von TANGO in hepatozellulären Karzinom Zelllinien im Vergleich zu normalen primären humanen Hepatozyten (PHH)
- Abbildung 59 Expression von TANGO in Kolon Karzinom Zelllinien
- Abbildung 60 Expression von TANGO in Leber Karzinom Zelllinien auf Protein-Ebene
- Abbildung 61 Expression von TANGO in Kolon Karzinom Zelllinien auf Protein-Ebene

Abbildung 62	Expression von TANGO <i>in situ</i> in verschiedenen HCC-Geweben versus entsprechenden Normalgeweben
Abbildung 63	Immunhistologie von TANGO an verschiedenen Leber-Tumorgeweben versus Leber-Normalgewebe (A) und an verschiedenen KOLON-Tumorgeweben versus KOLON-Normalgewebe (B)
Abbildung 64	Boydenkammer Invasionsassay
Abbildung 65	Boydenkammer Migrationsassay
Abbildung 66	Zirkulation von Blutzellen durch die Blutbahn
Abbildung 67	Expression von TANGO in Monozyten unter adhärenten und nicht-adhärenten Bedingungen
Abbildung 68	Expression von TANGO im adhärenten und nicht adhärenten Zustand von Monozyten auf mRNA (A) und Protein-Ebene (B)
Abbildung 69	Expression von TANGO während der Monozytendifferenzierung
Abbildung 70	Expression von TANGO in verschiedenen monozytären Zelllinien nach PMA Stimulation und damit einhergehender Adhäsion
Abbildung 71	Ko-Immunpräzipitation zum Nachweis der TANGO-Integrin CD11c Interaktion über Silber Färbung (A), Coomassie Färbung (B) und über den direkten anti-CD11c Antikörpernachweis (C)
Abbildung 72	Ko-Immunfluoreszens zeigt eine Interaktion von TANGO und CD11c
Abbildung 73	Expression von Integrin CD11c in verschiedenen monozytären Zelllinien nach Inkubation mit PMA auf mRNA Ebene (A) und Protein Ebene (B)
Abbildung 74	HL-60 Zellattachment an Fibrinogen (A,C,E) und HMECs (B,D,F) nach verschiedenen Behandlungen mit TANGO und Phorbol Myristat Acetat
Abbildung 75	Verstärkte Migration von HL-60 Zellen durch eine Schicht aus Fibrinogen (A) bzw. durch Endothelzellen (HMECs) (B) nach Inkubation mit rekombinantem TANGO Protein
Abbildung 76	Schematische Darstellung der Wirkungsweise von MIA und der hypothetischen Wirkung von TANGO zwischen Zellen und den Makromolekülen der extrazellulären Matrix (ECM)
Abbildung 77	Monozyten Bewegung nahe dem Endothel
Abbildung 78	Hypothese zur Funktion von TANGO während der Monozyten Extravasation

Tabellen

Tabelle 1	Liganden der TGF- β Superfamilie
Tabelle 2	Übersicht über Smad interagierende Proteine
Tabelle 3	Zugangsnummern von Ski, SnoN, Fussel-15 und Fussel-18 im BLAST des NCBI
Tabelle 4	Überblick über die MIA Familie

12 Publikationsverzeichnis

Arndt S, Poser I, Schubert T, Moser M, Bosserhoff AK: Cloning and functional characterization of a new Ski homolog protein, Fussel-18, which is specifically expressed in neuronal tissues. *Lab Invest* 85:1330-1341 (2005)

Arndt S, Bosserhoff AK: TANGO is a tumor suppressor of malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 119:2812-2820 (2006)

Arndt S, Poser I, Moser M and Bosserhoff AK: Fussel-15, a novel ski/sno homolog protein, antagonizes BMP signaling. *Mol Cell Neurosc.* (2007)

13 Literaturverzeichnis

Referenzen

- Akhurst RJ and Balmain A. (1999). *J Pathol*, **187**, 82-90.
- Akiyoshi S, Inoue H, Hanai J, Kusanagi K, Nemoto N, Miyazono K and Kawabata M. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 35269-35277.
- Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, Kauffman CL and Davison SP. (2006). *Plast Reconstr Surg*, **117**, 286-300.
- Amaravadi LS, Neff AW, Sleeman JP and Smith RC. (1997). *Dev Biol*, **192**, 392-404.
- Aoki H, Fujii M, Imamura T, Yagi K, Takehara K, Kato M and Miyazono K. (2001). *J Cell Sci*, **114**, 1483-1489.
- Arndt S and Bosserhoff AK. (2006). *Int J Cancer*, **119**, 2812-2820.
- Arndt S, Poser I, Moser M and Bosserhoff AK. (2007). *Mol Cell Neurosci*, **34**, 603-611.
- Arndt S, Poser I, Schubert T, Moser M and Bosserhoff AK. (2005). *Lab Invest*, **85**, 1330-1341.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C and Roberts AB. (1999). *Nat Cell Biol*, **1**, 260-266.
- Attisano L and Wrana JL. (1998). *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 188-194.
- Attisano L and Wrana JL. (2002). *Science*, **296**, 1646-1647.
- Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S and Massague J. (1992). *Cell*, **68**, 97-108.
- Bauer R, Humphries M, Fassler R, Winklmeier A, Craig SE and Bosserhoff AK. (2006). *J Biol Chem*, **281**, 11669-11677.
- Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D and Poynard T. (1995). *Hepatology*, **21**, 760-766.
- Bell E, Ivarsson B and Merrill C. (1979). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1274-1278.
- Bendas G, Krause A, Bakowsky U, Vogel J and Rothe U. (1999). *Int J Pharm*, **181**, 79-93.
- Bennett NT and Schultz GS. (1993). *Am J Surg*, **165**, 728-737.
- Berk M, Desai SY, Heyman HC and Colmenares C. (1997). *Genes Dev*, **11**, 2029-2039.
- Bilsland CA, Diamond MS and Springer TA. (1994). *J Immunol*, **152**, 4582-4589.
- Blackford J, Reid HW, Pappin DJ, Bowers FS and Wilkinson JM. (1996). *Eur J Immunol*, **26**, 525-531.
- Blesch A, Bosserhoff AK, Apfel R, Behl C, Hessdoerfer B, Schmitt A, Jachimczak P, Lottspeich F, Buettner R and Bogdahn U. (1994). *Cancer Res*, **54**, 5695-5701.
- Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, Gerlach M, Behl C, Hoppe J and Martin R. (1989). *Cancer Res*, **49**, 5358-5363.
- Bogdahn U, Weber H, Zapf J, Dunisch G, Loberring HG and Mertens HG. (1987). *Acta Neurol Scand*, **75**, 28-36.

- Bosserhoff AK. (2005). *Pigment Cell Res*, **18**, 411-416.
- Bosserhoff AK, Hein R, Bogdahn U and Buettner R. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 490-495.
- Bosserhoff AK, Moser M and Buettner R. (2004). *Gene Expr Patterns*, **4**, 473-479.
- Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R and Hellerbrand C. (2003a). *J Biol Chem*, **278**, 15225-15231.
- Bosserhoff AK, Stoll R, Sleeman JP, Bataille F, Buettner R and Holak TA. (2003b). *Lab Invest*, **83**, 1583-1594.
- Botti C, Seregni E, Ferrari L, Martinetti A and Bombardieri E. (1998). *Int J Biol Markers*, **13**, 51-69.
- Bottinger EP, Letterio JJ and Roberts AB. (1997). *Kidney Int*, **51**, 1355-1360.
- Bottner M, Kriegstein K and Unsicker K. (2000). *J Neurochem*, **75**, 2227-2240.
- Breier G, Blum S, Peli J, Groot M, Wild C, Risau W and Reichmann E. (2002). *Int J Cancer*, **97**, 142-148.
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E and Wyss-Coray T. (2003). *Neuron*, **40**, 1133-1145.
- Brummel TJ, Twombly V, Marques G, Wrana JL, Newfeld SJ, Attisano L, Massague J, O'Connor MB and Gelbart WM. (1994). *Cell*, **78**, 251-261.
- Chen D, Zhao M and Mundy GR. (2004). *Growth Factors*, **22**, 233-241.
- Chen J, He B, Li Y, Wang G and Zhang W. (1999). *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, **38**, 677-680.
- Cohen-Salmon M, Frenz D, Liu W, Verpy E, Voegeling S and Petit C. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 40036-40041.
- Colmenares C and Stavnezer E. (1989). *Cell*, **59**, 293-303.
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V and Taub R. (1996). *Science*, **274**, 1379-1383.
- De Robertis EM. (1995). *Nature*, **374**, 407-408.
- de Sampaio e Spohr TC, Martinez R, da Silva EF, Neto VM and Gomes FC. (2002). *Eur J Neurosci*, **16**, 2059-2069.
- De SB, La Porta CA, Bontempelli M and Comolli R. (2002). *Exp Gerontol*, **37**, 813-821.
- Dennler S, Goumans MJ and ten DP. (2002). *J Leukoc Biol*, **71**, 731-740.
- Derynck R and Zhang Y. (1996). *Curr Biol*, **6**, 1226-1229.
- Derynck R and Zhang YE. (2003). *Nature*, **425**, 577-584.
- di CN, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N and Cate R. (1994). *Mol Endocrinol*, **8**, 1006-1020.
- Dobbertin A, Schmid P, Gelman M, Glowinski J and Mallat M. (1997). *J Neurosci*, **17**, 5305-5315.
- Donovan J and Slingerland J. (2000). *Breast Cancer Res*, **2**, 116-124.

- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T and Miyazono K. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 12477-12480.
- Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS and Doetschman T. (1999). *Cancer Res*, **59**, 3379-3386.
- Flanders KC, Ren RF and Lippa CF. (1998). *Prog Neurobiol*, **54**, 71-85.
- Fumagalli S, Doneda L, Nomura N and Larizza L. (1993). *Melanoma Res*, **3**, 23-27.
- Funaba M, Zimmerman CM and Mathews LS. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 41361-41368.
- Glick AB, Kulkarni AB, Tennenbaum T, Hennings H, Flanders KC, O'Reilly M, Sporn MB, Karlsson S and Yuspa SH. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6076-6080.
- Guo Y and Kyriianou N. (1999). *Cancer Res*, **59**, 1366-1371.
- Gutman M, Singh RK, Xie K, Bucana CD and Fidler IJ. (1995). *Cancer Res*, **55**, 2470-2475.
- Hata A, Lagna G, Massague J and Hemmati-Brivanlou A. (1998a). *Genes Dev*, **12**, 186-197.
- Hata A, Shi Y and Massague J. (1998b). *Mol Med Today*, **4**, 257-262.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr., Wrana JL and Falb D. (1997). *Cell*, **89**, 1165-1173.
- Heldin CH, Miyazono K and ten DP. (1997). *Nature*, **390**, 465-471.
- Hellerbrand C, Bataille F, Schlegel J, Hartmann A, Muhlbauer M, Scholmerich J, Buttner R, Hofstatter F and Bosserhoff AK. (2005). *Liver Int*, **25**, 357-366.
- Hogan BL. (1996). *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 432-438.
- Horwitz DA, Gray JD and Ohtsuka K. (1999). *Microbes Infect*, **1**, 1305-1311.
- Hruska KA, Guo G, Wozniak M, Martin D, Miller S, Liapis H, Loveday K, Klahr S, Sampath TK and Morrissey J. (2000). *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F130-F143.
- Hubner G, Hu Q, Smola H and Werner S. (1996). *Dev Biol*, **173**, 490-498.
- Ihanus E, Uotila LM, Toivanen A, Varis M and Gahmberg CG. (2007). *Blood*, **109**, 802-810.
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M and Miyazono K. (1997). *Nature*, **389**, 622-626.
- Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Yang ZQ, Shimada Y, Nomura N, Hirai H, Imamura M and Inazawa J. (2001). *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 559-565.
- Jones LL, Kreutzberg GW and Raivich G. (1998). *Brain Res*, **795**, 301-306.
- Kalluri R and Zeisberg M. (2003). *Histol Histopathol*, **18**, 217-224.
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH and Wrana JL. (2000). *Mol Cell*, **6**, 1365-1375.
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K, Engel ME and Moses HL. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 29628-29631.
- Kim WS, Park C, Hong SK, Park BK, Kim HS and Park K. (2000). *Anticancer Res*, **20**, 1499-1502.

- Knaus PI, Lindemann D, DeCoteau JF, Perlman R, Yankelev H, Hille M, Kadin ME and Lodish HF. (1996). *Mol Cell Biol*, **16**, 3480-3489.
- Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G and Taub R. (2000). *Hepatology*, **31**, 149-159.
- Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I and Massague J. (1999). *Genes Dev*, **13**, 804-816.
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S and Kaluza J. (1996). *Stroke*, **27**, 852-857.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM and Karlsson S. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 770-774.
- Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK and Longaker MT. (1999). *Ann Plast Surg*, **43**, 179-184.
- Letterio JJ and Roberts AB. (1998). *Annu Rev Immunol*, **16**, 137-161.
- Ley K. (1996). *Cardiovasc Res*, **32**, 733-742.
- Li Y, Turck CM, Teumer JK and Stavnezer E. (1986). *J Virol*, **57**, 1065-1072.
- Lippa CF, Flanders KC, Kim ES and Croul S. (1998). *Neurobiol Aging*, **19**, 527-533.
- Liu X, Sun Y, Weinberg RA and Lodish HF. (2001). *Cytokine Growth Factor Rev*, **12**, 1-8.
- Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, Wright SD and Silverstein SC. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1044-1048.
- Luo K. (2004). *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 65-70.
- Luscinskas FW and Lawler J. (1994). *FASEB J*, **8**, 929-938.
- Lyons GE, Micale BK, Herr MJ, Horrigan SK, Namciu S, Shardy D and Stavnezer E. (1994). *Dev Dyn*, **201**, 354-365.
- Malhotra V, Hogg N and Sim RB. (1986). *Eur J Immunol*, **16**, 1117-1123.
- Marlin SD and Springer TA. (1987). *Cell*, **51**, 813-819.
- Massague J. (2000). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 169-178.
- Massague J, Blain SW and Lo RS. (2000). *Cell*, **103**, 295-309.
- Massague J and Chen YG. (2000). *Genes Dev*, **14**, 627-644.
- Massague J and Weis-Garcia F. (1996). *Cancer Surv*, **27**, 41-64.
- Massague J and Wotton D. (2000). *EMBO J*, **19**, 1745-1754.
- McCaffrey TA. (2000). *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 103-114.
- Miller LJ, Schwarting R and Springer TA. (1986). *J Immunol*, **137**, 2891-2900.
- Mittaud P, Labourdette G, Zingg H and Guenot-Di SD. (2002). *Glia*, **37**, 169-177.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T and Miyazono K. (2002). *Genes Cells*, **7**, 1191-1204.

- Mizuhara E, Nakatani T, Minaki Y, Sakamoto Y and Ono Y. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 3645-3655.
- Mocali A, Cedrola S, Della MN, Bontempelli M, Mitidieri VA, Bavazzano A, Comolli R, Paoletti F and La Porta CA. (2004). *Exp Gerontol*, **39**, 1555-1561.
- Motyl T, Grzelkowska K, Zimowska W, Skierski J, Wareski P, Ploszaj T and Trzeciak L. (1998). *Eur J Cell Biol*, **75**, 367-374.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S and Heldin CH. (2001). *J Cell Sci*, **114**, 4359-4369.
- Muller WA and Randolph GJ. (1999). *J Leukoc Biol*, **66**, 698-704.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH and ten DP. (1997). *Nature*, **389**, 631-635.
- Namciu S, Lyons GE, Micale BK, Heyman HC, Colmenares C and Stavnezer E. (1995). *Dev Dyn*, **204**, 291-300.
- Nomura N, Sasamoto S, Ishii S, Date T, Matsui M and Ishizaki R. (1989). *Nucleic Acids Res*, **17**, 5489-5500.
- Pannu J, Gardner H, Shearstone JR, Smith E and Trojanowska M. (2006). *Arthritis Rheum*, **54**, 3011-3021.
- Pearson-White S. (1993). *Nucleic Acids Res*, **21**, 4632-4638.
- Peltonen J, Hsiao LL, Jaakkola S, Sollberg S, Aumailley M, Timpl R, Chu ML and Uitto J. (1991). *J Invest Dermatol*, **97**, 240-248.
- Penton A, Chen Y, Staehling-Hampton K, Wrana JL, Attisano L, Szidonya J, Cassill JA, Massague J and Hoffmann FM. (1994). *Cell*, **78**, 239-250.
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B and De Robertis EM. (1996). *Cell*, **86**, 589-598.
- Poser I and Bosserhoff AK. (2004). *Histol Histopathol*, **19**, 173-188.
- Poser I, Rothhammer T, Dooley S, Weiskirchen R and Bosserhoff AK. (2005). *Int J Oncol*, **26**, 1411-1417.
- Pratt BM and McPherson JM. (1997). *Cytokine Growth Factor Rev*, **8**, 267-292.
- Qin BY, Lam SS, Correia JJ and Lin K. (2002). *Genes Dev*, **16**, 1950-1963.
- Querfeld C, Eckes B, Huerkamp C, Krieg T and Sollberg S. (1999). *J Dermatol Sci*, **21**, 13-22.
- Reed JA, Bales E, Xu W, Okan NA, Bandyopadhyay D and Medrano EE. (2001). *Cancer Res*, **61**, 8074-8078.
- Reiss M. (1999). *Microbes Infect*, **1**, 1327-1347.
- Reissmann E, Jornvall H, Blokzijl A, Andersson O, Chang C, Minchiotti G, Persico MG, Ibanez CF and Brivanlou AH. (2001). *Genes Dev*, **15**, 2010-2022.
- Rendtorff ND, Frodin M, ttie-Bitach T, Vekemans M and Tommerup N. (2001). *Genomics*, **71**, 40-52.
- Rich J, Borton A and Wang X. (2001). *Microsc Res Tech*, **52**, 363-373.
- Roberts AB. (1998). *Miner Electrolyte Metab*, **24**, 111-119.

- Robertson NG, Heller S, Lin JS, Resendes BL, Weremowicz S, Denis CS, Bell AM, Hudspeth AJ and Morton CC. (2000). *Genomics*, **66**, 242-248.
- Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten DP, Heldin CH and Miyazono K. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7632-7636.
- Rusten TE, Cantera R, Kafatos FC and Barrio R. (2002). *Development*, **129**, 3575-3584.
- Sadhu C, Ting HJ, Lipsky B, Hensley K, Garcia-Martinez LF, Simon SI and Staunton DE. (2007). *J Leukoc Biol*.
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK and De Robertis EM. (1994). *Cell*, **79**, 779-790.
- Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH and Gelbart WM. (1995). *Genetics*, **139**, 1347-1358.
- Selever J, Liu W, Lu MF, Behringer RR and Martin JF. (2004). *Dev Biol*, **276**, 268-279.
- Shah M, Foreman DM and Ferguson MW. (1994). *J Cell Sci*, **107 (Pt 5)**, 1137-1157.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J and Pavletich NP. (1998). *Cell*, **94**, 585-594.
- Shinagawa T, Dong HD, Xu M, Maekawa T and Ishii S. (2000). *EMBO J*, **19**, 2280-2291.
- Shinagawa T, Nomura T, Colmenares C, Ohira M, Nakagawara A and Ishii S. (2001). *Oncogene*, **20**, 8100-8108.
- Sirard C, de la Pompa JL, Elia A, Itie A, Mirtsos C, Cheung A, Hahn S, Wakeham A, Schwartz L, Kern SE, Rossant J and Mak TW. (1998). *Genes Dev*, **12**, 107-119.
- Slemp AE and Kirschner RE. (2006). *Curr Opin Pediatr*, **18**, 396-402.
- Smith WC and Harland RM. (1992). *Cell*, **70**, 829-840.
- Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL and Robertson EJ. (1998). *Dev Genet*, **22**, 321-339.
- Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, Vanpelt CS, Geng YJ, Deng JM, Behringer RR and de CB. (2007). *Arthritis Rheum*, **56**, 334-344.
- Stoll R, Renner C, Ambrosius D, Golob M, Voelter W, Buettner R, Bosserhoff AK and Holak TA. (2000). *J Biomol NMR*, **17**, 87-88.
- Stoll R, Renner C, Buettner R, Voelter W, Bosserhoff AK and Holak TA. (2003). *Protein Sci*, **12**, 510-519.
- Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, Bruggert M, Ambrosius D, Palme S, Engh RA, Golob M, Breibach I, Buettner R, Voelter W, Holak TA and Bosserhoff AK. (2001). *EMBO J*, **20**, 340-349.
- Stopa M, Anhuf D, Terstegen L, Gatsios P, Gressner AM and Dooley S. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 29308-29317.
- Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP and Trautwein C. (2001). *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*, **47**, 661-673.
- Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q and Luo K. (1999). *Science*, **286**, 771-774.
- Sun W, Watanabe Y and Wang ZQ. (2006). *World J Gastroenterol*, **12**, 5005-5009.

- ten DP, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH and Miyazono K. (1994). *J Biol Chem*, **269**, 16985-16988.
- Tremblay KD, Hoodless PA, Bikoff EK and Robertson EJ. (2000). *Development*, **127**, 3079-3090.
- Tuan TL and Nichter LS. (1998). *Mol Med Today*, **4**, 19-24.
- Unsicker K and Strelau J. (2000). *Eur J Biochem*, **267**, 6972-6975.
- Ushijima T. (2007). *J Biochem Mol Biol*, **40**, 142-150.
- Versmold B, Felsberg J, Mikeska T, Ehrentraut D, Kohler J, Hampl JA, Rohn G, Niederacher D, Betz B, Hellmich M, Pietsch T, Schmutzler RK and Waha A. (2007). *Int J Cancer*.
- Vivien D and Ali C. (2006). *Cytokine Growth Factor Rev*, **17**, 121-128.
- Vivien D, Bernaudin M, Buisson A, Divoux D, MacKenzie ET and Nouvelot A. (1998). *J Neurochem*, **70**, 2296-2304.
- Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, Shepard A, Jin D, Dattatreyamurty B, Jones W, Dorai H, Ryan S, Griffiths D, Maliakal J, Jelic M, Pastorcic M, Stavljenic A and Sampath TK. (1998). *J Clin Invest*, **102**, 202-214.
- Wada K, Maesawa C, Akasaka T and Masuda T. (2004). *J Invest Dermatol*, **122**, 805-811.
- Wang W, Huang XR, Li AG, Liu F, Li JH, Truong LD, Wang XJ and Lan HY. (2005). *J Am Soc Nephrol*, **16**, 1371-1383.
- Wang W, Mariani FV, Harland RM and Luo K. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14394-14399.
- Weinstein M, Yang X, Li C, Xu X, Gotay J and Deng CX. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9378-9383.
- Wiessner C, Gehrmann J, Lindholm D, Topper R, Kreutzberg GW and Hossmann KA. (1993). *Acta Neuropathol (Berl)*, **86**, 439-446.
- Wikstrom P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damberg JE and Bergh A. (1998). *Prostate*, **37**, 19-29.
- Wotton D, Lo RS, Swaby LA and Massague J. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 37105-37110.
- Wozney JM. (1998). *Eur J Oral Sci*, **106 Suppl 1**, 160-166.
- Wrana JL. (2000). *Sci STKE*, **2000**, RE1.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F and Massague J. (1994). *Nature*, **370**, 341-347.
- Wu JW, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K and Shi Y. (2002). *Cell*, **111**, 357-367.
- Yamamoto Y and Oelgeschlager M. (2004). *Naturwissenschaften*, **91**, 519-534.
- Yang D, Thangaraju M, Greeneltch K, Browning DD, Schoenlein PV, Tamura T, Ozato K, Ganapathy V, Abrams SI and Liu K. (2007). *Cancer Res*, **67**, 3301-3309.
- Yang X, Castilla LH, Xu X, Li C, Gotay J, Weinstein M, Liu PP and Deng CX. (1999). *Development*, **126**, 1571-1580.
- Yu H, Bock O, Bayat A, Ferguson MW and Mrowietz U. (2006). *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, **59**, 221-229.

- Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Muller GA and Kalluri R. (2003a). *Am J Physiol Renal Physiol*, **285**, F1060-F1067.
- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F and Kalluri R. (2003b). *Nat Med*, **9**, 964-968.
- Zhang F, Lundin M, Ristimaki A, Heikkila P, Lundin J, Isola J, Joensuu H and Laiho M. (2003). *Cancer Res*, **63**, 5005-5010.
- Zhang H and Bradley A. (1996). *Development*, **122**, 2977-2986.
- Zhao GQ. (2003). *Genesis*, **35**, 43-56.
- Zhou YX, Zhao M, Li D, Shimazu K, Sakata K, Deng CX and Lu B. (2003). *J Biol Chem*, **278**, 42313-42320.
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL and Thomsen GH. (1999). *Nature*, **400**, 687-693.
- Zhu Y, Richardson JA, Parada LF and Graff JM. (1998). *Cell*, **94**, 703-714.
- Zhu Y, Roth-Eichhorn S, Braun N, Culmsee C, Rami A and Kriegstein J. (2000). *Brain Res*, **866**, 286-298.

14 Danksagung

Nachfolgend möchte ich mich bei allen bedanken, die am Entstehen dieser Arbeit direkt oder indirekt beteiligt waren.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Chefin Prof. Dr. Anja Bosserhoff für ihre engagierte Betreuung, Unterstützung und Motivation, für ein immerzu offenes Ohr und ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Schneuwly, der meine Arbeit an der biologischen Fakultät vertreten hat.

Dem Institutsleiter der Pathologie, Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter danke ich, dass ich diese Arbeit an seinem Institut anfertigen durfte, und für die finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglichte am Kongress in Phoenix teilzunehmen.

Mein Dank gilt zudem der gesamten AG Bosserhoff, insbesondere meinen Kolleginnen aus Labor 3. Susanne, bei dir möchte ich mich besonders für die netten und aufbauenden Worte, für die Hilfe im Labor und für die Ausdauer beim Klettern bedanken. Danke der „großen“ Steffi, dass du mir mit deiner Diplomarbeit über Fussel in *Drosophila* gezeigt hast, dass Fliegen mindestens genauso kompliziert sein können wie der Mensch. Barbara und Jenny, vielen Dank für die netten Gespräche. Silke, Tanja und Anne, ein Dankeschön für die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung beim Korrekturlesen diverser Paper, des Antrags und der Doktorarbeit und für eure Flexibilität für Kaffeepausen. Danke Sibylla, für die Sequenzierungen und die Proben, die du mir zur Verfügung gestellt hast. Größtes Lob geht dabei an deine leckeren Kuchen. Jacqueline, dir ein Dank für die Unterstützung in Jena beim vermessen der Proben mittels SELDI-Toff. Richard möchte ich für die Hilfe beim Erstellen der Signalwegszeichnungen danken.

Vielen Dank auch allen Kooperationspartnern. Christian Melle aus Jena danke ich für die Hilfe bei der Interaktionspartnersuche von TANGO. Markus Moser möchte ich für die Maus *in situ* Hybridisierungen danken. Bei Sigrid Karrer möchte ich mich für die Bereitstellung der Keloid und Sklerodermie Proben bedanken und für die Diskussionsbereitschaft. Thomas Schubert und Frauke Bataille danke ich für die pathologischen Gutachten. Krishna Mondal, vielen Dank für die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei den Monozytenexperimenten.

Zum Abschluss möchte ich mich natürlich noch besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und meine Promotion überhaupt erst ermöglicht haben. Bei meinem Freund Jens, möchte ich mich für die Geduld, die aufmunternden Worte und vor allem aber auch für die Hilfe am PC während des Verfassens meiner Arbeit bedanken.