

Die Rolle der Activin Receptor-Like Kinase 1 (ALK1) in der Angiogenese

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alice Dittewig

Juni 2007

1. Gutachter: Prof. Petra Knaus
2. Gutachter: Prof. Martin Schneider

Disputation am 12. November 2007

Danksagung

Ich möchte mich bei Dr. Karl-Heinz Thierauch bedanken, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt und mir immer aufmunternd zur Seite gestanden hat. Seine freundliche Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft gaben mir immer neue Anregungen. Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Karina Schuck für die hervorragende Betreuung sowie Korrektur der Arbeit.

Prof. Petra Knaus und Prof. Martin Schneider danke ich herzlich für die Begleitung der Arbeit und die Erstellung der Gutachten.

Für die fachliche Unterstützung während der experimentellen Durchführung möchte ich mich besonders bei meinem Laborkollegen Kerstin Kaminski, Beatrice Kuhnert, Romy Hunger, Jana Wätzold, Stefan Stargard und Dr. Oliver Politz bedanken.

Ein herzliches Dankeschön für die nette Zeit gilt meinen Mitdoktoranden und Kollegen: Hortensia Faus, Julia Eschenbrenner, Tatjana Gust, Daniel Korr, Johanna Kaltenhäuser, Fanny Knoth, Andrea Sturz und Jörg Frauenschuh, sowie der gesamten Abteilung Onkologie.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und all meinen guten Freunden für ihre stete Unterstützung, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Zusammenfassung

Die activin receptor-like kinase 1 (ALK1) gehört zu den Typ I Ser/Thr Kinase Rezeptoren aus der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Rezeptorfamilie. ALK1 wird fast ausschließlich auf den Endothelzellen (ECs) der Blutgefäße exprimiert, und die Expression ist im Verlauf der Embryonalentwicklung und in pathogenen Situationen wie Wundheilung und Tumorangiogenese erhöht. Mutationen des ALK1-Gens bewirken erhebliche Störungen der Angiogenese; so ist in Mäusen der homozygote Knock-out embryonal lethal, und beim Menschen führen heterozygote Mutationen im ALK1-Gen zu der Gefäßerkrankung „Hereditary hemorrhagic telangiectasia Typ 2“. Diese Fehlbildungen des Blutgefäßsystems deuten darauf hin, dass ALK1 eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Kapillaren, der Stabilisierung von Blutgefäßen und der Rekrutierung von vaskulären glatten Muskelzellen spielt. Jedoch sind die Erkenntnisse über die zellulären Funktionen von ALK1 widersprüchlich, manche Gruppen zeigen, dass ALK1 die Aktivierungsphase der Angiogenese steuert, während andere zeigen, dass die Aktivierung von ALK1 zur Maturation von neu entstandenen Gefäßen führt. Auch ist weder der Ligand von ALK1 noch der interagierende Typ II Rezeptor eindeutig bestimmt, und über die Zielgene des ALK1-Signalwegs herrscht in der Literatur ebenfalls Uneinigkeit.

Daher wurden in der vorliegenden Dissertation potentielle Interaktionspartner und Liganden von ALK1 identifiziert und von ALK1 regulierte Gene untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss der Hemmung von ALK1 auf das EC-Wachstum *in vitro* und auf die Tumorangiogenese *in vivo* analysiert, um so Rückschlüsse auf die Funktion von ALK1 ziehen zu können.

Zunächst wurde die EC-spezifische Expression von ALK1 auf RNA- und Proteinebene in EC-Kulturen und auf Geweben bestätigt. Anschließend wurde in Luziferase-Reporter-Gen-Assays die Aktivierung des Id1-Promotors durch Transfektion mit ALK1 und durch BMP-2, -6, -7 und -9 verifiziert. In weiteren Id1-Promotorstudien wurde gezeigt, dass die Kotransfektion von ALK5, Endoglin, BMPRII und ActRIIB die ALK1-induzierte Id1-Aktivierung verstärkt. Dies deutet darauf hin, dass ALK1 mit diesen Rezeptoren interagiert. Im Gegensatz dazu hemmt die Kotransfektion mit T β RII die Stimulation, was eine Kooperation mit ALK1, wie sie in der Literatur vorgeschlagen wird, unwahrscheinlich erscheinen lässt. Der Einfluss verschiedener Liganden auf die Id1-Aktivierung durch ALK1 wurde ebenfalls untersucht. GDF-15, TGF- β 2 und schwächer auch Aktivin B, AB und A verstärken die Promoterstimulation und kommen daher als Liganden von ALK1 in Frage. TGF- β 1 und -3 hemmen die Id1 Promotoraktivität, was gegen die in mehreren Publikationen vertretene Rolle als Liganden von ALK1 spricht.

Im Luziferase-Assay zeigt sich weiterhin, dass die extrazelluläre Domäne von ALK1 (ALK1.ec) die ALK1- und Endoglin-induzierte Stimulation des Id1-Promotors blockiert, und daher als Werkzeug dienen kann, um die Hemmung der ALK1-Signaltransduktion zu untersuchen. Zur weiteren Bestätigung dieser Eigenschaft wurde mittels Western Blots nachgewiesen, dass ALK1.ec die durch ALK1 vermittelte Phosphorylierung von Smad1/5 in ECs reduziert.

Mittels dieser Hemmung des ALK1-Signalweges in humanen mikrovaskulären ECs (MVECs) wurden im Array potentielle Zielgene von ALK1 bestimmt. Hierbei zeigt sich, dass ALK1 eher Gene der Aktivierungsphase der Angiogenese stimuliert, wohingegen es Gene der Maturationsphase unterdrückt. In MVEC-Proliferationsassays führt die Inhibition von ALK1 durch Zugabe von ALK1.ec zur Hemmung des durch VEGF oder bFGF stimulierten Zellwachstums. Dies bestätigt ebenfalls eine Rolle von ALK1 in der Aktivierungsphase.

In vivo wurde die Rolle von ALK1 analysiert, indem die humane Melanomzelllinie A375 mit dem Konstrukt für eine sezernierte Form von ALK1.ec stabil transfiziert wurde und anschließend deren Tumorwachstum in Nacktmäusen untersucht wurde. Eine Tendenz zu geringerem Tumorwachstum zeigt sich für einige der ALK1.ec-Klone. Außerdem führte die Hemmung von ALK1 zu einer deutlich geringeren Expression von CD31-mRNA, ein Maß für die Vaskularisierung des Tumors. Somit konnte die Bedeutung einer funktionierenden ALK1-Signaltransduktion für die Tumorangiogenese gezeigt werden.

Die vorliegende Dissertation weist daher auf das Potential eines ALK1-inhibierenden Wirkstoffes als Anti-Angiogenese-Krebstherapie hin, und leistet einen Beitrag zur Aufklärung der ALK1-Funktionen und der zugrunde liegenden Mechanismen der ALK1-Signaltransduktion.

Abstract

Activin receptor-like kinase 1 (ALK1) is a type I ser/thr kinase receptor within the transforming growth factor (TGF- β) receptor family. ALK1 is expressed almost exclusively on endothelial cells (ECs) of the vasculature. Its expression is upregulated during embryonic development and in pathological situations such as wound healing and tumor angiogenesis. Mutations of the ALK1 gene result in considerable angiogenic dysfunctions: mice deficient for ALK1 display embryonic lethality due to defective angiogenesis, and in humans ALK1 mutations are linked to the autosomal dominant vascular disorder "hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2". These vascular defects imply a pivotal role for ALK1 in capillar differentiation, stabilization of blood vessels, and recruitment of vascular smooth muscle cells. However, the underlying mechanisms remain poorly understood. It is discussed controversially whether ALK1 controls the activation or the maturation phase of angiogenesis. Neither the ALK1 ligand nor the cooperating type II receptor have been identified unequivocally, and several publications suggest different target genes for ALK1.

In this work, potential interacting type II receptors and ligands for ALK1 were identified and genes regulated by ALK1 were analyzed. The effects of ALK1 inhibition on *in vitro* EC-proliferation and *in vivo* tumor angiogenesis were studied to draw conclusions about the function of ALK1.

The EC-specific expression of ALK1 was verified through RNA and protein detection in EC cultures and on tissue sections. Furthermore, luciferase reporter gene assays served to validate the Id1 promoter activation through ALK1 or BMP-9 transfection and through addition of BMP-2, -6, or -7. Co-transfection with ALK5, endoglin, BMPRII und ActRIIB further increase the ALK1-mediated Id1 stimulation, which suggests that ALK1 interacts with those receptors. In contrast, this stimulation is repressed by T β RII, questioning the published role for T β RII as cooperating type II receptor for ALK1. When investigating the effect of potential ligands in this assay, GDF-15, TGF- β 2 and to some degree also activin B, AB, and A amplified ALK1-induced activation of Id1, while TGF- β 1 and -3 suppressed this activation. These results indicate that ALK1 may utilize ligands other than TGF- β 1 and - β 3, specifically GDF-15 or TGF- β 2.

Moreover, the luciferase reporter gene assay was used to show that incubation with the extracellular domain of ALK1 (ALK1.ec) reduced the cooperative Id1 stimulation by ALK1 and endoglin. ALK1.ec also blocked ALK1-induced Smad1/5 phosphorylation in western blots, which further proves its ability to inhibit the ALK1 pathway. Therefore, ALK1.ec served as tool to investigate the effect of ALK1 inhibition.

Addition of ALK1.ec to human microvascular ECs (MVECs) was consequently used to identify potential ALK1 target genes in northern arrays. The majority of genes presumed to be upregulated by ALK1 play a role in the activation phase of angiogenesis, whereas genes associated with the maturation phase were mostly downregulated. In *in vitro* assays, the inhibition of ALK1 by ALK1.ec resulted in the reduction of VEGF- or bFGF-induced MVEC proliferation. These data support a function for ALK1 during the activation phase.

The *in vivo* effect of ALK1 inhibition was studied in nude mice xenografts of the human melanoma cell line A375, which was stably transfected to sequester ALK1.ec. A tendency to reduced tumor growth was detected for ALK1.ec clones. Moreover, the expression of soluble ALK1.ec significantly decreased the expression of CD31 mRNA, an indicator of vascularization, within the tumor tissue. This reduction of vessel density shows the dependence of an efficient tumor angiogenesis on ALK1.

In summary, the present work suggests ALK1 as promising drug target for interfering with tumor angiogenesis, and elucidates some of the underlying mechanisms of ALK1 signal transduction and function.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Angiogenese	1
1.2. Signaltransduktion der Rezeptoren der TGF-β Superfamilie	2
1.3. ALK1	5
1.3.1. Expression von ALK1	5
1.3.2. Liganden und Korezeptoren von ALK1	5
1.3.3. Signaltransduktion und Transkriptionsregulation durch ALK1	6
1.3.4. Zelluläre Funktionen von ALK1	8
1.3.5. <i>In vivo</i> Funktionen von ALK1.....	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit	10
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. Material	12
2.1.1. Geräte.....	12
2.1.2. Kits.....	13
2.1.3. Verbrauchsmaterial	13
2.1.4. Chemikalien	14
2.1.5. Zytokine und rekombinante Proteine.....	16
2.1.6. Antikörper	17
2.1.7. Lösungen und Puffer.....	17
2.1.8. Medien	19
2.1.9. Enzyme.....	20
2.1.10. Plasmide	21
2.1.11. Primer, Sonden und RT-PCR-Primer/Sonden-Mix.....	22
2.1.12. DNA-, RNA- und Proteinstandards.....	23
2.1.13. Bakterienstämme, eukaryontische Zelllinien und Primärzellen	23
2.1.14. Mäuse	24
2.1.15. Software.....	24
2.2. Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1. Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	25
2.2.2. Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.3. Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1. Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	25

2.3.2. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	26
2.3.3. RNA-Isolation.....	26
2.3.4. Bestimmung der RNA-Qualität.....	27
2.3.5. Reverse Transkription.....	27
2.3.6. DNA-Isolation.....	27
2.3.7. Polymerase-Kettenreaktion.....	28
2.3.7.1. Analytische PCR.....	28
2.3.7.2. Präparative PCR.....	29
2.3.7.3. PCR-Mutagenese.....	29
2.3.7.4. Real-Time PCR (RT-PCR).....	30
2.3.8. Restriktionsverdau von DNA.....	32
2.3.9. DNA-Modifikationen durch Enzyme.....	32
2.3.10. Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.3.11. Ligation von DNA-Fragmenten.....	33
2.3.12. Sequenzierung.....	34
2.3.13. Klonierung der extrazellulären Domäne von mALK1.....	34
2.4. Proteinbiochemische Methoden.....	34
2.4.1. Zellaufschluss.....	34
2.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
2.4.3. Ni-NTA- und α -c-myc-Fällung.....	36
2.4.4. SDS-PAGE.....	36
2.4.5. Färben von Proteingelen.....	36
2.4.6. Western Blot.....	36
2.4.7. Proteinaufreinigung.....	37
2.4.8. TCA-Fällung.....	38
2.5. Zellbiologische Methoden.....	38
2.5.1. Zellkultur.....	38
2.5.2. Proliferationsassay.....	39
2.5.3. Stabile Transfektionen.....	39
2.5.4. Transiente Transfektionen.....	40
2.5.5. Luziferase-Reporter-Gen-Assay.....	40
2.6. In vivo Methoden.....	42
2.6.1. Nacktmaus-Xenografts.....	42
2.7. Immunologische Methoden.....	42
2.7.1. Anfertigung von Gefrierschnitten.....	42
2.7.2. Immunhistochemie.....	42

2.8. Affymetrix Chip Analyse	43
3. ERGEBNISSE	44
3.1. Expression von ALK1	44
3.1.1. Array-Analyse der ALK1-mRNA-Expression.....	44
3.1.2. PCR-Analyse der ALK1-mRNA-Expression.....	44
3.1.3. Western Blot-Analyse der ALK1-Protein-Expression	47
3.1.4. Immunhistochemische Untersuchung der ALK1-Protein-Expression	48
3.2. ALK1-Signaltransduktion	48
3.2.1. Smad-Phosphorylierung.....	48
3.2.1.1. Smad1/5/8- und Smad2/3-Phosphorylierung durch ALK1	48
3.2.1.2. Smad1/5/8- und Smad2/3-Phosphorylierung nach Stimulation.....	50
3.2.2. Transkriptionsregulation	52
3.2.2.1. Array-Analyse der Transkriptionsregulation durch TGF- β 1 und hALK1/Fc	52
3.2.2.2. RT-PCR-Analyse der Transkriptionsregulation durch TGF- β , BMP und hALK1/Fc	58
3.2.2.3. Transkriptionsregulation des Id1-Promotors.....	62
3.3. Auswirkungen der Hemmung von ALK1 auf die <i>in vitro</i>-Proliferation von Endothelzellen	74
3.3.1. Herstellung der extrazellulären Domäne von hALK1	74
3.3.2. <i>In vitro</i> -Proliferation von ECs.....	77
3.4. Auswirkungen der Hemmung von ALK1 auf die <i>in vivo</i> Tumorangio-genese	79
3.4.1. Stabile Transfektion von A375-Zellen.....	79
3.4.2. Tumorwachstum.....	83
3.4.3. Expression von ALK1.ec in den Tumor-Xenografts	85
3.4.4. Vaskularisierung der Tumor-Xenografts	87
3.4.5. CD31-Expression in den Tumor-Xenografts.....	88
4. DISKUSSION	90
4.1. Expression von ALK1	90
4.1.1. ALK1 wird ausschließlich in stark durchbluteten Geweben, auf ECs und in Tumorendothel exprimiert.....	90
4.1.2. Die Eigenschaften von exogenem ALK1 gleichen denen des endogenen Proteins ..	91
4.2. ALK1-Signaltransduktion	92

4.2.1. Die extrazelluläre Domäne von ALK1 hemmt die ALK1-Signaltransduktion und kann daher als Werkzeug zur Untersuchung des ALK1-Signalweges dienen.....	92
4.2.2. TGF- β 2, GDF-15 und Aktivin A, B und AB sind potentielle Liganden von ALK1	94
4.2.2.1. Die Aktivierung des Id1-Promotors durch BMP-2, -6, -7 und -9 und durch ALK1 verstärken sich nicht gegenseitig.....	94
4.2.2.2. TGF- β 1 und -3 hemmen die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung.....	96
4.2.2.3. TGF- β 2, GDF-15 und Aktivin A, AB und B verstärken die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung.....	98
4.2.3. Endoglin, ALK5 und BMPRII sind potentielle Interaktionspartner von ALK1	99
4.2.3.1. Endoglin potenziert die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung	100
4.2.3.2. ALK5 verstärkt die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung	101
4.2.3.3. BMPRII verstärkt die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung.....	101
4.2.3.4. T β RII hemmt die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung	102
4.2.3.5. Die Hemmung des ActRIIB hemmt den ALK1-Signalweg, die Hemmung des ActRIIA hat keine Auswirkung.....	103
4.2.4. ALK1 phosphoryliert Smad1/5/8 und reguliert sein eigenes Signal.....	103
4.2.5. Das Genexpressionsprofil von ALK1/Fc gibt Hinweise auf die Zielgene von ALK1..	104
4.2.5.1. Die Zielgene von ALK1 spielen eine Rolle in der Aktivierungsphase der Angiogenese	104
4.2.5.2. TGF- β 1 reguliert die meisten Gene genau entgegengesetzt zu ALK1	106
4.3. Die Rolle von ALK1 bei der EC-Proliferation <i>in vitro</i>.....	107
4.3.1. Die Hemmung von ALK1 führt zu verringerter EC-Proliferation	107
4.4. Die Rolle von ALK1 während der Tumorangiogenese	108
4.4.1. Die Hemmung von AKL1 führt zu verringerter Tumolvaskularisierung	108
4.4.2. Die Hemmung von ALK1 führt zum Teil zu verringertem Tumorstadium.....	109
4.5. Zusammenfassung und Ausblick	110
Literaturverzeichnis	113
Abkürzungen.....	123
Lebenslauf.....	127