

1. Einleitung

1.1. Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Ausbildung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Im Gegensatz dazu wird die Gefäßneubildung aus bipotenten Vorläuferzellen, den Hämangioblasten, im Verlauf der Embryonalentwicklung als Vaskulogenese bezeichnet. Im Erwachsenenalter ist die Angiogenese auf wenige physiologische Situationen wie den Zyklus der Frau und einige pathologische Situationen wie Wundheilung, Entzündungsprozesse und Tumorwachstum beschränkt. Während der Tumorprogression ist die Angiogenese ein entscheidender Schritt, da die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen eine Voraussetzung für weiteres Wachstum und für die Invasion des Karzinoms ist. Tumore produzieren Angiogenese-induzierende Faktoren, welche das Umschalten auf einen angiogenen Phänotyp bewirken (Hanahan und Folkman 1996).

Die Angiogenese wird in Aktivierungsphase und Maturationsphase (oder Resolutionsphase) unterteilt (Abb. 1.1). Während der Aktivierungsphase wird die Basalmembran (BM) und die extrazelluläre Matrix (ECM) eines vorhandenen Gefäßes durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) abgebaut, und proliferierende Endothelzellen (ECs) migrieren in das umgebende Bindegewebe. Sie formen erst Kapillarsprossen und tubuläre Strukturen, und bilden dann arteriovenöse Kapillaren aus. Die Resolutionsphase ist durch das Ende der Proliferation und Migration gekennzeichnet, die Basalmembran bildet sich erneut, und das entstandene Gefäß wird, je nach Gewebe, durch die Anlagerung von Perizyten und vaskulären glatten Muskelzellen

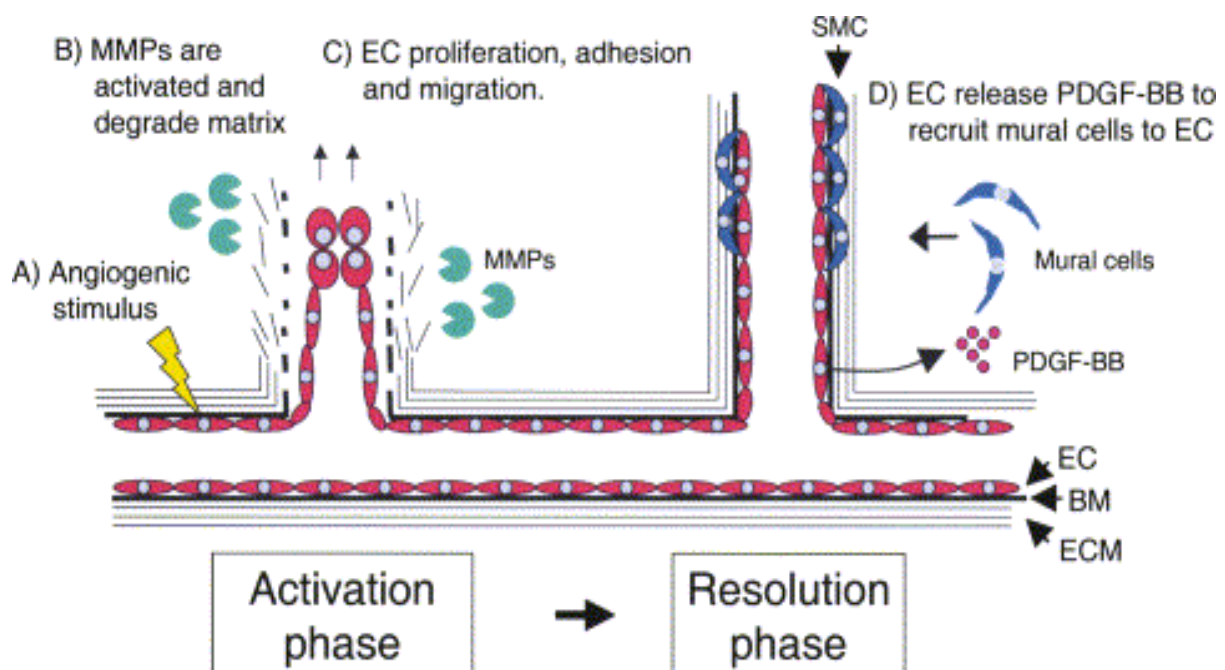


Abb. 1.1: Aktivierungs- und Reifungsphase der Angiogenese (Goumans, Lebrin et al. 2003)

(VSMCs) stabilisiert. Eine Vielzahl von Faktoren, z. B. vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet derived growth factor (PDGF) und transforming growth factor β (TGF- β), regulieren diese Schritte der Angiogenese über verschiedene Rezeptoren (Risau 1997), zu denen unter anderem die activin receptor-like kinase 1 (ALK1) gehört. Die Rolle der Signalübertragung mittels ALK1 ist umstritten und soll in dieser Arbeit näher beleuchtet werden.

1.2. Signaltransduktion der Rezeptoren der TGF- β Superfamilie

ALKs sind Typ I Rezeptoren für Zytokine der TGF- β Superfamilie, z.B. TGF- β s, Aktivine, bone morphogenic proteins (BMPs) und growth and differentiation factors (GDFs), die Wachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zellen regulieren. Die Wirkungen von TGF- β 1, dem Prototyp der TGF- β Superfamilie, sowohl auf die Angiogenese als auch auf das Tumorstadium sind einander kontextabhängig entgegengesetzt. In geringer Konzentration stimuliert TGF- β 1 die Migration von ECs, während es in höheren Konzentrationen die Migration und Proliferation hemmt (Gajdusek, Luo et al. 1993; Pepper, Vassalli et al. 1993). Diese Effekte hängen außerdem von der Inkubationszeit ab und variieren in der Literatur je nach verwendetem Assay. Des Weiteren beeinflussen die Auswirkungen von TGF- β 1 auf VSMCs, Perizyten und Fibroblasten zusätzlich die Angiogenese, so dass sich TGF- β 1 *in vivo* Angiogenese-induzierend verhält (Roberts, Sporn et al. 1986; Yang und Moses 1990; Basson, Kocher et al. 1992). Auch auf Tumore zeigt TGF- β 1 zwei anscheinend widersprüchliche Effekte, in frühen Stadien hemmt es das Tumorstadium, wohingegen es später Tumorstadium, -invasion und Metastasierung stimuliert (Welch, Fabra et al. 1990; Cui, Fowles et al. 1996; Akhurst und Derynck 2001; Derynck, Akhurst et al. 2001).

Abb.1 zeigt den Signalweg der TGF- β Superfamilie auf molekularer Ebene. TGF- β bindet als Dimer an Oligomere des Typ II Rezeptors, eine durch Autophosphorylierung konstitutiv aktive transmembrane Serin/Threonin Kinase (Abb. 1, 1) (Chen und Derynck 1994; Henis, Moustakas et al. 1994; Luo und Lodish 1997). Anschließend werden Dimere oder Oligomere des Typ I Rezeptors, eine strukturell ähnliche transmembrane Serin/Threonin Kinase, in den Komplex rekrutiert (Abb. 1.2, 2 und 3). Der Typ II Rezeptor phosphoryliert den Typ I Rezeptor an der intrazellulären GS-Domäne (Abb. 1.2, 4), die Glycin und Serin enthält und zwischen der Transmembran- und der Kinasedomäne liegt. Die Phosphorylierung der GS-Domäne bewirkt eine Konformationsänderung, welche die Kinasefunktion des Typ I Rezeptors aktiviert (Wrana, Attisano et al. 1992; Wrana, Attisano et al. 1994; Wieser, Wrana et al. 1995). Nach seiner Aktivierung phosphoryliert der Typ I Rezeptor Rezeptor-regulierte Smad Proteine (R-Smads: Smad1, 2, 3, 5, 8; Abb. 1.2, 5), die anschließend mit „common mediator“ Smads (Co-Smads: Smad4) oligomerisieren (Abb. 1.2, 6) und in den Zellkern überführt werden. Im Nukleus bindet der Komplex zusammen mit DNA-bindenden Proteinen in den Promotorregionen der Zielgene

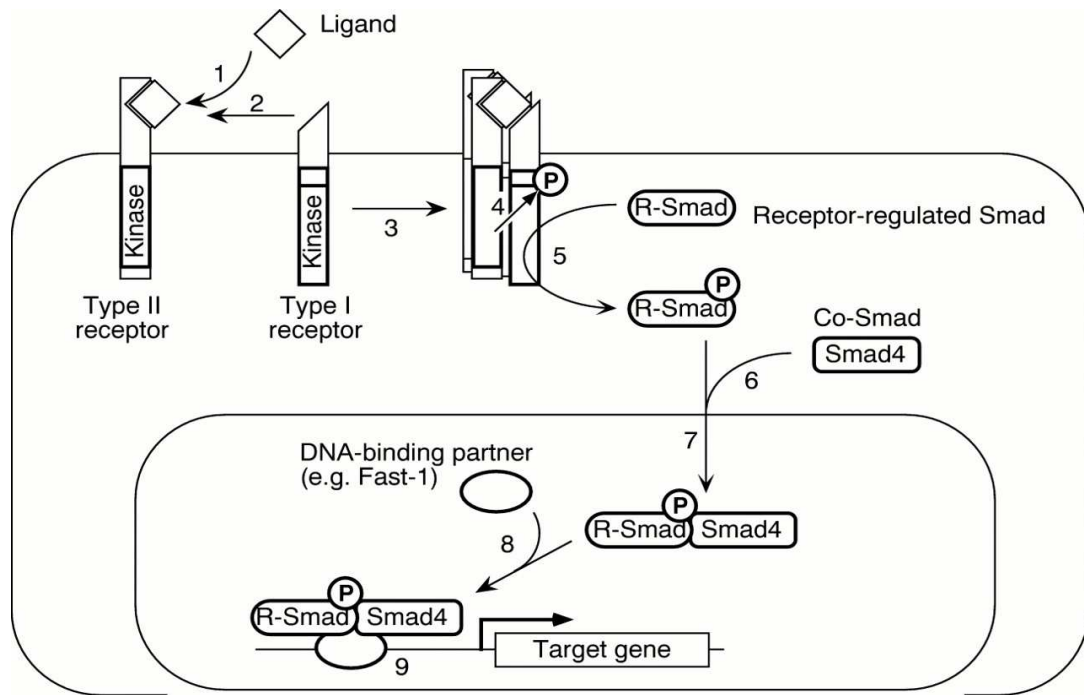


Abb. 1.2: TGF-β Signaltransduktion (Massague 1998)

(Abb. 1.2, 8) und aktiviert spezifisch die Transkription dieser Gene (Abb. 1.2, 9). Das Smad-Signaling wird durch inhibitorische Smads (I-Smads: Smad6 und 7) blockiert, die sowohl an den Typ I Rezeptor binden und die Phosphorylierung der R-Smads hemmen, als auch die Oligomerisierung der R-Smads mit den Co-Smads verhindern (Heldin, Miyazono et al. 1997; Kretzschmar und Massague 1998; Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001; Shi und Massague 2003). Außerdem gibt es weitere Faktoren, die bereits extrazellulär die Signale der TGF-β-Superfamilie regulieren. Lösliche Faktoren wie Noggin und Chordin binden BMPs und verhindern damit die Bindung der BMPs an ihre Rezeptoren (Piccolo, Sasai et al. 1996; Zimmerman, De Jesus-Escobar et al. 1996), Follistatin hingegen bindet Aktivine und blockiert so das Aktivin-Signaling (Nakamura, Takio et al. 1990). Der Pseudo-Typ-I-Rezeptor BAMBI, ein transmembranes Protein dessen extrazelluläre Domäne große Ähnlichkeit zum TGF-β Typ I Rezeptor aufweist, verhindert die Transphosphorylierung des Typ I-Rezeptors durch den Typ II Rezeptor. Dadurch inhibiert BAMBI die Weiterleitung von Aktivin- und BMP-Signalen ins Zellinnere (Onichtchouk, Chen et al. 1999).

TGF-βs, Aktivine und BMPs aktivieren ihre Signalwege über unterschiedliche Kombinationen von Typ I und Typ II Rezeptoren und Smads (Abb. 1.3). Smad2 und 3 werden spezifisch von Aktivin im Komplex mit den Aktivin Typ I und Typ II Rezeptoren (ActR-IB/ALK4 und ActR-II) und von TGF-β mit TGF-β Typ I und Typ II Rezeptoren (TβR-I/ALK5 und TβR-II) aktiviert. BMPs binden an ActR-II und BMP Typ II Rezeptoren (BMPR-II) und aktivieren über BMP Typ I Rezeptoren (BMPR-IA/ALK3, BMPR-IB/ALK6) und ActR-I/ALK2 die Transkriptionsfaktoren Smad1, 5 und 8. Zusätzlich kann der sogenannte akzessorische Typ III Rezeptor an den

Komplex binden. Dieser membran-verankerte Rezeptor erhöht die Effektivität der Signalübertragung, indem er die Präsentation des Liganden für den Typ I-II-Rezeptorkomplex verbessert. Im Falle von ALK1 ist dies Endoglin (CD105) (Lux, Attisano et al. 1999; Blanco, Santibanez et al. 2005). Strukturell ähnliche Paare von Typ I Rezeptoren bilden jeweils ALK4 und ALK5, ALK3 und ALK6 und ALK1 und ALK2; außerdem sind ALK3 und 6 entfernt mit ALK1 und 2 verwandt (Miyazawa, Shinozaki et al. 2002). Der Rezeptor ALK1/TSR-I stellt eine Besonderheit in diesem Schema dar, weil er zwar Smad1 und -5 phosphoryliert, aber wahrscheinlich über T β R-II und den Typ III Rezeptor Endoglin (CD105) an TGF- β 1 und TGF- β 3 bindet (Attisano, Carcamo et al. 1993; Lux, Attisano et al. 1999; Oh, Seki et al. 2000; Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002). Diese Interaktionspartner von ALK1 sind aber noch nicht eindeutig geklärt, ALK1 ist auch mit anderen Liganden und Typ II -Rezeptoren im Komplex nachgewiesen worden (siehe Kapitel 1.3.2. und Kapitel 4).

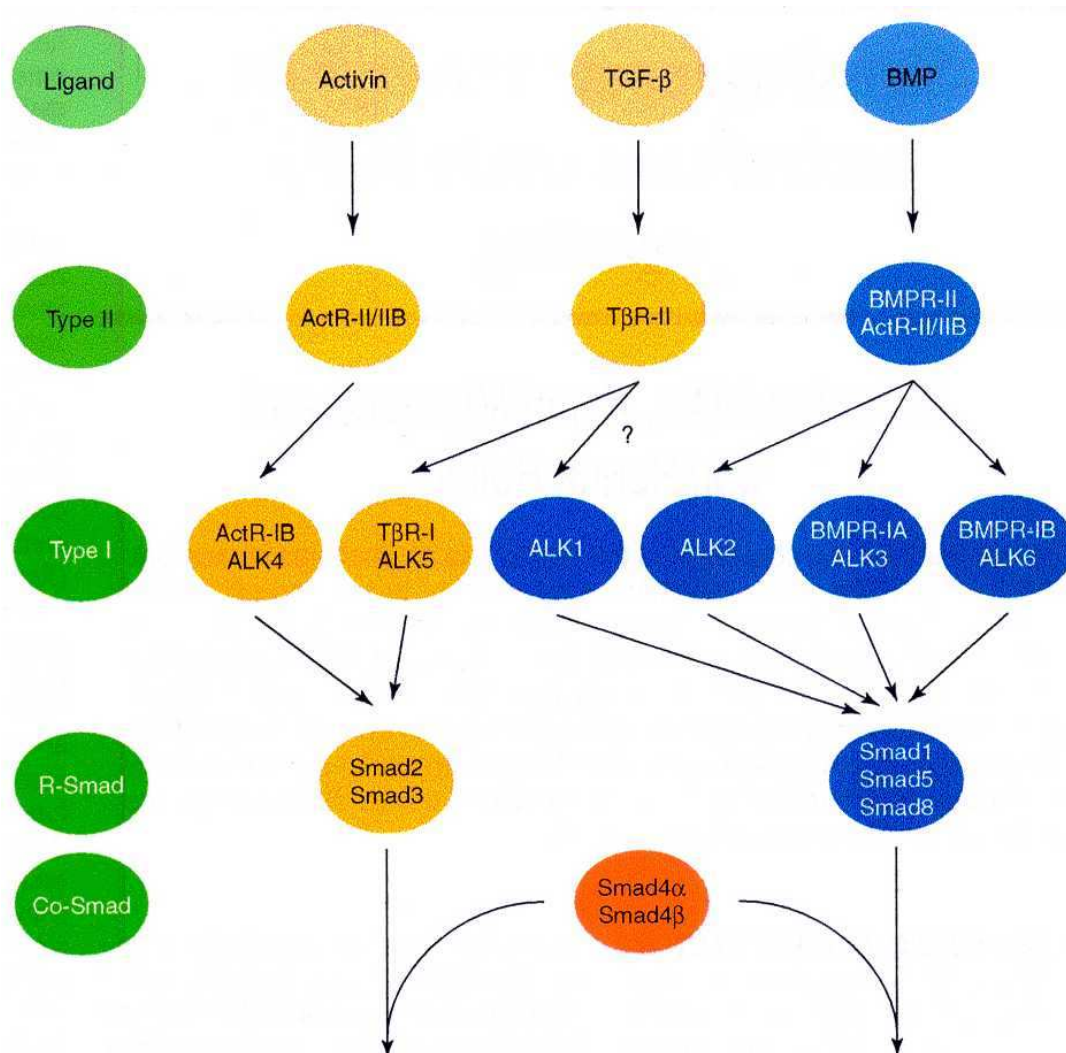


Abb. 1.3: Kombinationen von Typ I und Typ II Rezeptoren und Smads (ten Dijke, Miyazono et al. 2000)

1.3. ALK1

1.3.1. Expression von ALK1

Die Expression von ALK1 wurde zuerst mittels Northern Blot Analysen in Lunge, Plazenta und anderen stark vaskularisierten Geweben gefunden (ten Dijke, Ichijo et al. 1993). ALK1 wird ausschließlich auf Blutgefäßen exprimiert, wobei ECs eine wesentlich höhere Expression aufweisen als VSMCs (Panchenko, Williams et al. 1996). Die Expression von ALK1 auf ECs in Kapillaren und Arteriolen (präkapillare Arterien) ist stärker als auf venösen ECs und in größeren Gefäßen. Diese Ergebnisse wurden durch Northern Blot Analysen, *in situ* Hybridisierungen, RT-PCR und immunhistochemische Analysen ermittelt (Attisano, Carcamo et al. 1993; Panchenko, Williams et al. 1996; Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002). Lediglich König, Kogel et al. (2005) konnten ALK1 auch auf Neuronen detektieren, wo es der Neuroprotektion dienen soll.

Durch Insertion des LacZ-Gens unter der Kontrolle des ALK1-Promotors konnten Seki, Yun et al. (2003) alle ALK1-exprimierenden Gefäße blau anfärben und so zeigen, dass ALK1 vor allem in Arterien der embryonalen und neugeborenen Maus exprimiert wird. In der adulten Maus ist die ALK1-Expression nur noch schwach und ist auf die Lunge und auf pathogene Situationen wie die Wundheilung oder die Tumorangiogenese beschränkt. Während des Tumorstwachstums weisen insbesondere die zuführenden Arterien eine starke ALK1-Expression auf. Da sich das ALK1-Expressionsmuster deutlich von dem des T β RI ALK5 unterscheidet, schlagen Seki, Hong et al. (2006) vor, dass ALK1 und ALK5 ihre unterschiedlichen Rollen während der vaskulären Entwicklung dadurch ausüben können, dass ALK5 im Gegensatz zu ALK1 auf VSMCs exprimiert wird.

1.3.2. Liganden und Korezeptoren von ALK1

Wie bereits in Kapitel 1.2. erwähnt, bindet ALK1 zusammen mit dem korrespondierenden Typ-II Rezeptor (möglicherweise T β R-II) und Endoglin an seinen Liganden (möglicherweise TGF- β 1). Bisher ist es jedoch nicht gelungen, den physiologischen Liganden und korrespondierenden Typ II Rezeptor für ALK1 eindeutig zu identifizieren, da ALK1 alleine weder an den Typ II Rezeptor noch den Liganden binden kann (Wrana, Attisano et al. 1992). Wenn ALK1 mit ActR-II oder ActR-IIB kotransfiziert wird, bindet es Aktivin, während es TGF- β 1 bindet, wenn es mit T β R-II kotransfiziert wird (Attisano, Carcamo et al. 1993). Jedoch führen diese Komplexe nicht zu den üblichen TGF- β -vermittelten Effekten wie Aktivierung des TGF- β -/Aktivin-induzierbaren Promotors von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), Proliferationshemmung und erhöhte Expression von extrazellulären Matrix-Proteinen (Attisano, Carcamo et al. 1993; ten Dijke, Ichijo et al. 1993; Bassing, Yingling et al. 1994; Carcamo, Weis et al. 1994). Auch im Komplex mit ActRII oder ActRIIB vermittelt ALK1 keine Stimulation des PAI-1-Promotors nach Zugabe von Aktivin A (Attisano, Carcamo et al. 1993). Werden Endoglin und ALK1

kotransfiziert, können sie ligandenunabhängig immunopräzipitiert werden (Lux, Attisano et al. 1999). Abdalla, Pece-Barbara et al. (2000) finden dabei keine Ligandenbindung an den Komplex aus ALK1 und Endoglin; erst wenn zusätzlich T β RII transfiziert wird, werden TGF- β 1 und -3 gebunden. In untransfizierten ECs sind die Ergebnisse widersprüchlich; Oh, Seki et al. (2000) weisen ALK1 mit TGF- β 1 und T β RII im Komplex nach, während andere keine Komplexe mit ALK1 finden (Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000). Lux, Attisano et al. (1999) haben ebenfalls gezeigt, dass TGF- β 1, TGF- β 3 und ein weiterer Ligand im Serum ALK1 aktivieren, während BMP-2, BMP-7, Aktivin A und Inhibin A als Liganden für ALK1 ausgeschlossen werden konnten. Auch ten Dijke, Yamashita et al. (1994) fanden weder BMP-4 noch BMP-7 im Komplex mit ALK1. Eine neuere Veröffentlichung identifiziert ALK1 als potentiellen Rezeptor für BMP-9, basierend auf Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Studien (BIAcore), und da ALK1/Fc die BMP-9-vermittelte Alkaline Phosphatase Aktivität und Reporter-gen-Aktivierung blockiert (Brown, Zhao et al. 2005). Weiterhin konnten Goumans, Valdimarsdottir et al. (2003) zeigen, dass auch der Typ I-Rezeptor ALK5 nach Zugabe von TGF- β im Komplex mit ALK1 vorliegt und dass ALK5 für eine optimale ALK1-Signaltransduktion nötig ist.

1.3.3. Signaltransduktion und Transkriptionsregulation durch ALK1

Mittels Expression einer konstitutiv aktiven Form von ALK1 (ALK1-Q201D, kurz ALK1-Q/D, oder caALK1), in der ein Glutamin an Position 201 in der GS-Domäne zu einem Aspartat mutiert ist (Wieser, Wrana et al. 1995), wurde nachgewiesen, dass ALK1 Smad1 und 5 phosphorylieren und BMP-responsive Promotoren aktivieren kann (Macias-Silva, Hoodless et al. 1998; Chen und Massague 1999). Koexpression sowohl von Wildtyp-ALK1 als auch caALK1 mit ALK5 reduziert die TGF- β 1-abhängige Induktion des PAI-1 Promotors durch ALK5 (Lux, Attisano et al. 1999; Oh, Seki et al. 2000). PAI-1 ist ein potenter Inhibitor vaskulärer Zellmigration *in vitro* (Stefansson und Lawrence 1996) und der *in vivo* Angiogenese in der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos (Stefansson, Petitclerc et al. 2001). Diese Hemmung des ALK5-Signals durch ALK1 impliziert, dass die Balance zwischen den ALK1- und ALK5-Signalwegen die Eigenschaften des Endothels während der Angiogenese entscheidend beeinflusst (Oh, Seki et al. 2000).

Anhand von Oligonukleotid Microarray Analysen mit mRNA aus ALK1-Q/D-transfizierten ECs wurden verschiedene Gene identifiziert, deren Expression durch ALK1 hoch- bzw. herabreguliert wird. Konstitutiv aktives ALK1 induziert die Transkription von Endoglin (Ota, Fujii et al. 2002; Lux, Salway et al. 2006), seinem zugehörigen Typ III Rezeptor. Die Gene zweier anderer Proteine der TGF- β -Familie, Growth and differentiation factor 15 (GDF-15) und BMPRII, zählen ebenfalls zu den von ALK1 aktivierten Zielgenen (Lamouille, Mallet et al. 2002). Die Transkription der TGF- β -Rezeptoren T β RII und ALK5 hingegen wird inhibiert (Lux, Salway et al. 2006). Als negative Feedback-Regulation seiner eigenen Signaltransduktion aktiviert ALK1 die

Transkription von Smad6 und 7, während es die von Smad1 hemmt (Ota, Fujii et al. 2002; Lux, Salway et al. 2006; Wu, Ma et al. 2006).

Wie die BMPs, die ebenfalls über Smad1 und -5 Signale vermitteln, erhöht ALK1 die Transkription von Inhibitor of DNA binding 1 oder Inhibitor of differentiation 1 (Id1) und Id2 (Hollnagel, Oehlmann et al. 1999; Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002; Korchynskyi und ten Dijke 2002; Ota, Fujii et al. 2002; Lux, Salway et al. 2006). Id Proteine steigern Zellwachstum und -migration (Norton, Deed et al. 1998; Lin, Singh et al. 2000), und wirken Angiogenese-induzierend durch Repression der Transkription des Angiogenese-Inhibitors Thrombospondin-1 (Volpert, Pili et al. 2002). Sie werden für eine endgültige Differenzierung, z. B. in der Angiogenese und Tumor-Vaskularisation, herabreguliert (Norton 2000). Dies deutet darauf hin, dass ALK1 in der Aktivierungsphase der Angiogenese eine Rolle spielt. Auch die Transkription des Angiogenese-induzierenden Faktors VEGF wird stimuliert (Wu, Ma et al. 2006). Außerdem wird IL1RL1 aktiviert, welches vermutlich bei der Zellproliferation eine Rolle spielt und daher ebenfalls proangiogen wirken würde (Ota, Fujii et al. 2002). Des Weiteren reguliert ALK1 die Expression von Plakoglobin herunter (Ota, Fujii et al. 2002), einem zytoplasmatischen Bestandteil von Desmosomen und adhering junctions. Plakoglobin vermittelt intrazelluläre Signale durch die Verbindung von Cadherin und Aktinfilamenten (Mathur, Goodwin et al. 1994; Ruiz, Brinkmann et al. 1996). Die Hemmung der Plakoglobin-Expression durch ALK1 könnte die Ablösung von ECs zur Folge haben, was für die Proliferation, Migration und Invasion in der Aktivierungsphase der Angiogenese notwendig ist. Zur erleichterten Migration und Invasion würde auch die Aktivierung der Matrixmetalloprotease MMP10 und die Inhibition der Expression der Zelladhäsions-Proteine ICAM-1 und -2 beitragen, wie Wu, Ma et al. (2006) nach Transfektion mit ALK1-Q/D beobachtet haben. All diese durch ALK1 stimulierten Prozesse finden in der Aktivierungsphase der Angiogenese statt.

Für eine Rolle von ALK1 in der Resolutionsphase spricht, dass die Transkription des cyclin-dependent kinase (Cdk) Inhibitors p21/waf1 von ALK1 induziert wird (Lamouille, Mallet et al. 2002). Der Cdk-Inhibitor p21/waf1 blockiert die Proliferation, indem er die zur Zellzyklus-Progression notwendigen Cdk's inhibiert. Außerdem wird vermehrt die Rezeptorkinase EphB4 exprimiert (Ota, Fujii et al. 2002), die in der Maturationsphase der Angiogenese bei der Differenzierung von Arterien und Venen eine Rolle spielt (Gerety, Wang et al. 1999). Durch ALK1-Transfektion wird weiterhin der Chemokine Receptor 4 (CXCR-4) inhibiert (Ota, Fujii et al. 2002), der auf vaskulären ECs als positiver Regulator der Gefäßbildung dient (Tachibana, Hirota et al. 1998). Weiterhin wird sowohl die Transkription von Integrin- α E stimuliert, als auch die Transkription der Proteasen MT1-MMP und ADAM 15 inhibiert, was zur Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte und verringerter Mobilität der ECs während der Maturationsphase beitragen könnte (Ota, Fujii et al. 2002). Weitere Ergebnisse von Lamouille, Mallet et al. (2002) bringen ALK1 ebenfalls in Zusammenhang mit der Resolutionsphase, da sowohl die drei

Zytoskelettproteine β -Aktin, Paxillin und Zyxin, als auch das Proto-Onkogen c-myc herabreguliert werden. Eine Hemmung der Zytoskelettproteine verhindert die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe während der Migration, und die Inhibition der c-myc-Transkription ist für den Arrest des Zellzyklus notwendig.

Somit scheint ALK1 sowohl Gene zu regulieren, die in der Resolutionsphase als auch in der Aktivierungsphase der Angiogenese eine Rolle spielen. Für die eindeutige Aufklärung der Rolle von ALK1 bedarf es weiterer Untersuchungen auf zellulärer Ebene und im vollständigen Organismus.

1.3.4. Zelluläre Funktionen von ALK1

Die zellulären Funktionen von ALK1 *in vitro* wurden mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Lamouille, Mallet et al. (2002) haben herausgefunden, dass die adenovirale Infektion von verschiedenen humanen EC-Typen mit caALK1 zu verringerter Proliferation, Migration, „Wundheilung“ (Wiederbewachsen einer Zellkulturlücke im sog. „scratch assay“), Readhäsion und Zellausbreitung („cell spreading“) führt. Ein Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus bewirkt die Abnahme der Proliferation. Aufgrund dieser Funktionstests und der Ergebnisse ihrer Microarray-Analysen schlagen Lamouille, Mallet et al. (2002) vor, dass ALK1 die Proliferation von ECs negativ reguliert und die Aktivierung von ALK1 zur Maturation von neu entstandenen Gefäßen führt.

Im Gegensatz dazu zeigen Goumans, Valdimarsdottir et al. (2002), dass caALK1-infizierte ECs schneller proliferieren, migrieren und sich eine Zellkulturlücke schneller schließt als bei untransfizierten Zellen. caALK5-infizierte Zellen hingegen weisen verminderte Proliferation und Migration und ein langsames Schließen der Lücke auf. Die Infektion von ECs mit Smad5 oder Smad3 führt zu den gleichen Ergebnissen wie die Infektion mit ALK1 bzw. ALK5. Auch Wu, Ma et al. (2006) konnten zeigen, dass ALK1 die Proliferation von ECs beeinflusst und die Bildung von tubulären Strukturen verstärkt, während ALK5 die EC-Aggregation stimuliert, also Zell-Zell-Interaktion und -Adhäsion und den Umbau der extrazellulären Matrix moduliert. Daher argumentieren Goumans, Valdimarsdottir et al. (2002) und Wu, Ma et al. (2006), im Einklang mit den mRNA-Analysen von Ota, Fujii et al. (2002) und Lux, Salway et al. (2006), dass ALK1 die Aktivierungsphase und ALK5 die Resolutionsphase steuert.

Wie in Kapitel 1.2. erwähnt, besitzt TGF- β einen biphasischen Effekt auf ECs, d.h. in geringer Konzentration stimuliert es die Migration, während es in höheren Konzentrationen die Migration und Proliferation hemmt (Gajdusek, Luo et al. 1993; Pepper, Vassalli et al. 1993). Mit ALK1-Antisense-Oligonukleotiden (ASOs) erreicht man eine Blockierung der durch niedrige TGF- β -Konzentrationen bewirkten Stimulation, während ALK5-ASOs die Wirkungen hoher TGF- β -Konzentrationen blockieren (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002). Danach verlaufen die Aktivierungen von ALK1 bzw. ALK5 mit unterschiedlichen Kinetiken und besitzen

unterschiedliche Schwellenwerte. Somit kann TGF- β durch eine Balance zwischen den beiden Rezeptoren die Entwicklung des Endothels im Verlauf der Angiogenese regulieren. Dieses Wechselspiel zwischen den beiden Rezeptoren wurde ebenfalls von Oh, Seki et al. (2000) und Seki, Hong et al. (2006) analysiert, jedoch kommen diese beiden zu dem gegenteiligen Schluss wie Goumans, Valdimarsdottir et al. (2002). Ihnen zufolge ist ALK5 für die Aktivierungsphase zuständig, und ALK1 steuert die Resolutionsphase. Diese Widersprüche lassen sich mit bestehenden Kenntnissen nicht aufklären, da in den Studien unterschiedliche Primärzellen bzw. Zelllinien und unterschiedliche Kultur- und Assaybedingungen verwendet wurden.

1.3.5. *In vivo* Funktionen von ALK1

Mutationen im ALK1-Gen führen zu erheblichen Störungen der Angiogenese; so weisen Embryos der Zebrafisch-Mutante von ALK1 erweiterte Blutgefäße mit einer erhöhten Zahl an ECs auf (Roman, Pham et al. 2002). In Mäusen ist das homozygote Knock-out des ALK1 Genes (*Acvr11^{-/-}*) aufgrund von Fehlbildungen des Blutgefäßsystems embryonal lethal (Tag 10,5-11,5). Dies lässt auf eine Störung der Angiogenese, nicht der Vaskulogenese zurückschließen. Die Föten zeigen eine erhöhte Expression von angiogenen Faktoren und Plasminogen-Aktivatoren, und weisen fusionierte Kapillaren, geweitete Gefäße und eine gestörte Anlagerung von VSMCs auf (Oh, Seki et al. 2000; Urness, Sorensen et al. 2000). Die Ähnlichkeit zum Phänotyp von *Smad5*- (Chang, Huylebroeck et al. 1999) und vor allem Endoglin- (Sorensen, Brooke et al. 2003) Knock-out Mäusen legt nahe, dass es sich um Mitglieder des gleichen Signaltransduktionsweges handelt (Li, Sorensen et al. 1999; Yang, Castilla et al. 1999). Beim Menschen führen heterozygote Mutationen in den Genen für Endoglin oder ALK1 zu der Erkrankung "Hereditäre Hämorrhagische Teleangiektasia" (oder Osler-Rendu-Weber-Krankheit) Typ 1 (HHT1) bzw. Typ 2 (HHT2) (McAllister, Grogg et al. 1994; Johnson, Berg et al. 1996). Diese autosomal dominante Krankheit äußert sich in Kapillarerweiterungen (Teleangiektasien) in Haut und Mucosa, die unter anderem Nasenbluten verursachen, und in arterio-venösen Verbindungen ohne dazwischenliegendes Kapillarbett („arteriovenous malformations“, AVMs), die vor allem in den inneren Organen vorkommen (Marchuk 1998; Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000; Srinivasan, Hanes et al. 2003; van den Driesche, Mummery et al. 2003).

Die in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Experimente von Seki, Yun et al. (2003) implizieren, dass ALK1 für den Umbau („vascular remodeling“) von Arterien zuständig ist, da ALK1 vermehrt in Arterien exprimiert wird, die Wunden und Tumore versorgen.

All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ALK1 eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Kapillaren, bei der Stabilisierung von Blutgefäßen und bei der Rekrutierung von VSMCs spielt. In Abb. 1.4. ist die widersprüchliche Signaltransduktion und Rolle von ALK1 in der Literatur dargestellt.

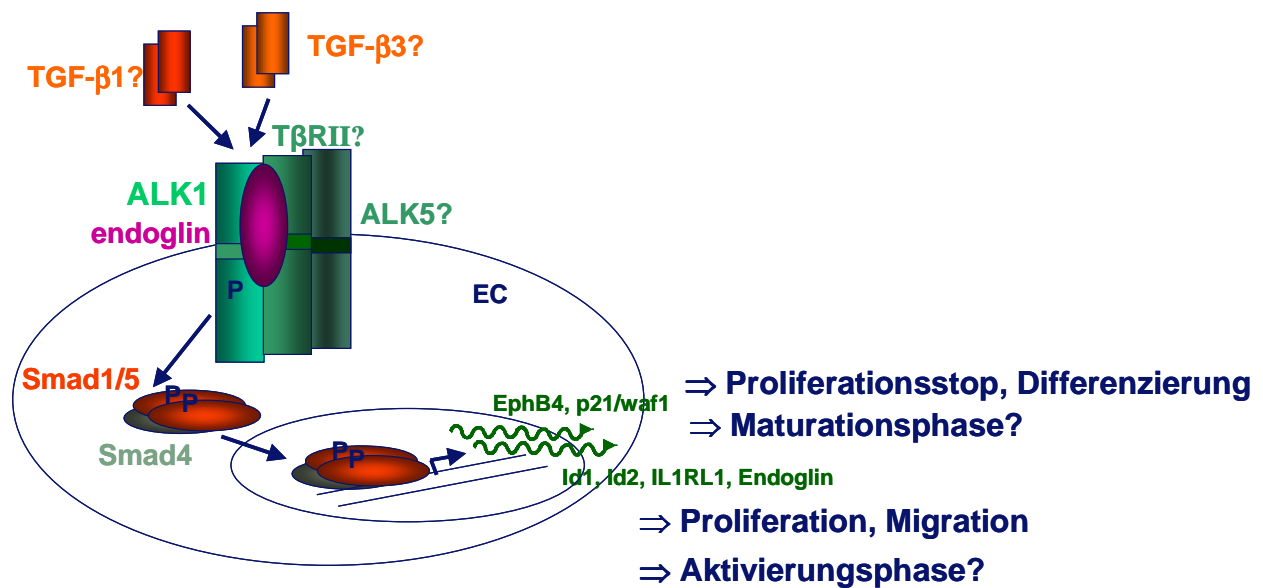


Abb. 1.4: Bisheriges Modell zur Signaltransduktion und Funktion von ALK1.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

ALK1 ist eine transmembrane Typ I Rezeptorkinase für Zytokine der TGF-β-Superfamilie, die fast ausschließlich auf ECs exprimiert wird. In ALK1-k.o.-Mäusen kommt es zu embryonal lethalen Gefäßmissbildungen, und im Menschen führen heterozygote Mutationen im ALK1-Gen ebenfalls zu vaskulären Defekten. Diese Beobachtungen legen eine Rolle von ALK1 in der Angiogenese nahe, jedoch sind weder ihre Interaktionspartner noch ihre Funktion eindeutig identifiziert. Daher ist das Ziel meiner Dissertation, die ALK1-Signaltransduktion und die Funktionsweise von ALK1 in der Angiogenese *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

In der Literatur werden zumeist TGF-β1 und -3 als Liganden für ALK1 vorgeschlagen, und TβRII und Endoglin als kooperierende Rezeptoren. Jedoch sind die Angaben kontrovers, und es konnten teilweise auch andere Liganden und Typ II-Rezeptoren identifiziert werden. In meiner Arbeit sollen potentielle Interaktionspartner von ALK1 bestimmt werden, indem mittels eines Id1-Reporterassays der Einfluss verschiedener Liganden und Rezeptoren der TGF-β-Superfamilie auf die ALK1-vermittelte Aktivierung des Promotors untersucht wird.

Weiterhin soll die extrazelluläre Domäne von ALK1 als Werkzeug etabliert werden, um den ALK1-Signalweg zu hemmen und die daraus resultierenden Auswirkungen zu untersuchen. Zum einen sollen so im Microarray mögliche Zielgene der ALK1-Signaltransduktion bestimmt werden, und daraus Hinweise auf Funktionen von ALK1 gewonnen werden. Zum anderen

sollen mit Hilfe der extrazellulären Domäne die Auswirkungen einer Hemmung von ALK1 auf die Proliferation von ECs *in vitro* geprüft werden, um so die zellulären Aufgaben von ALK1 zu untersuchen. Ebenfalls soll in Tumor-Xenografts analysiert werden, welchen Einfluss die Inhibition des ALK1-Signalweges auf die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum hat. Die Ergebnisse meiner Dissertation können daher dazu beitragen, Einsatzmöglichkeiten einer Hemmung von ALK1 in der Anti-Angiogenese-Therapie von Tumoren zu prüfen und die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären.