

3. Ergebnisse

3.1. Expression von ALK1

3.1.1. Array-Analyse der ALK1-mRNA-Expression

Um Informationen zur Gewebeverteilung des humanen ALK1-Rezeptors zu erhalten, wurden Affymetrix-Array-Untersuchungen analysiert (Abb. 3.1), die mittels Hybridisierung auf dem Chip saTIVa durchgeführt worden waren (Abteilung Bioinformatics, Schering AG, Berlin). Dieser Chip wurde speziell für Schering entwickelt und enthält ca. 6400 Gene wichtiger Signalwege. Das ALK1-spezifische Oligo Probe Set NM_000020_s_at detektiert verschiedene ALK1-Transkripte, die durch unterschiedliches Splicing und Polyadenylierung entstehen können. ALK1 wird am stärksten in der Lunge und der Plazenta exprimiert. Eine geringere Expression wurde in primären ECs, Milz, Lymphknoten und Lymphgefäßen, Blase, Verdauungsorganen und Herz detektiert, und überwiegend in fetalen Geweben, z.B. Haut, Skelettmuskeln, Magen und Dickdarm.

3.1.2. PCR-Analyse der ALK1-mRNA-Expression

Mittels analytischer PCR wurde die Expression von hALK1 in den primären humanen Endothelzellen MVECs, in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2, in der humanen Melanoma-Zelllinie A375 und als Positivkontrolle im Plasmid pcDNA3.1-ALK1 überprüft (Abb. 3.2 a). Die verwendeten Primer erkennen die Kinase-Domäne von hALK1 und ergeben ein PCR-Produkt von 1,1 Kb. Als Kontrolle für das Gelingen der cDNA-Synthese und der PCR-Reaktion und diente eine parallele PCR mit Primern für das highly basic protein (hbp, 124 bp). Lediglich MVECs weisen eine Expression von ALK1 auf, in HepG2 und A375 ist keine Expression detektierbar.

Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die Stärke der mRNA-Expression von hALK1 in den primären humanen Endothelzellen MVECs, HUVECs und HPAECs und der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 verglichen (Abb. 3.2 b, Karina Schuck, Schering AG, Berlin). Die primären Endothelzellen zeigen eine vergleichbare ALK1-Expression, während die A549-Zelllinie keine aufweist.

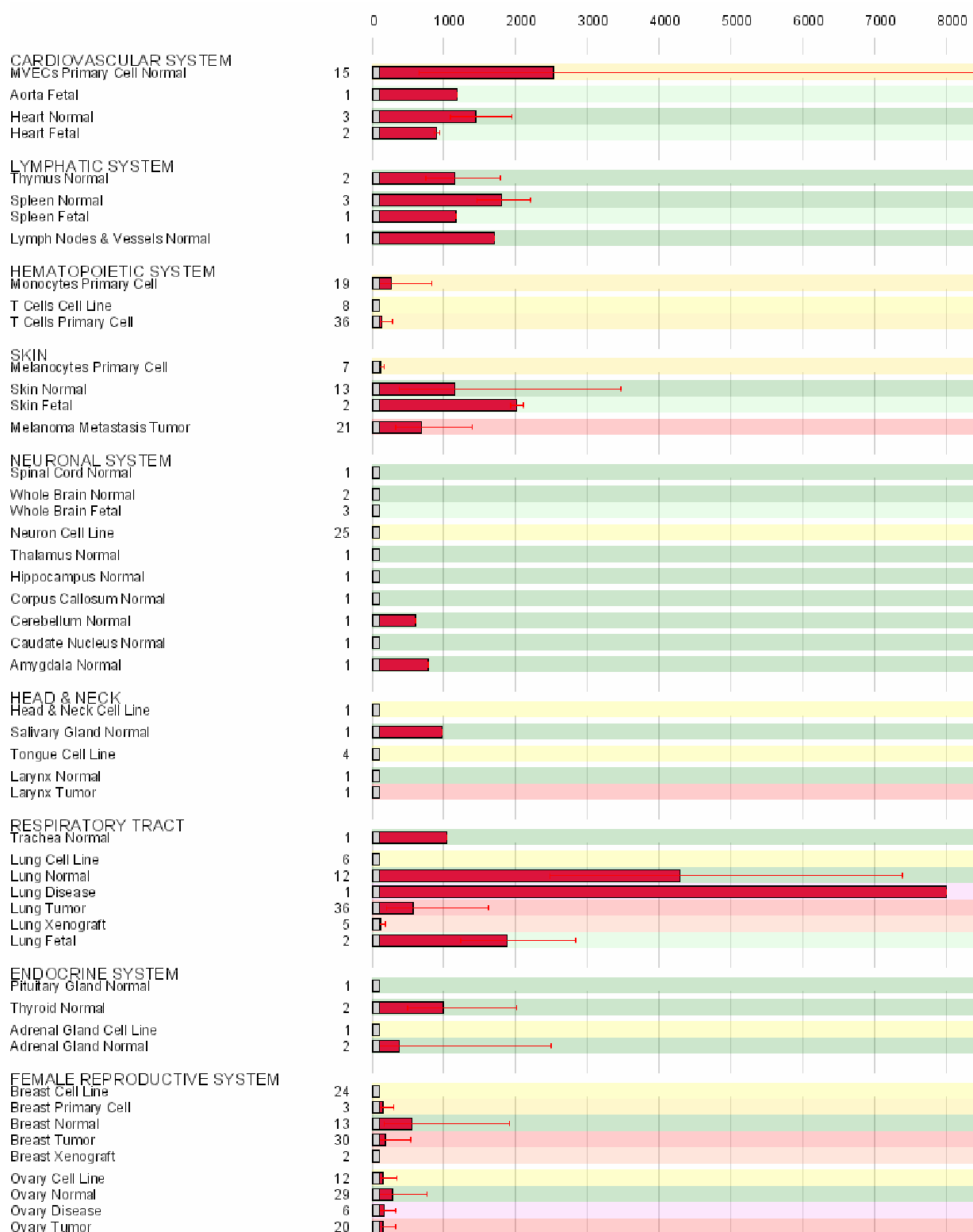
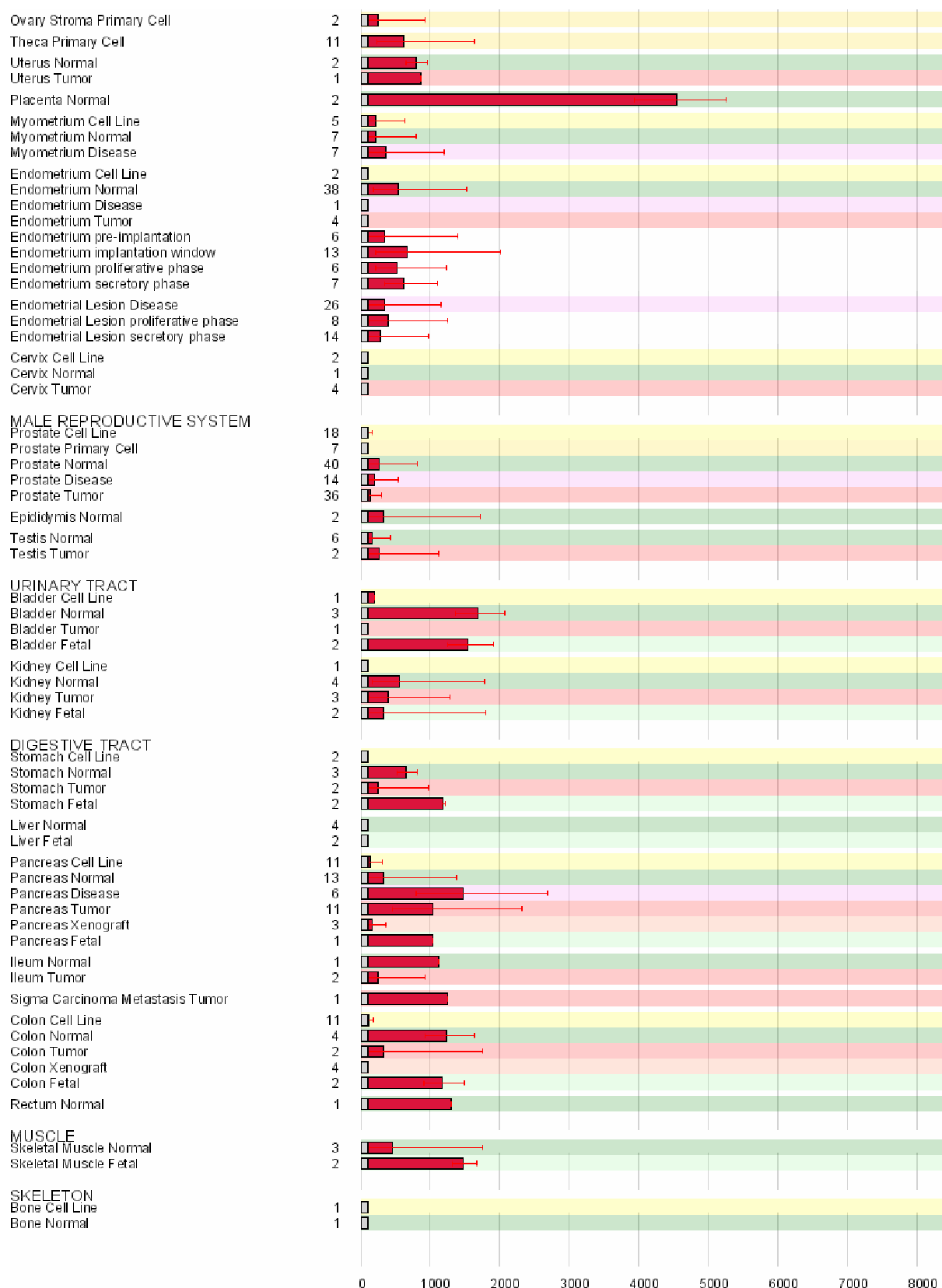


Abb. 3.1: Expression von hALK1.

(Fortsetzung auf der nächsten Seite) Array-Untersuchungen der hALK1-mRNA-Expression auf dem Chip saTIVA. Dargestellt ist der Mittelwert aus verschiedenen Proben desselben Gewebes oder verschiedener Experimente mit derselben Zelllinie. Die Zahl hinter dem Gewebe-/Zelltyp gibt die Anzahl der Proben an, die untersucht wurden.



NM_000020_s_at: [man] ALK-1 Homo sapiens activin A receptor type II-like 1 (ACVRL1) mRNA [hmm:kinase] [TCL=817]mRNA[ref]NM_000020.1[0.0]1825]

Condensationset: TIV_ALL_07-04

View Name: default.TISSUE_ALL

3.1.3. Western Blot-Analyse der ALK1-Protein-Expression

Die Proteinexpression von hALK1 wurde in verschiedenen Zelllinien und primären Endothelzellen untersucht. Dazu wurden identische Proteinmengen von Duschl-Lysaten der Zellen auf einem Western Blot mit Hilfe eines α -hALK1-Antikörpers detektiert, der die extrazelluläre Domäne von hALK1 erkennt (Abb. 3.2 c). ALK1-Protein mit einer Größe von 55-60 kDa wurde in den primären humanen Endothelzellen HUVECs, MVECs und HPAECs nachgewiesen. Außerdem exprimieren Zellen der Schweine-Endothelzelllinie PAEC, die stabil mit ALK1 transfiziert wurden (PAEC-ALK1 (8), siehe 3.2.1.1.), große Mengen des ALK1-Proteins. Die nicht-Endothelzelllinien MCF7 (humane Mammakarzinom-Zelllinie), CHO (Ovarialzelllinie des chinesischen Hamsters) und A459 (humane Lungenkarzinom-Zelllinie) zeigen keine ALK1-Expression.

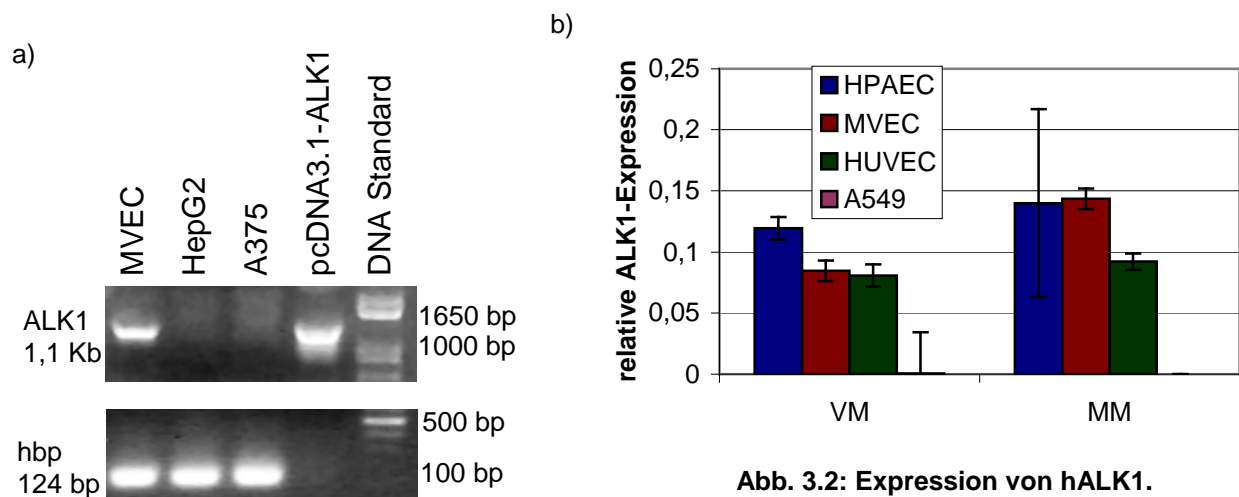
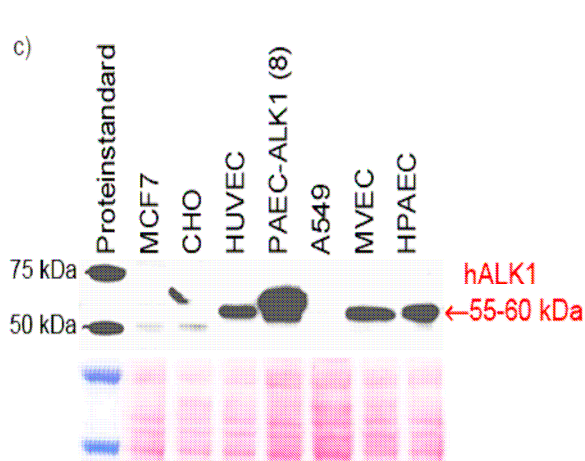


Abb. 3.2: Expression von hALK1.



a) PCR-Untersuchung der hALK1-mRNA-Expression. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und eine PCR mit den Primern ALK_Kin_for und ALK_Kin_rev bei einer Annealing-Temperatur von 58°C über 30 Zyklen durchgeführt. Plasmid-DNA diente als Positivkontrolle (vorletzte Bahn auf dem Gel). Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und mittels Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht analysiert. b) Semi-quantitative RT-PCR-Untersuchung der hALK1-mRNA-Expression, normiert auf GAPDH-Expression. Es wurde der Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix Hs00163543_m1 verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm STABW. VM = Vollmedium, MM = Magermedium. c) Proteinexpression von

hALK1. Duschl-Zelllysate wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und nach Western Blotting mittels α -hALK1 (polyklonaler goat-Antikörper) und ECL detektiert. Die untere Abbildung zeigt eine Ponceau-Färbung vor der Antikörper-Inkubation, um die aufgetragene Proteinmenge nachzuweisen.

3.1.4. Immunhistochemische Untersuchung der ALK1-Protein-Expression

Die Expression von ALK1 wurde außerdem immunhistochemisch auf menschlichem Tumor- und gesundem Gewebe untersucht (Abb. 3.3, Gregor Fachinger, Schering AG, Berlin). Vergleicht man die Lokalisation von ALK1 mit der des EC-Markers CD31, erkennt man, dass ALK1 ebenfalls nur auf ECs exprimiert wird. Die Schnitte des Tumorgewebes zeigen, dass die ALK1-Expression eindeutig auf das Tumorendothelium beschränkt ist, wohingegen in den Tumorzellen selbst kein ALK1 detektierbar ist.

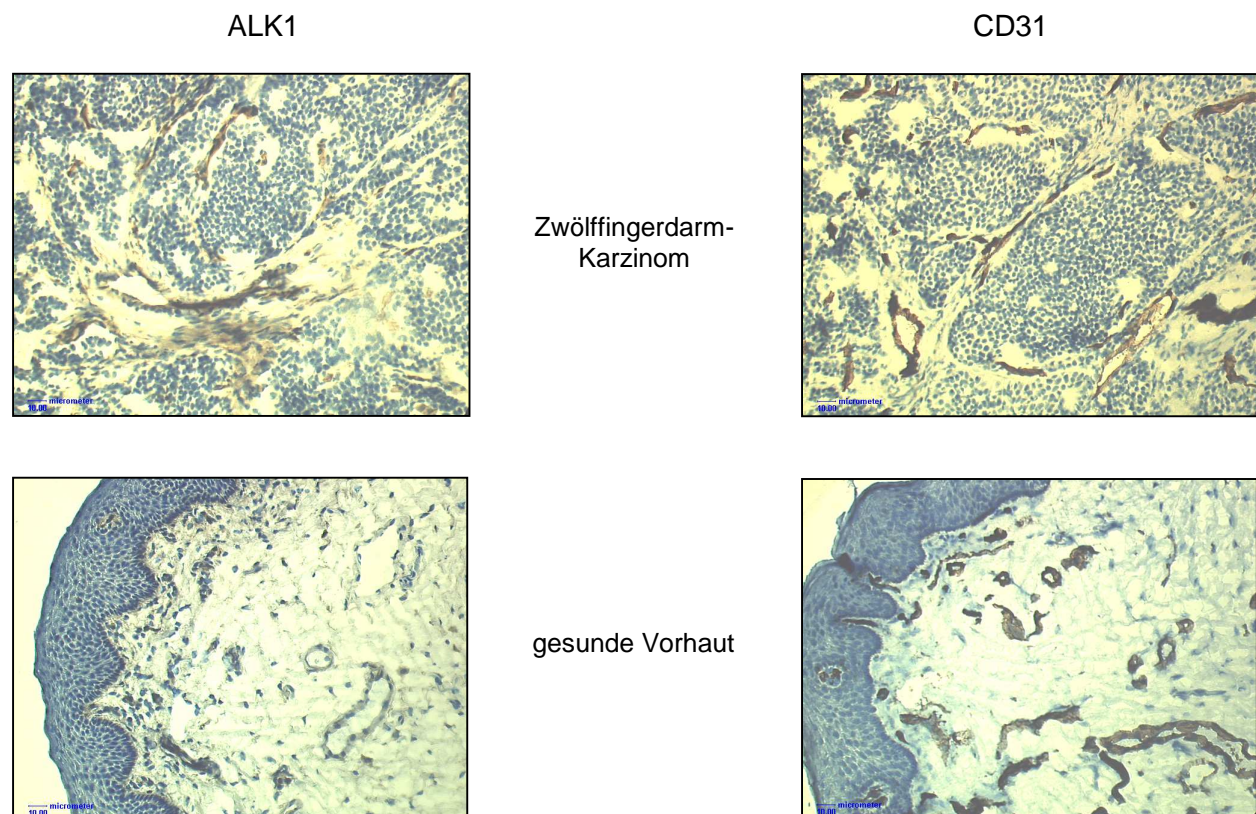


Abb. 3.3: hALK1-Färbung auf menschlichen Gewebeschnitten.

Nach Entnahme der Tumore wurden Gefrierschnitte von 10 µm Dicke angefertigt. Die beiden linken Schnitte wurden mit einem α -hALK1-Antikörper angefärbt (braun), der die extrazelluläre Domäne erkennt. Auf den rechten Schnitten wurden die Blutgefäße mit Hilfe eines α -CD31-Antikörper ebenfalls braun angefärbt. Die Zellkerne sind mit Hämatoxylin blau gegengefärbt. 250-fache Vergrößerung

3.2. ALK1-Signaltransduktion

3.2.1. Smad-Phosphorylierung

3.2.1.1. Smad1/5/8- und Smad2/3-Phosphorylierung durch ALK1

Die Smad1/5- und Smad2/3-Phosphorylierung durch ALK1 sollte anhand verschiedener ALK1-Mutanten (wildtyp (wt), konstitutiv aktiv, dominant negativ) untersucht werden. Dazu wurden PAECs mit den Plasmiden pcDNA3.1-ALK1, pcDNA3.1-ALK1-Q/D oder pcDNA3.1-ALK1-K/R stabil transfiziert. Das Plasmid pcDNA3.1-ALK1 enthält das wt-Gen für hALK1 aus MVECs im

Expressionsvektor pcDNA3.1/*myc*-HIS, der stromabwärts der MCS die Gene für ein *c-myc*-Epitop und einen 6xHIS-Tag zur Detektion und zur Proteinaufreinigung bietet. In der konstitutiv aktiven Mutante ALK1-Q/D ist ein Glutamin an Position 201 in der GS-Domäne zu einem Aspartat mutiert (Wieser, Wrana et al. 1995; Abb. 3.4). Die geladene Seitenkette des Aspartats bewirkt eine Konformationsänderung, die die Phosphorylierung in der GS-Domäne nachahmt. Bei der dominant negativen Mutante ALK1-K/R ist das Lysin an Position 229 durch ein Arginin ersetzt (Wrana, Attisano et al. 1994; Abb. 3.4), dessen geladene Seitenkette die Bindung von ATP an der Kinasedomäne verhindert. Diese ALK1-Mutante wird dominant negativ genannt, da sie die Funktion von ALK1 in der Zelle trotz Vorhandensein von nativem ALK1 blockiert.

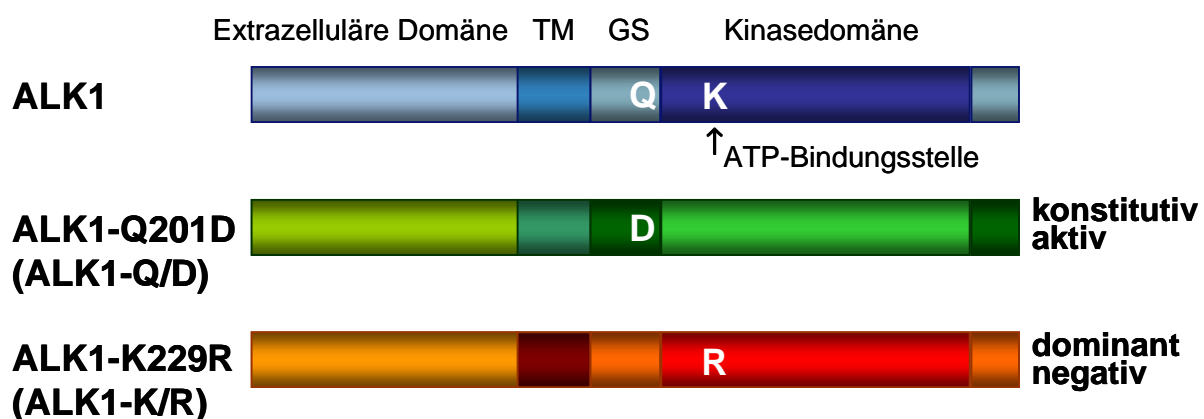


Abb. 3.4: Konstruktion von ALK1 (wt), ALK1-Q/D und ALK1-K/R

Die Expression der ALK1-Konstrukte wurde in RIPA-Lysaten der verschiedenen PAEC-Klone auf Western-Blots mit Hilfe von α -*c-myc* analysiert (Abb. 3.5 a). Eine gleichmäßige Proteinbeladung der Taschen wurde durch Ponceau-Färbung des Blots nachgewiesen (Abb. 3.5 d). ALK1 hat eine Größe von ungefähr 55-60 kDa. In den Lysaten der ALK1 (wt)- und der ALK1-Q/D-Klone liegt ALK1 überwiegend in einer 5-10 kDa größeren Form vor, was auf eine Phosphorylierung zurückschließen lässt. Die dominant negative ALK1-K/R-Mutante liegt hauptsächlich in der kleineren Form, also unphosphoryliert vor. Der Klon PAEC-ALK1 (8) exprimiert am meisten ALK1, während im Lysat der untransfizierten PAEC-Zellen kein ALK1 nachweisbar ist.

Die Smad-Phosphorylierung wurde mittels α -pSmad1/5- oder α -pSmad2/3-Detektion ebenfalls auf den Western-Blots der RIPA-Lysate untersucht (Abb. 3.5 b und c). Nur in den Lysaten der PAEC-ALK1- und der PAEC-ALK1-Q/D-Klone findet sich phosphoryliertes Smad1/5/8 (pSmad1/5/8), aber nicht in den Lysaten der untransfizierten PAECs und der PAEC-ALK1-K/R-Klone. Dies zeigt, dass exogenes ALK1 in den PAECs funktionsfähig exprimiert wird. Dabei bewirkt ALK1-Q/D eine stärkere Smad1/5/8-Phosphorylierung als ALK1 (wt) bei ungefähr gleicher ALK1-Expression (vgl. PAEC-ALK1 (11) und PAEC-ALK1-Q/D (3)). Eine höhere Expression von ALK1 führt zu mehr pSmad1/5/8 (vgl. PAEC-ALK1 (8) und PAEC-ALK1 (11)).

pSmad2/3 findet sich vor allem im Lysat der PAEC-wt-Zellen. Ungefähr die gleiche Menge an pSmad2/3 wird im Lysat des Klons PAEC-ALK1-Q/D (1) detektiert, und eine geringe Menge ist im Lysat des Klons PAEC-ALK1 (11) nachweisbar. In den restlichen Klonen ist pSmad2/3 kaum detektierbar.

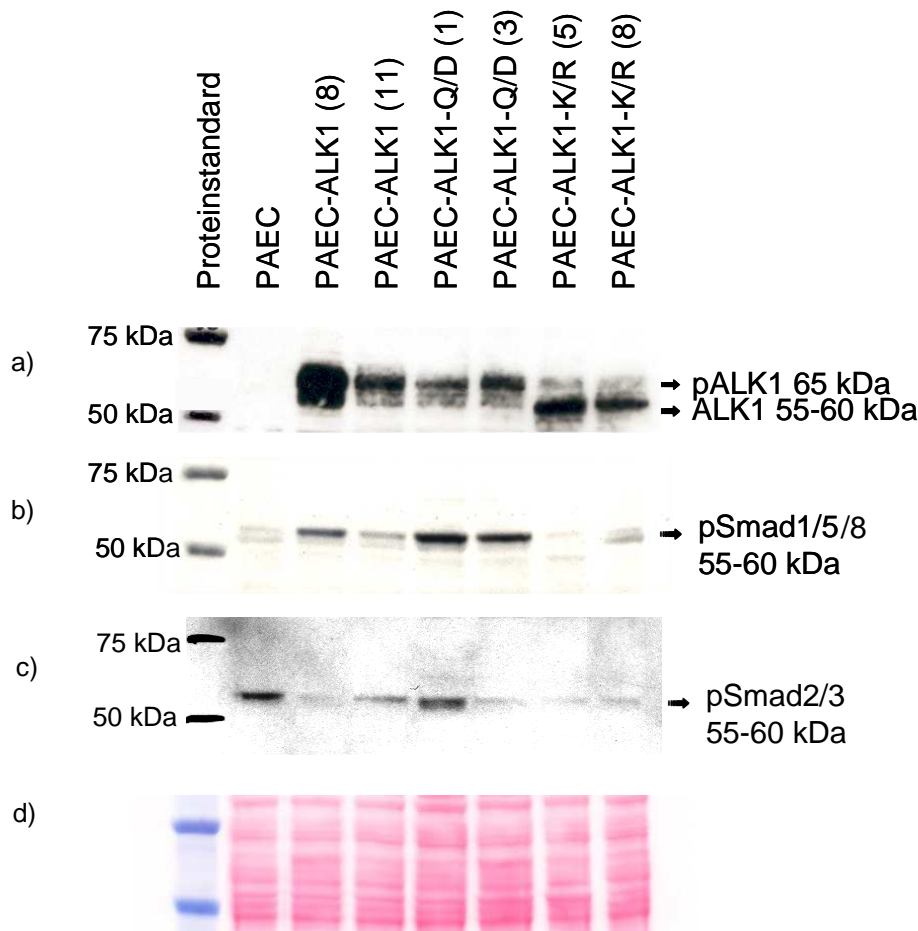


Abb. 3.5: Detektion von ALK1, pSmad1/5/8 und pSmad2/3 in stabil transfizierten PAEC-Klonen.

RIPA-Lysate der PAEC-ALK1-, PAEC-ALK1-Q/D-, und PAEC-ALK1-K/R-Klone wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit a) α -c-myc (zur ALK1-Detektion), b) α -pSmad1/5/8 oder c) α -pSmad2/3 detektiert. d) Der Blot wurde vor der Antikörper-Inkubation mit Ponceau S-Lösung angefärbt.

3.2.1.2. Smad1/5/8- und Smad2/3-Phosphorylierung nach Stimulation

Mittels Antikörper-Detektion von phosphoryliertem Smad1/5/8 (pSmad1/5/8) und phosphoryliertem Smad2/3 (pSmad2/3) sollte der Einfluss der extrazellulären Domäne von ALK1 auf die Smad-Phosphorylierung in ECs untersucht werden. Dazu wurden zuerst MVECs mit der extrazellulären Domäne von humanem ALK1 mit Fc-tag (hALK1/Fc) und zur Kontrolle nur mit dem Fc-tag (IgG₁ Fc) behandelt. Die anschließend hergestellten RIPA-Lysate wurden auf Western-Blots mit α pSmad1/5/8- bzw. α pSmad2/3-Antikörpern analysiert (Abb. 3.6 a). Die Zugabe von hALK1/Fc auf MVECs inhibiert im Vergleich zur Kontrolle mit IgG₁ Fc die Smad1/5/8-Phosphorylierung signifikant, während es auf pSmad2/3 nur einen sehr geringen hemmenden Einfluss hat. Dies weist darauf hin, dass hALK1/Fc die ALK1-Signaltransduktion hemmt.

Die Smad-Phosphorylierung in ECs sollte außerdem nach Zugabe verschiedener potentieller Liganden von ALK1 untersucht werden. Dazu wurden MVECs und PAECs mit TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2 oder BMP-6 inkubiert und zytoplasmatische und nukleäre Lysate getrennt isoliert. Da sich pSmad fast ausschließlich im Kern befindet (Abb. 3.6 b), wird in allen weiteren Abbildungen nur die nukleäre Fraktion gezeigt. In MVECs liegt Smad1/5/8 bereits ohne Stimulation phosphoryliert vor, aber die Menge an pSmad1/5/8 wird durch Inkubation mit TGF- β 1 noch erhöht (Abb. 3.6 c). TGF- β 3 hingegen hat keinen Einfluss auf die Smad1/5/8-Phosphorylierung.

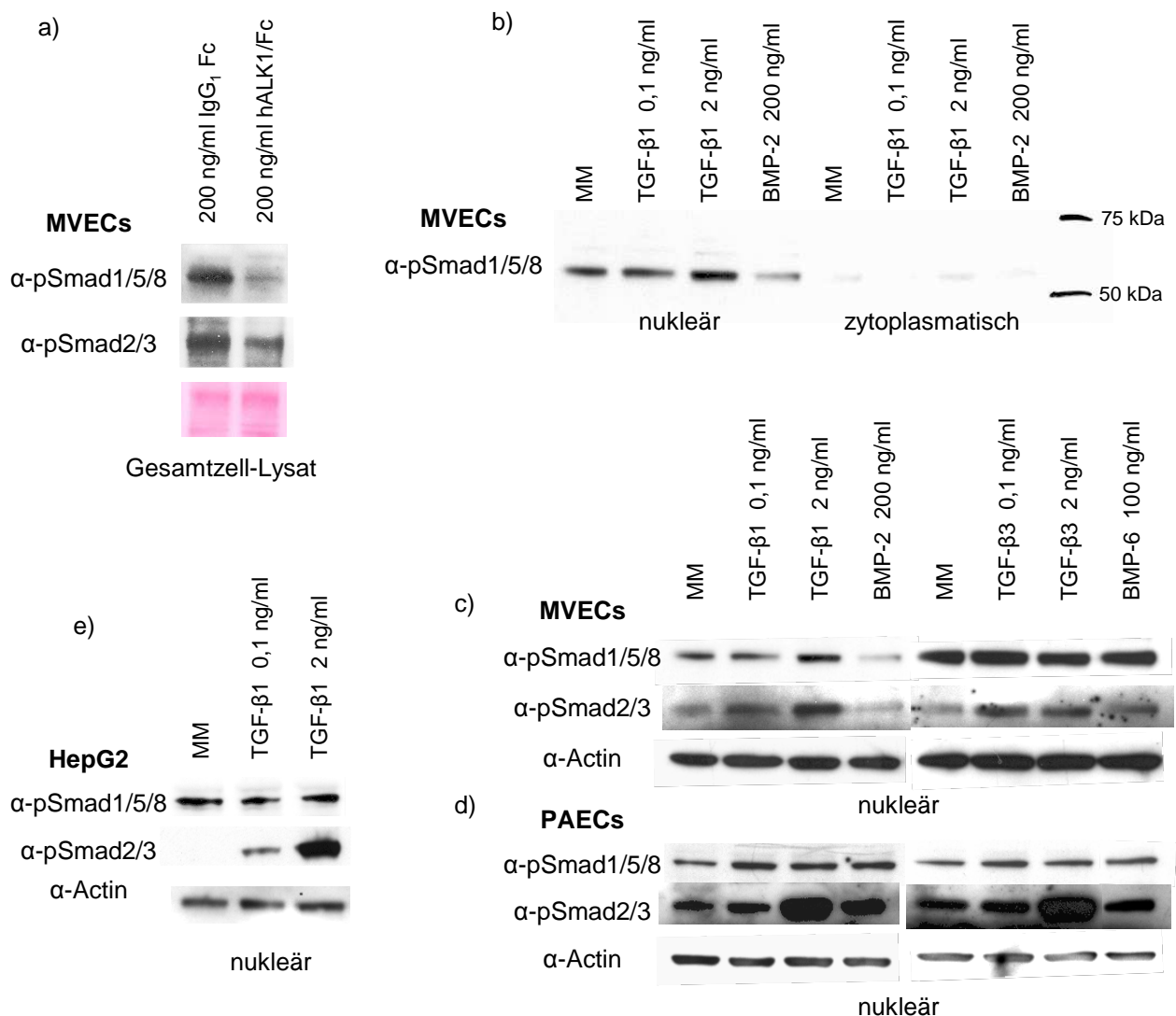


Abb. 3.6: Smad-Phosphorylierung durch hALK1/Fc, TGF- β s und BMPs.

a) - c) MVECs, d) PAECs und e) HepG2 wurden nach Aushungern in Magermedium über Nacht für 60 min mit den angegebenen Konzentrationen an hALK1/Fc, IgG₁ Fc, TGF- β 1 (im Falle von d) Schweine-TGF- β 1), TGF- β 3, BMP-2 oder BMP-6 stimuliert. Die Zellen wurden entweder in RIPA-Puffer lysiert oder es wurden nukleäre und cytoplasmatische Lysate getrennt angefertigt. In den Lysaten wurde die Proteinkonzentration bestimmt, und gleiche Proteinmengen der a) RIPA-Lysate, b) nukleären und cytoplasmatischen Lysate bzw. c) - e) nukleären Lysate wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt. Nach Western Blotting wurde die pSmad-Expression mittels α -pSmad1/5/8 und α -pSmad2/3 und ECL detektiert. Eine gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Taschen wurde durch a) Ponceau-Färbung oder b) - e) α -Actin-Detektion sichergestellt.

Smad2/3 ist in unstimulierten MVECs nur sehr schwach detektierbar. Die Zugabe sowohl von TGF- β 1 als auch von TGF- β 3 führt zu einer deutlich verstärkten Phosphorylierung von Smad2/3, wobei das Maximum mit TGF- β 1 erst bei 2 ng/ml erreicht ist, während es bei TGF- β 3 schon bei 0,1 ng/ml eintritt. BMP-2 hemmt in MVECs die Phosphorylierung von Smad1/5/8, die Menge von pSmad2/3 verringert sich nicht signifikant. BMP-6 zeigt keine Wirkung auf die Smad1/5/8-Phosphorylierung, und erhöht die Menge an pSmad2/3 nur in sehr geringem Maße. Insgesamt zeigen PAECs nach Zugabe von TGF- β eine ähnliche Smad-Phosphorylierung wie MVECs (Abb. 3.6 d). TGF- β 1 führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von Smad1/5/8, während TGF- β 3 pSmad1/5/8 kaum beeinflusst (evtl. eine nicht signifikante Verstärkung). Die Menge an pSmad2/3 wird durch TGF- β 1 und -3 deutlich erhöht. Anders als in MVECs phosphoryliert BMP-2 in PAECs sowohl Smad1/5/8 als auch Smad2/3. BMP-6 hat auf die Smad1/5/8-Phosphorylierung keinen wirklichen Einfluss, aber pSmad2/3 wird leicht verstärkt. Der Einfluss von TGF- β 1 wurde auch auf nicht-ECs betrachtet, die kein ALK1 exprimieren (siehe 3.1.2.). Dazu wurden von HepG2 Zellen ebenfalls nukleäre Lysate auf Western-Blots untersucht. Auch in HepG2 liegt Smad1/5/8 ohne Stimulation phosphoryliert vor (Abb. 3.6 e). Im Gegensatz zu den ECs ändert sich in HepG2 aber durch TGF- β 1 die Menge des pSmad1/5/8 nicht. In unstimulierten HepG2 ist kein pSmad2/3 nachweisbar, doch durch Zugabe von steigenden TGF- β 1-Konzentrationen wird Smad2/3 zunehmend phosphoryliert.

3.2.2. Transkriptionsregulation

3.2.2.1. Array-Analyse der Transkriptionsregulation durch TGF- β 1 und hALK1/Fc

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass hALK1/Fc die Smad1/5/8-Phosphorylierung in ECs inhibiert. Dies deutet darauf hin, dass die ALK1-Signaltransduktion durch hALK1/Fc inhibiert wird. Falls das stimmt, sollte hALK1/Fc auch die Aktivierung von ALK1-Zielgenen blockieren bzw. verhindern, dass von ALK1 negativ regulierte Gene gehemmt werden. Um dies nachzuprüfen, wurde die Transkriptionsregulation von hALK1/Fc in MVECs mit Hilfe einer Affymetrix-Analyse untersucht. Außerdem wurde analysiert, wie sich die Zugabe von TGF- β 1 auf die Genexpression auswirkt. Wenn TGF- β 1 tatsächlich der Ligand von ALK1 ist, dann sollten ALK1/Fc und TGF- β 1 die Gene genau entgegengesetzt regulieren. Dazu wurde 2, 6 und 24 Std. nach Zugabe von TGF- β 1 bzw. hALK1/Fc RNA aus MVECs isoliert. Zur Hybridisierung wurde der Chip HG-U133-Plus-2.0 verwendet, der 39500 Gensequenzen des humanen Genoms enthält. Die Werte der Fluoreszenzsignale nach TGF- β 1- bzw. hALK1/Fc-Stimulation wurden auf den Wert der unstimulierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt normiert. Da nur eine Einfachbestimmung durchgeführt wurde, wurde nach Genen gesucht, die zu zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten deutlich herauf- bzw. herunterreguliert waren oder von denen bekannt ist, dass sie im TGF- β -Signalling eine Rolle spielen (Tabelle 3.1). Dabei sind alle

Werte fett markiert, die eine mindestens 2-fache Stimulation oder eine mindestens 0,5-fache Hemmung der Genexpression im Vergleich zum Kontrollansatz darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TGF- β 1 die Expression von BMP8b, Inhibin- β , BMPRII, Smad6, Smad7, Id2, Mortalin-2, PAC1 (nach 2 und 6 Std.), CDK9, Thrombospondin 1, Trophinin, Cadherin 19 (nach 2 und 6 Std.), Contactin 1, ADAMTS5, PCPE2 (nach 24 Std.) und abLIM1 induziert. Die Expression von BMP-3, GDF-5, Betaglycan, Smad4, Noggin, IL1RL1, TAO1, LPA1/EDG2, PAC1 (nach 24 Std.), Cyclin M1, CDK6, Cadherin (nach 24 Std.) und PCPE2 (nach 2 und 6 Std.) wird durch TGF- β 1 inhibiert. ALK1/Fc hingegen aktiviert die Expression von BMP-2, BMP-4, BMP8b, T β RII, Smad7 (nach 6 Std.), LPA1/EDG2, Mortalin, PAC1 (nach 2 Std.), CDK6 (nach 2 Std.), CDK9, Trophinin, Cadherin 19 (nach 6 Std.), Thrombospondin 1, Contactin (nach 24 Std.), PCPE2 (nach 24 Std.) und abLIM. ALK1/Fc hemmt die Expression von BMP-3, BMPRII, Smad4, Smad6, Smad7 (nach 2 und 24 Std.), Noggin, BAMBI, Id1, Id2, ILRL1, TAO1, PAC1 (nach 6 und 24 Std.), Cyclin M1 (nach 2 und 6 Std.), CDK6 (nach 6 Std.), Cadherin 19 (nach 24 Std.), Contactin (nach 2 und 6 Std.) und PCPE2 (nach 2 und 6 Std.). Eine genauere Analyse der Funktion der genannten Gene wird in der Diskussion gezeigt (Kapitel 4.2.5.).

Liganden der TGF- β -Superfamilie

Betrachtet man potentielle Liganden von ALK1 aus der TGF- β -Familie, so zeigt sich, dass TGF- β 1 und ALK1/Fc beide die BMP-8b-Expression schnell und deutlich stimulieren, der Effekt von ALK1/Fc ist sogar ungefähr drei Mal stärker als der von TGF- β 1. Die Expression von BMP-2 und BMP-4 wird nur durch ALK1/Fc nach 2 Std. signifikant verstärkt. Die Inhibin- β -A-Expression wird durch TGF- β 1 zu allen Zeitpunkten aktiviert. BMP-3 und GDF-5 werden sowohl durch TGF- β 1 als auch durch ALK1/Fc herabreguliert, vor allem nach 6 Std.. Die BMP-10-Expression wird von TGF- β 1 erst nach 24 Std. gehemmt, während ALK1/Fc sie zum gleichen Zeitpunkt leicht aktiviert. GDF-3 wird nur von TGF- β 1 nach 6 Std. leicht heraufreguliert. Die BMP-1-Expression wird weder durch TGF- β 1 noch durch ALK1/Fc beeinflusst. BMPs sind pleiotrope Differenzierungsfaktoren, die unter anderem Knorpelformation und Knochenbildung induzieren (Wozney 1989). GDF-3 ist ein adipogener Faktor, der im Fettsäure-Metabolismus der Adipozyten eine Rolle spielt (Witthuhn und Bernlohr 2001). GDF-5 stimuliert die Differenzierung von Osteoblasten und wirkt angiogenese-induzierend (Yamashita, Shimizu et al. 1997; Aoki, Fujii et al. 2001). Je nachdem, ob Inhibin- β A als Homodimer oder als Heterodimer mit Inhibin- α vorliegt, wirkt es stimulierend oder inhibierend auf das Follikel-stimulierende Hormon, welches bei der Frau zur Bildung von Östrogen und Reifung der Eizellen und beim Mann zur Entwicklung der Spermien führt (Ying 1987).

Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie

TGF- β 1 und ALK1/Fc erhöhen beide die Expression von T β RII zu allen Zeitpunkten, dabei wird das Maximum nach 6 Std. erreicht und ALK1/Fc stimuliert die Expression stärker als TGF- β 1. T β RII bildet wahrscheinlich mit ALK1 einen Rezeptorkomplex, der das Signal ins Zellinnere weiterleitet (Attisano, Carcamo et al. 1993; Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000; Oh, Seki et al. 2000). Die BMPRII-Expression wird nach 6 Std. durch TGF- β 1 verdoppelt, während ALK1/Fc sie nach 2 Std. halbiert. Der BMPRII ist der Typ II Rezeptor für BMPs (Chen, Zhao et al. 2004). Die Expression von Betaglycan, dem Typ III-Rezeptor für TGF β -1, -2 und -3 und Inhibin (Lopez-Casillas, Wrana et al. 1993; Lewis, Gray et al. 2000), wird am deutlichsten durch TGF- β 1 nach 6 Std. gehemmt. Der BMPRI, ein Typ I-Rezeptor für BMP-2, BMP-4, BMP-7, AMH und GDF-5 (Massague, Blain et al. 2000), wird nach 6 Std. von TGF- β 1 und ALK1/Fc herabreguliert.

Signaltransduktionsmoleküle und Regulatoren des TGF- β -Signalweges

Die Smad4-Expression wird sowohl durch TGF- β 1 als auch hALK1/Fc gehemmt, am deutlichsten direkt nach 2 Std.. Smad6 wird durch TGF- β 1 zu späten Zeitpunkten immer stärker aktiviert, während es von hALK1/Fc sofort sehr stark herabreguliert wird. Die Expression von Smad7 wird sowohl von TGF- β 1 als auch von ALK1/Fc nach 6 Std. verstärkt, aber nach 2 und nach 24 Std. hemmt ALK1/Fc die Expression. Das Co-Smad Smad4 leitet das Signal der TGF- β -Rezeptoren in den Zellkern weiter, während die inhibitorischen Smads Smad6 und -7 die Signaltransduktion blockieren (Heldin, Miyazono et al. 1997). Die Noggin-Expression wird durch TGF- β 1 und vor allem durch ALK1/Fc deutlich gesenkt. Noggin ist ein löslicher extrazellulärer Faktor, der die BMP-Signaltransduktion durch Bindung an BMPs inhibiert (Zimmerman, De Jesus-Escobar et al. 1996). Auf die Expression von BAMBI hat TGF- β 1 keinen Einfluss, wohingegen ALK1/Fc sie nach 2 Std. stark hemmt. BAMBI, ein „Pseudo-Typ-I-Rezeptor“, verhindert die Transphosphorylierung der Typ I-Rezeptoren durch den Typ II-Rezeptor, da es mit dem Typ I-Rezeptoren nicht aktivierbare Komplexe bildet (Onichtchouk, Chen et al. 1999).

Proliferations-, Überlebens- oder Angiogenese-fördernde Gene

Die Expression von Id1 und Id2 wird durch hALK1/Fc nach 2 Std. signifikant gehemmt. Im Gegensatz dazu stimuliert TGF- β 1 die Expression von Id1 und vor allem von Id2. Id-Proteine steigern Zellwachstum und -migration (Norton, Deed et al. 1998; Lin, Singh et al. 2000) und wirken Angiogenese-induzierend (Volpert, Pili et al. 2002). IL1RL1 wird sowohl durch TGF- β 1 als auch durch ALK1/Fc zu allen Zeitpunkten herabreguliert. IL1RL1 spielt vermutlich bei der Zellproliferation eine Rolle und könnte ebenfalls proangiogen wirken (Ota, Fujii et al. 2002). Die Expression der TAO Kinase 1 (TAO1) wird sowohl von TGF- β 1 als auch von ALK1/Fc gesenkt. TAO1 aktiviert MAP/ERK Kinasen im Stress-responsiven MAP-Kinase-Signalweg (Hutchison, Berman et al. 1998), der wiederum die Zellproliferation anregt. Die Expression des

Lysophosphatidic acid receptors 1 oder Endothelial differentiation gene receptor 2 (LPA1/EDG2) wird durch TGF- β 1 zu frühen Zeitpunkten gehemmt, während ALK1/Fc sie erhöht. LPA1 löst eine Reihe verschiedener Zellprozesse aus, z.B. Proliferation, Überleben, Motilität und Differenzierung, vor allem im Nervensystem (Moolenaar, Kranenburg et al. 1997). Mortalin-2 wird von TGF- β 1 und ALK1/Fc im Laufe der Zeit immer stärker heraufreguliert, aber von TGF- β 1 deutlicher und früher. Mortalin-2 fördert das Überleben von Zellen; es liegt in immortalen Zelllinien perinukleär vor, was die seneszenzfördernde Wirkung des in normalen Zellen zytosolischen Mortalins Mortalin-1 verhindert (Wadhwa, Kaul et al. 1994). TGF- β 1 und ALK1/Fc stimulieren beide die Expression des Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor type I (PAC1) zuerst und hemmen sie später, wobei die Hemmung durch ALK1/Fc wesentlich früher einsetzt. Das Polypeptid wirkt neuro- und cardioprotektiv (Dejda, Sokolowska et al. 2005; Dvorakova 2005).

Zellzyklus- und Transkriptionsregulatoren

Zyclin M1 wird von TGF- β 1 zu allen und von ALK1/Fc zu frühen Zeitpunkten herabreguliert. Die Expression der Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) wird durch TGF- β 1 gesenkt, während ALK1/Fc die Expression zuerst anregt und dann hemmt. Die CDK9-Expression hingegen wird durch TGF- β 1 vor allem spät und durch ALK1/Fc eher früh erhöht. CDK6 gehört zu den CDKs, die zusammen mit Zyklinen einen Komplex formen und eine Schlüsselrolle beim Übergang von der G0/G1- zur S-Phase während des eukaryontischen Zellzykluses spielen (Harbour, Luo et al. 1999). CDK9 ist nicht direkt an der Zellzyklus-Regulation beteiligt, sondern fördert die Transkription und Zelldifferenzierung (de Falco und Giordano 1998).

Zell-Adhäsions-, Matrix- und Zytoskelett-Gene

Die Expression von Thrombospondin 1 wird sowohl durch TGF- β 1 als auch durch ALK1/Fc deutlich stimuliert. Thrombospondin 1 ist ein sezerniertes Protein, das mit Zelloberflächen-Rezeptoren, Heparansulfatproteoglykanen, Wachstumsfaktoren und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix interagiert. Es aktiviert latentes TGF- β , inhibiert verschiedene Proteasen, beeinflusst Zelladhäsion, -motilität und -wachstum, und wirkt damit deutlich anti-angiogen (Roberts 1996). Die Trophinin-Expression wird durch TGF- β 1 und ALK1/Fc zu allen Zeitpunkten gesteigert, mit Abstand am deutlichsten nach 2 Std. Trophinin ist ein Membranprotein, das für die Adhäsion zwischen Trophoblast und Endometrium während der Implantation des Embryos notwendig ist (Fukuda, Sato et al. 1995). TGF- β 1 und ALK1/Fc erhöhen beide zu frühen Zeitpunkten die Cadherin 19-Expression, und hemmen sie nach 24 Std. Cadherine sind Zelloberflächen-Moleküle, die an der strukturellen und funktionellen Organisation von Zellen beteiligt sind und selektive Zell-Zell-Adhäsion vermitteln (Takeichi 1988). Contactin 1 wird nach 24 Std. durch TGF- β 1 heraufreguliert. ALK1/Fc senkt zu den frühen Zeitpunkten seine

Expression, um sie dann nach 24 Std. ebenfalls zu stimulieren. Contactin 1 ist ein neuronales Zelladhäsions-Protein der Immunoglobulin-Superfamilie, das axonale und dendritische Interaktionen von cerebellaren Interneuronen kontrolliert und zur cerebellaren Microorganisation beiträgt (Berglund, Murai et al. 1999). Die Expression von a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 5 (ADAMTS5) wird nach 6 und 24 Std. von TGF- β 1 aktiviert. ADAMTS5 ist eine sezernierte Matrix-abbauende Protease, die verantwortlich für den Abbau von Aggrecan ist. Sowohl TGF- β 1 als auch ALK1/Fc inhibieren zu den beiden frühen Zeitpunkten die Expression des Procollagen C-proteinase enhancer 2 (PCPE2), während sie nach 24 Std. deutlich aktiviert wird. PCPE2 bindet das COOH-terminale Propeptid von Typ I Collagen und verstärkt dadurch die Spaltung durch Procollagen C-Proteinasen (z.B. BMP-1) verstärkt, ein wichtiger Schritt während der Collagen-Ablagerung (Takahara, Kessler et al. 1994).

Die Expression des actin binding LIM protein 1 (abLIM1) von TGF- β 1 im Laufe der Zeit immer stärker heraufreguliert. Dagegen wird die abLIM1-Expression von ALK/Fc nach 2 Std. unterdrückt und erst nach 6 und 24 Std. zunehmend stimuliert, dann aber sogar stärker als durch TGF- β 1. abLIM1 ist ein zytoskelettales LIM Protein, das die Interaktion zwischen Aktinfilamenten und zytoplasmatischen Zielmolekülen während der Morphogenese und Differenzierung vermitteln könnte, und wahrscheinlich in der Axonlenkung involviert ist (Roof, Hayes et al. 1997).

| Gen | TGF- β 1 | | | hALK1/Fc | | |
|---|----------------|-------------|---------|-------------|-------------|---------|
| | 2 Std. | 6 Std. | 24 Std. | 2 Std. | 6 Std. | 24 Std. |
| <i>Liganden der TGF-β-Superfamilie</i> | | | | | | |
| BMP-1 | 0,93 | 0,93 | 1,08 | 1,01 | 0,86 | 1,04 |
| BMP-2 | 0,86 | 0,68 | 0,80 | 2,39 | 0,67 | 1,48 |
| BMP-3 | 0,90 | 0,44 | 0,72 | 1,87 | 0,44 | 1,15 |
| BMP-4 | 1,21 | 1,22 | 1,37 | 2,73 | 1,72 | 1,24 |
| BMP-8b | 2,37 | 1,01 | 1,45 | 6,27 | 1,15 | 1,00 |
| BMP-10 | 1,00 | 1,00 | 0,54 | 1,00 | 1,00 | 1,72 |
| GDF-3 | 1,00 | 1,73 | 1,00 | 1,00 | 0,83 | 1,00 |
| GDF-5 | 0,87 | 0,43 | 0,78 | 1,02 | 0,64 | 0,84 |
| Inhibin- β A | 2,63 | 2,58 | 1,97 | 1,00 | 1,56 | 1,00 |
| <i>Rezeptoren der TGF-β-Superfamilie</i> | | | | | | |
| T β RII | 1,39 | 1,73 | 1,34 | 1,51 | 2,71 | 1,82 |
| BMPRII | 0,74 | 1,93 | 0,97 | 0,53 | 1,03 | 0,84 |
| T β RIII (Betaglycan) | 0,97 | 0,44 | 0,59 | 0,80 | 0,96 | 0,87 |

| | | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| BMPRII | 1,72 | 0,52 | 0,76 | 1,00 | 0,52 | 1,12 |
| <i>Signaltransduktionsmoleküle und Regulatoren des TGF-β-Signalweges</i> | | | | | | |
| Smad4 | 0,13 | 0,84 | 0,99 | 0,13 | 0,60 | 0,71 |
| Smad6 | 0,66 | 1,42 | 3,15 | 0,01 | 0,40 | 1,00 |
| Smad7 | 1,29 | 6,94 | 1,19 | 0,02 | 2,61 | 0,49 |
| Noggin | 1,24 | 0,44 | 0,95 | 0,11 | 0,06 | 0,93 |
| BAMBI | 1,07 | 1,07 | 0,77 | 0,16 | 0,78 | 0,70 |
| <i>Proliferations-, Überlebens- oder Angiogenese-fördernde Gene</i> | | | | | | |
| Id1 | 1,22 | 1,67 | 1,40 | 0,38 | 0,72 | 0,92 |
| Id2 | 0,68 | 4,03 | 1,00 | 0,13 | 1,00 | 1,00 |
| IL1RL1 | 0,19 | 0,57 | 0,33 | 0,19 | 0,50 | 0,33 |
| TAO1 | 0,27 | 1,26 | 0,37 | 0,27 | 0,40 | 1,11 |
| LPA1/EDG2 | 0,11 | 0,24 | 1,71 | 1,07 | 2,74 | 1,62 |
| Mortalin-2 | 2,61 | 3,91 | 4,57 | 1,00 | 1,83 | 2,54 |
| PAC1 | 4,68 | 3,50 | 0,39 | 3,58 | 0,58 | 0,39 |
| <i>Zellzyklus- und Transkriptionsregulatoren</i> | | | | | | |
| Zyclin M1 | 0,27 | 0,31 | 0,51 | 0,27 | 0,48 | 1,65 |
| CDK6 | 1,00 | 0,27 | 0,45 | 2,61 | 0,27 | 0,98 |
| CDK9 | 1,00 | 3,48 | 2,08 | 3,14 | 2,78 | 1,00 |
| <i>Zell-Adhäsions-, Matrix- und Zytoskelett-Gene</i> | | | | | | |
| Thrombospondin 1 | 1,07 | 4,34 | 2,02 | 1,28 | 5,02 | 2,56 |
| Trophinin | 7,70 | 1,44 | 1,79 | 6,70 | 2,90 | 2,52 |
| Cadherin 19 | 2,51 | 5,17 | 0,38 | 1,00 | 3,01 | 0,22 |
| Contactin 1 | 1,53 | 0,90 | 5,30 | 0,26 | 0,24 | 2,41 |
| ADAMTS5 | 1,00 | 5,72 | 3,09 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| PCPE2 | 0,66 | 0,32 | 2,54 | 0,13 | 0,32 | 5,65 |
| abLIM1 | 1,19 | 2,85 | 6,02 | 0,54 | 3,72 | 8,12 |

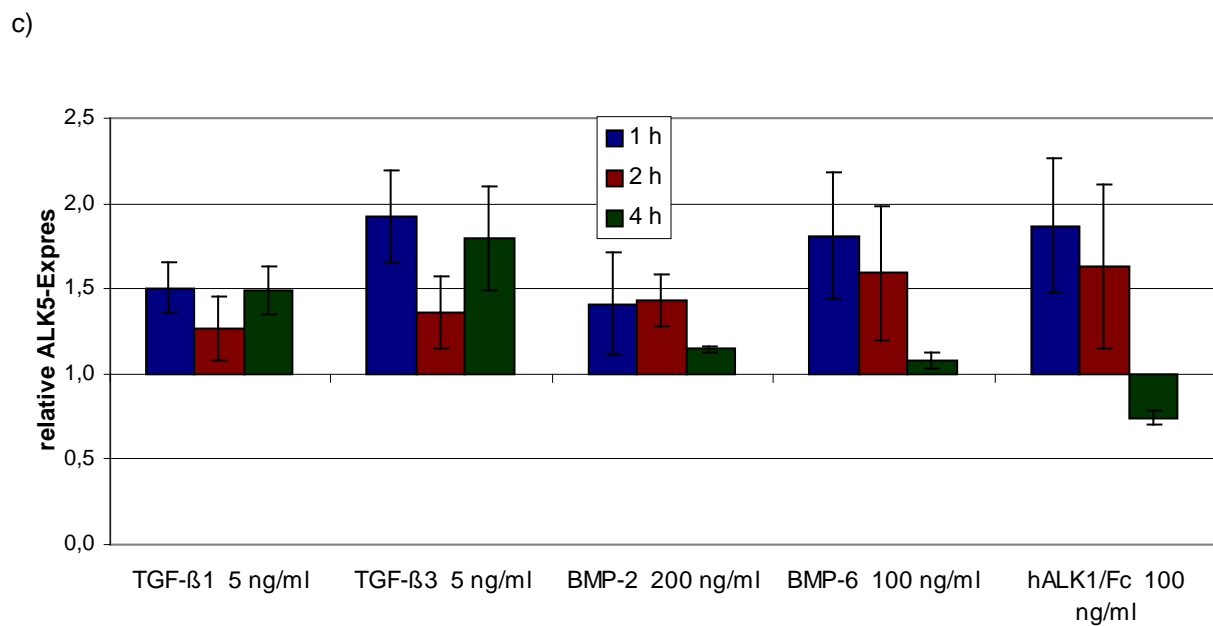
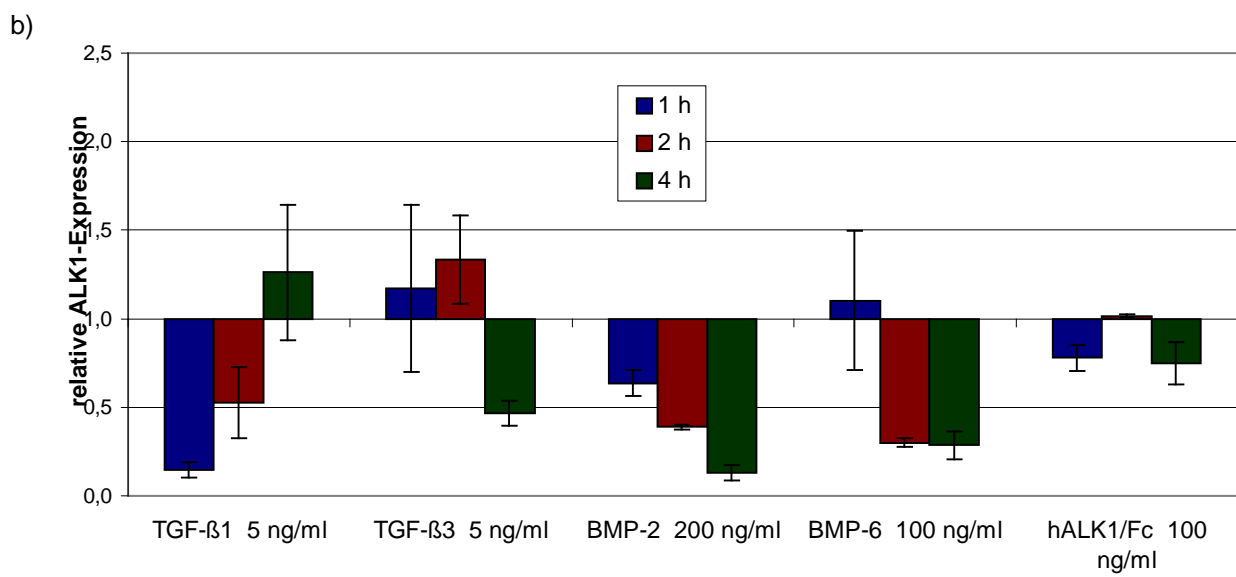
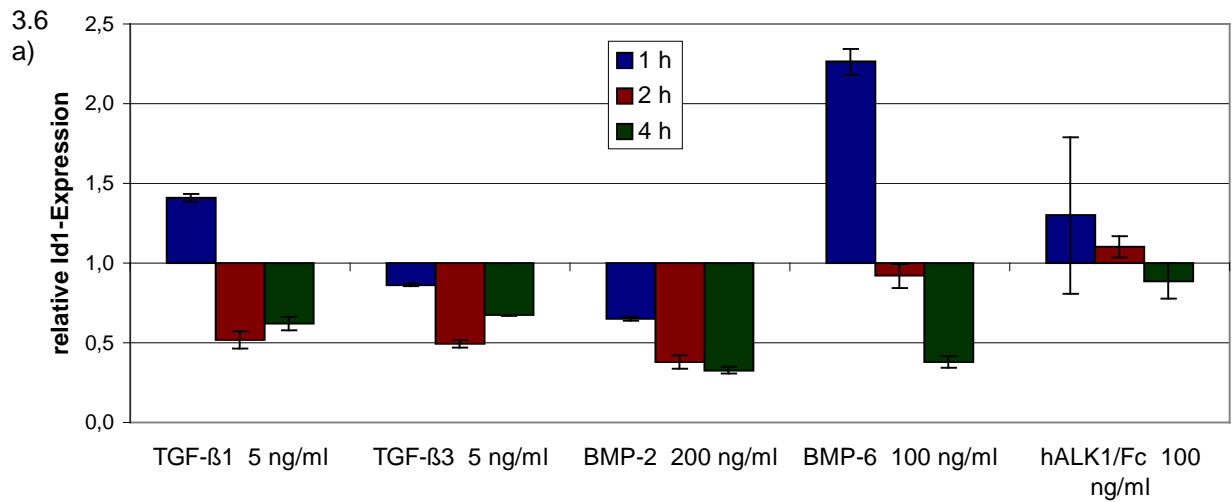
Tab. 3.1: Transkriptionsregulation in MVECs durch TGF- β 1 und hALK1/Fc.

Je $6,5 \times 10^5$ MVECs wurden in Vollmedium ausgesät, über Nacht in Magermedium ausgehungert, und dann 2, 6 bzw. 24 Std. mit 55 ng/ml TGF- β 1 oder 100 ng/ml hALK1/Fc behandelt. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die biotin-markierte cRNA auf dem Chip HG-U133-Plus-2.0 hybridisiert. Die Detektion erfolgte im GeneArray Scanner 3000, und die Array-Datenanalyse wurde mit Hilfe der Genedata Expressionist Analyst Pro Software ausgeführt. Die Werte wurden auf den unstimulierten Kontrollwert des jeweiligen Zeitpunkts normiert.

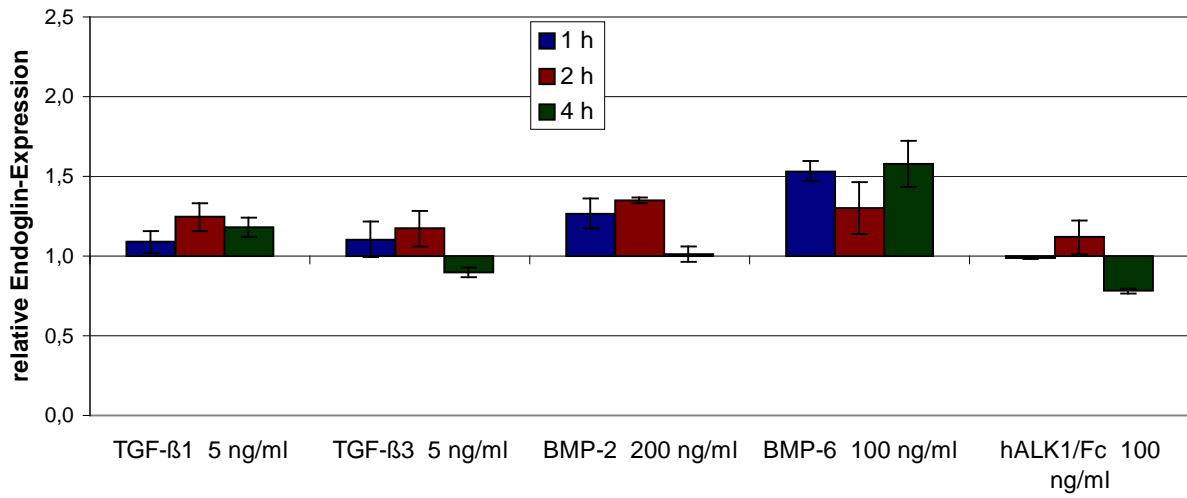
3.2.2.2. RT-PCR-Analyse der Transkriptionsregulation durch TGF- β , BMP und hALK1/Fc

Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die Transkriptionsregulation durch TGF- β 1 und -3, BMP-2 und -6 und hALK1/Fc in MVECs untersucht. Dazu wurden die Zellen für 1, 2 und 4 Std. mit den verschiedenen Stimulantien behandelt und anschließend die Gene ALK1, ALK5, KDR, Id1, Id2, T β RII, BMPRII, Endoglin, Noggin, GDF-15, IL1RL1, Smad6 und Smad7 betrachtet. ALK5 ist wie ALK1 ein Typ I Rezeptor der TGF- β -Familie, der aber im Gegensatz zu ALK1 ubiquitär exprimiert wird, und TGF- β zusammen mit dem Typ II Rezeptor T β RII bindet (Massague 1998). Der BMPRII ist ebenfalls ein Typ II Rezeptor, seine Liganden sind die BMPs, die die Bildung von Knorpel und schließlich Knochen bewirken (Wozney 1989). GDF-15 (human MIC-1) ist ein Ligand der TGF- β -Familie, der sowohl anti-tumorigene, pro-apoptotische Eigenschaften hat (Shim und Eling 2005), als auch protektive, überlebensfördernde, z.B. nach einer Verletzung in Hirn, Herzen, Leber und anderen Organen auf Neuronen oder Cardiomyocyten (Strelau, Schober et al. 2003; Kempf, Eden et al. 2006; Zimmers, Jin et al. 2006). Noggin ist ein löslicher extrazellulärer Faktor, der die BMP-Signaltransduktion durch Bindung an BMPs inhibiert (Zimmerman, De Jesus-Escobar et al. 1996). Die inhibitorischen Smads Smad6 und -7 blockieren die Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie (Heldin, Miyazono et al. 1997). Id1, Id2 und IL1RL1 sind Zielgene von ALK1, die proliferations- und angiogeneseinduzierend wirken (Ota, Fujii et al. 2002). KDR, oder auch VEGF-R2, ist der humane Rezeptor für VEGF und spielt eine Schlüsselrolle in der Angiogenese (Risau 1997). Als endogene Kontrolle der RT-PCR diente die Expression von hGAPDH, auf die die Expression der untersuchten Gene normiert wurde. Die relative Expression jedes Gens wurde außerdem auf den unstimulierten Kontrollwert des jeweiligen Zeitpunkts normiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.6 a) – m) für die verschiedenen Gene zusammengefasst.

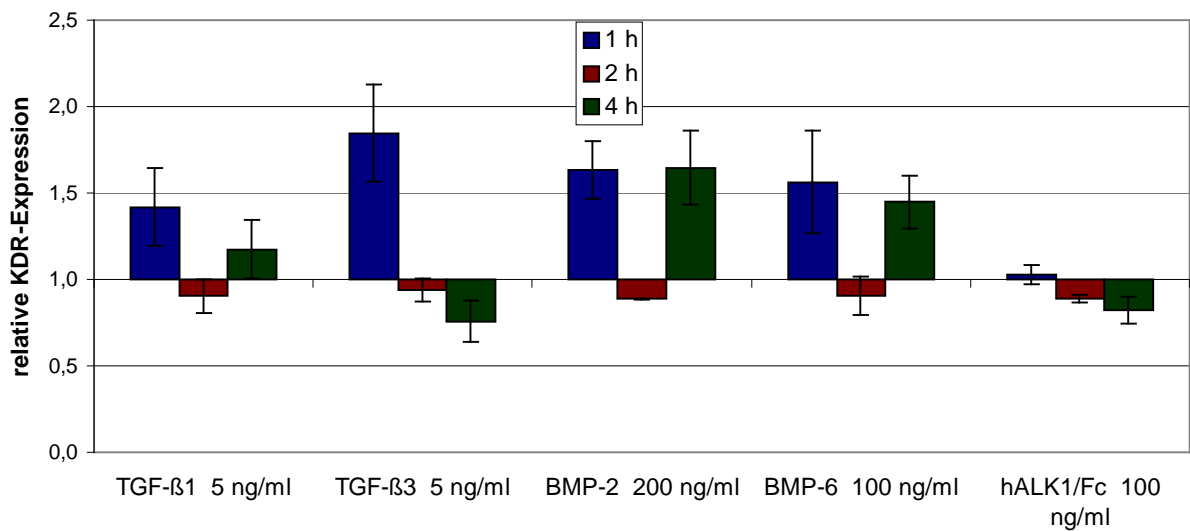
TGF- β 1 reguliert die ALK1-Expression nach 1 Std. signifikant und nach 2 Std. geringfügig herab. Die Expression von Id1 wird durch TGF- β 1 nach 2 und 4 Std. halbiert. TGF- β 3 stimuliert die Expression von ALK5 und KDR. Darüber hinaus hemmt es ebenfalls die Id1-Expression nach 2 und 4 Std. und die von ALK1 nach 4 Std., beides aber weniger stark. BMP-2 inhibiert deutlich die Expression von Id1 und ALK1, zu späteren Zeitpunkten hin immer stärker. Die KDR-Expression wird leicht induziert durch BMP-2. BMP-6 verstärkt die Id1-Expression nach 1 Std. signifikant, und inhibiert sie nach 4 Std.. Die ALK1-Expression wird durch BMP-6 nach 2 und 4 Std. auf ungefähr ein Drittel reduziert. Des weiteren wird die Expression von ALK5 durch BMP-6 aktiviert, am deutlichsten nach 1 Stunde. hALK1/Fc stimuliert die Smad6-Expression sehr stark, nach 1 Std. vierfach und nach 2 Std. sogar um den Faktor 7. Die Expression von ALK5 wird durch hALK1/Fc signifikant, die von Smad7 geringfügig heraufreguliert.



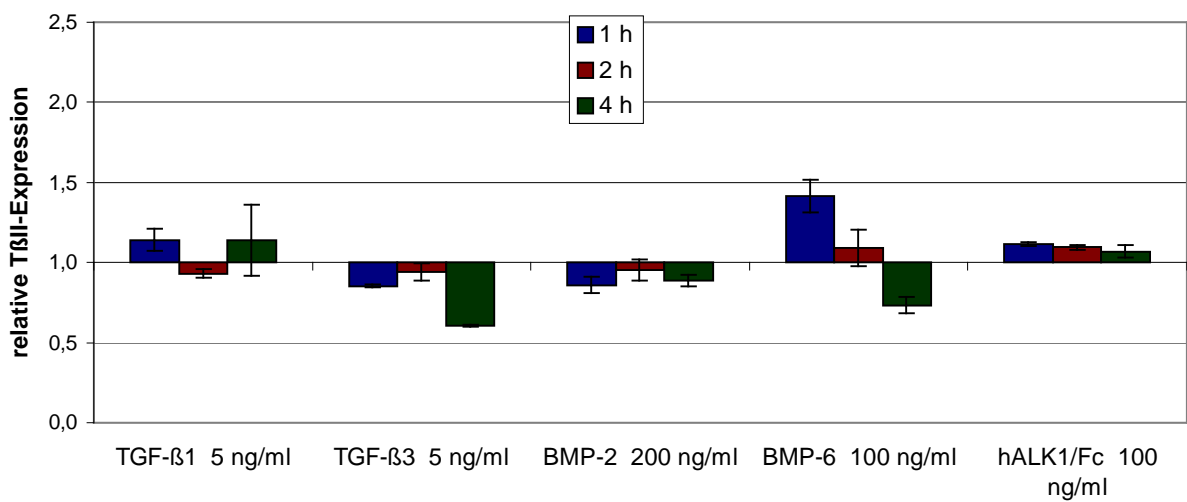
d)



e)



f)



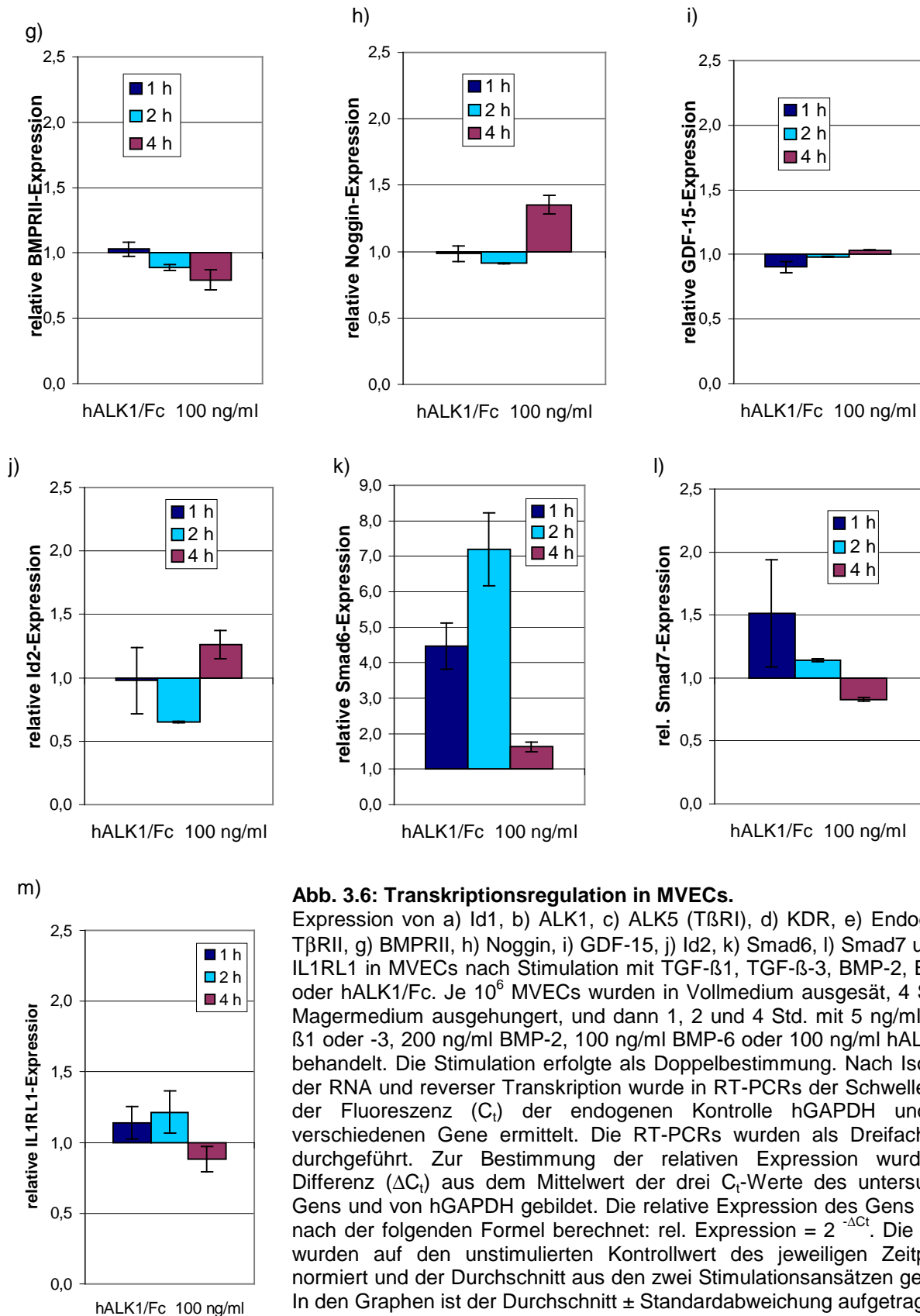


Abb. 3.6: Transkriptionsregulation in MVECs.

Expression von a) Id1, b) ALK1, c) ALK5 (T β RI), d) KDR, e) Endoglin, f) T β RII, g) BMPRII, h) Noggin, i) GDF-15, j) Id2, k) Smad6, l) Smad7 und m) IL1RL1 in MVECs nach Stimulation mit TGF- β 1, TGF- β -3, BMP-2, BMP-6 oder hALK1/Fc. Je 10^6 MVECs wurden in Vollmedium ausgesät, 4 Std. in Magermedium ausgehungert, und dann 1, 2 und 4 Std. mit 5 ng/ml TGF- β 1 oder -3, 200 ng/ml BMP-2, 100 ng/ml BMP-6 oder 100 ng/ml hALK1/Fc behandelt. Die Stimulation erfolgte als Doppelbestimmung. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde in RT-PCRs der Schwellenwert der Fluoreszenz (C_t) der endogenen Kontrolle hGAPDH und der verschiedenen Gene ermittelt. Die RT-PCRs wurden als Dreifachwerte durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Expression wurde die Differenz (ΔC_t) aus dem Mittelwert der drei C_t -Werte des untersuchten Gens und von hGAPDH gebildet. Die relative Expression des Gens wurde nach der folgenden Formel berechnet: rel. Expression = $2^{-\Delta C_t}$. Die Werte wurden auf den unstimulierten Kontrollwert des jeweiligen Zeitpunkts normiert und der Durchschnitt aus den zwei Stimulationsansätzen gebildet. In den Graphen ist der Durchschnitt \pm Standardabweichung aufgetragen.

3.2.2.3. Transkriptionsregulation des Id1-Promotors

Aktiviertes ALK1 stimuliert die Expression von Id1, indem es die Signaltransduktionsmoleküle Smad1 und Smad5 aktiviert, die durch Interaktion mit dem Id1-Promotor dessen Expression auslösen (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002; Ota, Fujii et al. 2002). Daher wurde anhand eines Luziferase-Reportergen-Assay untersucht, welche Liganden, Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle der TGF- β -Superfamilie zusätzlich zu ALK1 einen stimulierenden Einfluss auf den humanen Id1-Promotor haben. So kann darauf zurückgeschlossen werden, welche dieser Liganden und Rezeptoren als Interaktionspartner für ALK1 in Frage kommen. Außerdem wurde die Aktivierung des Endoglin-Promotors untersucht, da dieser ebenfalls ein Zielgen von ALK1 ist (Ota, Fujii et al. 2002).

Diese Reporterstudien mussten in HepG2-Zellen durchgeführt werden, da ECs sich nicht transfizieren ließen bzw. nach der Transfektion nicht mehr weiter proliferierten (Daten nicht gezeigt). Man kann aber davon ausgehen, dass die ALK1-Signalübertragung trotz fehlender endogener ALK1-Expression (siehe Abb. 3.2 a) auch in HepG2 funktioniert, da der BMP-Signalweg, der ebenfalls über Smad1/5 vermittelt wird, aktivierbar ist (siehe Abb. 3.12). Außerdem können so eventuelle Effekte von endogenem ALK1 ausgeschlossen werden.

Plasmide für den Luziferase-Reportergen-Assay

Um die Aktivierung eines Promotors im Luziferase-Reportergen-Assay zu untersuchen, muss der zu untersuchende Promotor in einem Reportergenplasmid der Luziferase vorangestellt sein, so dass bei Aktivierung des Promotors die Transkription der Luziferase induziert wird. Zur Untersuchung der Id1-Aktivierung wurde der Vektor pGL3-Basic-Id1_Prom verwendet, der den Id1-Promotor von Position -1370 bis +86 (Lopez-Rovira, Chaux et al. 2002) aus genomischer DNA von A375 im Luziferase-Reportergen-Vektor pGL3-Basic enthält. Der Vektor pXP2-Endo_Prom besteht aus dem Luziferase-Reportergen-Vektor pXP2 und dem humanen Endoglin-Promotor von Position -397 bis +341 ebenfalls aus genomischer DNA von A375. Um den Einfluss verschiedener Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren zu analysieren, mussten die cDNAs dafür in Expressionsplasmiden vorliegen. Dazu wurden verschiedene Konstrukte des Expressionsvektors pcDNA3.1/myc-HIS verwendet, welche die Sequenzen von ALK1, ALK5, Endoglin, T β RII, Smad1, Smad4, Smad5 bzw. Smad7 aus MVEC-cDNA oder aus käuflich erworbenen Plasmiden enthielten. Die Plasmide pGL3-Basic-Id1_Prom, pXP2-Endo_Prom, pcDNA3.1-Endoglin, pcDNA3.1-T β RII, pcDNA3.1-ALK1, pcDNA3.1-ALK5, pcDNA3.1-Smad1, pcDNA3.1-Smad4, pcDNA3.1-Smad5 und pcDNA3.1-Smad7 wurden von Gregor Fachinger, Karina Schuck, Andrea Sturz und Beatrice Kuhnert (Schering AG, Berlin) erhalten. Die Plasmide pCMV-SPORT6-Smad3, pCMV-SPORT6-BMPRII und pSport1_Sfi-BMP9 konnten als Expressionsvektoren direkt eingesetzt werden.

Untersuchung der exogenen ALK1-Expression

Bevor der Einfluss von ALK1 auf den Id1-Promotor untersucht wurde, musste sichergestellt werden, dass das ALK1-Protein exprimiert wird. Dazu wurden HepG2-Zellen genauso behandelt wie im Luziferase-Reportergen-Assay, und nach 30 Std. wurde die ALK1-Expression mittels Western-Blot analysiert (Abb. 3.7). Mit steigenden Mengen des Plasmids pcDNA3.1-ALK1 steigt auch die Menge an detektiertem ALK1-Protein. ALK1 liegt wie in 3.2.1.1. gezeigt in einer größeren und einer kleineren Form vor, wobei die größere Form wahrscheinlich auf eine Phosphorylierung zurückschließen lässt.

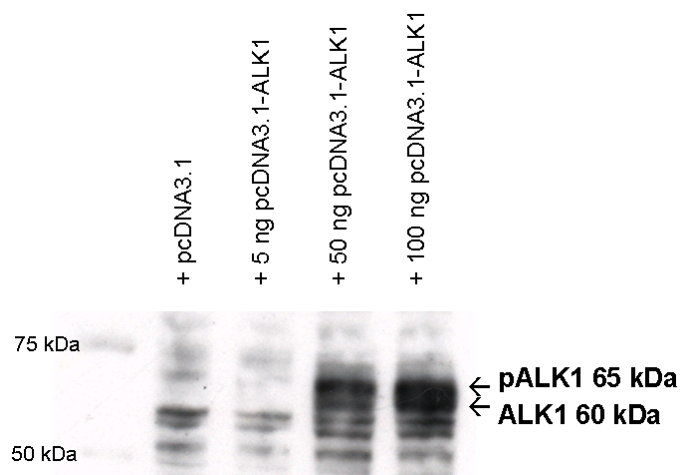


Abb. 3.7: Expression von exogenem hALK1 in HepG2.

HepG2-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an Leervektor bzw. ALK1-Expressionsplasmid pro 7000 Zellen transient transfiziert. Nach 6 Stunden wurde das Medium in Magermedium ausgetauscht und 30 Stunden nach der Transfektion wurden Duschl-Lysate hergestellt. Diese wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und nach Western Blotting mittels α -hALK1 (polyklonaler goat-Antikörper) und ECL detektiert.

Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1

In HepG2 wird der Id1-Promotor sowohl durch ALK1 wt als auch durch konstitutiv aktives ALK1-Q/D stimuliert (Abb 3.8 a). Dies zeigt, dass exogenes ALK1 in den HepG2 nicht nur exprimiert wird, sondern auch funktionsfähig ist. Dominant negatives ALK1-K/R kann den Id1-Promotor nicht aktivieren. Die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Stimulation wird durch Zugabe von aus CHOs aufgereinigtem hALK1.ec (extrazellulären Domäne von humanem ALK1, siehe 3.3.1) gehemmt (Abb. 3.8. b). Die Zugabe von hALK1/Fc (extrazelluläre Domäne von humanem ALK1 mit Fc-tag) hemmt die Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1 im Vergleich zur Kontrolle mit IgG1 Fc nur minimal, eine Hemmung durch mALK1/Fc (extrazellulären Domäne von murinem ALK1 mit Fc-tag) ist sogar nur bei 5 ng ALK1-Plasmid zu beobachten. Da die Stimulation durch ALK1 bei 10 ng des Plasmids ein Plateau erreicht, wurden für die folgenden Versuche maximal 10 ng pcDNA3.1-ALK1 eingesetzt.

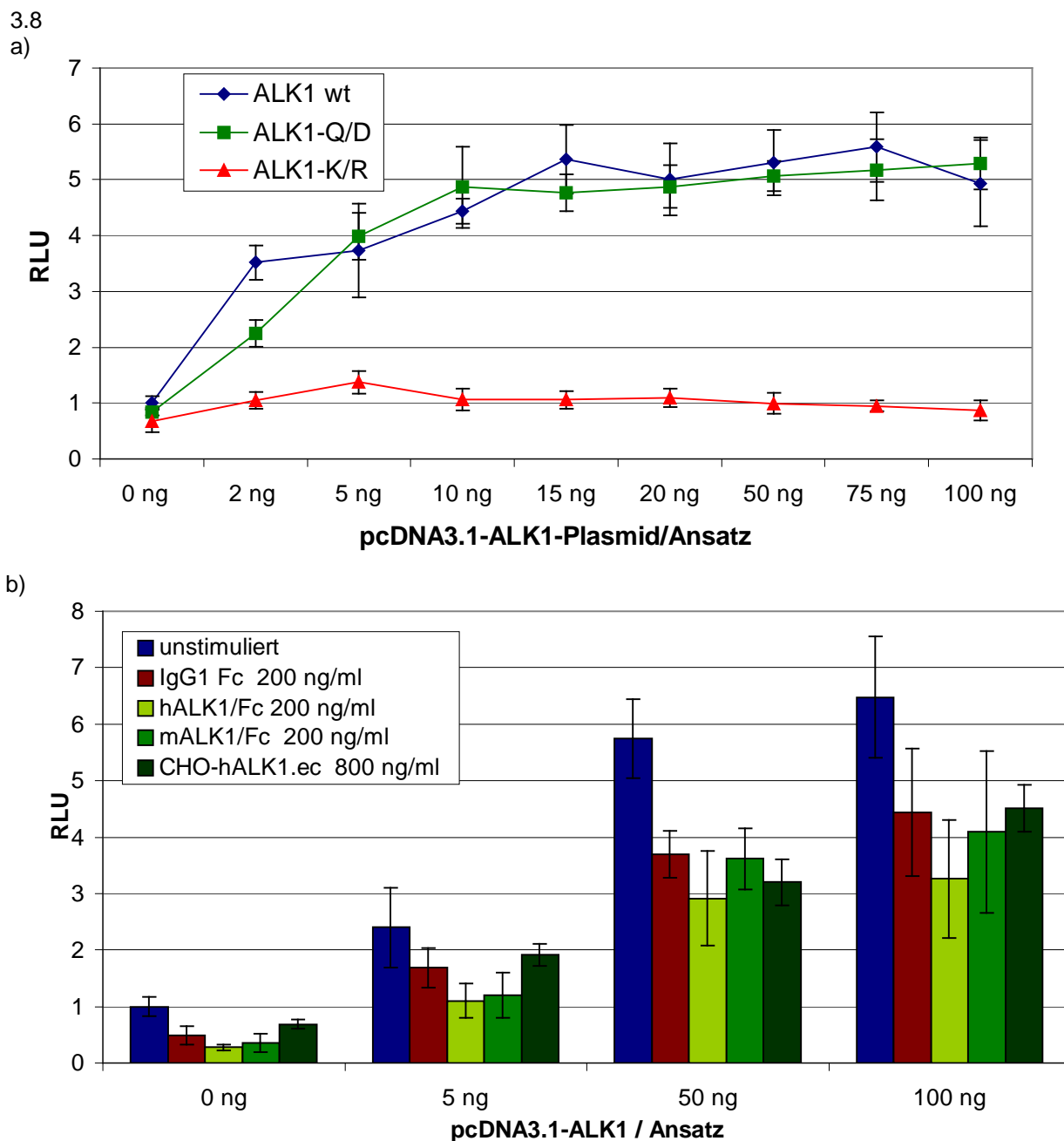


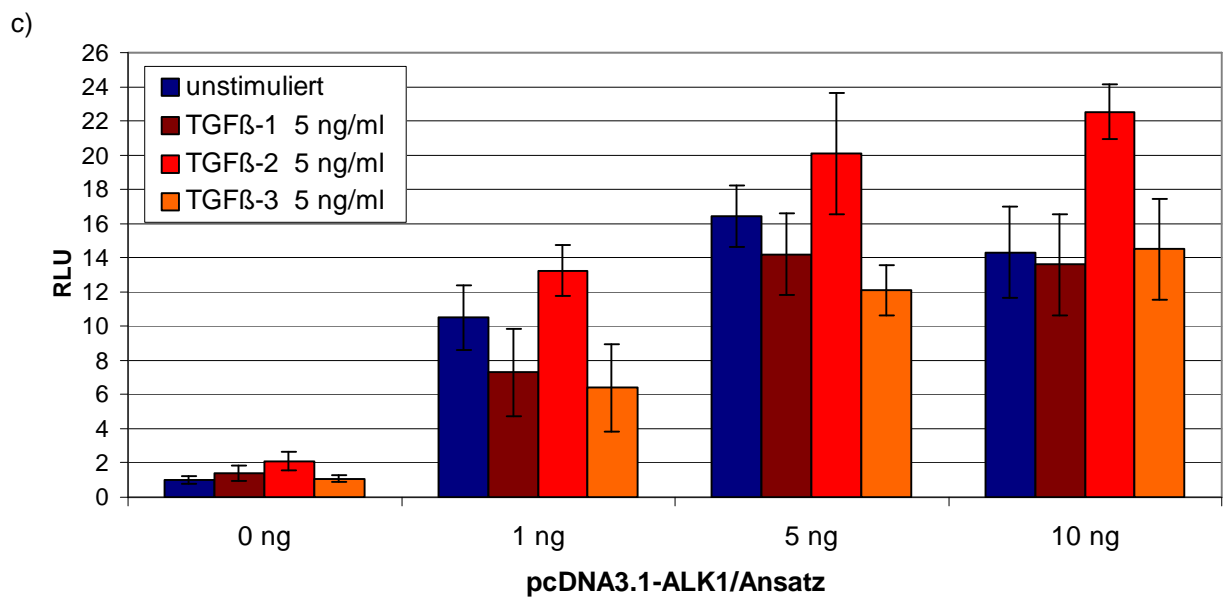
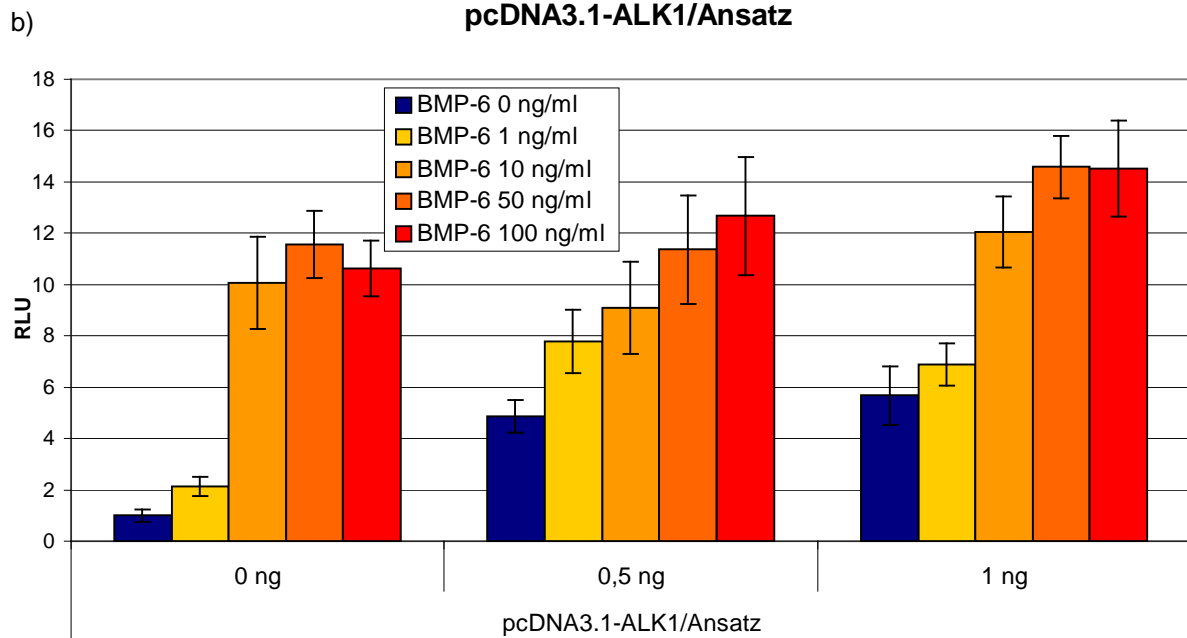
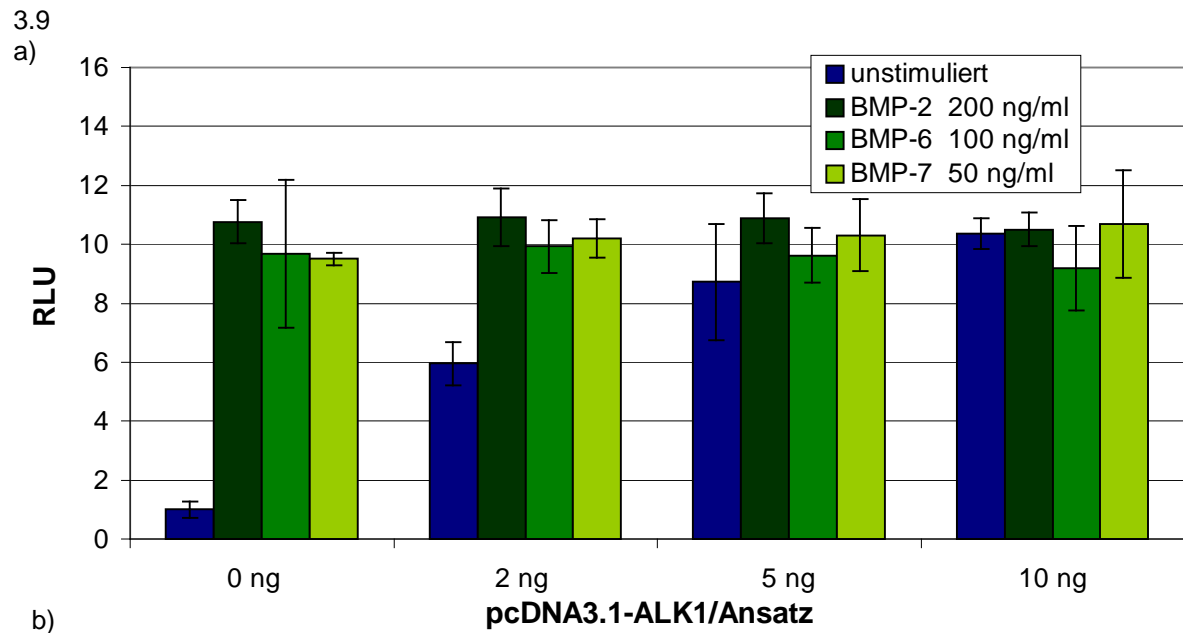
Abb. 3.8: Einfluss von ALK1, ALK1-Q/D, ALK1-K/R und der extrazelluläre Domäne von ALK1 auf die Aktivität des Id1-Promotors.

Je 7000 HepG2-Zellen wurden mit 100 ng des Reporter-gen-Plasmids pGL3-Basic-Id1_Prom und den angegebenen Mengen an a) pcDNA3.1-ALK1, -ALK1-Q/D und -ALK1-K/R bzw. in b) pcDNA3.1-ALK1 transient transfiziert. Zusätzlich wurde mit der entsprechenden Menge des Leervektors pcDNA3.1/myc-HIS A kotransfiziert, so dass jeder Ansatz insgesamt 200 ng Plasmid-DNA enthielt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control, das das Luziferase-Reporter-gen unter Kontrolle des intrinsisch aktiven SV40 Promoter enthält. Nach 6 Stunden wurde in a) das Medium gegen Magermedium ausgetauscht und in b) die angegebenen Konzentrationen an IgG1 Fc, hALK1/Fc, mALK1/Fc und CHO-hALK1.ec in Magermedium zugegeben. 30 Stunden nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats im Luminometer gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle mit 100 ng Leervektor ohne ALK1-Plasmid normiert und in RLU angegeben. Die Graphen zeigen die Mittelwerte von 6-fach-Bestimmungen \pm Standardabweichung und sind repräsentativ für drei identische Experimente. RLU = relative Luziferase Units

Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1 und verschiedene Liganden der TGF- β -Familie

Durch BMP-2, -6 und -7 wird Id1 ebenfalls angeregt, jedoch wird diese Stimulation nicht durch ALK1 verstärkt (Abb 3.9 a). Auch bei 15-100 ng des ALK1-Plasmids wird der Id1-Promotor nicht mehr zusätzlich durch die BMPs stimuliert (ohne Abb.). Nur bei sehr geringen Konzentrationen der BMPs intensiviert eine Transfektion mit kleinen Mengen von ALK1 die Id1-Promotor-Aktivität noch zusätzlich (Abb 3.9 b am Beispiel von BMP-6). TGF- β 1 und -3 allein haben keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität des Id1-Promotors (Abb. 3.9 c). Die Id1-Aktivierung durch ALK1 wird von TGF- β 1 und -3 aber gehemmt, mit steigender ALK1-Expression nimmt diese Hemmung ab. TGF- β 2 allein hat einen leicht stimulierenden Einfluss auf den Id1-Promotor, und vergrößert die Aktivierung durch ALK1. Die Auswirkungen der TGF- β s wurden im Bereich von 0,1 bis 10 ng/ml getestet, die in Abb. 3.9 c gezeigten Effekte steigen konzentrationsabhängig und erreichen ihr Maximum bei ca. 5 mg/ml (ohne Abb.). Konstitutiv aktives ALK1-Q/D verhält sich genauso wie ALK1 (ohne Abb.), die BMPs haben keinen zusätzlichen Einfluss, während TGF- β 1 und -3 die Aktivierung hemmen. Dominant negatives ALK1-K/R aktiviert wie oben beschrieben den Id1-Promotor nicht, beeinflusst aber auch die Stimulierung durch die BMPs nicht (ohne Abb.). Id1 wird durch GDF-15 kaum stimuliert, aber die Aktivierung wird mit steigenden Konzentrationen von ALK1 verstärkt (Abb. 3.9 d). Aktivin A allein erhöht die Id1-Promotor-Aktivität leicht, Aktivin AB deutlich und Aktivin B sehr stark. Zusammen mit ALK1 intensivieren sie die Id1-Transaktivierung. Auch GDF-15, Aktivin A, B und AB wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet, die in Abb. 3.9 d gezeigten Effekte steigen konzentrationsabhängig (ohne Abb.). BMP-9 musste als Expressionsplasmid eingesetzt werden, da kein aufgereinigtes oder rekombinantes BMP-9 erhältlich war. Auch BMP-9 steigert die Id1-Promotor-Aktivität, mit steigender Menge immer deutlicher (Abb. 3.10). Aber lediglich bei 1 ng des BMP-9-Plasmids verstärkt die Transfektion mit ALK1 die Aktivierung von Id1, bei größeren Mengen an BMP-9 hat ALK1 wie auch bei den anderen BMPs keinen zusätzlichen stimulierenden Einfluss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TGF- β 2, GDF-15 und Aktivin A, B und AB die ALK1-vermittelte Aktivierung des Id1-Promotors steigern, während die BMPs keinen Einfluss haben und TGF- β 1 und -3 diese sogar unterdrücken.



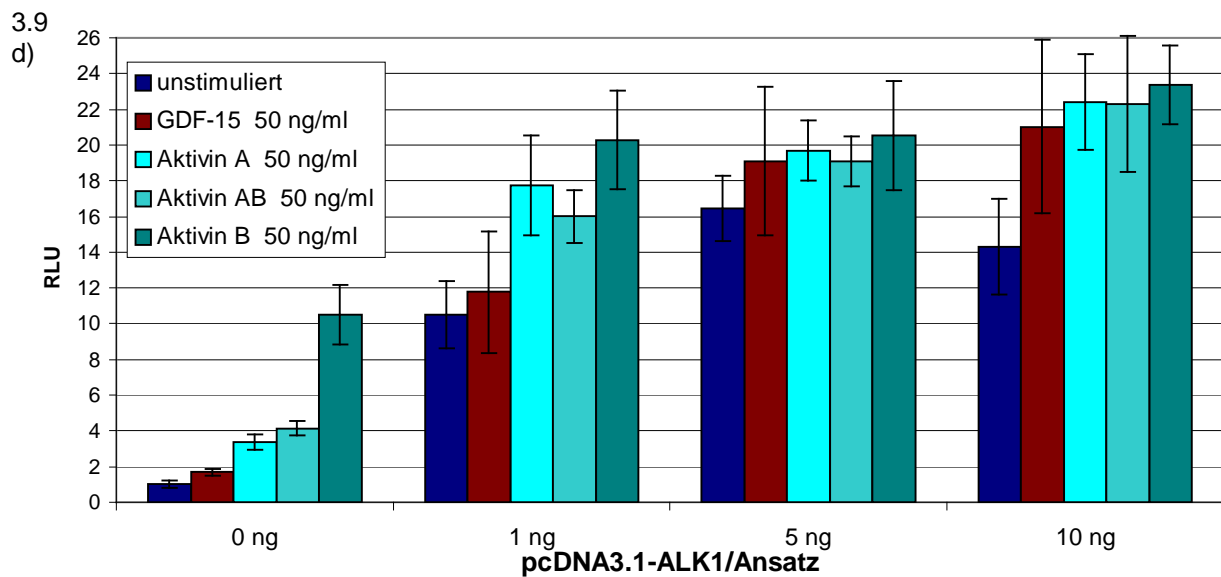


Abb. 3.9: Einfluss von ALK1 und BMPs, TGF- β s, GDF-15 oder Aktivinen auf die Aktivität des Id1-Promotors.

Je 7000 HepG2-Zellen wurden mit 100 ng des Reporter-Gen-Plasmids pGL3-Basic-Id1_Prom und den angegebenen Mengen an pcDNA3.1-ALK1 transient transfiziert. Zusätzlich wurde mit der entsprechenden Menge des Leervektors pcDNA3.1/*myc*-HIS A kotransfiziert, so dass jeder Ansatz insgesamt 110 ng Plasmid-DNA enthielt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control. Nach 6 Stunden wurden die angegebenen Konzentrationen an a) BMP-2, BMP-6 und BMP-7, b) BMP-6, c) TGF- β 1, TGF- β 2, und TGF- β 3, d) GDF-15, Aktivin A, Aktivin AB und Aktivin B in Magermedium zugegeben. 30 Stunden nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats im Luminometer gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle mit 10 ng Leervektor ohne ALK1-Plasmid normiert und in RLU angegeben. Die Graphen zeigen die Mittelwerte von 6-fach-Bestimmungen \pm Standardabweichung und sind repräsentativ für jeweils drei identische Experimente. RLU = relative Luciferase Units

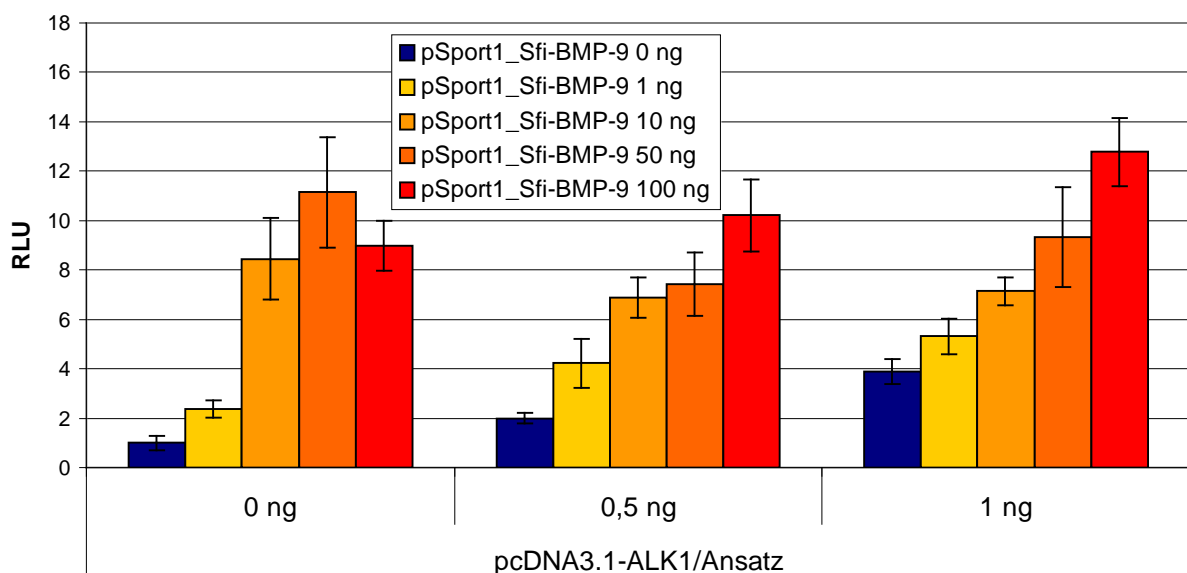


Abb. 3.10: Einfluss von ALK1 und BMP-9 auf die Aktivität des Id1-Promotors.

Je 7000 HepG2-Zellen wurden mit 100 ng des Reporter-Gen-Plasmids pGL3-Basic-Id1_Prom und den angegebenen Mengen an pcDNA3.1-ALK1 und pSport_Sfi-BMP-9 transient transfiziert. Zusätzlich wurde mit der entsprechenden Menge des Leervektors pcDNA3.1/*myc*-HIS A kotransfiziert, so dass jeder Ansatz insgesamt 201 ng Plasmid-DNA enthielt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control. Nach 6 Stunden wurde das Medium gegen

Magermedium ausgetauscht. 30 Stunden nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats im Luminometer gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle mit 101 ng Leervektor ohne Expressions-Plasmide normiert und in RLU angegeben. Der Graph zeigt die Mittelwerte von 6-fach-Bestimmungen \pm Standardabweichung und ist repräsentativ für zwei identische Experimente. RLU = relative Luziferase Units

Endoglin-Promotor-Aktivierung durch ALK5 und TGF- β

Im Gegensatz zum Id1-Promotor wird der Endoglin-Promotor in HepG2 durch ALK1 nicht stimuliert, sondern durch ALK1 wt und durch ALK1-K/R sogar noch inhibiert (Abb 3.11 a). ALK5 verstärkt die Endoglin-Promotor Aktivität leicht. TGF- β 1 aktiviert den Endoglin-Promotor mit steigenden Konzentrationen immer deutlicher, während BMP-6 keinen Einfluss hat (Abb. 3.11 b).

3.11

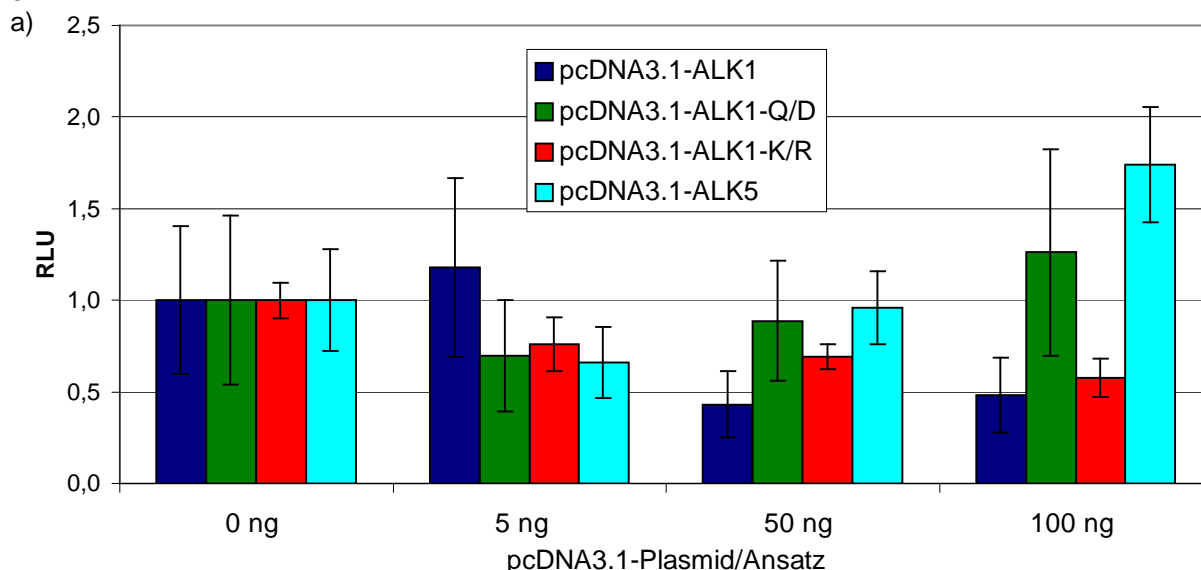
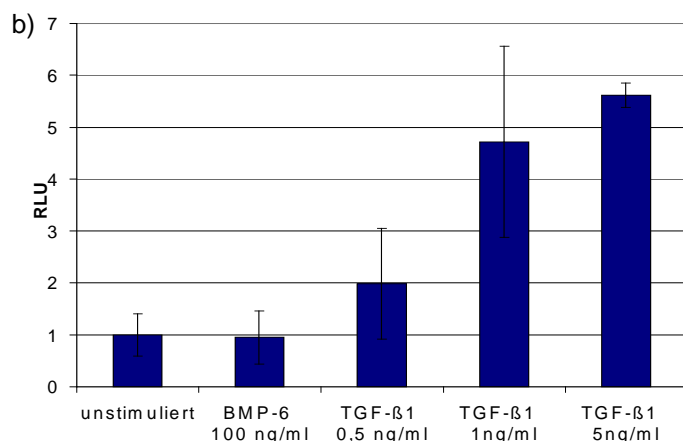


Abb. 3.11: Einfluss von ALK1, ALK1-Q/D, ALK1-K/R, ALK5, TGF- β s oder BMP-6 auf die Aktivität des Endoglin-Promotors.

Je 7000 HepG2-Zellen wurden mit 100 ng des Reporter-Gen-Plasmids pXP2-Endo_Prom und in a) den angegebenen Mengen an pcDNA3.1-ALK1, pcDNA3.1-ALK1-Q/D, pcDNA3.1-ALK1-K/R bzw. pcDNA3.1-ALK5 transient transfiziert. Zusätzlich wurde mit der entsprechenden Menge des Leervektors pcDNA3.1/myc-HIS A kotransfiziert, so dass jeder Ansatz insgesamt 100 ng Plasmid-DNA enthielt. Zur



Überprüfung der Transfektionseffizienz diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control. Nach 6 Stunden wurden in b) die angegebenen Konzentrationen an TGF- β 1 und BMP-6 in Magermedium zugegeben und in a) das Medium gegen Magermedium ausgetauscht. 30 Stunden nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats im Luminometer gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle mit 100 ng Leervektor ohne ALK1-Plasmid normiert und in RLU angegeben. Die Graphen zeigen die Mittelwerte von 6-fach-Bestimmungen \pm Standardabweichung und sind repräsentativ für jeweils zwei identische Experimente. RLU = relative Luziferase Units

Id1-Promotor-Aktivierung durch BMPRII und BMPs

Die *Id1*-Promotor-Aktivität wird durch BMPRII, den Typ II-Rezeptor für BMPs, ebenfalls induziert, aber erst ab einer Plasmidmenge von 10 ng pro Ansatz, und noch deutlicher durch 100 ng (Abb. 3.12 a). Wie bereits in Abb. 3.9 a) gezeigt, stimuliert BMP-7 den *Id1*-Promotor; diese Aktivierung wird durch Transfektion mit 100 ng des BMPRII-Expressionsplasmids noch verstärkt. Auch die BMP-6-Aktivierung des Promotors ist bei 100 ng BMPRII leicht gesteigert, während diese Verstärkung durch den BMPRII bei BMP-2 kaum zu sehen ist bzw. bei 1 und 10 ng sogar eine schwache Inhibition detektiert wird. Die BMP-9-vermittelte Aktivierung des *Id1*-Promotors kann lediglich bei 1 ng des BMP-9-Plasmids deutlich durch eine zusätzliche Transfektion mit dem BMPRII erhöht werden (Abb. 3.12 b). Bei 10 ng des Plasmids fällt diese zusätzliche Stimulation bereits sehr gering aus, und bei noch größeren Mengen an BMP-9 hat der BMPRII keinen verstärkenden Effekt. Umgekehrt zeigt sich aber, dass die *Id1*-Aktivierung durch 100 ng des BMPRII-Plasmids zusätzlich durch BMP-2, -6, -7 und -9 verstärkt wird.

3.12

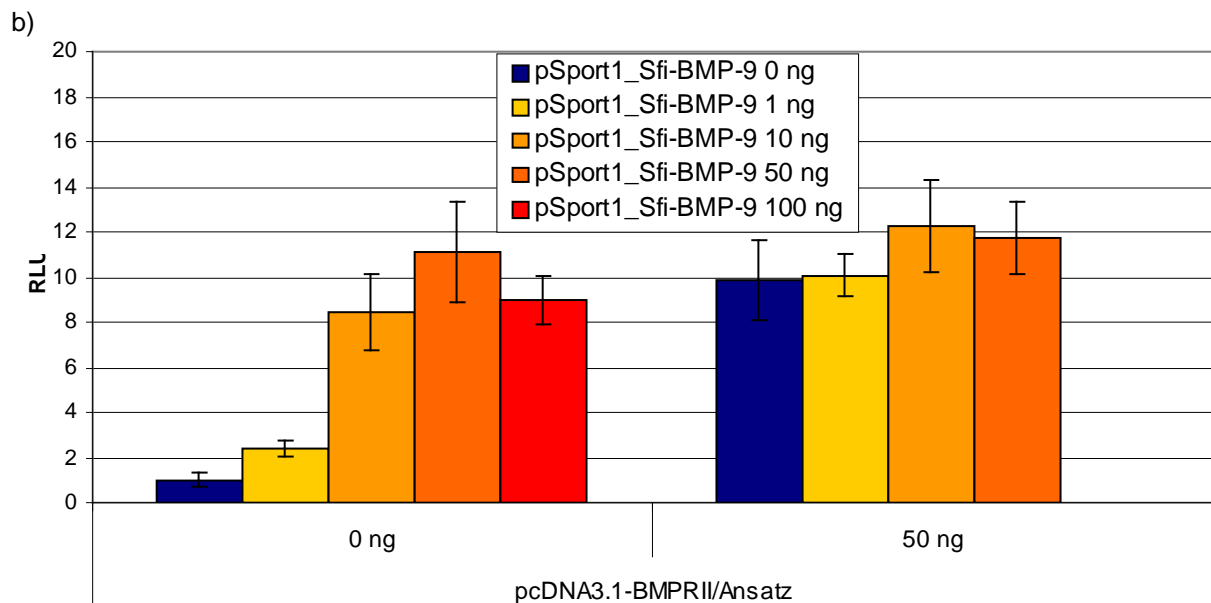
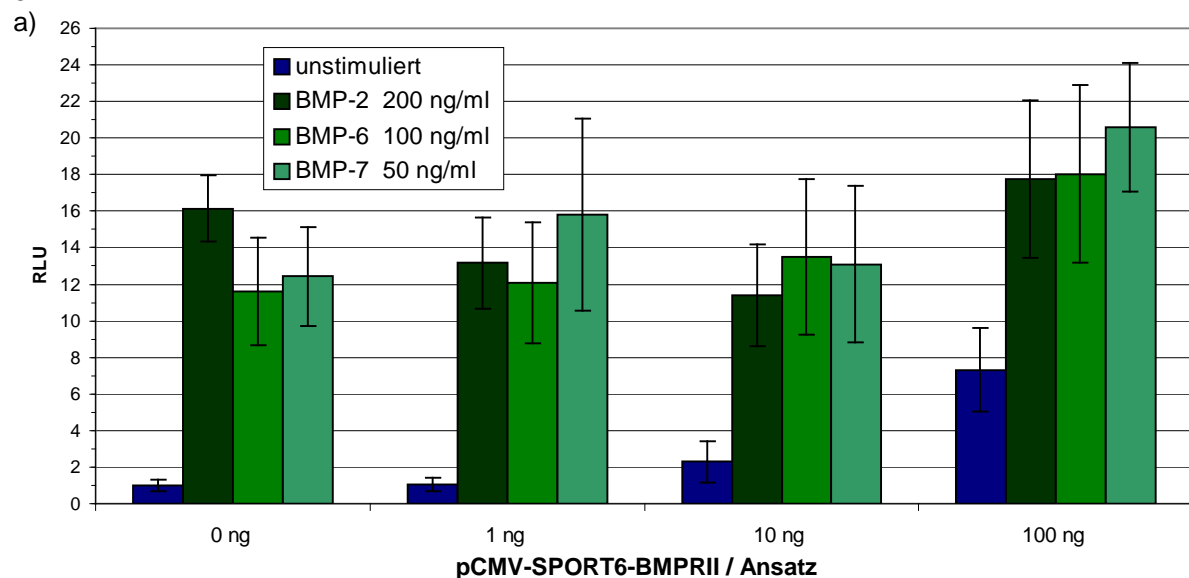


Abb. 3.12: Einfluss von BMPRII und BMPs auf die Aktivität des Id1-Promotors.

Je 7000 HepG2-Zellen wurden mit 100 ng des Reporter-Gen-Plasmids pGL3-Basic-Id1_Prom, den angegebenen Mengen an pCMV-SPORT6-BMPRII und in b) an pSport1_Sfi-BMP-9 transient transfiziert. Zusätzlich wurde mit der entsprechenden Menge des Leervektors pcDNA3.1/myc-HIS A kotransfiziert, so dass jeder Ansatz insgesamt 200 ng (a) bzw. 250 ng (b) Plasmid-DNA enthielt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control. Nach 6 Stunden wurden in a) die angegebenen Konzentrationen an BMP-2, BMP-6 und BMP-7 in Magermedium zugegeben und in b) das Medium gegen Magermedium ausgetauscht. 30 Stunden nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats im Luminometer gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle nur mit Leervektor ohne Expressions-Plasmide normiert und in RLU angegeben. Die Graphen zeigen die Mittelwerte von 6-fach-Bestimmungen \pm Standardabweichung und sind repräsentativ für jeweils zwei identische Experimente. RLU = relative Luziferase Units

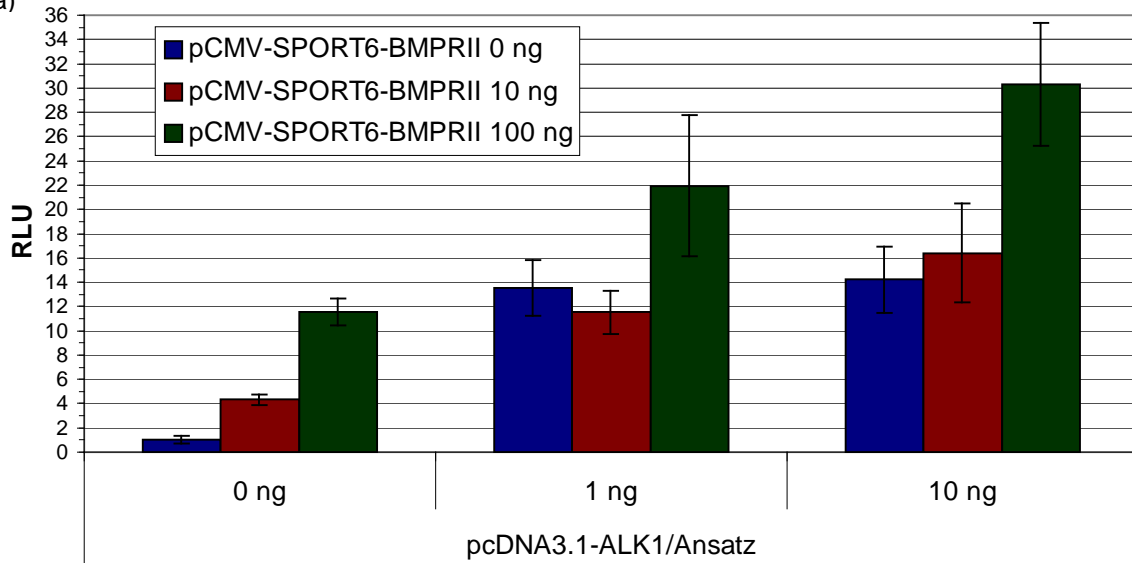
Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1 und verschiedene Rezeptoren der TGF- β -Familie

Die Aktivierung des Id1-Promotors durch ALK1 und den Typ II-Rezeptor BMPRII verhält sich additiv (Abb. 3.13 a). Der Korezeptor Endoglin allein hat, wenn überhaupt, nur eine schwach stimulierende Wirkung auf den Id1-Promotor (Abb. 3.13 b). Die Id1-Promotor-Stimulation durch ALK1 jedoch wird durch Kotransfektion mit Endoglin vervielfacht, zumindest bei 1 ng ALK1-Plasmid pro Ansatz. Daher wurde in allen weiteren Experimenten mit ALK1 und Endoglin maximal 2 ng pcDNA3.1-ALK1 verwendet. Mit dem TGF- β -Typ I-Rezeptor ALK5 zeigt Endoglin diese Verstärkung der Id1-Promotor-Stimulation nicht (ohne Abb.). Auch ALK5 allein verdoppelt die Aktivität des Id1-Promotors lediglich (Abb. 3.13 c). Wird aber ALK5 zu ALK1 kotransfiziert, wird die Stimulation auch wieder multipliziert, zumindest durch 100 ng pcDNA3.1-ALK5. Eine Kotransfektion mit dem Typ II Rezeptor T β RII zu ALK1 senkt dessen Id1-Promotor-Aktivierung auf die Hälfte bei 100 ng pc-DNA3.1-T β RII (Abb. 3.13 d). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Stimulation (bei 1 ng pcDNA3.1-ALK1) durch Endoglin um den Faktor 3,3, durch ALK5 um den Faktor 1,7 und durch BMPRII um den Faktor 1,6 verstärkt wird (für 100 ng des jeweiligen Plasmids). Dabei ist auffällig, dass aber der BMPRII allein die größte Wirkung auf den Id1-Promotor hat. Durch den T β RII wird die Id1-Promotor-Stimulation gehemmt.

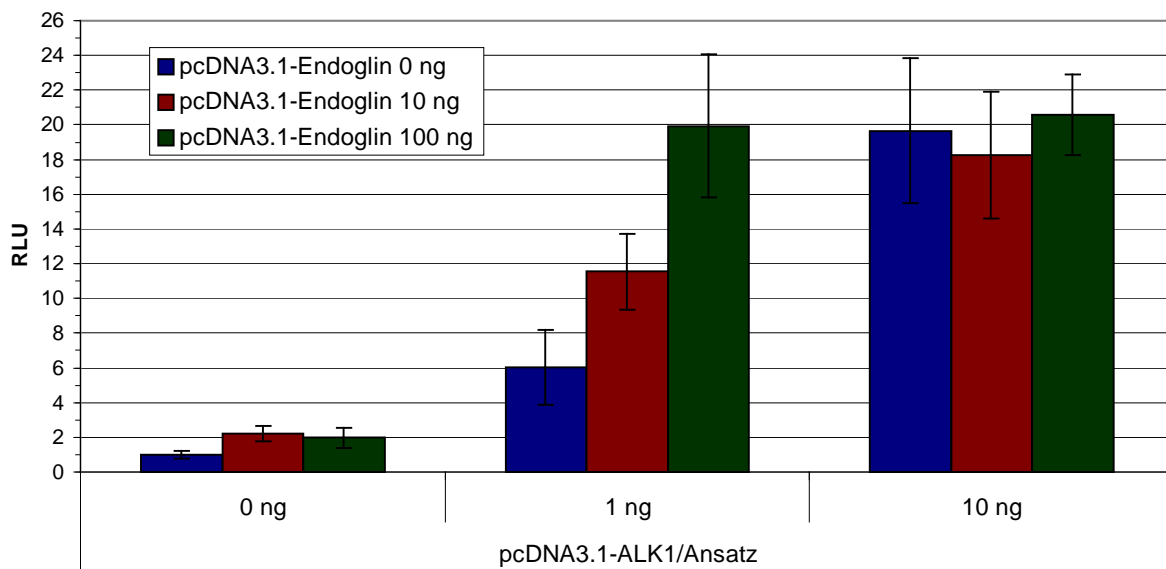
Eine Transfektion mit 10 und 100 ng der anderen Plasmide pcDNA3.1-Smad1, pCMV-SPORT6-Smad3, pcDNA3.1-Smad4, pcDNA3.1-Smad5 und pcDNA3.1-Smad7 haben keinen signifikanten Effekt auf Id1, nur Smad1 und 5 hemmen, wenn in großen Mengen transfiziert (ohne Abb.).

3.13

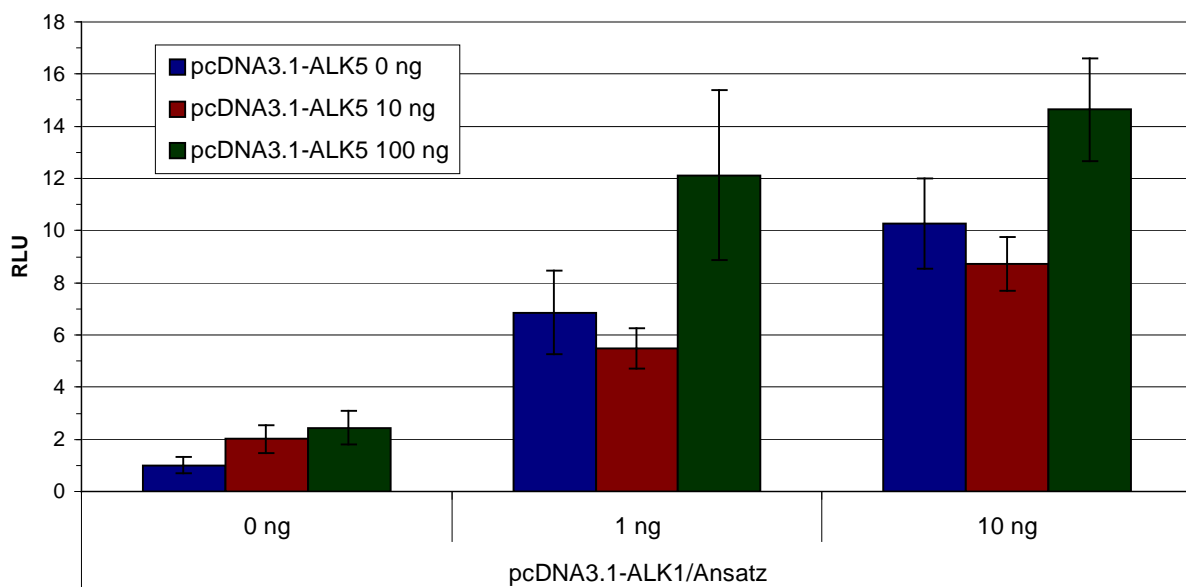
a)



b)



c)



3.13

d)

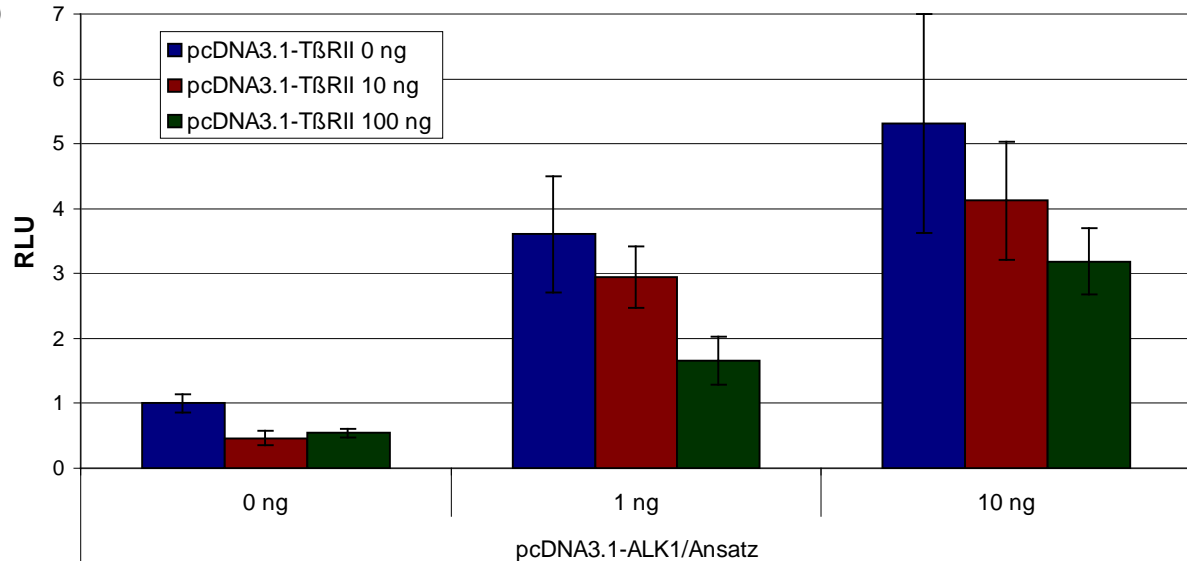


Abb. 3.13: Einfluss von ALK1 und BMPRII, Endoglin, ALK5 oder TβRII auf die Aktivität des Id1-Promotors.

Je 7000 HepG2-Zellen wurden mit 100 ng des Reporter-Gen-Plasmids pGL3-Basic-Id1_Prom, den angegebenen Mengen an pcDNA3.1-ALK1 und a) pCMV-Sport6-BMPRII, b) pcDNA3.1-Endoglin, c) pcDNA3.1-ALK5 oder d) pcDNA3.1-TβRII transient transfiziert. Zusätzlich wurde mit der entsprechenden Menge des Leervektors pcDNA3.1/myc-HIS A kotransfiziert, so dass jeder Ansatz insgesamt 210 ng Plasmid-DNA enthielt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control. Nach 6 Stunden wurde das Medium gegen Magermedium ausgetauscht. 30 Stunden nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats im Luminometer gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle mit 110 ng Leervektor ohne Expressions-Plasmide normiert und in RLU angegeben. Die Graphen zeigen die Mittelwerte von 6-fach-Bestimmungen ± Standardabweichung und sind repräsentativ für jeweils drei identische Experimente. RLU = relative Luziferase Units

Einfluss der Hemmung verschiedener Rezeptoren der TGF-β-Familie auf die kooperative Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1 und Endoglin

Wie bereits in 3.2.1.2. und weiter oben in diesem Kapitel gezeigt, hemmt die extrazelluläre Domäne von ALK1 die ALK1-Signaltransduktion. Das gleiche Prinzip sollte für die extrazellulären Domänen anderer Rezeptoren gelten. Daher wurde in weiteren Versuchen der Einfluss verschiedener extrazellulärer Rezeptor-Domänen (mit Fc-tag) aus der TGF-β-Familie auf den Id1-Promotor untersucht (Abb. 3.14). Die kooperative Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1 und Endoglin wird durch ALK1/Fc auf fast die Hälfte gesenkt. Auch BMPRII/Fc und ActRIIB/Fc hemmen die Stimulation, um ungefähr 40% bzw. 35%. Die extrazelluläre Domäne des ActRIIA hat fast keinen inhibierenden Einfluss, und TβRII/Fc zeigt gar keinen Effekt auf die Aktivierung durch ALK1 und Endoglin.

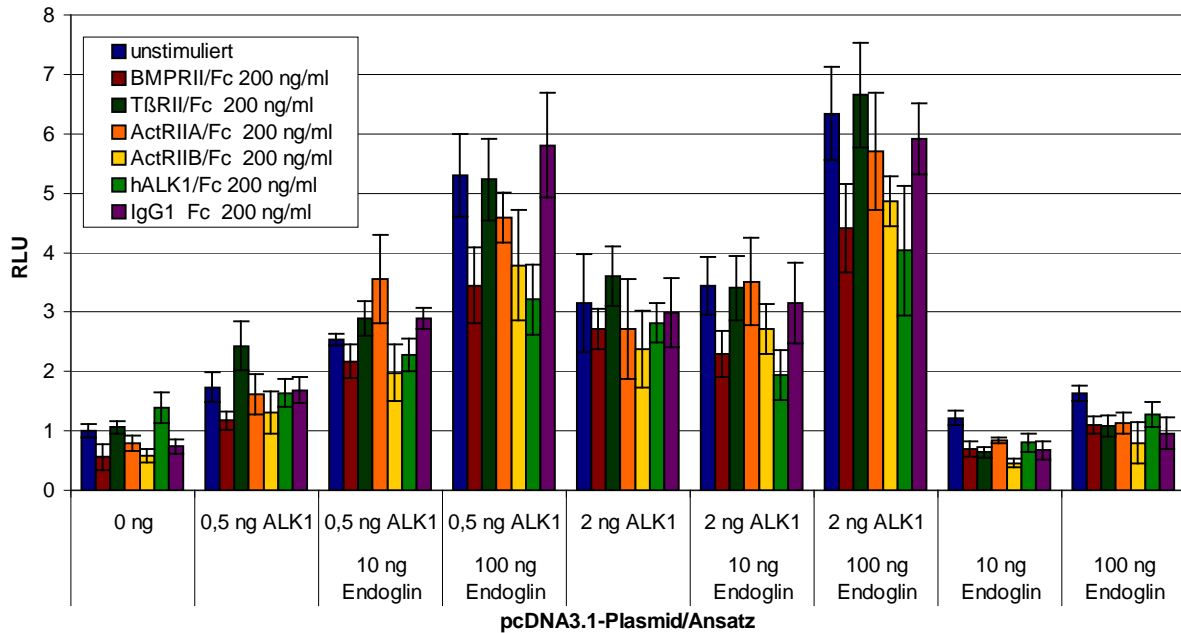


Abb. 3.14: Einfluss der extrazellulären Domänen von BMPRII, TβRII, ActRIIA, ActRIIB oder ALK1 auf die Aktivierung des Id1-Promotors durch ALK1 und Endoglin.

Je 7000 HepG2-Zellen wurden mit 100 ng des Reporter-gen-Plasmids pGL3-Basic-Id1_Prom und den angegebenen Mengen an pcDNA3.1-ALK1 und pcDNA3.1-Endoglin transient transfiziert. Zusätzlich wurde mit der entsprechenden Menge des Leervektors pcDNA3.1/*myc*-HIS A kotransfiziert, so dass jeder Ansatz insgesamt 202 ng Plasmid-DNA enthielt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control. Nach 6 Stunden wurden die angegebenen Mengen an BMPRII/Fc, TβRII/Fc, ActRIIA/Fc, ActRIIB/Fc, ALK1/Fc und IgG1 Fc in Magermedium zugegeben. 30 Stunden nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats im Luminometer gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle mit 102 ng Leervektor ohne Expressions-Plasmide normiert und in RLU angegeben. Der Graph zeigt die Mittelwerte von 6-fach-Bestimmungen ± Standardabweichung und ist repräsentativ für drei identische Experimente. RLU = relative Luziferase Units

Ein anti-Endoglin-Antikörper zeigt ebenfalls eine bis zu 35%-ige Hemmung der ALK1/Endoglin-vermittelten Stimulation des Id1-Promotors (Abb. 3.15).

3.15

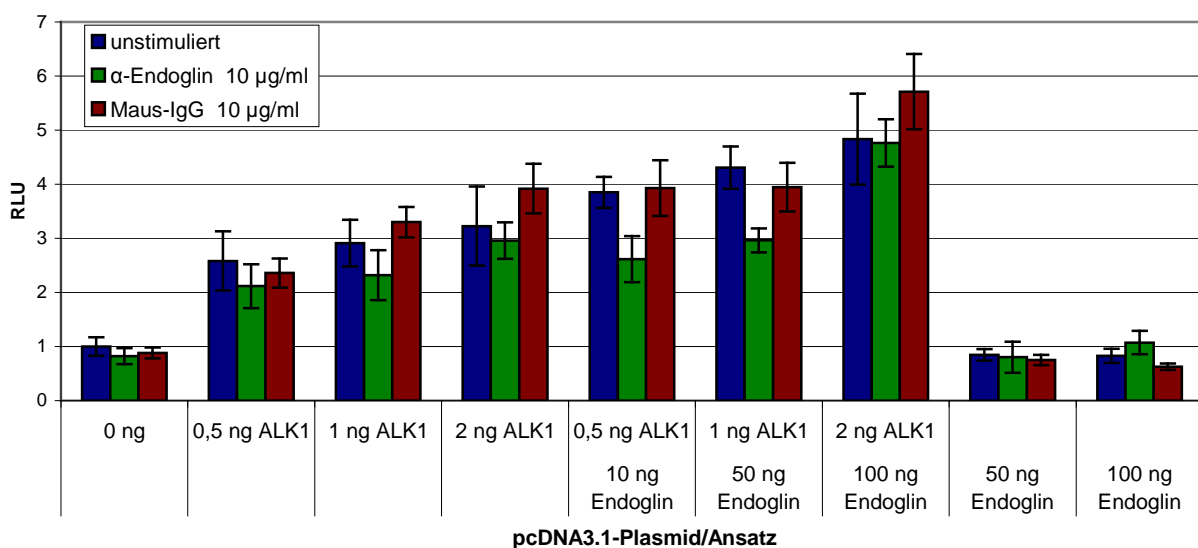


Abb. 3.15: Einfluss von α -Endoglin auf die Aktivierung des Id1-Promotors durch ALK1 und Endoglin.

Je 7000 HepG2-Zellen wurden mit 100 ng des Reporter-Gen-Plasmids pGL3-Basic-Id1_Prom und den angegebenen Mengen an pcDNA3.1-ALK1 und pcDNA3.1-Endoglin transient transfiziert. Zusätzlich wurde mit der entsprechenden Menge des Leervektors pcDNA3.1/*myc*-HIS A kotransfiziert, so dass jeder Ansatz insgesamt 202 ng Plasmid-DNA enthielt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control. Nach 6 Stunden wurden die angegebenen Mengen an α -Endoglin (aus Ziege) und Ziege-IgG1 in Magermedium zugegeben. 30 Stunden nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats im Luminometer gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle mit 102 ng Leervektor ohne Expressions-Plasmide normiert und in RLU angegeben. Der Graph zeigt die Mittelwerte von 6-fach-Bestimmungen \pm Standardabweichung und ist repräsentativ für zwei identische Experimente. RLU = relative Luziferase Units

3.3. Auswirkungen der Hemmung von ALK1 auf die *in vitro*-Proliferation von Endothelzellen

In Kapitel 3.2.1.2. wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne von ALK1 die Smad1/5/8-Phosphorylierung inhibiert. Weiterhin hemmt sie die ALK1- und auch die Endoglin-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung (siehe 3.2.2.3). Dies sind beides Hinweise darauf, dass die extrazelluläre Domäne von ALK1 die ALK1-Signaltransduktion hemmt. Daher wurde der Einfluss der extrazellulären Domäne von ALK1 auf das Wachstum von ECs untersucht, um die zellulären Funktionen von ALK1 anhand ihrer Hemmung zu betrachten.

3.3.1. Herstellung der extrazellulären Domäne von hALK1

Expression von hALK1.ec in CHO-Zellen

Das Plasmid pSec-hALK1.ec, das für die sezernierte extrazelluläre Domäne von hALK1 ohne Signalpeptid kodiert (Aminosäuren 22-116), wurde von Gregor Fachinger (Schering AG, Berlin) erhalten. Mit dem Plasmid wurden CHO-Zellen stabil transfiziert.

Zum Nachweis der Expression des sezernierten hALK1.ec wurde der Überstand der Klone nach Ni-NTA-Fällung auf Western Blots mit α -c-*myc* detektiert (Abb. 3.16 a). Mittels Ponceau-Färbung wurde die Proteinbeladung der Taschen überprüft (Abb. 3.16 b). hALK1.ec hat eine Größe von ca. 30 kDa. Die Klone CHO-hALK1.ec 1-1, 1-2, 1-3 und 1-5 exprimieren und sezernieren hALK1.ec, wobei der Klon 1-3 die stärkste Expression zeigt. Im Überstand der Klone 1-4, 2-1 und 2-2 ist dagegen kein hALK1.ec nachzuweisen.

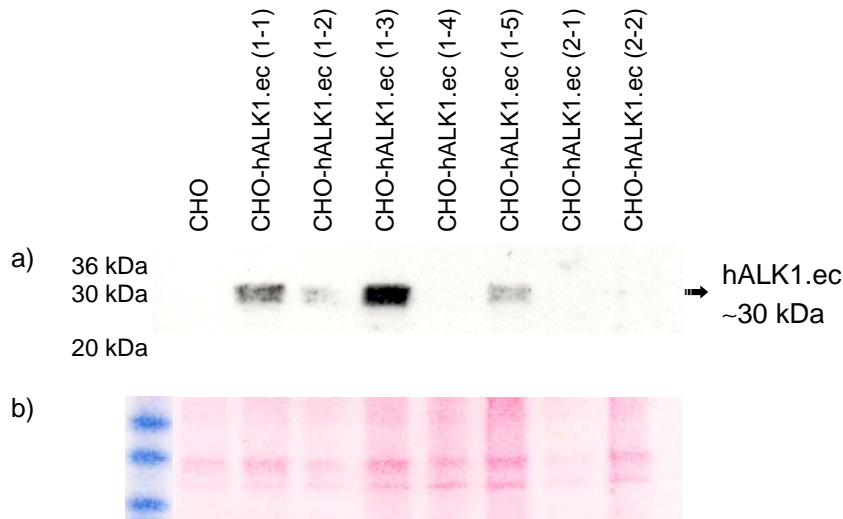


Abb. 3.16: Detektion von hALK1.ec in Überständen stabil transfizierter CHO-Klone.

a) Überstände der CHO-hALK1.ec-Klone wurden über Nacht mit Ni-NTA-Agarose gefällt und anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Western Blotting wurde mit α -c-myc mittels ECL detektiert. b) Der Blot wurde vor der Antikörper-Inkubation mit Ponceau S-Lösung angefärbt.

Aufreinigung von hALK1.ec

Der am stärksten exprimierende Klon aus der oben beschriebenen Transfektion (CHO-hALK1.ec (1-3)) wurde in serumfreiem Medium kultiviert, um hALK1.ec im Überstand anzureichern, während die Konzentration an anderen Proteinen minimal gehalten wurde. Das Protein wurde mittels FPLC über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Während der Elution mit steigenden Imidazol-Konzentrationen wurden 1ml-Fractionen gesammelt und gleichzeitig deren Proteinkonzentration durch UV-Absorption bei 280 nm gemessen (Abb. 3.17 a). Die Fractionen 12 bis 20 enthalten das eluierte Protein. Mittels Proteinbestimmung nach Bradford wurde die genaue Proteinkonzentration in den Elutionsfractionen bestimmt, dabei weisen ähnlich wie in der Analyse der UV-Absorption die Fractionen 10 bis 16 die höchste Konzentration auf. Im Anschluss wurden Überstand, Durchlauf, Waschfraction und ausgewählte Elutionsfractionen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und gefärbt, um die Qualität der Aufreinigung zu überprüfen (Abb. 3.17 b). Es zeigt sich eine dominante Bande bei ca. 30 kDa in den Fractionen 11 bis 18, die in der Fraction 14 am stärksten ist. Zusätzlich ist bei ca. 60 kDa eine weitere Bande detektierbar. Die hALK1.ec-Expression in Durchlauf, Waschfraction und ausgewählten Elutionsfractionen wurde durch Detektion mit einem α -c-myc-Antikörper auf einem Western Blot analysiert (Abb. 3.17 c). Die Fractionen 11-17 enthalten hALK1.ec und wurden daher gepoolt, umgepuffert und das Eluat auf ca. 1 ml reduziert.

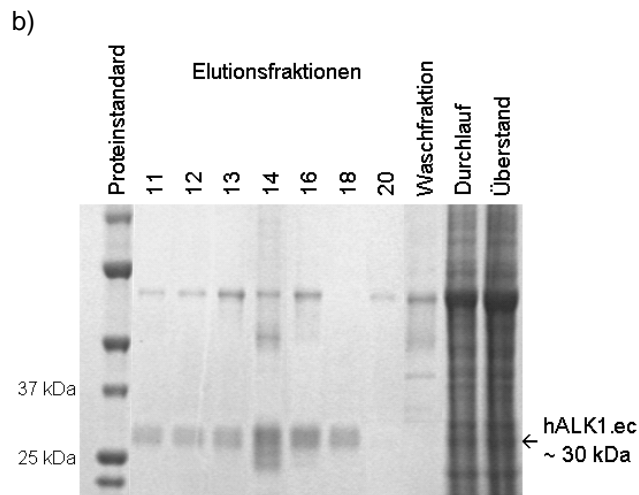
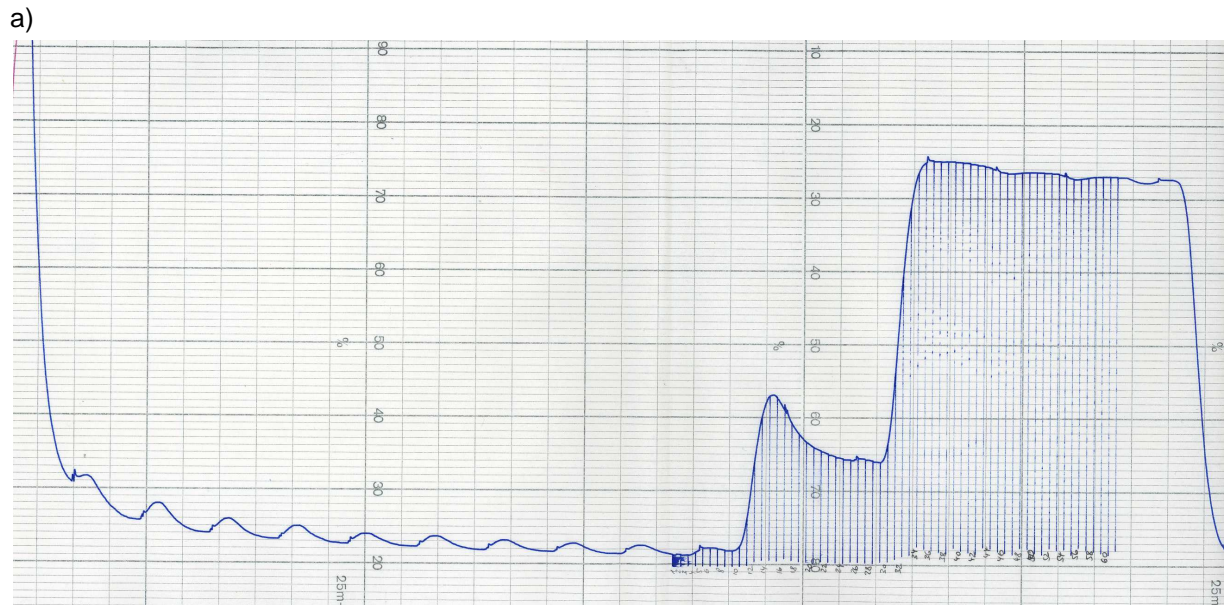
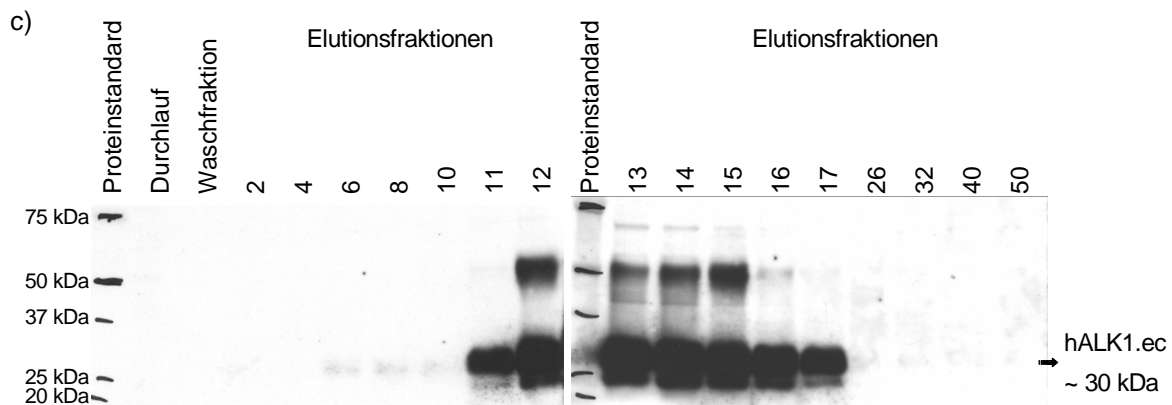


Abb. 3.17: Aufreinigung von hALK1.ec aus Überstand von CHO-hALK1.ec (1-3).

Der CHO-hALK1.ec (1-3) Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Säule gegeben und mittels FPLC aufgereinigt. Dabei wurde das Protein mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (0 mM – 500 mM) eluiert. a) UV-Detektion der Proteinmenge während des Waschens und in den Elutionsfraktionen. b) Überstand, Durchlauf, Waschfraktion und ausgewählte Elutionsfraktionen wurden nach TCA-Fällung auf einem SDS-Gel aufgetrennt und gefärbt. c) Die hALK1.ec-Expression von Durchlauf, Waschfraktion und ausgewählten Elutionsfraktionen wurde analysiert, indem je 30 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen und auf einem Western Blot mit α -myc detektiert wurden.



3.3.2. *In vitro*-Proliferation von ECs

Die Auswirkung der Zytokine VEGF, bFGF, TGF- β 1 und -3, BMP-2 und -6 und Aktivin A auf das Wachstum von MVECs sollte im *in vitro*-Proliferationsassay betrachtet werden. Um eine mögliche Stimulation beobachten zu können, mussten die ECs vorher über Nacht in Magermedium ausgehungert werden. Die Wirkung der Zytokine auf ECs ist am deutlichsten nach 3 Tagen zu messen (Abb. 3.18 a). VEGF stimuliert die Proliferation, während Aktivin A sie bei einer Konzentration von 5 ng/ml inhibiert. 0,5 und 1 ng/ml Aktivin A zeigen noch keine Auswirkung auf das EC-Wachstum. TGF- β 1 und -3 hemmen vor allem bei 2 ng/ml die Proliferation, während BMP-2 und BMP-6 keinen signifikanten Einfluss haben (Abb. 3.18 b). bFGF regt genau wie VEGF das Wachstum der ECs an.

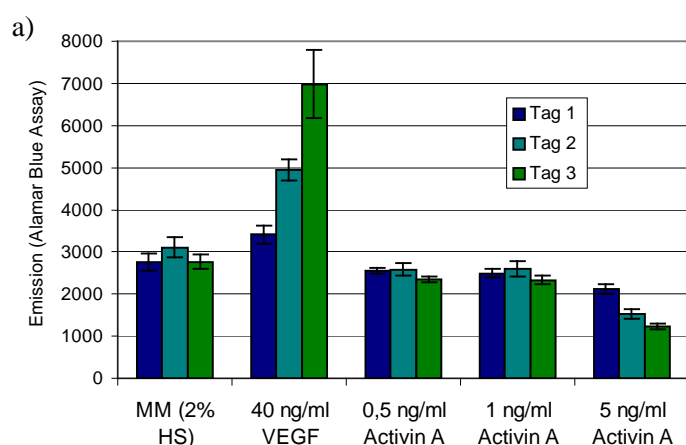
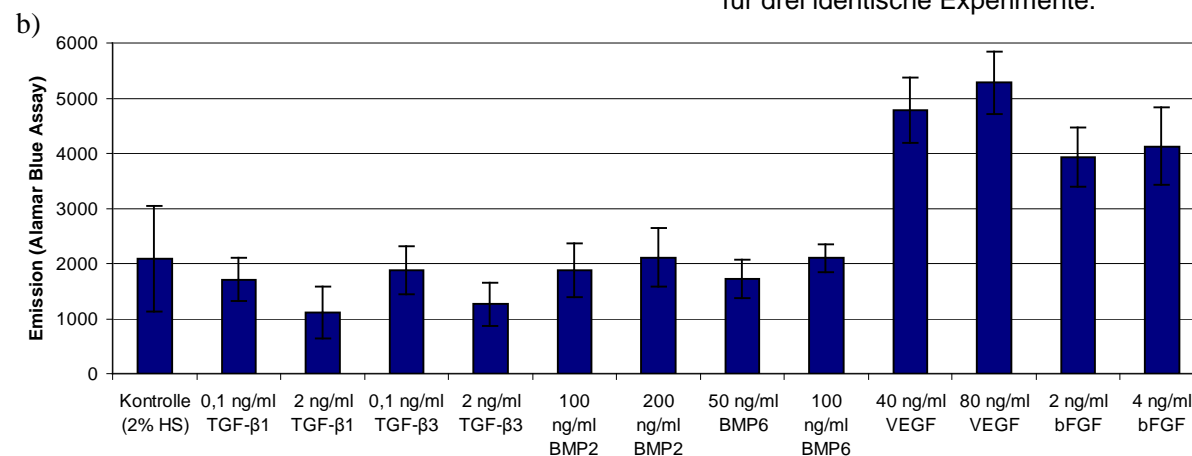


Abb. 3.18: Proliferation von MVECs nach Stimulation.

Je $1,5 \times 10^4$ MVECs wurden in Vollmedium ausgesät und nach dem Ädherieren in Magermedium über Nacht ausgehungert. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an bFGF, VEGF, Aktivin A, TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2 bzw. BMP-6 inkubiert. Bei a) erfolgte die Bestimmung der Proliferation mittels Alamar-Blue-Färbung nach 1, 2 und 3 Tagen, in b) wurde nur an Tag 3 gemessen. Die Graphen zeigen die Mittelwerte von 3-fach-Bestimmungen \pm Standardabweichung und ist repräsentativ für drei identische Experimente.



Im Anschluss sollte der Einfluss der extrazellulären Domäne von ALK1 auf die EC-Proliferation untersucht werden. Dazu wurden einerseits die kommerziell erhältlichen löslichen extrazellulären Domänen von humanem und murinem ALK1 fusioniert mit einem Fc-tag (hALK1/Fc bzw. mALK1/Fc) eingesetzt, andererseits die wie oben beschrieben aus den transfizierten CHO-Zellüberständen aufgereinigte humane extrazelluläre Domäne hALK1.ec ohne Fc-tag. Um eine eventuelle Proliferationshemmung untersuchen zu können, wurde das Wachstum der ECs zuvor durch Stimulation mit VEGF oder bFGF angeregt. Sowohl hALK1/Fc

als auch mALK1/Fc inhibieren die Proliferation von MVECs, die durch gleichzeitige Zugabe von VEGF oder bFGF stimuliert wurden (Abb. 3.19). Auch aufgereinigtes CHO-hALK1.ec hemmt das EC-Wachstum, wenn auch nicht ganz so deutlich.

Auf die VEGF- oder bFGF-stimulierte Proliferation von HUVECs wirkt die extrazelluläre Domäne von ALK1 ebenfalls hemmend (ohne Abb.).

Die Wirkung der extrazellulären Domänen von verschiedenen Rezeptoren der TGF- β -Familie wurde im *in vitro*-Proliferationsassay an HPAECs untersucht (Abb. 3.20, Beatrice Kuhnert, Schering AG, Berlin). Dazu wurde das Wachstum der Zellen mit Vollmedium stimuliert, da dies auch VEGF und bFGF enthält. Auch auf die HPAEC-Proliferation wirkt die extrazelluläre Domäne von ALK1 inhibierend. Außerdem wird das Wachstum auch leicht durch die extrazelluläre Domäne von BMPRII gehemmt, nicht aber durch die von ActRIIA und T β RII.

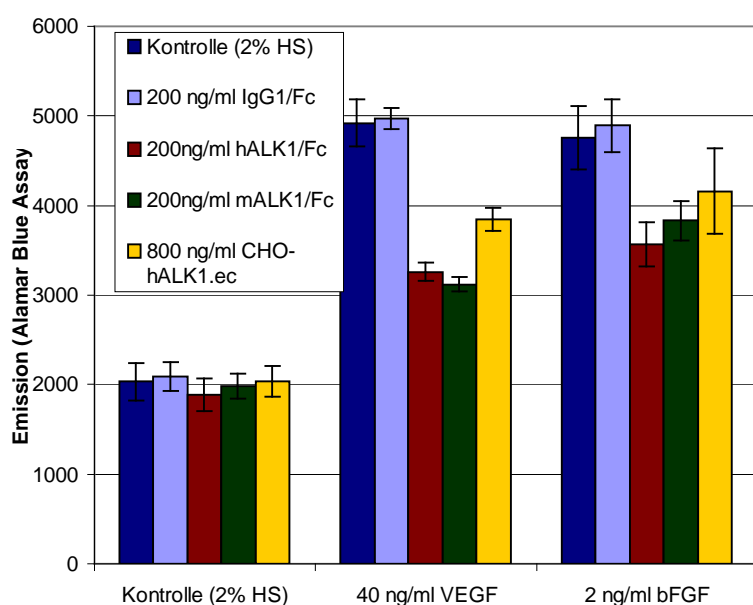


Abb. 3.19: Proliferation von MVECs nach Zugabe der extrazellulären Domäne von ALK1.

Je $1,5 \times 10^4$ MVECs wurden in Vollmedium ausgesät und nach dem Ädherieren in Magermedium über Nacht ausgehungert. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an bFGF, VEGF, IgG1/Fc, hALK1/Fc, mALK1/Fc bzw. aufgereinigtem CHO-hALK1.ec inkubiert. Am Tag 3 erfolgte die Bestimmung der Proliferation mittels Alamar-Blue-Färbung. Der Graph zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung und ist repräsentativ für drei identische Experimente.

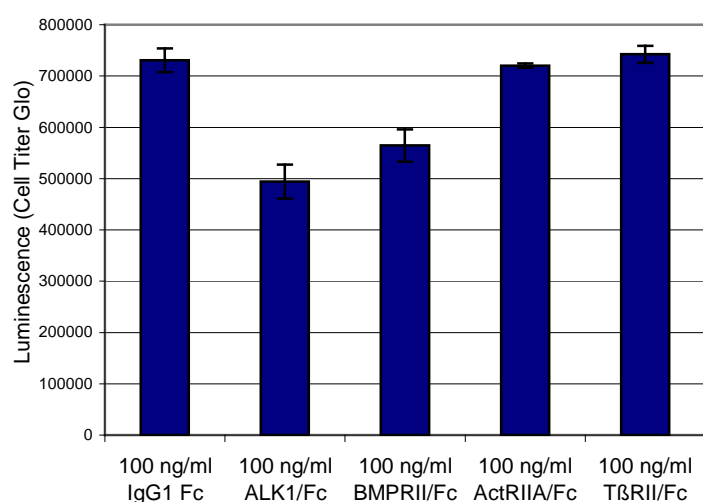


Abb. 3.20: Proliferation von HPAECs nach Zugabe der extrazellulären Domänen von ALK1, BMPRII, ActRIIA oder T β RII.

Je 2000 HPAECs wurden in Vollmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an IgG1 Fc, hALK1/Fc, BMPRII/Fc, ActRIIA/Fc und T β RII/Fc inkubiert. Am Tag 3 erfolgte die Bestimmung der Proliferation mittels CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. Der Graph zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung und ist repräsentativ für zwei identische Experimente.

3.4. Auswirkungen der Hemmung von ALK1 auf die *in vivo* Tumorangiogenese

In Kapitel 3.2.1.2. wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne von ALK1 die Smad1/5/8-Phosphorylierung in ECs inhibiert. Weiterhin hemmt sie die ALK1- und auch die Endoglin-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung (siehe 3.2.2.3). Zusammen mit der Proliferationsinhibition von ECs durch die extrazelluläre Domäne von ALK1 (siehe 3.3.2.) deutet dies darauf hin, dass sie die ALK1-Signaltransduktion hemmt. Um die Rolle von ALK1 *in vivo* anhand ihrer Hemmung zu analysieren, wurde daher ebenfalls der Einfluss der extrazellulären Domäne von ALK1 auf die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum in Xenotransplantaten untersucht.

3.4.1. Stabile Transfektion von A375-Zellen

Um die Auswirkungen der Hemmung von ALK1 auf das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese in einem Maus-Xenograft-Modell zu untersuchen, wurden A375-Zellen (exprimieren kein endogenes ALK1, siehe 3.1.2.) mit einer sezernierten Form der extrazellulären Domäne von ALK1 stabil transfiziert. Da ein humanisiertes Modell aufgestellt werden sollte, wurde zuerst humanes ALK1 verwendet. Dazu wurde das Plasmid pSec-hALK1.ec (siehe 3.3.1.) verwendet.

In der extrazellulären Domäne betragen die Sequenzidentität und die Konsensussequenz zwischen humanem und murinem ALK1 jedoch nur 68% bzw. 76% (AlignX, Vector NTI), so dass außerdem die murine extrazelluläre Domäne (mALK1.ec) kloniert wurde.

Klonierung der extrazellulären Domäne von mALK1

Das Plasmid pSec-mALK1.ec, das für die sezernierte extrazelluläre Domäne von mALK1 ohne Signalpeptid kodiert (Aminosäuren 23-119), wurde hergestellt wie im Kapitel 2.3.13. in Material und Methoden beschrieben. Das DNA-Fragment der extrazellulären Domäne inklusive angefügter *HindIII*- und *XhoI*-Schnittstellen weist eine Größe von 319 bp auf (Abb. 3.21 a). Nach dem Verdau des Plasmids pCRII-TOPO-mALK1.ec und des Vektors pSecTag2/Hygro B mit *XhoI* zeigt sich nur jeweils ein Fragment, da beide nur eine *XhoI*-Schnittstelle enthalten (Abb. 3.21 b). Die geschnittenen Plasmide laufen im Agarose-Gel langsamer als die ungeschnittenen Plasmide, da diese in der kompakteren supercoiled-Form vorliegen. Durch Restriktionsverdau mit *HindIII* fällt aus dem Plasmid pCRII-TOPO-mALK1.ec das 321 bp-große mALK1-Fragment heraus (Abb. 3.2. c). Es ist 2 bp größer als das PCR-Fragment, da die *XhoI*-Schnittstelle zu einem glatten Ende aufgefüllt wurde. Mittels PCR-Screening wurden die *E.coli*-Kolonien identifiziert, die das gewünschte Plasmid pSec-mALK1.ec enthalten. Das PCR-Produkt hat dabei eine Größe von 412 bp, da ein Primer komplementär zu einem Teil des Inserts und der andere Primer komplementär zur DNA stromabwärts der MCS des Vektors ist

(Abb. 3.21 d). Der Vektor pSecTag2/Hygro B weist stromaufwärts der MCS einen Igκ-Leader auf, so dass mALK1.ec sezerniert wird. Außerdem enthält der Vektor stromabwärts der MCS die Gene für ein *c-myc*-Epitop und einen 6xHIS-Tag zur Detektion und zur Proteinaufreinigung (Abb. 3.21 e).

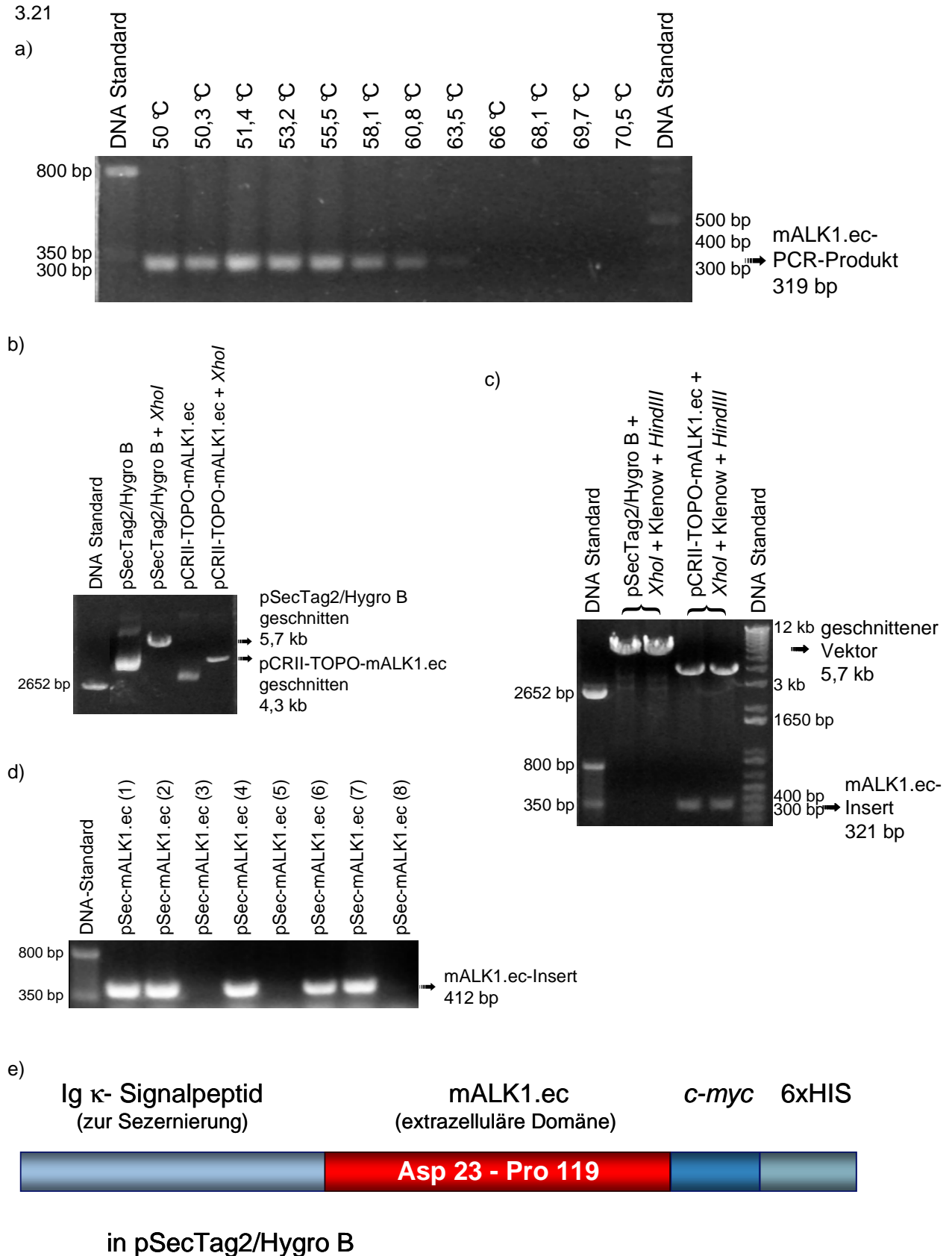


Abb. 3.21: Klonierung von mALK1.ec in den Vektor pSecTag2/Hygro B.

a) Die PCR-Produkte einer Gradienten-PCR bei den angegebenen Annealing-Temperaturen mit den Primern mALK1-ec_for und mALK1-ec_rev auf MS1-cDNA wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das 319 bp große mALK1.ec-Fragment aus den Taschen 2-8 aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. b) Der Vektor pSecTag2/Hygro B und das Plasmid pCRII-TOPO-mALK1.ec wurden mit *XhoI* geschnitten. Zur Überprüfung des Restriktionsverdau wurde ein Teil des Reaktionsansatzes und jeweils die ungeschnittenen Plasmide auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. c) Nach Restriktionsverdau mit *HindIII* wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Das 321 bp große mALK1.ec-Insert (Taschen 4+5) und der 5,7 kb große geschnittene Vektor pSecTag2/Hygro B (Taschen 2+3) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. d) pSecTag2/Hygro B und das mALK1.ec-Insert wurden ligiert und *E. coli* damit transformiert. Die Klone wurden mittels PCR mit den Primern mALK1-ec_for und pcDNA3mcsR auf das Vorhandensein des Plasmids pSec-mALK1.ec getestet. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. e) Konstruktion von mALK1.ec im Vektor pSecTag2/Hygro B.

Transfektion von A375 mit pSec-hALK1.ec, -mALK1.ec, und pSecTag2/Hygro B

A375-Zellen wurden mit den Plasmiden pSec-hALK1.ec, pSec-mALK1.ec oder dem Leervektor pSecTag2/Hygro B stabil transfiziert.

Mittels PCR-Screening wurden die Mock-Klone identifiziert, die den Leervektor enthalten. Das PCR-Produkt weist dabei eine Größe von 302 bp auf (Abb. 3.22 a). In der DNA der Klone A375-pSec (2), (4), (5) und (11) kann der Leervektor pSecTag2/Hygro B eindeutig nachgewiesen werden, der Klon (3) zeigt nur ein schwaches Signal. Auch der Klon (10) enthält die Leervektor-DNA (ohne Abb.).

Sezerniertes hALK1.ec bzw. mALK1.ec wurde auf Western Blots mittels α -c-myc bzw. α -mALK1 detektiert. Die beiden Proteine weisen eine Größe von ungefähr 30 kDa auf (Abb 3.22 b und c). Die Klone A375-hALK1.ec (3), (5) und (2-4) exprimieren und sezernieren hALK1.ec. Sezerniertes mALK1 kann in den Überständen der Klone A375-mALK1.ec (1), (9) und (12) nachgewiesen werden, wobei die Klone (9) und (12) eine höhere Expression aufweisen als Klon (1). Im Überstand der verschiedenen A375-pSec-Klone kann weder hALK1.ec noch mALK1.ec detektiert werden.

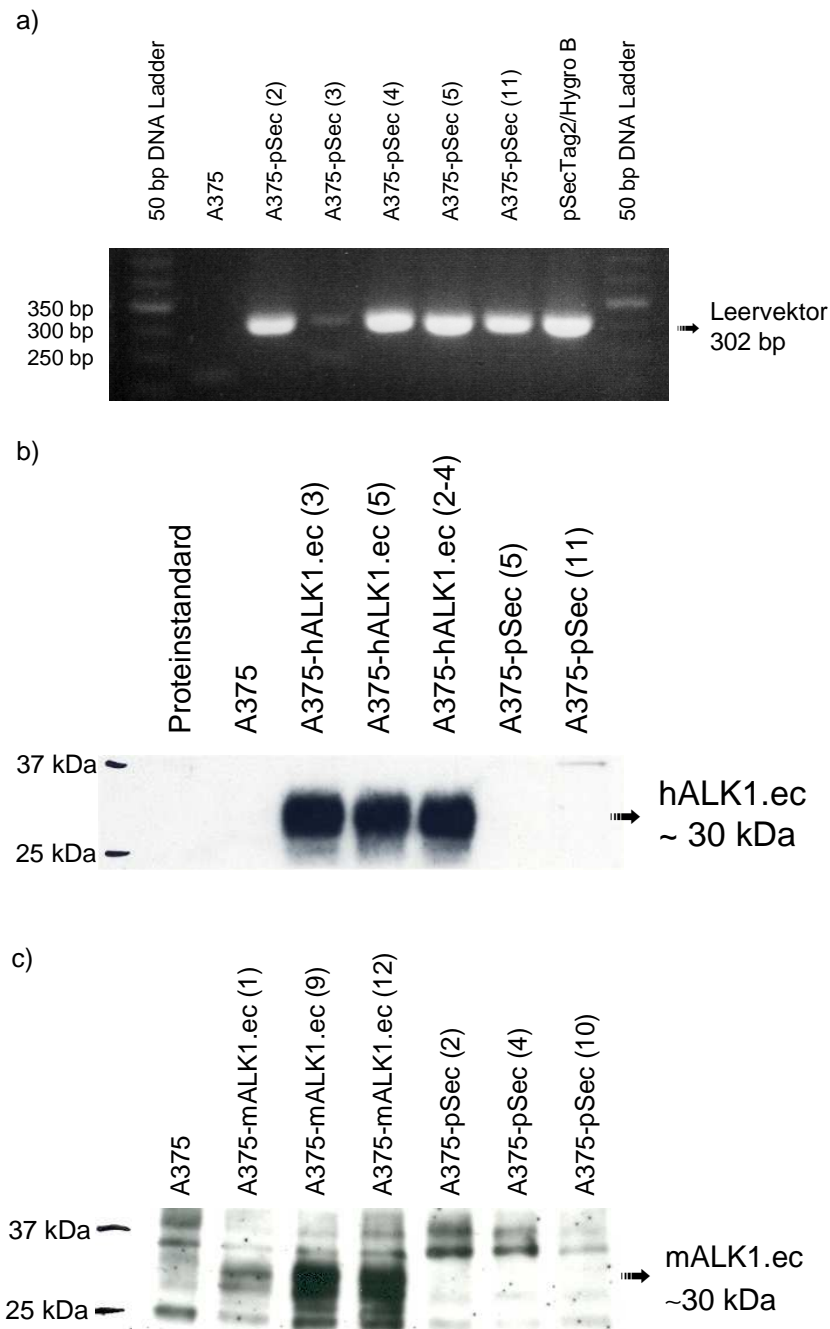


Abb. 3.22: Detektion von Leervektor und hAlk1.ec in stabil transfizierten A375-Klonen.

a) Zum Nachweis der Integration des Leervektors pSecTag2/Hygro B in das Genom der A375-Zellen wurde auf isolierter DNA der Klone eine PCR mit Primern durchgeführt, die die MCS flankieren (forward Primer: T7 forward, reverse Primer: pcDNA3mcsR). Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. b) und c) Die Überstände der A375-Klone wurden über Nacht mit Ni-NTA-Agarose gefällt, auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit α -c-myc (b) oder α -mALK1 (c) mittels ECL detektiert. Die Proteinbeladung der Taschen wurde durch Ponceau-Färbung der Blots überprüft (ohne Abb.).

Proliferation der A375-Klone in vitro

Bevor die A375-Tumorzellen in Mäuse injiziert wurden, wurde ihre Proliferation *in vitro* untersucht, um *in vivo* ungefähr gleich schnell wachsende Klone der ALK1.ec- und Mock-Transfektionen einzusetzen. Als Mock-Klone, die ein ähnliches Wachstum wie die Klone A375-hALK1.ec (3), (5) und (2-4) aufweisen, wurden A375-pSec (5) und (11) ausgewählt. Für die Klone A375-mALK1.ec (1), (3), und (12) wurden als Kontrolle A375-pSec (2), (4) und (10) verwendet (Abb. 3.23 a und b).

Um auszuschließen, dass die extrazelluläre Domäne von ALK1 die *in vitro*-Proliferation von A375-Zellen selbst hemmt, wurde der Einfluss von aufgereinigtem hALK1.ec aus CHO (siehe 3.2.2.2.) und der löslichen extrazellulären Domäne von hALK1 bzw. mALK1 fusioniert mit einem Fc-tag (hALK1/Fc bzw. mALK1/Fc) im Proliferationsassay untersucht. Weder aufgereinigtes hALK1.ec, noch hALK1/Fc oder mALK1/Fc hemmen *in vitro* die Proliferation von A375-Zellen (Abb. 3.23 c).

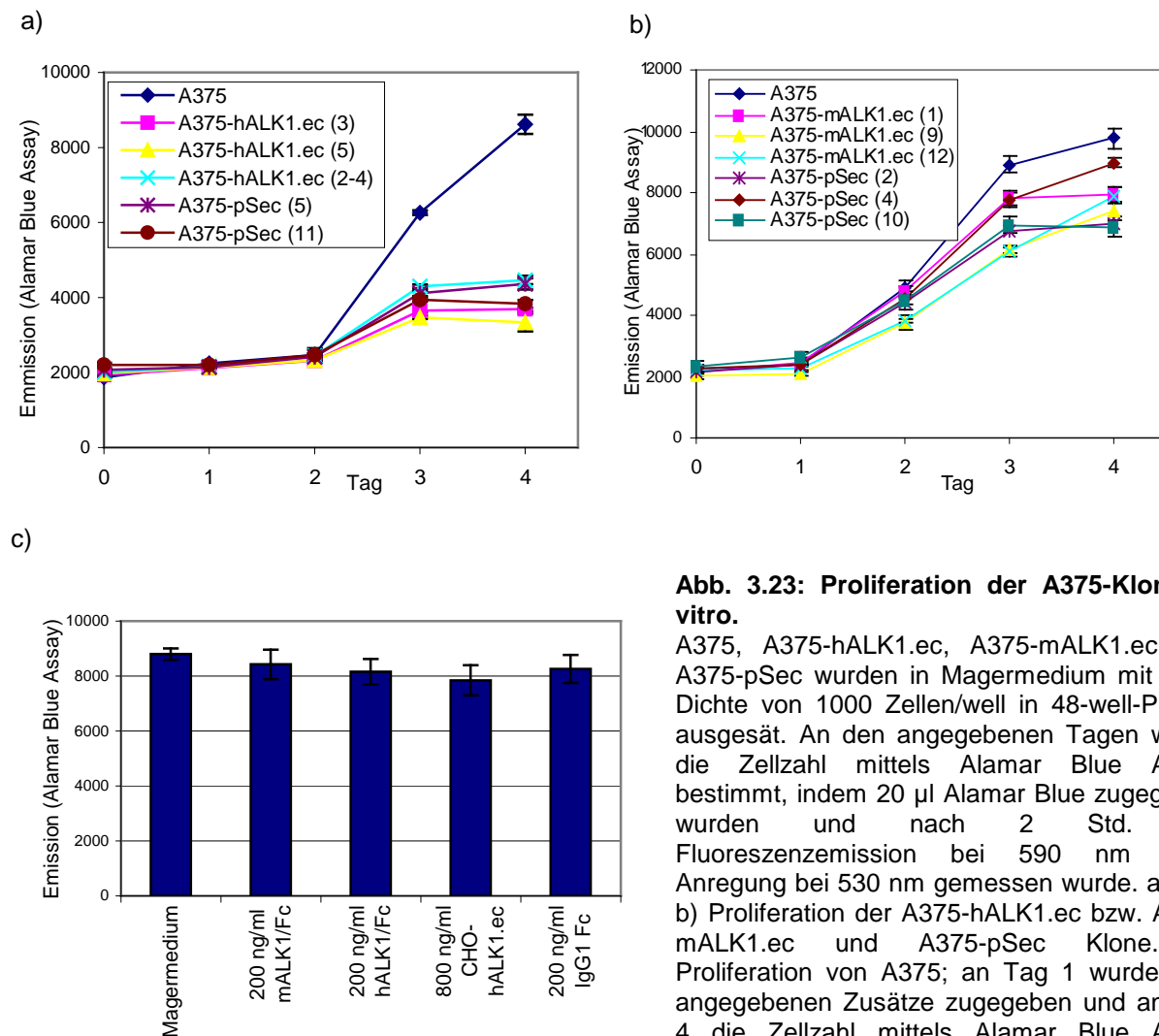


Abb. 3.23: Proliferation der A375-Klone *in vitro*.

A375, A375-hALK1.ec, A375-mALK1.ec und A375-pSec wurden in Magermedium mit einer Dichte von 1000 Zellen/well in 48-well-Platten ausgesät. An den angegebenen Tagen wurde die Zellzahl mittels Alamar Blue Assay bestimmt, indem 20 μ l Alamar Blue zugegeben wurden und nach 2 Std. die Fluoreszenzemission bei 590 nm nach Anregung bei 530 nm gemessen wurde. a) und b) Proliferation der A375-hALK1.ec bzw. A375-mALK1.ec und A375-pSec Klone. c) Proliferation von A375; an Tag 1 wurden die angegebenen Zusätze zugegeben und an Tag 4 die Zellzahl mittels Alamar Blue Assay bestimmt.

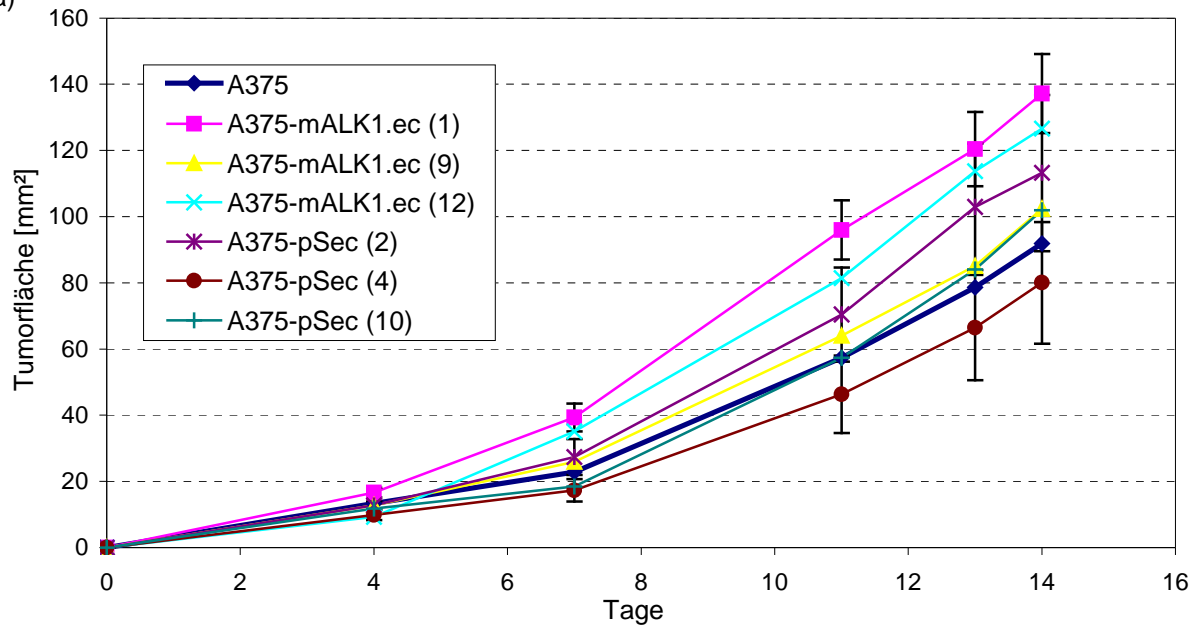
3.4.2. Tumorwachstum

Wenn die Hemmung von ALK1 zu einer geringeren Tumolvaskularisierung führt, sollte dies auch das Tumorwachstum verringern. Um daher die Auswirkungen der Hemmung von ALK1 auf das Tumorwachstum zu untersuchen, wurden die A375-hALK1.ec- bzw. A375-mALK1.ec-Zellen s.c. in Nacktmäuse injiziert. Ihr Tumorwachstum wurde jeweils mit dem Wachstum von mock-transfizierten A375-pSec-Tumoren verglichen (Abb. 3.24 a bzw. b), die *in vitro* eine ähnliche Proliferationsrate aufgewiesen hatten (siehe Kapitel 3.4.1.). Vergleicht man das Wachstum der Tumore der mALK1.ec-Klone mit denen der pSec-Klone, so zeigt sich keine

eindeutige Tendenz. Am schnellsten wachsen Tumore der Klone mA375-hAKL1.ec (1) und (12), gefolgt von den A375-pSec (2)-Tumore. Tumore der Klone A375-mALK1.ec (9) und A375-pSec (10) sind im Verlauf der Messungen ungefähr gleich groß, und weisen ein ähnliches Wachstum wie die der Parentallinie A375 auf. Nur Tumore des Klons A375-pSec (4) wachsen langsamer als die A375-Tumore. Das Wachstum der hALK1-ec-Klone hingegen bleibt insgesamt hinter dem der pSec-Tumore zurück. Tumore von A375-hALK1.ec (5) und vor allem von A375-hALK1.ec (3) wachsen deutlich langsamer als die A375-pSec (11)-Tumore. Tumore des Klons A375-hALK1.ec (2-4) sind zu allen Messungen ungefähr genauso groß wie die von A375-pSec (11). Die A375-pSec (5)-Tumore weisen ein extrem viel schnelleres Wachstum auf als die aller anderen Klone. Die Parentallinie A375 wurde im Experiment mit den hALK1-Klonen nicht betrachtet, zeigt aber *in vivo* ein ähnliches Wachstum wie die Klone A375-pSec (11) oder A375-hALK1.ec (2-4).

3.24

a)



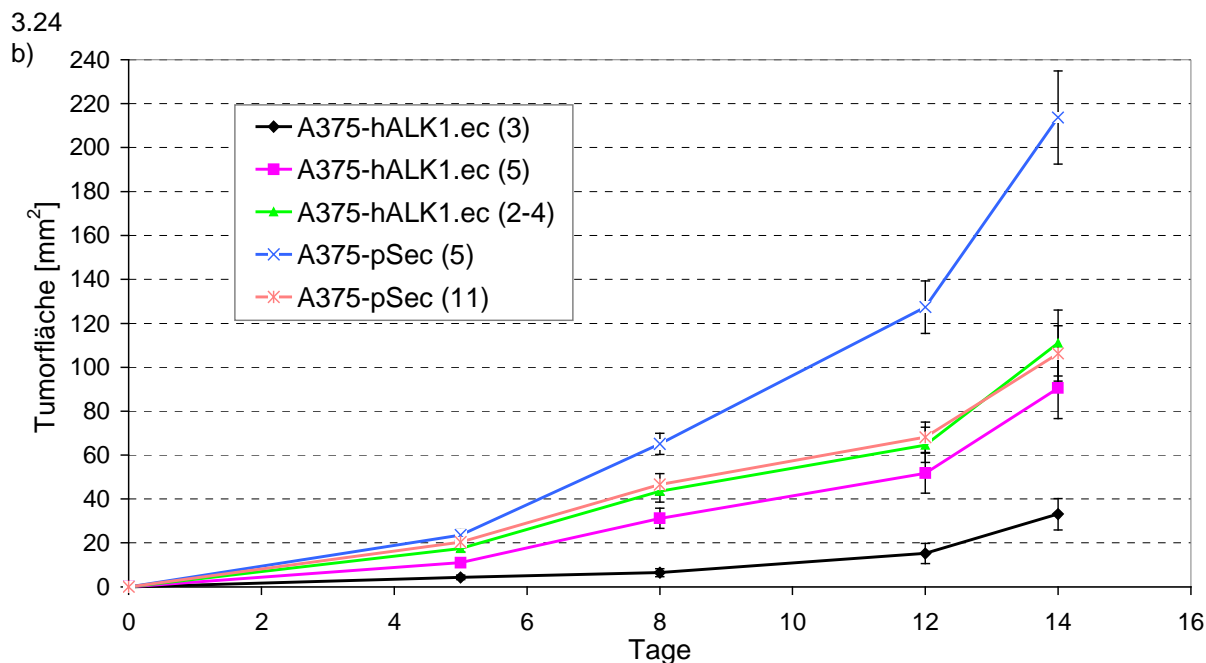


Abb. 3.24: Tumorwachstum der A375-hALK1.ec-, A375-mALK1.ec- und A375-pSec-Klone in Nacktmäusen (Xenografts).

An Tag 0 wurden je 10^6 Zellen der angegebenen Klone von A375-hALK1.ec (a) -mALK1.ec (b) und -pSec (a und b) s.c. in jeweils 8 Nacktmäuse injiziert. Mit einer Schiebelehre wurde der längste Durchmesser des Tumors und der darauf senkrecht stehende Durchmesser gemessen. Die Tumorfläche errechnet sich aus dem Produkt der beiden. Die Werte geben den Mittelwert aus 8 Tumoren \pm Standardabweichung an.

3.4.3. Expression von ALK1.ec in den Tumor-Xenografts

Nach Entnahme der Tumore wurde mittels RT-PCR überprüft, ob die Tumorzellen das exogene hALK1.ec bzw. mALK1.ec noch exprimieren. hGAPDH diene als Referenzgen zur relativen Quantifizierung der Genexpression, da nur die Expression in den humanen A375-Tumoren überprüft werden sollte, nicht aber im umliegenden Mausgewebe. Zur Kontrolle wurde außerdem die Expression des Leervektors pSecTag2/Hygro B überprüft. Alle hALK1-Tumore exprimieren hALK1.ec und kein pSec (Abb. 3.25 a), während die pSec-Tumore keine hALK1.ec-Expression zeigen sondern nur pSec-Expression (ohne Abb.). Auch alle mALK1.ec-Tumore exprimieren mALK1.ec (Abb. 3.25 b), wohingegen in den pSec-Tumoren kein mALK1 zu detektieren ist. Vergleicht man die Höhe der ALK1.ec-Expression mit der Tumorgröße, so erkennt man einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang. Die Tumore des Klons A375-hALK1.ec (3), die im Durchschnitt deutlich mehr hALK1.ec exprimieren, sind deutlich kleiner geblieben als die Tumore der Klone A375-hALK1.ec (2-4) und (5). Auch für die mALK1-Tumore zeigt sich eine ähnliche Tendenz, die Tumore des Klons (9) weisen die höchste mALK1-Expression und das langsamste Tumorwachstum auf.

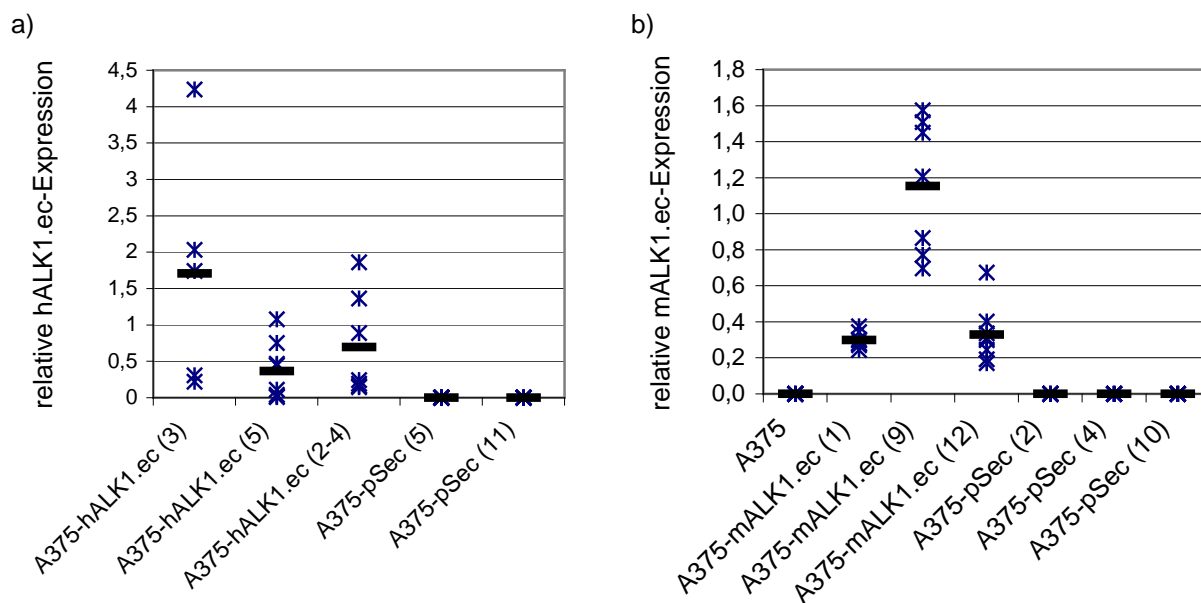


Abb. 3.25: Expression von hALK1.ec- bzw. mALK1-mRNA in A375-Tumor-Xenografts.

Die Tumore wurden an Tag 14 entnommen und die Aufreinigung der RNA erfolgte bei gleichzeitiger Proteinisolierung. Nach reverser Transkription der mRNA wurde in RT-PCRs die relative Expression von a) hALK1.ec- bzw. b) mALK1 in Relation zur endogenen Kontrolle hGAPDH ermittelt. Die blauen Kreuze geben den Durchschnitt aus Dreifachbestimmungen für jeden Tumor an, die Schwarzen Balken den Mittelwert für jeden Klon.

Außerdem wurde die ALK1-Expression auf Proteinebene untersucht, indem Tumorlysate mit α -*c-myc*-Agarose-beads gefällt wurden und nach Gelelektrophorese auf Western-Blots das Protein mit α -hALK1 bzw. α -mALK1 detektiert wurde. Alle getesteten ALK1.ec-Tumore exprimierten das humane bzw. murine Protein, während es in den pSec-Tumoren nicht nachweisbar war (Abb. 3.26). Jedoch ist die Stärke der ALK1.ec-Expression nicht quantifizierbar, da wegen unterschiedlicher Tumorgößen nicht immer die gleiche Menge an Tumormaterial eingesetzt werden konnte und weil durch die Fällung unterschiedliche Verluste auftreten können.

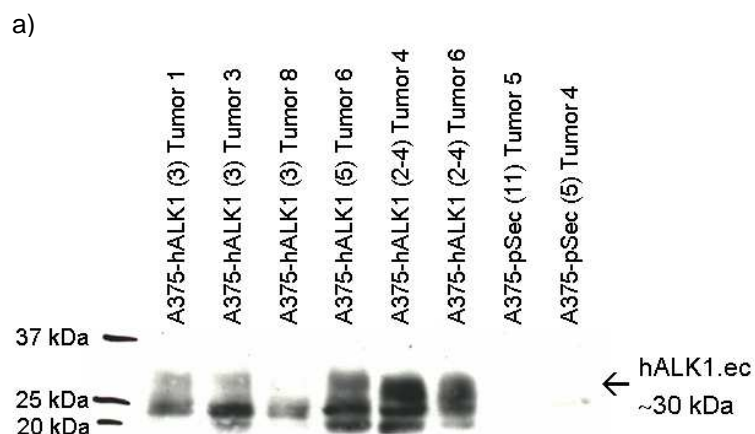


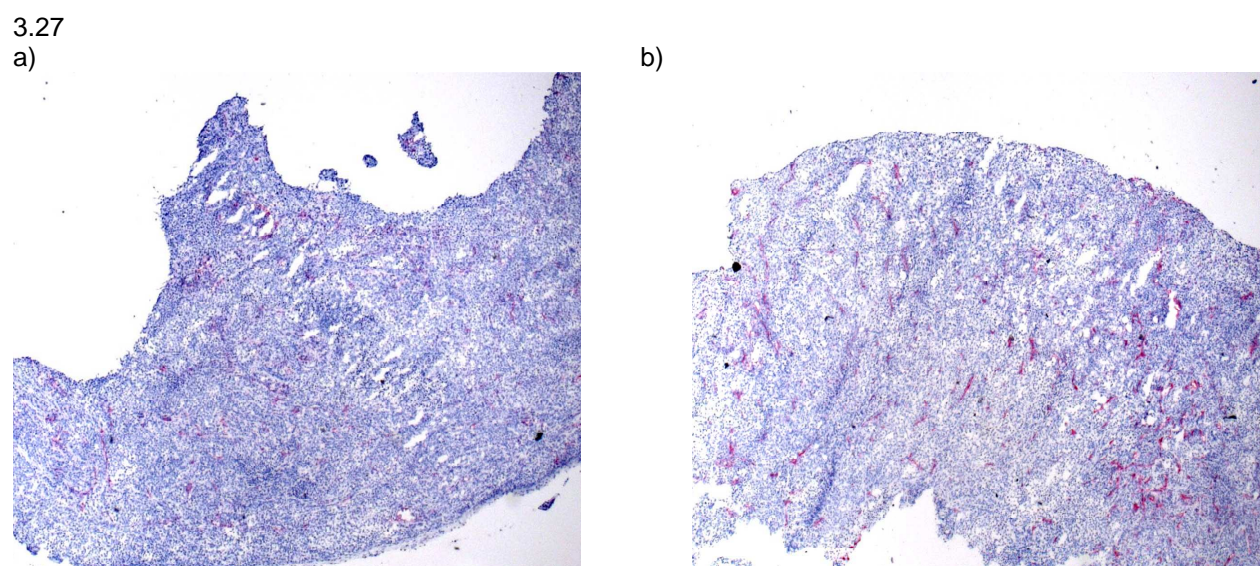
Abb. 3.26: Proteinexpression von hALK1.ec bzw. mALK1- in A375-Tumor-Xenografts.

Die Tumore wurden an Tag 14 entnommen und die Proteinisolierung erfolgte bei gleichzeitiger RNA-Aufreinigung. Die Lysate wurden über Nacht mit α -*c-myc*-Agarose-beads gefällt (weil der Puffer aus PARIS-Kit zur Protein- und RNA-Isolation EDTA enthält, welches die Ni-NTA-Fällung stört) und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Western Blots wurden mit a) α -hALK1- bzw. b) α -mALK1-Antikörper inkubiert und mittels ECL detektiert.



3.4.4. Vaskularisierung der Tumor-Xenografts

Zusätzlich zum Tumorwachstum sollte auf Gewebeschnitten die Gefäßbildung im Tumor analysiert werden. Dazu wurden Gefrierschnitte angefertigt und mit α -Maus-CD31 angefärbt. CD31 dient als Gefäß-Marker, da es ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird. Jedoch war kein offensichtlicher Unterschied zwischen der CD-31-Färbung auf Schnitten der A375-hALK1.ec-Tumore und der A375-pSec-Tumore zu erkennen (Abb. 3.27). Da die Verteilung der Gefäße sehr inhomogen war und dies eine unvoreingenommene Auswertung unmöglich machte, wurde auf ein Auszählen der Mikrogefäße zur Bestimmung der Gefäßdichte („microvessel density“) verzichtet.



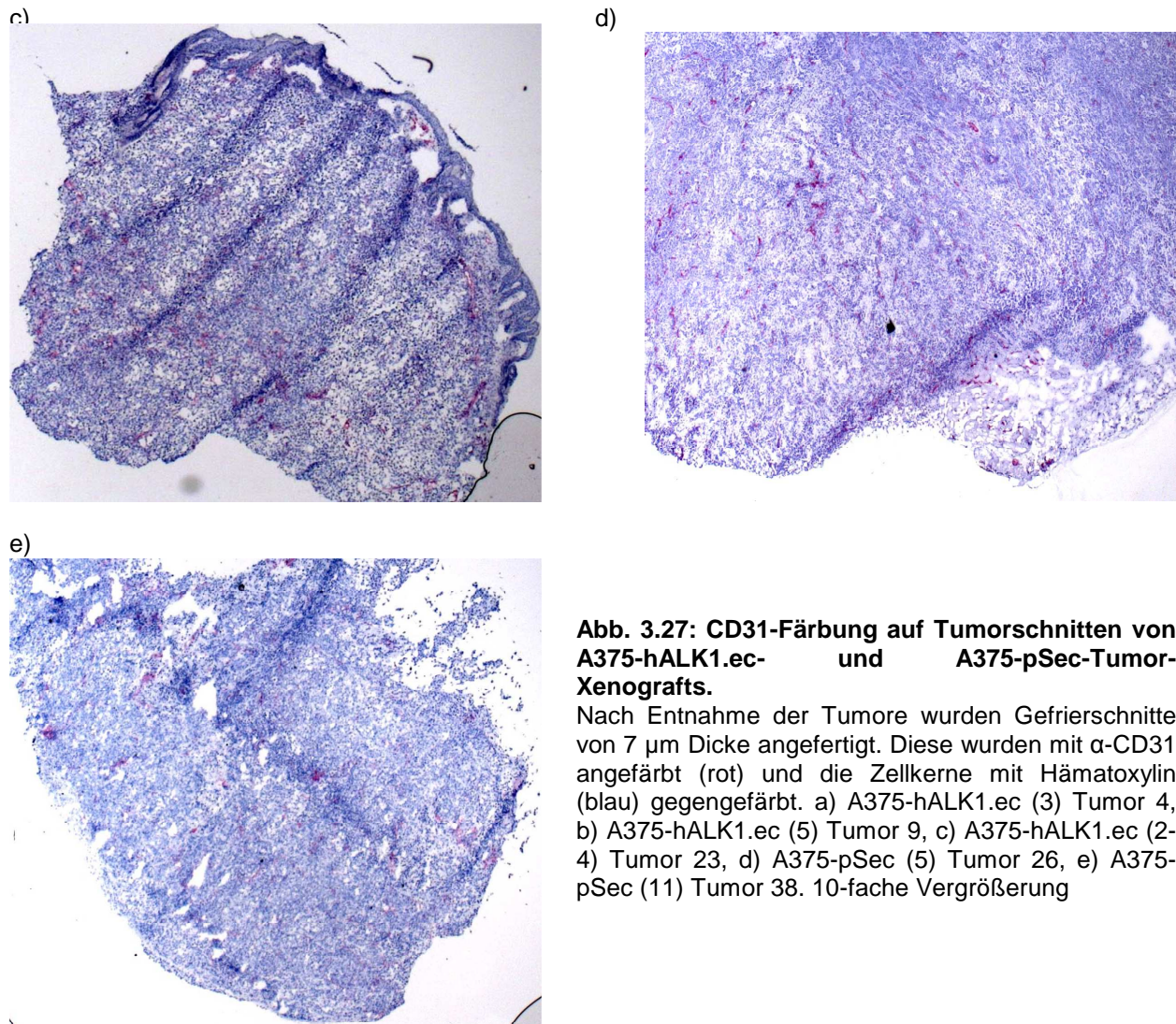


Abb. 3.27: CD31-Färbung auf Tumorschnitten von A375-hALK1.ec- und A375-pSec-Tumor-Xenografts.

Nach Entnahme der Tumore wurden Gefrierschnitte von 7 μm Dicke angefertigt. Diese wurden mit $\alpha\text{-CD31}$ angefärbt (rot) und die Zellkerne mit Hämatoxylin (blau) gegengefärbt. a) A375-hALK1.ec (3) Tumor 4, b) A375-hALK1.ec (5) Tumor 9, c) A375-hALK1.ec (2-4) Tumor 23, d) A375-pSec (5) Tumor 26, e) A375-pSec (11) Tumor 38. 10-fache Vergrößerung

3.4.5. CD31-Expression in den Tumor-Xenografts

Da die Anfärbung von murinem CD31 auf den Tumorschnitten nicht objektiv quantifizierbar war, diente die Expression von mCD31-mRNA als Maß für die Vaskularisierung der Tumore. Zur Bestimmung der Expression von mCD31 mittels RT-PCR wurde eukaryontische 18S rRNA als Referenzgen eingesetzt, da die Tumore aus humanen A375-Tumorzellen und murinem Gewebe bestanden.

A375-hALK1.ec- und A375-mALK1.ec-Tumore exprimieren im Durchschnitt ungefähr viermal weniger CD31 als A375-pSec-Tumore (Abb. 3.28 a bzw. b). Die Tumore der Parentallinie A375 exprimieren ungefähr so viel CD31 wie der A375-pSec-Klon mit der niedrigsten Expression, also nur wenig mehr als der A375-mALK1.ec-Klon mit der höchsten Expression. Vergleicht man aber die CD31-Expression der einzelnen ALK1.ec-exprimierenden Tumore untereinander, so besteht kein linearer Zusammenhang zwischen hoher hALK1.ec- bzw. mALK1.ec- und niedriger CD31-Expression.

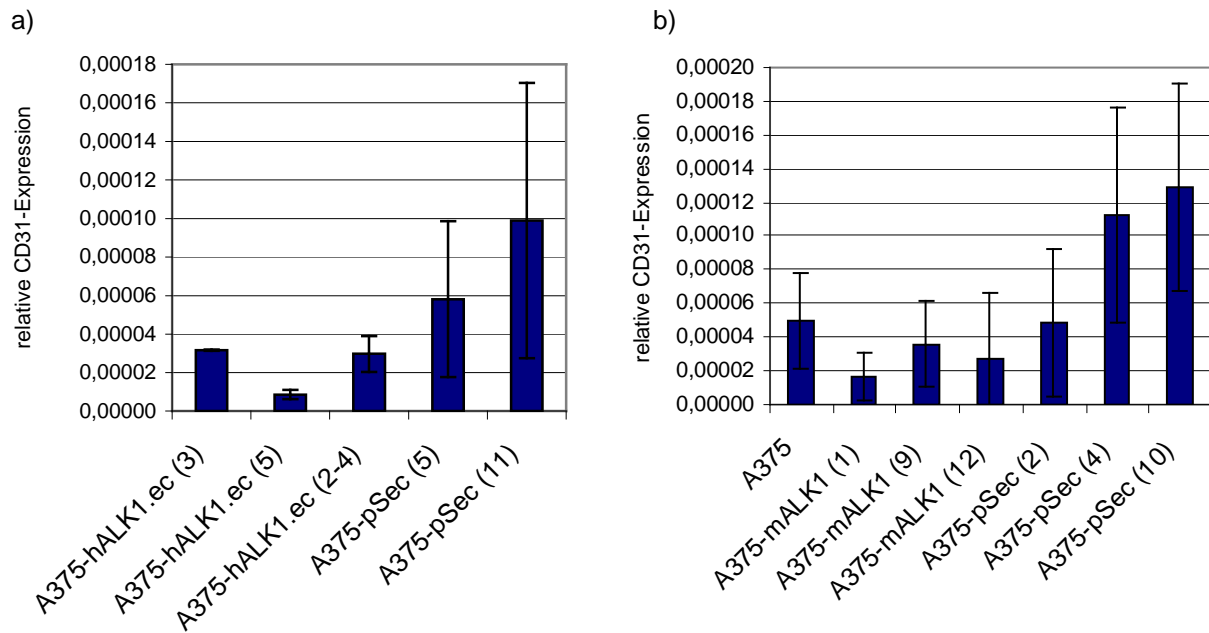


Abb. 3.28: CD31-Expression der A375-hALK1.ec-, A375-mALK1.ec und A375-pSec-Tumore (Xenografts).

Die Tumore wurden an Tag 14 entnommen und die Aufreinigung der RNA erfolgte bei gleichzeitiger Proteinisolierung. Nach reverser Transkription der mRNA wurde in RT-PCRs die relative Expression von mCD31 in Relation zur endogenen Kontrolle eukaryontische 18S rRNA ermittelt. Die Graphen geben Mittelwerte \pm Standardabweichung der acht Tumore pro Klon an, aus Dreifachbestimmungen für jeden Tumor.