

4. Diskussion

Da bisher weder der Signalweg von ALK1 noch die Funktionen eindeutig aufgeklärt sind, sollten in meiner Dissertation die molekularen Ereignisse der ALK1-Signaltransduktion und die Rolle von ALK1 in der Angiogenese *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Zunächst wurde die endothelzellspezifische Expression von ALK1 überprüft. Anschließend dienten Reporterassays zur Analyse des Einflusses verschiedener Liganden und Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie auf die ALK1-vermittelte Aktivierung des Id1-Promoters, um so potentielle Interaktionspartner zu bestimmen. Weiterhin wurde die extrazelluläre Domäne von ALK1 als Werkzeug etabliert, um den ALK1-Signalweg zu hemmen und die daraus resultierenden Auswirkungen zu untersuchen. Dadurch konnten sowohl zelluläre Funktionen von ALK1 als auch die Bedeutung für die Tumorangio-genese analysiert werden.

4.1. Expression von ALK1

4.1.1. ALK1 wird ausschließlich in stark durchbluteten Geweben, auf ECs und in Tumorendothel exprimiert

Die Expression von ALK1 in humanen Geweben, Primärzellen und Zelllinien wurde mittels Array-Analyse, PCRs, Western Blots und Immunhistochemie untersucht. Im Array zeigt sich die stärkste Expression in der Lunge und der Plazenta. Eine geringere Expression wird in primären ECs, Milz, Lymphknoten und Lymphgefäßen, Blase, Verdauungsorganen, Herz und fetalem Gewebe detektiert. In den PCRs weisen die primären humanen Endothelzellen, also MVECs, HUVECs und HPAECs, eine deutliche Expression von hALK1 auf, wohingegen die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2, die humane Melanoma-Zelllinie A375 und die humane Lungenkarzinom-Zelllinie A549 kein hALK1 exprimieren. hALK1-Protein kann durch Detektion mit einem α -ALK1-Antikörper auf Western-Blots ebenfalls in MVECs, HUVECs und HPAECs nachgewiesen werden, aber nicht in den humanen Zelllinien MCF7 und A549, die nicht endothelialen Ursprungs sind. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen aus der Literatur. So zeigten auch Attisano, Carcamo et al. (1993), Wu, Robinson et al. (1995), Panchenko, Williams et al. (1996) und Goumans, Valdimarsdottir et al. (2002) mittels Northern Blot Analysen, *in situ* Hybridisierung, PCR bzw. Immunpräzipitation, dass ALK1 in Lunge, Plazenta und anderen gut durchbluteten Organen exprimiert wird, und wiesen ALK1-Expression in primären ECs, aber nicht in Zelllinien epithelialen oder fibroblastischen Ursprungs nach. Lediglich König, Kogel et al. (2005) detektierten ALK1 mittels RT-PCR auch auf primären hippocampalen Neuronen und Phäochromozytom-Zellen (Tumor der Medulla der Nebennierendrüse), und schwächer auf Sekundärkulturen von Astrozyten und einer embryonalen Fibroblasten-Zelllinie.

Die Expression von endogenem ALK1 wurde außerdem immunhistochemisch auf menschlichem Tumorgewebe und gesundem Gewebe untersucht. 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. Dies entspricht den Beobachtungen von Seki, Yun et al. (2003), die ALK1 in Arterien nachwiesen, die den Tumor versorgen.

4.1.2. Die Eigenschaften von exogenem ALK1 gleichen denen des endogenen Proteins

Die Größe von hALK1 aus MVECs, HUVECs und HPAECs auf den Western-Blots beträgt ca. 55-60 kDa. In der Literatur wird ALK1 mit einer Größe von 60-64 kDa detektiert, und manche Gruppen finden auch eine zweite Bande bei 64-76 kDa (Wu, Robinson et al. 1995; Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002; König, Kogel et al. 2005). Die beiden verschiedenen Größen von ALK1 wurden auf unterschiedliche Glykosylierungs- oder Splice-Varianten zurückgeführt. In den untersuchten Zellen in den eigenen Experimenten scheint also nur die kleinere Splice-Variante oder eine Form mit geringerer Glykosylierung vorhanden zu sein.

PAECs wurden mit den DNA-Konstrukten für ALK1 (wt), ALK1-Q/D (konstitutiv aktiv) und ALK1-K/R (dominant negativ) stabil transfiziert und die ALK1-Expression auf Western-Blots analysiert. Durch den *c-myc*- und HIS-tag aus dem pcDNA3.1-Vektor sollte es ungefähr 4 kDa größer als endogenes ALK1. Exogenes hALK1 in den transfizierten PAECs zeigt zwei Banden bei ca. 58 und ca. 65 kDa, ist also ungefähr genauso groß wie endogenes ALK1 in den primären ECs. Die größere Form wird überwiegend in PAECs mit konstitutiv aktivem ALK1 und mit starker ALK1(wt)-Expression detektiert, während die dominant negative ALK1-K/R-Mutante hauptsächlich in der kleineren Form vorliegt. Der Größenunterschied von 5-10 kDa weist auf eine Phosphorylierung hin. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine Autophosphorylierung von ALK1, die durch die Überexpression von ALK1 (wt) oder ALK1-Q/D bewirkt wird. In diesen Linien wird auch in den Reporterstudien Id1 durch ALK1 ohne Zugabe des Liganden aktiviert. Dies bedeutet entweder, dass der Ligand auch im Magermedium vorhanden ist, oder - was wahrscheinlicher ist - dass die Überexpression von ALK1 zur Autophosphorylierung führt. Diese ligandenunabhängige Phosphorylierung wird häufig beobachtet, wenn Rezeptoren transient überexprimiert werden und somit die Rezeptor-Dichte an der Zelloberfläche stark erhöht ist. Örtliche Nähe macht eine gegenseitige Aktivierung der ALK1-Rezeptoren möglich, die sich unter physiologischen Bedingungen nicht selbst phosphorylieren und deren Kinase ohne Ligand normalerweise nicht aktiviert vorliegt.

CHOs wurden mit der extrazellulären Domäne von hALK1 (ALK1.ec) mit einem *c-myc*- und HIS-tag stabil transfiziert. Dieses DNA-Konstrukt sollte den Massen der Aminosäuren zufolge 18 kDa groß sein, auf dem Blot zeigt sich hingegen eine Bande bei ungefähr 30 kDa. Dieser

Größenunterschied ist ein Hinweis darauf, dass ALK1.ec wie endogenes ALK1 an der extrazellulären Domäne glykosyliert wird, wie von Wu, Robinson et al. (1995) vorgeschlagen.

4.2. ALK1-Signaltransduktion

4.2.1. Die extrazelluläre Domäne von ALK1 hemmt die ALK1-Signaltransduktion und kann daher als Werkzeug zur Untersuchung des ALK1-Signalweges dienen

Die extrazelluläre, ligandenbindende Domäne von ALK1 sollte als Werkzeug verwendet werden, um die Signaltransduktion von ALK1 auf extrazellulärer Ebene zu hemmen. Dieses Prinzip wurde in der Literatur bereits mehrfach für verschiedene Rezeptoren angewendet. So haben zum Beispiel Siemeister, Schirner et al. (1999) trunkeerte Formen von VEGF-R1, VEGF-R3, Tie-1 und Tie-2 verwendet, um den VEGF- bzw. Tie-Signalweg in der Tumorangio-genese zu inhibieren. Die extrazelluläre Domäne des ActRIIA inhibiert die Transaktivierung eines Aktivin-responsiven Promotors, indem sie heteromere Komplexe mit ActRIA und ActRIB bildet (De Winter, De Vries et al. 1996). Die Überexpression einer trunkeerten Form des T β RII-Rezeptors im extraembryonalen Mesoderm, aus dem die endothelialen und haematopoietischen Zellen des Dottersacks entstehen, führt zur gestörten Vaskulogenese (Goumans, Zwijsen et al. 1999). Brown, Zhao et al. (2005) konnten durch Zugabe von löslichem ALK1/Fc in zellbasierten Assays die BMP-9-vermittelte Alkalische-Phosphatase-Aktivität und Reporter-gen-Aktivierung blockieren.

Die Inhibition der ALK1-Signaltransduktion könnte folgendermaßen funktionieren (Abb. 4.1): Die extrazelluläre Domäne von ALK1 kann inaktive Heterodimere mit den Typ II Rezeptoren für ALK1 bilden, da sie keine Kinase-Domäne besitzt und daher das Signal nicht ins Zellinnere weiterleiten kann. Wird diese verkürzte Form im Überschuss zugegeben, komplexiert sie alle auf der Zelle vorhandenen Typ II Rezeptoren für ALK1 und verhindert so, dass endogenes, intaktes ALK1 Komplexe bilden und ein Signal übertragen kann. Die extrazelluläre Domäne könnte außerdem den Liganden von ALK1 wegfangen und dessen Bindung an die Rezeptoren blockieren. Diese Art der Inhibition ist aber eher unwahrscheinlich, da ALK1 alleine den Liganden nicht binden kann (Wrana, Attisano et al. 1992).

Zunächst wurde in zwei verschiedenen Assays auf unterschiedlichen Ebenen der ALK1-Signaltransduktion getestet, ob die extrazelluläre Domäne von ALK1 fusioniert mit einem Fc-tag (ALK1/Fc) bzw. ohne Fc-tag (ALK1.ec) tatsächlich den ALK1-Signalweg inhibiert.

Eine der messbaren Auswirkungen von aktiviertem ALK1 ist die Phosphorylierung von Smad1/5, was in der Literatur bestätigt wird (Macias-Silva, Hoodless et al. 1998; Chen und Massague 1999; Oh, Seki et al. 2000; Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002). In MVECs liegt Smad1/5/8 bereits teilweise phosphoryliert vor. Die Zugabe von hALK1/Fc auf MVECs reduziert im Vergleich zur Kontrolle mit IgG₁ Fc die Smad1/5/8-Phosphorylierung signifikant, was darauf

hinweist, dass die extrazelluläre Domäne von ALK1 tatsächlich die ALK1-Signaltransduktion hemmt.

Eine weitere detektierbare Wirkung von ALK1 ist die Aktivierung des Id1-Reporters (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002; Ota, Fujii et al. 2002), welche in Luziferase-Reporterstudien mit dem Id1-Promotor bestätigt wurde. Anschließend wurde der Einfluss von ALK1/Fc und hALK1.ec auf die ALK1-vermittelte Id1-Stimulation untersucht. Die von ALK1 induzierte Id1-Promotor-Aktivierung wird durch Zugabe von aus CHO aufgereinigtem hALK1.ec reduziert. Humanes und murines ALK1/Fc inhibieren die Aktivierung des Id1-Promotors durch ALK1 nur minimal, da schon IgG₁ Fc alleine die Promotor-Aktivität deutlich senkt. Die kooperative Id1-Promotor-Induktion durch ALK1 und Endoglin hingegen wird durch hALK1/Fc im Vergleich zur Kontrolle mit IgG₁ Fc deutlich blockiert. Dies zeigt, dass sowohl ALK1.ec als auch ALK1/Fc die ALK1-Transkriptionsregulation hemmen.

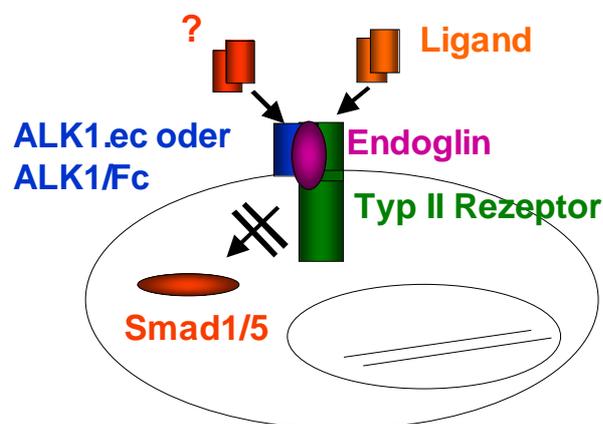


Abb. 4.1: Potentieller Wirkmechanismus der extrazellulären Domäne von ALK1.

Dabei liegt ALK1/Fc wahrscheinlich wie ein Antikörper als Dimer vor, da die Fc-Teile eine Dimerisierung begünstigen. Dies könnte zu einer verbesserten Inhibition der ALK1-Signaltransduktion führen, weil die endogenen ALK1-Rezeptoren auf der Zelle ebenfalls als Dimere vorliegen, und so die ALK1/Fc-Dimere vermutlich leichter die Dimere der vorhandenen Typ II Rezeptoren für ALK1 komplexieren können. Der Fc-Teil allein kann jedoch bereits Auswirkungen auf die ALK1-Signalübertragung haben, wie sich im Luziferase-Reporterassay mit dem Id1-Promotor herausstellte. Daher wurde für die *in vivo*-Studien ALK1.ec verwendet, welches keinen Fc-tag besitzt. Allem Anschein nach liegt ALK1.ec auch ohne dimerisierenden Fc-Teil als Dimer vor, da bei der Aufreinigung im Western Blot eine zusätzliche Bande bei ungefähr der doppelten Größe, also 60 kDa, detektiert wurde. Die Dimerisierung von ALK1.ec könnte durch Sequenzen in der extrazellulären Domäne von ALK1 vermittelt werden.

Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Smad1/5-Phosphorylierung und den Id1-Promotor-Studien, dass die extrazelluläre Domäne von ALK1 die ALK1-Signaltransduktion inhibiert. Daraufhin wurden ALK1.ec und ALK1/Fc als Werkzeuge eingesetzt, um die Auswirkungen der Hemmung von ALK1 in Array und RT-PCRs auf die Genregulation, in *in vitro*-Proliferationsassays auf zelluläre Funktionen von ALK1 und in Tumorxenografts auf die Tumorangienese zu analysieren.

4.2.2. TGF- β 2, GDF-15 und Aktivin A, B und AB sind potentielle Liganden von ALK1

Bisher konnte der physiologische Ligand für ALK1 nicht eindeutig identifiziert werden. Daher wurde in Reporterassays der Einfluss verschiedener Liganden der TGF- β -Superfamilie auf die ALK1-vermittelte Aktivierung des Id1-Promotors analysiert, um so potentielle Interaktionspartner zu bestimmen. TGF- β 2, GDF-15, Aktivin A, Aktivin B und Aktivin AB steigern die ALK1-vermittelte Aktivierung des Id1-Promotors, und kommen daher als Liganden für ALK1 in Frage. Die untersuchten BMPs hingegen zeigen zusammen mit ALK1 keine additive Steigerung der Promotor-Aktivität, und TGF- β 1 und TGF- β 3 unterdrücken die Stimulierung durch ALK1 sogar. In der Literatur hingegen werden zumeist TGF- β 1 und -3 als Liganden für ALK1 vorgeschlagen, jedoch sind die Angaben kontrovers. Nur wenn ALK1 mit T β RII cotransfiziert wird, bindet es TGF- β 1 und -3 (Attisano, Carcamo et al. 1993; Bassing, Yingling et al. 1994; Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000), während es Aktivin A bindet, wenn es mit ActRII oder ActRIIB cotransfiziert wird (Attisano, Carcamo et al. 1993; Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000). In untransfizierten ECs weisen manche Gruppen ALK1 mit TGF- β 1 und T β RII im Komplex nach (Oh, Seki et al. 2000), während andere keine Komplexe von TGF- β 1 oder -3 mit ALK1 finden (Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000). Außerdem ist ein weiterer unbekannter Ligand für ALK1 im Serum gefunden worden (Lux, Attisano et al. 1999). Die eindeutige Identifizierung des physiologischen Liganden für ALK1 wird dadurch erschwert, dass endogenes ALK1 alleine seinen Liganden nicht binden kann, sondern nur im Komplex mit dem Typ II-Rezeptor (Wrana, Attisano et al. 1992). Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass entgegen der Literaturangaben TGF- β 1 und TGF- β 3 unwahrscheinlich als Liganden für ALK1 erscheinen, sondern dass eher TGF- β 2, GDF-15, Aktivin A, Aktivin B und Aktivin AB als Liganden in Betracht gezogen werden sollten.

4.2.2.1. Die Aktivierung des Id1-Promotors durch BMP-2, -6, -7 und -9 und durch ALK1 verstärken sich nicht gegenseitig

BMP-2, -6, -7 und -9 stimulieren bereits alleine den Id1-Promotor deutlich. Diese Aktivierung wird nur bei geringen Konzentrationen durch Transfektion mit ALK1 zusätzlich verstärkt. Ebenso wird die Aktivierung des Id1-Promotors durch Transfektion mit ALK1 nur bei geringen Mengen des Plasmids zusätzlich durch die BMPs stimuliert. Dies lässt zunächst vermuten, dass

in den Experimenten mit höheren Konzentrationen an ALK1 und BMPs die Grenze der Stimulierbarkeit des Id1-Promotors bei einer 10-fachen Aktivierung erreicht ist. Jedoch kann er in anderen Versuchen auch über das 10-fache hinaus stimuliert werden, was dieses Argument entkräftet. Außerdem zeigt sich im Vergleich mit dem BMPRII, dass vor allem bei größeren Mengen des Rezeptors die BMPRII-vermittelte Id1-Aktivierung anders als bei ALK1 zusätzlich durch BMP-2, -6, und -7 erhöht wird. Das bedeutet, dass Ligand und der zugehörige Rezeptor die Aktivierung des Promotors gegenseitig verstärken. Da dies bei ALK1 und den untersuchten BMPs nicht der Fall ist, liegt es nahe, dass die untersuchten BMPs keine physiologischen Liganden von ALK1 sind. Weiterhin beeinflusst dominant negatives ALK1-K/R die Wirkung von BMP-2, -6, und -7 auf den Id1-Promotor nicht, was demonstriert, dass die Funktion der ALK1-Kinase zur BMP-Signaltransduktion nicht notwendig ist. Dies stimmt weitestgehend mit Literaturangaben überein, denn Lux, Attisano et al. (1999) zeigten, dass BMP-2 und -7 keine ALK1-Signaltransduktion auslösen, und ten Dijke, Yamashita et al. (1994) fanden BMP-7 nicht im Komplex mit ALK1. Die ALK1-Bindung und Signaltransduktion von BMP-6 wurde nicht untersucht. BMP-2 und BMP-6 können zusätzlich durch die RT-PCR-Untersuchungen der Transkriptionsregulation weitgehend als Liganden von ALK1 ausgeschlossen werden. Wenn die beiden BMPs tatsächlich Liganden von ALK1 wären, dann sollten ALK1/Fc und BMP-2 oder -6 die untersuchten Gene genau entgegengesetzt regulieren. Dies ist jedoch nicht der Fall, in einigen Fällen hat ALK1/Fc ähnliche Effekte wie BMP-2 und -6, oder es zeigt gar keinen Einfluss auf die Genexpression von Genen, die von BMP-2 und -6 stimuliert bzw. gehemmt werden. Außerdem zeigen BMP-2 und -6 in den *in vitro*-Proliferationsassays keine Wirkung auf ALK1-exprimierende MVECs, während ein potentieller ALK1-Ligand stimulierend wirken sollte, da ALK1/Fc die Proliferation der MVEC hemmt. Da ALK1 Smad1/5 phosphoryliert und ALK1/Fc die Smad1/5-Phosphorylierung hemmt, sollte ein Ligand von ALK1 in ECs ebenfalls Smad1/5 phosphorylieren. Dies konnte in Western Blots weder für BMP-2 noch für BMP-6 bestätigt werden. Eine Smad-Phosphorylierung zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Auswirkungen von BMP-9 auf Genexpression, Proliferation und Smad-Phosphorylierung konnten nicht untersucht werden, da BMP-9 nicht als aufgereinigtes Protein käuflich erhältlich ist. Eine neuere Veröffentlichung identifiziert ALK1 als potentiellen Rezeptor für BMP-9, basierend auf Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Studien (BIAcore), und da ALK1/Fc die BMP-9-vermittelte Alkaline-Phosphatase-Aktivität und Reporter-gen-Aktivierung blockiert (Brown, Zhao et al. 2005). Jedoch widersprechen die unterschiedlichen Expressionsmuster und Funktionen von BMP-9 und ALK1 einer Rolle von BMP-9 als physiologischer Ligand von ALK1: Während ALK1 nahezu ausschließlich auf ECs exprimiert wird, ist die Expression von BMP-9 auf Leber (Miller, Harvey et al. 2000) und embryonales Septum und Rückenmark beschränkt (Lopez-Coviella, Berse et al. 2000). ALK1 spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese, wohingegen BMP-9 das Wachstum von

Leberzellen stimuliert (Song, Celeste et al. 1995), die cholinerge Differenzierung und Acetylcholin-Synthese fördert (Lopez-Coviella, Berse et al. 2000), zur Knorpel- und Knochenbildung führt (Kang, Sun et al. 2004), und den Glukose-Metabolismus reguliert (Chen, Grzegorzewski et al. 2003).

Insgesamt kann BMP-2 anhand der Ergebnisse aus den Reporterassays, RT-PCRs und Proliferationsassays und den Literaturdaten als Interaktionspartner für ALK1 ausgeschlossen werden. BMP-7 ist ebenfalls kein Ligandenkandidat für ALK1, da auch hier die negativen Ergebnisse aus Veröffentlichungen in den Id1-Promotorstudien bestätigt werden. BMP-6 wurde zwar in der Literatur nicht untersucht, aber die Resultate aus Reporterstudien, RT-PCRs und Proliferationsassays sprechen gegen eine Rolle als Ligand von ALK1. BMP-9 wurde in einer Veröffentlichung als ALK1-Interaktionspartner identifiziert, scheint aber anhand der Reporterassays unwahrscheinlich als ALK1-Ligand. Für eine abschließende Beurteilung bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

4.2.2.2. TGF- β 1 und -3 hemmen die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung

TGF- β 1 und -3 allein haben keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität des Id1-Promotors, hemmen aber die ALK1-vermittelte Id1-Stimulation. Dies legt nahe, dass TGF- β 1 und -3 nicht die physiologischen Liganden von ALK1 sind. Es ist aber nicht vollständig auszuschließen, dass diese Hemmung der ALK1-Signaltransduktion einen negativen feedback-Mechanismus darstellt, und TGF- β 1 und -3 doch als Interaktionspartner für ALK1 in Frage kommen. Jedoch wurde auch bei geringen Konzentrationen von 0,1 ng/ml TGF- β keine Aktivierung beobachtet, was diese Möglichkeit unwahrscheinlich erscheinen lässt. Auf die Id1-Promotor-Stimulation durch konstitutiv aktives ALK1-Q/D wirken TGF- β 1 und -3 genauso inhibierend wie auf die ALK1(wt)-vermittelte Aktivierung. Dies bedeutet, dass die Hemmung des ALK1-Signalweges durch TGF- β 1 und -3 nicht über die Ligandenbindung vermittelt wird, da sonst die Stimulierung durch ALK1-Q/D nicht beeinflusst werden dürfte. Die Inhibition durch TGF- β 1 und -3 dürfte daher im Signalweg unterhalb der ALK1-Aktivierung stattfinden, wahrscheinlich durch Konkurrenz um Smad4 oder durch aktive Inhibition des Id1-Promotors. Für den umgekehrten Fall, die Hemmung der ALK5-vermittelten TGF- β 1-induzierten Stimulation des PAI-Promotors durch ALK1, wurde ebenfalls entweder eine aktive Inhibition des PAI-1-Promotors oder eine Konkurrenz um Signaltransduktionsproteine wie Smad4 vorgeschlagen, oder eine Konkurrenz um den Liganden (Lux, Attisano et al. 1999; Oh, Seki et al. 2000). In RT-PCRs wird nur die ALK5-Expression, nicht aber die ALK1-Expression, durch TGF- β 1 und -3 verstärkt. Dies weist darauf hin, dass nicht ALK1, sondern ALK5 der Rezeptor für TGF- β 1 und -3 ist, da TGF- β 1 mittels eines positiven Rückkopplungsmechanismus die Synthese seines eigenen Rezeptors stimuliert (Van Obberghen-Schilling, Roche et al. 1988; Morgan, Rozovsky et al. 2000). Wenn TGF- β 1 und -3 tatsächlich Liganden von ALK1 wären, dann sollte weiterhin die Genexpression

durch ALK1/Fc genau umgekehrt reguliert werden wie durch TGF- β 1 und -3. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie sich in Untersuchungen der Transkriptionsregulation in RT-PCRs und im Affymetrix-Array zeigt. In den RT-PCRs werden die Gene entweder durch ALK1/Fc so ähnlich wie durch TGF- β 1 und -3 reguliert, oder ALK1/Fc bzw. TGF- β 1/-3 zeigen keinen Effekt auf die Genexpression. Auch in den Array-Analysen werden von den 33 näher betrachteten Genen sogar 13 Gene durch TGF- β 1 und ALK1/Fc ähnlich reguliert, während nur BMP-10, GDF-3 und Id1 annähernd entgegengesetzt reguliert werden. Eine ähnliche Disparität der Genregulation durch ALK1-Q/D und TGF- β 1 wurde ebenfalls von Lux, Salway et al. (2006) und Wu, Ma et al. (2006) beobachtet. In den Proliferationsassays mit ALK1-exprimierenden MVECs sollte ein potentieller Ligand von ALK1 ebenfalls die gegenteilige Wirkung wie ALK1/Fc zeigen, also stimulierend sein. TGF- β 1 und -3 wirken aber hemmend auf die EC-Proliferation, werden also durch diesen Assay zusätzlich als Liganden für ALK1 ausgeschlossen. Lediglich die Untersuchungen der Smad1/5-Phosphorylierung unterstützen eine Rolle von TGF- β 1 als Ligand von ALK1. TGF- β 3 zeigt keine Auswirkung auf die Smad1/5/8-Phosphorylierung, aber TGF- β 1 erhöht die Menge an pSmad1/5/8 in MVECs leicht. In HepG2, die kein endogenes ALK1 exprimieren, zeigt TGF- β 1 diesen Effekt nicht. Diese TGF- β 1-induzierte Smad1/5/8-Phosphorylierung nur in ALK1-exprimierenden ECs impliziert möglicherweise TGF- β 1 als Auslöser der ALK1-Signaltransduktion. Diese These wird zwar durch mehrere Veröffentlichungen bestätigt, die TGF- β 1 und TGF- β 3 im Komplex mit ALK1 und dem T β RII finden (Attisano, Carcamo et al. 1993; Bassing, Yingling et al. 1994; Oh, Seki et al. 2000). Jedoch zeigen nur Lux, Attisano et al. (1999) eine leichte Promotorstimulation durch ALK1 nach Zugabe von TGF- β 1 oder -3, die anderen Veröffentlichungen können keine funktionelle Signaltransduktion von TGF- β über ALK1 nachweisen. Somit ist auch in der Literatur nicht eindeutig nachgewiesen, dass TGF- β 1 und -3 funktionelle Interaktionspartner von ALK1 sind. Insgesamt sprechen die Ergebnisse sowohl der Id1-Promotorstudien als auch der Genexpressionsanalysen und der Proliferationsassays gegen eine Rolle für TGF- β 1 und -3 als Liganden von ALK1. Diese These wird durch die Untersuchungen von Wu, Ma et al. (2006) und Lux, Salway et al. (2006) bestätigt, die in Microarrays und RT-PCRs unterschiedliche Profile der Genregulation für TGF- β 1 und ALK1-Q/D finden. Weiterhin unterstützten die Ergebnisse von Iso, Maeno et al. (2006) die Annahme, dass TGF- β 1 nicht mit ALK1 interagiert: In HUVECs kann die Stimulation mit TGF- β 1 nicht - wie ALK1-Q/D - die Induktion des arteriellen Marker-Gens HERP1 stimulieren, trotz der Anwesenheit von endogenem ALK1.

4.2.2.3. TGF- β 2, GDF-15 und Aktivin A, AB und B verstärken die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung

TGF β -2 allein hat bereits einen leicht stimulierenden Einfluss auf den Id1-Promotor, vergrößert aber auch zusätzlich die durch ALK1-Transfektion vermittelte Aktivierung, mit steigender Menge an ALK1 umso mehr. Diese Befunde legen TGF- β 2 als Ligand für ALK1 nahe, obwohl die These einigen Literaturergebnissen widerspricht. Zum Beispiel zeigten Attisano, Carcamo et al. (1993), dass TGF- β 2 nur mit erheblich niedrigerer Affinität als TGF- β 1 an einen Komplex aus ALK1 und T β RII bindet. Lux, Attisano et al. (1999) wiesen ebenfalls lediglich eine ALK1-Signaltransduktion durch TGF- β 1 und -3 nach, aber nicht durch TGF- β 2. Auch im Komplex mit T β RII-B stimuliert ALK1 nach Zugabe von TGF- β 2 nicht den TGF- β /Aktivin-responsiven PAI-1-Promotor (Rotzer, Roth et al. 2001). Jedoch könnte ALK1 mit einem anderen Typ II-Rezeptor außer T β RII bzw. T β RII-B einen Komplex bilden und dann TGF- β 2 binden. In den Veröffentlichungen wurde nicht der BMP-responsive Id1-Promotor untersucht, dessen Aktivierung über Smad1/5 vermittelt wird, sondern nur der Smad2/3-Signalweg, der zur PAI-1-Promotorinduktion führt.

Daher kommt TGF- β 2 weiterhin trotz der Literaturdaten als Ligand für ALK1 in Frage. Des Weiteren liegen TGF- β 1, -2 und -3 zwar vor allem als Homodimere vor, kommen aber auch als Heterodimere vor (Cheifetz, Weatherbee et al. 1987). Eventuell könnte somit auch ein TGF- β 2-Heterodimer mit TGF- β 1 oder -3 eine Rolle in der ALK1-Signaltransduktion spielen.

Id1 wird durch GDF-15 alleine kaum stimuliert, aber die Aktivierung wird mit steigenden Konzentrationen von ALK1 verstärkt. Die GDF-15-Expression wird durch ALK1-Q/D aktiviert, weswegen Lamouille, Mallet et al. (2002) vermuten, dass GDF-15 der Ligand von ALK1 sein könnte und eine Aktivierung von ALK1 daher die Synthese des eigenen Liganden stimuliert. Solch ein positiver Rückkopplungsmechanismus wurde bereits für TGF- β 1 gezeigt, welches seine eigene Expression und die seiner Rezeptoren initiiert (Van Obberghen-Schilling, Roche et al. 1988; Morgan, Rozovsky et al. 2000). Zusammen mit diesem Befund deuten die Ergebnisse aus den Id1-Reporterstudien darauf hin, dass GDF-15 ein potentieller Ligand für ALK1 ist.

Aktivin A allein erhöht die Id1-Promotor-Aktivität leicht, Aktivin AB deutlich und Aktivin B sehr stark. Zusammen mit ALK1 intensivieren alle drei Aktivine dessen Id1-Stimulation. Die Vermutung, dass Aktivin A daher ein Interaktionspartner von ALK1 sein könnte, wird in der Literatur zum Teil bestätigt. Wenn ALK1 mit ActRII oder ActRIIB kotransfiziert wird, bindet es Aktivin A (Attisano, Carcamo et al. 1993; Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000). Jedoch vermitteln diese Komplexe nicht die übliche Stimulation eines Aktivin-responsiven Promotors nach Zugabe von Aktivin A (Attisano, Carcamo et al. 1993). Auch Lux, Attisano et al. (1999) finden keine

ALK1-Signaltransduktion durch Aktivin A. In den Proliferationsassays mit ALK1-exprimierenden MVECs wirkt Aktivin A mit steigender Konzentration hemmend auf das Zellwachstum, was eine Rolle als Ligand für ALK1 unwahrscheinlich werden lässt. Ein potentieller Ligand nämlich sollte die gegenteilige Wirkung wie ALK1/Fc zeigen, also stimulieren. Jedoch ist dieser Assay nicht unbedingt sensitiv, da eine Reihe anderer Faktoren Einfluss auf die Proliferation haben können. Außerdem könnte Aktivin bei einer Konzentration unterhalb von 0,5 ng/ml oder oberhalb von 5 ng/ml eine andere Wirkung zeigen. Aktivin AB und Aktivin B wurden im Zusammenhang mit ALK1 in der Literatur nicht weiter untersucht. Aufgrund der Ergebnisse aus den Luziferase-Reporterassays kommen Aktivin A, AB und B als Liganden für ALK1 in Frage.

4.2.3. Endoglin, ALK5 und BMPRII sind potentielle Interaktionspartner von ALK1

Die eindeutige Zusammensetzung des ALK1-Signalkomplexes ist noch nicht aufgeklärt. Die Identifizierung des physiologischen Typ II-Rezeptors für ALK1 gestaltet sich schwierig, da ALK1 den Typ II-Rezeptor nur ligandeninduziert binden kann (Wrana, Attisano et al. 1992). Zwar wird vielfach der T β RII als kooperierender Typ II-Rezeptor vorgeschlagen, jedoch gelingt außer bei Oh, Seki et al. (2000) eine Koimmunopräzipitation nur nach Überexpression beider Rezeptoren (Attisano, Carcamo et al. 1993; Bassing, Yingling et al. 1994; ten Dijke, Yamashita et al. 1994; De Winter, De Vries et al. 1996; Lux, Attisano et al. 1999; Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000). Nach Transfektion der entsprechenden Rezeptoren findet sich ALK1 aber auch im Komplex ActRII oder ActRIIB (Attisano, Carcamo et al. 1993; Lux, Attisano et al. 1999; Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000). Außerdem führen diese ALK1/T β RII-Komplexe nicht zu den üblichen TGF- β - bzw. Aktivin-vermittelten Effekten wie der Aktivierung des PAI-1-Promoters (Attisano, Carcamo et al. 1993; ten Dijke, Ichijo et al. 1993; Bassing, Yingling et al. 1994; Carcamo, Weis et al. 1994). Weiterhin zeigten Goumans, Valdimarsdottir et al. (2003), dass sich ALK5 im Komplex mit ALK1 befindet und das ALK1-Signal verstärkt; eine Tatsache die zunächst unwahrscheinlich erscheint, da ALK5 und ALK1 die Signaltransduktion in ECs entgegengesetzt regulieren (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002; Ota, Fujii et al. 2002; Goumans, Valdimarsdottir et al. 2003). Endoglin wurde ebenfalls im Komplex mit ALK1 gefunden, und scheint für die ALK1-Signaltransduktion notwendig zu sein (Lebrin, Goumans et al. 2004; Blanco, Santibanez et al. 2005).

Mittels Id1-Reporterassays wurde analysiert, welchen Einfluss die Kotransfektion verschiedener Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie auf die ALK1-vermittelte Stimulation des Id1-Promoters haben. So kann darauf zurückgeschlossen werden, welche dieser Rezeptoren als funktionelle Interaktionspartner für ALK1 in Frage kommen. Weiterhin wurde als Gegenprobe untersucht, wie sich die Zugabe eines Endoglin-Antikörpers oder der extrazellulären Domänen verschiedener Typ II-Rezeptoren (mit Fc-tag) auf die kooperative Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1 und Endoglin auswirkt. Die extrazellulären Domänen können

inaktive Heterodimere bilden oder den Liganden wegfangen, und so die ALK1-Signaltransduktion hemmen, falls die entsprechenden Typ II-Rezeptoren Kooperationspartner für ALK1 sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Stimulation durch Endoglin um ein Vielfaches gesteigert wird, dass ALK5 und BMPRII sie verstärken, während T β RII sie deutlich reduziert. Die kooperative Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1 und Endoglin wird durch ALK1/Fc, anti-Endoglin, BMPRII/Fc und ActRIIB/Fc gesenkt, wohingegen ActRIIA/Fc und T β RII/Fc keinen signifikant inhibierenden Effekt zeigen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ALK1 entgegen der Literaturangaben nicht mit T β RII und ActRIIA interagiert. Stattdessen könnten BMPRII oder möglicherweise auch ActRIIB Komplexe mit ALK1 bilden. Die Verstärkung des ALK1-Signals durch ALK5 deutet darauf hin, dass ALK5 ebenfalls ein Mitglied des Signalkomplexes sein könnte. Vor allem konnte mit den Versuchen eindeutig gezeigt werden, dass ALK1 und Endoglin interagieren und diese funktionelle Kooperation auf einer physikalischen Interaktion beruht.

4.2.3.1. Endoglin potenziert die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung

Transfektion mit dem Korezeptor Endoglin hat allein lediglich eine sehr schwach stimulierende Wirkung auf den Id1-Promotor, potenziert aber die ALK1-vermittelte Aktivierung. Mit ALK5 zeigt Endoglin diese Verstärkung der Id1-Promotor-Stimulation nicht. Dies beweist, dass Endoglin spezifisch den ALK1-Signalweg verstärkt. Da sich die Signale gegenseitig amplifizieren und nicht nur additiv verhalten, wirken ALK1 und Endoglin nicht unabhängig voneinander, sondern interagieren. Diese kooperative Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1 und Endoglin wird sowohl durch ALK1/Fc als auch durch einen Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne von Endoglin gerichtet ist, deutlich gesenkt. Der Antikörper verhindert vermutlich die Bildung von ALK1/Endoglin-Komplexen, indem er Bindungsstellen für ALK1 auf Endoglin blockiert. Ähnlich dürften sich durch die Zugabe eines Überschusses an ALK1/Fc nur inaktive ALK1-Signalkomplexe bilden. Die Hemmung der Id1-Promotor-Aktivierung durch ALK1/Fc und den Endoglin-Antikörper zeigt, dass funktionelle Komplexe aus ALK1 und Endoglin für die ALK1-Signaltransduktion notwendig sind. Diese Komplexbildung entspricht den Angaben in der Literatur. Werden Endoglin und ALK1 überexprimiert, können sie ligandenunabhängig koimmunopräzipitiert werden (Lux, Attisano et al. 1999). Sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Domäne von Endoglin interagieren mit ALK1 (Blanco, Santibanez et al. 2005). Die funktionelle Kooperation zwischen ALK1 und Endoglin wird durch weitere Experimente unterstützt: Endoglin verstärkt in Gegenwart von aktivierbarem ALK1 die TGF- β 1-induzierte Smad1-Phosphorylierung und Id1-Promotor-Aktivierung, und ALK1 ist für die Endoglin-stimulierte EC-Proliferation nötig (Lebrin, Goumans et al. 2004; Blanco, Santibanez et al. 2005).

Somit bestärken die Ergebnisse der Id1-Reporterassays die Erkenntnis, dass Endoglin im Komplex mit ALK1 vorliegt und dessen Signaltransduktion verstärkt.

4.2.3.2. ALK5 verstärkt die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung

Wird ALK5 im Luziferase-Reporterassay zusätzlich zu ALK1 kotransfiziert, wird die ALK1-induzierte Id1-Promotor-Stimulation multipliziert. Obwohl ALK5 und ALK1 die Signaltransduktion in ECs entgegengesetzt regulieren (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002; Ota, Fujii et al. 2002; Goumans, Valdimarsdottir et al. 2003), verstärkt ALK5 eindeutig das ALK1-Signal. Dies könnte dafür sprechen, dass ALK5 ebenfalls ein Mitglied im ALK1-Signalkomplex ist; eine These, die auch in einigen Veröffentlichungen vertreten wird. Goumans, Valdimarsdottir et al. (2003) zum Beispiel finden ALK5 durch TGF- β induziert im Komplex mit ALK1 und zeigen, dass ALK5 eine optimale ALK1-Signaltransduktion begünstigt. Weiterhin ist sowohl ALK1 als auch ALK5 notwendig für die Endoglin-stimulierte EC-Proliferation (Lebrin, Goumans et al. 2004). Im Einklang mit den Daten aus der Literatur legen die eigenen Ergebnisse eine funktionelle Interaktion zwischen ALK1 und ALK5 nahe.

4.2.3.3. BMPRII verstärkt die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung

Die Aktivierung des Id1-Promotors durch ALK1 und BMPRII verhält sich additiv, und BMPRII/Fc hemmt die kooperative Id1-Promotor-Stimulation durch ALK1 und Endoglin signifikant. Weiterhin lässt sich in Proliferationsassays mit ECs zeigen, dass BMPRII/Fc eine ähnlich wachstumshemmende Wirkung wie ALK1/Fc. Diese Ergebnisse legen nahe, dass BMPRII eine ähnliche Rolle in ECs und in der Angiogenese spielen könnte wie ALK1. Die Aktivierung beider Rezeptoren führt zur Phosphorylierung von Smad1/5 und unter anderem zur Expression von proliferations-, überlebens- oder angiogenese-fördernden Proteinen wie Id1 (Miyazono und Miyazawa 2002). Im Menschen wird die primäre pulmonale Hypertonie (Lungenhochdruck) sowohl mit Mutationen im BMPRII in Verbindung gebracht (Lane, Machado et al. 2000), als auch mit Mutationen in ALK1 in manchen HHT2-Patienten (Trembath, Thomson et al. 2001). Dabei handelt es sich um eine vaskuläre Erkrankung, die durch anhaltenden arteriellen Druck in der Lunge verursacht wird und zu unkontrolliertem Remodeling der Lungenarterien führt. Außerdem könnte ALK1 gemeinsam mit BMPRII eine Rolle in der Osteogenese spielen. Die Hemmung der BMPRII-Expression durch ALK1/Fc im Array ist ein weiterer Hinweis darauf, dass BMPRII der zugehörige Typ II-Rezeptor von ALK1 ist. Dabei könnte es sich um einen positiven Rückkopplungsmechanismus handeln, wodurch die Aktivierung von ALK1 die Synthese der verschiedenen Komponenten seines eigenen Rezeptorkomplexes stimuliert. Auch Lamouille, Mallet et al. (2002) berichten, dass die BMPRII-Expression durch Transfektion mit ALK1-Q/D aktiviert wird. Möglicherweise konvergieren die Signalwege von ALK1 und BMPRII also nicht nur in denselben Signaltransduktionsmolekülen und Zielgenen, sondern es könnte sich um

Mitglieder des gleichen Signaltransduktionsweges handeln, die Interaktionspartner sein könnten.

4.2.3.4. T β RII hemmt die ALK1-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung

Durch T β RII wird die basale Id1-Promotor-Aktivität gehemmt, und eine Kotransfektion von T β RII zu ALK1 senkt außerdem dessen Id1-Promotor-Stimulation. Dies deutet darauf hin, dass der T β RII nicht der kooperierende Typ II-Rezeptor für ALK1 ist. Es ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, dass die Hemmung des ALK1-Signals durch einen negativen feedback-Mechanismus bewirkt wird, und der T β RII doch als Interaktionspartner für ALK1 in Frage kommt. Jedoch wurde bereits bei einer Transfektion mit geringen Mengen des T β RII-Plasmids eine Inhibition beobachtet, was diese Möglichkeit unwahrscheinlich erscheinen lässt. Da außerdem T β RII/Fc nicht wie ALK1/Fc die ALK1/Endoglin-vermittelte Id1-Promotor-Aktivierung hemmt, scheint T β RII kein Mitglied des ALK1-Signalkomplexes zu sein. Auch im *in vitro*-Proliferationsassay zeigt T β RII/Fc im Gegensatz zu ALK1/Fc keinen Einfluss auf das EC-Wachstum. Weiterhin wurde in den Affymetrix-Studien nachgewiesen, dass ALK1/Fc die Expression von T β RII erhöht, seine Expression also durch ALK1 blockiert werden sollte. Auch Ota, Fujii et al. (2002) und Lux, Salway et al. (2006) zeigen, dass die Transfektion von ECs mit ALK1-Q/D die T β RII-Expression hemmt. Dies könnte darauf hindeuten, dass T β RII nicht als Oligomerisierungspartner für ALK1 in Frage kommt, da keine positive Rückkopplung stattfindet wie bei einer Aktivierung des TGF- β 1-Signalweges. All diese Befunde sprechen daher gegen eine funktionelle Kooperation zwischen ALK1 und T β RII. Andererseits widerspricht diese These den Angaben in der Literatur. ALK1 wurde sowohl ligandenunabhängig als auch ligandeninduziert im Komplex mit T β RII gefunden (Attisano, Carcamo et al. 1993; Bassing, Yingling et al. 1994; ten Dijke, Yamashita et al. 1994; De Winter, De Vries et al. 1996; Lux, Attisano et al. 1999; Abdalla, Pece-Barbara et al. 2000; Oh, Seki et al. 2000). Die TGF- β 3-induzierte Smad1/5-Phosphorylierung, die über ALK1 vermittelt werden könnte, benötigt den funktionellen T β RII (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2003). Auch für die Endoglin-induzierte EC-Proliferation sind ALK1 und T β RII beide notwendig (Lebrin, Goumans et al. 2004), was eine Interaktion der Rezeptoren impliziert. Allerdings wurden die meisten Untersuchungen nicht unter physiologischen Bedingungen durchgeführt; fast alle Veröffentlichungen analysieren die Komplexbildung und Signaltransduktion lediglich nach exogener Überexpression der Rezeptoren, nur Oh, Seki et al. (2000) wiesen die ALK1/T β RII-Komplexe in untransfizierten ECs nach. Im Widerspruch zur letztgenannten Veröffentlichung fanden aber Abdalla, Pece-Barbara et al. (2000) in untransfizierten ECs ALK1 nicht zusammen mit T β RII in TGF- β -induzierten Komplexen. Eine mögliche Kooperation zwischen ALK1 und T β RII ist daher weiterhin nicht eindeutig geklärt und scheint aufgrund der dargestellten Ergebnisse unwahrscheinlich.

4.2.3.5. Die Hemmung des ActRIIB hemmt den ALK1-Signalweg, die Hemmung des ActRIIA hat keine Auswirkung

Im Luziferase-Reporter-Gen-Assay reduziert die Zugabe von ActRIIB/Fc die kooperative Id1-Promotor-Aktivierung durch Alk1 und Endoglin. Die extrazelluläre Domäne des ActRIIA hat nur einen sehr geringen inhibierenden Einfluss. Auch auf die Proliferation von ECs *in vitro* zeigt ActRIIA/Fc keinen Effekt. Diese Ergebnisse sprechen für eine funktionelle Kooperation zwischen ALK1 und ActRIIB, nicht aber ActRIIA. Zwar wurde ALK1 nach Zugabe von Aktivin A sowohl mit ActRIIA als auch ActRIIB im Komplex gefunden (Attisano, Carcamo et al. 1993; De Winter, De Vries et al. 1996), jedoch vermittelt keiner der beiden Komplexe eine Stimulation des Aktivin-induzierbaren PAI-1-Promotors (Attisano, Carcamo et al. 1993). ActRIIA scheint also gemeinsam mit ALK1 weder ein Signal über den TGF- β /Aktivin-induzierten Smad2/3-PAI-1-Signalweg zu übertragen, noch einen Einfluss auf den BMP-induzierten Smad1/5-Id1-Signalweg zu haben. Im Gegensatz dazu zeigt ein ALK1/ActRIIB-Komplex zwar keinen Einfluss auf den PAI-1-Promotor, könnte aber über Smad1/5 eine Id1-Stimulation vermitteln. Die Interaktion von ALK1 und ActRIIB innerhalb dieses Signalweges ist in der Literatur nicht weiter untersucht worden. Eine Kooperation zwischen ALK1 und ActRIIB ist daher möglich, muss aber noch genauer untersucht werden.

4.2.4. ALK1 phosphoryliert Smad1/5/8 und reguliert sein eigenes Signal

Die Transfektion von PAECs mit ALK1 (wt) und vor allem mit konstitutiv aktivem ALK1-Q/D führt zu verstärkter Smad1/5/8-Phosphorylierung, wohingegen durch die Transfektion mit dominant negativem ALK1-K/R Smad1/5/8 nicht phosphoryliert wird. Im Gegensatz dazu wird die Smad2/3-Phosphorylierung durch ALK1 eher unterdrückt. Dies wird in der Literatur bestätigt: Macias-Silva, Hoodless et al. (1998), Chen und Massague (1999) und Oh, Seki et al. (2000) fanden, dass Smad1 durch ALK1 phosphoryliert und aktiviert wird, und Goumans, Valdimarsdottir et al. (2002) zeigten, dass sich die Smad1/5-Phosphorylierung in ECs durch Inhibition der ALK1-Expression blockieren lässt.

In Affymetrix-Arrays wurde der Einfluss der extrazellulären Domäne von ALK1, die die ALK1-Signaltransduktion inhibiert, auf die Genexpression von MVECs analysiert. ALK1/Fc sollte daher die Aktivierung von ALK1-Zielgenen blockieren bzw. verhindern, dass von ALK1 negativ regulierte Gene gehemmt werden. Daher gibt die Hemmung eines Gens durch ALK1/Fc einen Hinweis darauf, dass dieses Gen von ALK1 stimuliert werden könnte. Die Aktivierung eines Genen durch ALK1/Fc hingegen deutet darauf hin, dass dieses Gen von ALK1 inhibiert werden könnte.

Die Expression von Smad4, welches das Signal der TGF- β -Rezeptoren in den Zellkern weiterleitet, wird in den Array-Analysen durch ALK1/Fc vor allem nach 2 Std. gehemmt. Dies

bedeutet, dass ALK1 die Smad4-Expression aktivieren könnte, also dadurch sein eigenes Signal direkt nach der Aktivierung verstärken würde. Weiterhin werden die inhibitorischen Smads Smad6 und -7 zu fast allen Zeitpunkten von ALK1/Fc inhibiert. ALK1 könnte daher deren Expression stimulieren, und somit seiner eigenen Aktivierung mittels negativem Feedback-Mechanismus entgegensteuern. Mehrere Veröffentlichungen unterstützen diese These, da die Expression von Smad6 und -7 durch ALK1-Q/D erhöht wird (Ota, Fujii et al. 2002; Lux, Salway et al. 2006; Valdimarsdottir, Goumans et al. 2006; Wu, Ma et al. 2006). Zusätzlich wird die Noggin-Expression durch ALK1/Fc gesenkt, könnte also durch ALK1 ebenfalls stimuliert werden. Da Noggin die BMP-Signaltransduktion durch Bindung an BMPs inhibiert (Zimmerman, De Jesus-Escobar et al. 1996), würde auch seine Stimulation zur negativen Regulation des ALK1-Signals beitragen, falls ALK1 durch die BMPs aktiviert wird. Außerdem wird BAMBI, ein weiterer Regulator der BMP- und Aktivin-Signalwege, durch ALK1/Fc herabreguliert, also möglicherweise durch ALK1 induziert. BAMBI könnte mit ALK1, wie mit anderen Typ I Rezeptoren, nicht aktivierbare Komplexe bilden und so die Transphosphorylierung von ALK1 verhindern.

4.2.5. Das Genexpressionsprofil von ALK1/Fc gibt Hinweise auf die Zielgene von ALK1

4.2.5.1. Die Zielgene von ALK1 spielen eine Rolle in der Aktivierungsphase der Angiogenese

Um indirekt die Transkriptionsregulation von ALK1 untersuchen zu können, wurde in Affymetrix-Arrays der Einfluss von hALK1/Fc auf die Genexpression von MVECs analysiert. Die Expression von einigen Genen nach Zugabe von ALK/Fc wurde weiterhin in RT-PCRs überprüft. Zusätzlich wurde im Luziferase-Reporterassay untersucht, ob Id1- und Endoglin-Promotor tatsächlich durch ALK1 induziert werden.

Wie in Kapitel 4.2.1. beschrieben, inhibiert ALK1/Fc die ALK1-Signaltransduktion. Daher kommen Gene, welche von ALK1/Fc stimuliert werden, als von ALK1 negativ regulierte Gene in Frage, während von ALK1/Fc inhibierte Gene potentielle ALK1-aktivierte Zielgene sind. Die Betrachtung dieser Gene gibt Hinweise auf eine Funktion von ALK1 in ECs und während der Angiogenese. Dabei sind vor allem die „early response genes“, die nach 1-6 Stunden reguliert werden, direkte ALK1-Zielgene. Die im Array nach 24 Std. detektierten Gene sind „late response genes“, die eher indirekt durch ALK1 beeinflusst werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass je Zeitpunkt nur ein Chip verwendet wurde, und weitere Bestätigungen der Messungen unabdingbar sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ALK1 vermutlich eher Gene der Aktivierungs- als der Resolutionsphase aktiviert. So werden Gene wie Id1, Id2, IL1RL1, TAO1, CDK6 und Zyklin M1, die Proliferation, Zellzyklus oder Angiogenese vorantreiben, durch ALK1/Fc gehemmt, würden also durch ALK1 stimuliert. Auch im Reporterassay wird der Id1-Promotor sowohl durch ALK1 (wt) als auch durch ALK1-Q/D stimuliert. Diese Befunde werden in der Literatur bestätigt,

so wird die Id1-, Id2- und IL1RL1-Expression durch Infektion mit ALK1-Q/D ebenfalls aktiviert (Lamouille, Mallet et al. 2002; Ota, Fujii et al. 2002; Lux, Salway et al. 2006). Weiterhin wird das Zytoskelett-Protein abLIM1, das die Motilität und Invasion der ECs erleichtert, vermutlich durch ALK1 heraufreguliert, da es zu frühen Zeitpunkten von ALK1/Fc inhibiert wird. Die Expression von PCPE2, das die Collagen-Ablagerung fördert, wird von ALK1/Fc ebenfalls früh inhibiert und anschließend aktiviert. ALK1 würde daher diesen wichtigen Schritt, der z.B. während der Wundheilung und der Knorpelbildung durch BMP induziert wird, erst verstärken und dann hemmen. Die Expression der Zelladhäsions- und Matrixproteine Thrombospondin 1, Trophinin, Cadherin 19 und Contactin 1 wird zu verschiedenen Zeitpunkten durch ALK1/Fc aktiviert, und müsste daher von ALK1 verringert werden. Dadurch würde die Migration der ECs zusätzlich begünstigt, indem unter anderem Zell-Zell-Kontakte gelöst und Proteasen aktiviert werden, eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierungsphase der Angiogenese. Die Differenzierungs- und Überlebensgene CDK9, PAC1, LPA1 und Mortalin-2 werden zu den meisten Zeitpunkten durch ALK1/Fc stimuliert. ALK1 würde die Expression dieser Proteine, die vermutlich in der späteren Resolutionsphase eine Rolle spielen, daher eher hemmen. All diese Befunde legen, übereinstimmend mit Goumans, Valdimarsdottir et al. (2002), Ota, Fujii et al. (2002), Goumans, Valdimarsdottir et al. (2003) und Wu, Ma et al. (2006) nahe, dass ALK1 in der Aktivierungsphase der Angiogenese involviert ist.

Der akzessorische Typ III-Rezeptor Endoglin wird in einigen Veröffentlichungen als Zielgen von ALK1 genannt (Ota, Fujii et al. 2002; Fernandez-L, Sanz-Rodriguez et al. 2005; Lux, Salway et al. 2006). Jedoch konnte eine Stimulation des humanen Endoglin-Promotors durch ALK1 im Luziferase-Reporterassay nicht gezeigt werden, es tritt sogar eine leichte Hemmung durch ALK1 (wt) und durch ALK1-K/R auf. Die deutliche Aktivierung durch TGF- β 1 zeigt aber, dass der Endoglin-Promotor im untersuchten System prinzipiell funktioniert. Die eigenen Ergebnisse stehen in direktem Widerspruch zu der Veröffentlichung von Fernandez-L, Sanz-Rodriguez et al. (2005), die eine Stimulation des Endoglin-Promotors durch ALK1 und ALK1Q/D in Reporterstudien zeigen. Allerdings ist zu beachten, dass Fernandez-L, Sanz-Rodriguez et al. (2005) ihre Experimente in BOECs, nicht in HepG2, durchgeführt haben, und den Endoglin-Promotor von Position -450 bis +350 statt von -397 bis +341 verwendet haben. Auch in den RT-PCRs mit MVECs wird die Endoglin-Expression nicht durch ALK1/Fc beeinflusst. In den Array-Untersuchungen konnte die Expression nicht untersucht werden, da sich Endoglin nicht auf dem Chip befand. Die negativen Ergebnisse des Reporterassays und der RT-PCR-Expressionsanalyse werden zum Teil in der Literatur bestätigt; so finden Lamouille, Mallet et al. (2002) und Wu, Ma et al. (2006) in primären mikrovaskulären Endothelzellen ebenfalls keine Erhöhung der Endoglin-Expression durch ALK1-Q/D. Lux, Salway et al. (2006) können in ihren Experimenten beide Fälle belegen: die ECRF24-Zelllinie, die von humanen venösen Nabelschnur-Endothelzellen stammt, zeigt keine Regulation von Endoglin durch ALK1-Q/D,

während in primären HUVEC und in der humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie HMEC-1 die Endoglin-Expression durch ALK1-Q/D aktiviert wird. Diese Beobachtungen legen nahe, dass zwischen verschiedenen Endothelzelltypen beträchtliche Unterschiede in der ALK1-induzierten Genexpression herrschen.

In den Affymetrix-Analysen wurden überraschenderweise mehrere neuronale Proteine gefunden, die von ALK1/Fc reguliert werden. PAC1 zum Beispiel wirkt neuroprotektiv (Dejda, Sokolowska et al. 2005; Dvorakova 2005), LPA spielt vor allem eine Rolle in der neuronalen Entwicklung (Moolenaar, Kranenburg et al. 1997), Cdk9 reguliert die neuronale Differenzierung (De Falco, Bellan et al. 2005), abLIM könnte unter anderem eine Rolle in der Axonlenkung spielen (Roof, Hayes et al. 1997), und Contactin 1 trägt zur cerebellaren Microorganisation bei (Berglund, Murai et al. 1999). Diese Befunde lassen vermuten, dass ECs ähnliche Proteine zur Signalvermittlung während Migration, Differenzierung und Überleben verwenden wie Neuronen. König, Kogel et al. (2005) konnten sogar ALK1-Expression auf Neuronen detektieren und sprechen ihm eine Rolle in der Neuroprotektion zu.

4.2.5.2. TGF- β 1 reguliert die meisten Gene genau entgegengesetzt zu ALK1

Außerdem konnte in den Array-Untersuchungen auf ECs eine antiproliferative und antiangiogene Wirkung von hohen TGF- β 1-Konzentrationen (Gajdusek, Luo et al. 1993; Pepper, Vassalli et al. 1993) bestätigt werden: IL1RL1, TAO1, CDK6 und Cyclin M1, die fördernd auf Proliferation, Zellzyklusprogression oder Angiogenese wirken, werden gehemmt. Im Gegensatz dazu werden Differenzierungs- und Überlebensgene wie CDK9, PAC1 und Mortalin-2 durch TGF- β 1 eher aktiviert. Weiterhin blockiert TGF- β 1 Thrombospondin 1, Trophinin, Cadherin 19 und Contactin 1, wodurch die Migration der ECs verhindert wird, da dadurch z.B. Zell-Zell-Kontakte gestärkt werden. Somit scheint TGF- β 1 in hohen Konzentrationen die Resolutionsphase der Angiogenese zu begünstigen, wie bereits in der Literatur angedeutet. Es ist bekannt, dass TGF- β für die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen notwendig ist, was zur Reifung und Stabilisierung der Gefäße führt (Pepper 1997). Die im Array betrachteten Gene werden zum Großteil durch TGF- β 1 genau entgegengesetzt reguliert wie durch ALK1. Auch Lux, Salway et al. (2006) und Wu, Ma et al. (2006) beobachteten deutliche Unterschiede in der Genregulation zwischen ALK1-Q/D und TGF- β 1. Dies spricht erneut dafür, dass ALK1 eine Rolle in der Aktivierungsphase spielt, während TGF- β eher über ALK5 die Resolutionsphase reguliert. Die Wirkung von TGF- β müsste jedoch noch in niedrigeren Konzentrationen untersucht werden, da TGF- β einen biphasischen Effekt auf ECs besitzt, also in geringer Konzentration deren Migration stimuliert (Gajdusek, Luo et al. 1993; Pepper, Vassalli et al. 1993).

4.3. Die Rolle von ALK1 bei der EC-Proliferation *in vitro*

4.3.1. Die Hemmung von ALK1 führt zu verringerter EC-Proliferation

Die zellulären Funktionen von ALK1 wurden analysiert, indem in EC-Proliferations-Assays die ALK1-Signaltransduktion durch Zugabe der extrazellulären Domäne von ALK1 inhibiert wurde. Wie bereits in Kapitel 4.2.1. beschrieben, formt die extrazelluläre Domäne von ALK1 wahrscheinlich inaktive Heterodimere mit den Typ II Rezeptoren für ALK1. Dadurch hemmen ALK1/Fc (mit Fc-tag) und ALK1.ec (ohne Fc-tag) die ALK1-Signalweitergabe, was durch die Hemmung sowohl der Smad1/5-Phosphorylierung als auch der Id1-Promotor-Stimulation nachgewiesen wurde.

Die extrazelluläre Domäne von ALK1 verringert die durch VEGF oder bFGF stimulierte *in vitro*-Proliferation von primären humanen ECs. Dies bedeutet, dass die reduzierte EC-Proliferation durch eine Reduktion des ALK1-Signals ausgelöst werden muss. Also stimuliert ALK1 das Wachstum der ECs, was wiederum für eine Rolle von ALK1 in der Aktivierungsphase der Angiogenese spricht. Die Analyse der Genregulation von ALK1 (siehe 4.2.5.) untermauert diese These zusätzlich, da ALK1 vorwiegend Gene heraufreguliert, die Proliferation und Migration fördern, bzw. ALK1 die Expression von Genen supprimiert, die Motilität und Invasion der ECs verhindern oder deren Differenzierung anregen. In der Literatur wird mehrfach gefolgert, dass ALK1 in der Aktivierungsphase der Angiogenese involviert ist: die adenovirale Expression von konstitutiv aktivem ALK1 in ECs führt zu verstärkter Proliferation, Migration und Tube-Formation der ECs, und verstärkt die Expression proliferations- und angiogenesefördernde Gene (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002; Ota, Fujii et al. 2002; Wu, Ma et al. 2006).

Die Proliferationshemmung durch hALK1/Fc und mALK1/Fc ist ungefähr gleich effektiv, während die Inhibition durch CHO-ALK1.ec etwas geringer ausfällt. Einerseits wird dadurch bestätigt, dass der Effekt nicht allein durch den Fc-tag hervorgerufen wird. Andererseits legt diese Beobachtung nahe, dass die Hemmung durch die beiden Fc-gekoppelten extrazellulären Domänen stärker ist, da diese als Dimere vorliegen. Da auch murines ALK1/Fc die Proliferation von humanen ECs hemmt, wird durch den EC-Proliferationsassay weiterhin gezeigt, dass humanes und murines ALK1 kreuzreaktiv sind. Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da in der extrazellulären Domäne die Sequenzidentität und die Konsensussequenz zwischen humanem und murinem ALK1 nur 68% bzw. 76% (AlignX, Vector NTI) betragen.

Die extrazellulären Domänen von ActRIIA und T β RII haben keinen Einfluss auf das EC-Wachstum *in vitro*, während BMPRII/Fc dieses leicht hemmt. Diese Befunde machen deutlich, dass der proliferationsfördernde Effekt ALK1- und BMPRII-spezifisch ist.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass ALK1/Fc und ALK1.ec das Wachstum der Tumorzelllinie A375 nicht beeinflussen. Dies bestätigt, dass die Wirkung von ALK1 EC-spezifisch ist, da nur ECs ALK1 exprimieren.

4.4. Die Rolle von ALK1 während der Tumorangiogenese

Wie bereits durch die Hemmung der Smad1/5-Phosphorylierung und der Id1-Promotor-Stimulation nachgewiesen, blockiert die extrazelluläre Domäne von ALK1 die ALK1-Signaltransduktion (siehe 4.2.1.). Weiterhin zeigen die Analyse der Genregulation und die Wirkung auf die *in vitro*-Proliferation von ECs, dass ALK1/Fc und ALK1.ec erfolgreich als Werkzeug eingesetzt werden können, um die Rolle von ALK1 in der Zelle zu untersuchen (siehe 4.2.5. und 4.3.). Daher wurde der Einfluss der extrazellulären Domäne von ALK1 auf die Tumorangiogenese untersucht, um auch die *in vivo*-Funktionen von ALK1 anhand ihrer Hemmung zu betrachten.

Dazu wurde die humane Melanoma-Zelllinie A375, die selbst kein ALK1 exprimiert, stabil mit der sezernierten extrazellulären Domäne von humanem und murinem ALK1 transfiziert und in Nacktmäuse injiziert. Da im Proliferationsassay hALK1/Fc und mALK1/Fc das Wachstum von humanen ECs gleich stark hemmen, kann man davon ausgehen, dass humanes und murines ALK1 kreuzreaktiv sind und auch die extrazelluläre Domäne des humanen ALK1 mit dem murinem ALK1 der ECs in den Nacktmäusen interagiert. Es wurde die Sequenz für die extrazelluläre Domäne ohne Fc-tag verwendet, um jeglichen Einfluss des Fc-tags auszuschließen.

Um auszuschließen, dass die extrazelluläre Domäne von ALK1 das Wachstum der A375-Zellen selbst hemmt, wurde mittels *in vitro*-Proliferationsassays bestätigt, dass die Zugabe von hALK/Fc, mALK1/Fc und CHO-hALK1.ec keinen Einfluss auf das Tumorzellwachstum hat. Dies entspricht den Erwartungen, da A375-Zellen kein ALK1 exprimieren, und daher eine Störung des ALK1-Signalwegs ihre Proliferation, im Gegensatz zur EC-Proliferation, nicht beeinflussen sollte.

4.4.1. Die Hemmung von ALK1 führt zu verringerter Tumervaskularisierung

Die Expression von CD31-mRNA konnte als Maß für die Vaskularisierung der Tumore verwendet werden, da CD31 ausschließlich auf ECs exprimiert wird. Alle A375-ALK1.ec-Tumore exprimieren im Durchschnitt viermal weniger CD31-mRNA als die Vergleichstumore der mit dem Leervektor transfizierten A375-Klone und Tumore der Parentallinie A375. Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung der ALK1-Signaltransduktion zu einer verringerten CD31-Expression und daher geringerer Tumervaskularisierung führt. Die Inhibition wird sowohl durch Expression der extrazellulären Domäne von humanem als auch von murinem ALK1 vermittelt. Jedoch besteht kein linearer Zusammenhang zwischen hoher hALK1.ec- bzw. mALK1.ec- und niedriger CD31-Expression der einzelnen Tumore. Also hemmt die extrazelluläre Domäne von ALK1 zwar eindeutig die Gefäßbildung im Tumor, aber wahrscheinlich ist bereits die Grenze überschritten, bis zu der mehr ALK1.ec jeweils zu weniger Vaskularisierung führt, und darüber hinaus scheinen noch andere Faktoren einen zusätzlichen Einfluss zu haben. Dass ALK1 nicht

nur zur Angiogenese während der Embryonalentwicklung nötig ist (Oh, Seki et al. 2000; Urness, Sorensen et al. 2000; Roman, Pham et al. 2002), sondern auch während der Angiogenese in pathologischen Situationen verstärkt exprimiert wird, wurde bereits von Seki, Yun et al. (2003) beobachtet. Der vorliegende Versuch zeigt aber darüber hinaus zum ersten Mal, dass eine funktionierende ALK1-Signalweiterleitung für die Tumorangio-genese notwendig ist.

Außerdem wurde mittels CD31-Färbung auf Gewebeschnitten der A375-hALK1.ec-Tumore die Tumolvaskularisierung analysiert. Es war jedoch kein objektiver Unterschied in der Anzahl der Mikrogefäße zu den Schnitten der Kontrolltumore zu erkennen, da die Verteilung der Gefäße vor allem zwischen Rand und Mitte des Tumors sehr inhomogen war. Somit konnte die Hemmung der Tumorangio-genese durch Blockierung der ALK1-Signaltransduktion zwar nicht auf Proteinebene bestätigt werden, sondern wurde nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen, konnte dafür aber eindeutig quantifiziert werden.

Weiterhin müsste nicht nur die „microvessel density“ oder Vaskularisierung anhand der Expression von CD31 untersucht werden, sondern auch der angiogene Zustand des Tumors (Eberhard, Kahlert et al. 2000). Dies gelingt durch Analyse von Markern wie Endoglin (CD105) oder $\alpha_5\beta_3$ -Integrin, die während der Angiogenese hochreguliert werden.

4.4.2. Die Hemmung von ALK1 führt zum Teil zu verringertem Tumorwachstum

Die geringere Vaskularisierung durch die Hemmung von ALK1 sollte zu einem geringeren Tumorwachstum führen, da die Tumore schlechter mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt sind. Vergleicht man das Wachstum der A375-ALK1.ec-Tumore mit dem der Kontrolltumore, deren Zellklone *in vitro* eine ähnliche Proliferationsrate aufwiesen, so zeigt sich bei den mALK1.ec-Tumoren keine eindeutige Tendenz, während die hALK1.ec-Tumore insgesamt langsamer wachsen als die Mock-transfizierten Tumore. Somit konnte nur für die Expression der extrazellulären Domäne von humanem ALK1 nachgewiesen werden, dass die Blockierung der ALK1-Signaltransduktion zu weniger Tumolvaskularisierung und damit zu einem verlangsamten Tumorwachstum führt. Ein Problem bei dieser Art von Experimenten stellt jedoch der Einfluss der Transfektion mit dem Kontrollvektor auf das Tumorwachstum dar, so dass manche Mock-transfizierten Tumore deutlich schneller wachsen als andere. Eventuell sind auch die A375-mALK1.ec-Klone aggressiver als die hALK1.ec-Klone, da sie bereits *in vitro* schneller gewachsen sind, so dass sich die geringere Vaskularisierung nicht signifikant auf das Tumorwachstum auswirken konnte. Außerdem exprimieren die mALK1.ec-Tumore im Durchschnitt weniger ALK1.ec als die hALK1.ec-Tumore, so dass die Menge an ALK1.ec eventuell nicht ausgereicht haben könnte. Trotzdem besteht sowohl bei den hALK1.ec- als auch bei den mALK1.ec-Tumoren ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Tumorgröße und der Höhe der ALK1.ec-Expression jedes Klons. Eventuell besteht zwischen der Angiogeneserate und der Tumorgröße ein klarerer Zusammenhang als zwischen der Stärke

der Vaskularisierung und der Tumorgröße. Dies müsste in weiteren Experimenten bestimmt werden.

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel meiner Arbeit war es, die Rolle von ALK1 in der Angiogenese *in vitro* und *in vivo* zu analysieren. Da der Signalweg von ALK1 nicht eindeutig aufgeklärt ist, habe ich die potenziellen Liganden und kooperierenden Rezeptoren von ALK1 und die Zielgene der ALK1-Signaltransduktion genauer untersucht. Weiterhin wurden im Verlauf meiner Arbeit die Auswirkungen einer Hemmung von ALK1 auf die Proliferation von ECs und auf die Tumorangiogenese geprüft.

Zunächst wurde die extrazelluläre Domäne von ALK1 (ALK1.ec) als Werkzeug etabliert, um die ALK1-Signaltransduktion zu hemmen. Mittels der Untersuchung der Hemmung des ALK1-Signalweges wurden die Zielgene von ALK1 im Array bestimmt, um die in der Literatur kontrovers diskutierte Aufgabe von ALK1 während der Angiogenese aufzuklären. So sehen Goumans, Valdimarsdottir et al. (2002) und Ota, Fujii et al. (2002) eine Rolle für ALK1 in der Aktivierungsphase, während Lamouille, Mallet et al. (2002), Oh, Seki et al. (2000) und Seki, Yun et al. (2003) vorschlagen, dass die Aktivierung von ALK1 zur Maturation der Gefäße führt. In den eigenen Array-Untersuchungen zeigt sich, dass ALK1 eher Gene der Aktivierungsphase der Angiogenese stimuliert, wohingegen es Gene der Maturationsphase unterdrückt. Die Expression der gefundenen Zielgene müsste noch sowohl in RT-PCRs als auch auf Proteinebene bestätigt werden, und man könnte den gleichen Array zur Kontrolle mit ALK1 (wt)-, ALK1-Q/D- und ALK1-K/R-transfizierten Zellen wiederholen.

Mittels Reporterstudien wurde der Einfluss verschiedener Liganden und Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie auf die ALK1-vermittelte Aktivierung des Id1-Promoters untersucht, um so potentielle Interaktionspartner zu bestimmen. Aufgrund der Ergebnisse der Id1-Promotorstudien und der Array-Untersuchungen kommt entgegen einiger Veröffentlichungen (Attisano, Carcamo et al. 1993; Lux, Attisano et al. 1999; Oh, Seki et al. 2000; Goumans, Valdimarsdottir et al. 2002) eher ein anderer Ligand als TGF- β 1 oder -3 und ein anderer Typ II-Rezeptor als T β RII für ALK1 in Frage. ALK1 könnte GDF-15, TGF- β 2 und eventuell auch Aktivin B, AB und A als Liganden verwenden, da diese die ALK1-vermittelte Promotorstimulation verstärken. Als interagierende Rezeptoren für ALK1 werden BMPRII und eventuell ActRIIB vorgeschlagen, da sie ebenfalls die Wirkung von ALK1 auf den Id1-Promotor steigern bzw. ihre Blockierung zur Hemmung des ALK1-Signalweges führt. Zur eindeutigen Identifizierung des Liganden von ALK1 und des kooperierenden Rezeptors sind jedoch weitere Experimente notwendig, wie z.B. Crosslinking- und Koimmunopräzipitations-Studien oder BIAcore-Affinitätsmessungen. Außerdem könnte nach Zugabe von inhibitorischen Antikörpern oder Peptiden, die gegen den Rezeptor oder den Liganden gerichtet sind, oder nach Transfektion mit dominant-negativen Typ

II-Rezeptormutanten untersucht werden, ob die ALK1-Signaltransduktion noch aktiv ist oder verringert wird. Da ALK5 ebenfalls die ALK1-vermittelte Id1-Promotoraktivierung verstärkt, kann die in einigen Veröffentlichungen gezeigte Kooperation dieser beiden Rezeptoren mit ALK1 untermauert werden (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2003; Lebrin, Goumans et al. 2004). Endoglin potenziert die ALK1-vermittelte Id1-Promotoraktivierung, und eine Blockade jeweils eines der beiden Rezeptoren verhindert diese kooperative Stimulation. Damit ist nachgewiesen, dass ALK1 und Endoglin nicht nur kooperieren, sondern direkt interagieren, wie es auch von Lebrin, Goumans et al. (2004) und Blanco, Santibanez et al. (2005) vorgeschlagen wurde.

Untersuchungen der *in vitro*-Funktion von ALK1 mittels EC-Proliferationsassays zeigen, dass die Inhibition von ALK1 zur Hemmung des Zellwachstums führt, was erneut eine Rolle in der Aktivierungsphase bestätigt. Weitere Untersuchungen der zellulären Funktionen von ALK1 im Tube-Formation-Assay und Migrationsassay nach Zugabe von ALK1.ec stehen noch aus. Außerdem könnte die ALK1-Signaltransduktion in den zellulären Assays alternativ mit inhibierenden Antikörpern, ALK1-Kinase-Inhibitoren oder RNAi blockiert werden. Die genannten Assays konnten jedoch nicht zusätzlich mit ALK1-, ALK1-Q/D und ALK1-K/R-transfizierten ECs durchgeführt werden, da die ECs nach der Elektroporation oder chemischen Transformation nicht weiter proliferierten (Daten nicht gezeigt). Eine Alternative wäre eine adenovirale Infektion der ECs mit den Vektoren. Ein weiterer interessanter Versuch wäre die Isolation von ECs aus ALK1-defizienten Mäusen und die Analyse ihrer Eigenschaften in *in vitro*-Assays, wie es Larsson, Goumans et al. (2001) mit Zellen aus ALK5-k.o.-Mäusen durchgeführt haben.

Abschließend wurde in Tumor-Xenografts gezeigt, dass die Hemmung des ALK1-Signalweges durch ALK1.ec zu verminderter Vaskularisierung führt, was sich in einer Tendenz zu geringerem Tumorwachstum auswirkt. Dies zeigt die Bedeutung einer funktionierenden ALK1-Signaltransduktion für die Tumorangio-genese. Seki, Yun et al. (2003) hatten bereits die Expression von ALK1 in Arterien nachgewiesen, die zum Tumor führen. Die eigenen Ergebnisse weisen nun auf das Potential eines ALK1-inhibierenden Wirkstoffes als Anti-Angiogenese-Krebstherapie hin. Es müsste jedoch noch in weiteren Experimenten bestätigt werden, dass die Hemmung von ALK1 wirklich eindeutig die Tumorangio-genese hemmt; z. B. könnte Tumolvaskularisierung und -wachstum in heterozygoten oder konditionellen ALK1-k.o.-Mäusen untersucht werden, oder ALK1-RNAi in tumortragende Mäuse injiziert werden. Die Expression von ALK1 in humanem Tumorendothel konnte bereits gezeigt werden; ein weiterer Schritt wäre die Analyse der Hyperaktivierung des ALK1-Signalweges während der Tumorangio-genese.

Die Thesen zur Signaltransduktion und Funktion von ALK1 sind in Abb. 4.2 modellhaft zusammengefasst. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine Rolle von ALK1 in der Aktivierungsphase der Angiogenese. Entgegen der gängigen Meinung in der Literatur konnten TGF- β 1 und -3 nicht als Liganden bestätigt werden, sondern es werden TGF β 2 und GDF-15 vorgeschlagen. Ebenso wurde nicht T β RII als kooperierender Rezeptor für ALK1 identifiziert, sondern BMPRII zeigt eine Kooperation mit ALK1. Die abschließende Identifikation des zugehörigen Liganden und Typ II-Rezeptors erfordert weitere Untersuchungen der direkten Protein-Protein-Interaktion. Die Inhibierung der ALK1-Signaltransduktion stellt eine vielversprechende Möglichkeit zur Angiogenese-Hemmung in Tumoren dar und sollte weiter verfolgt werden.

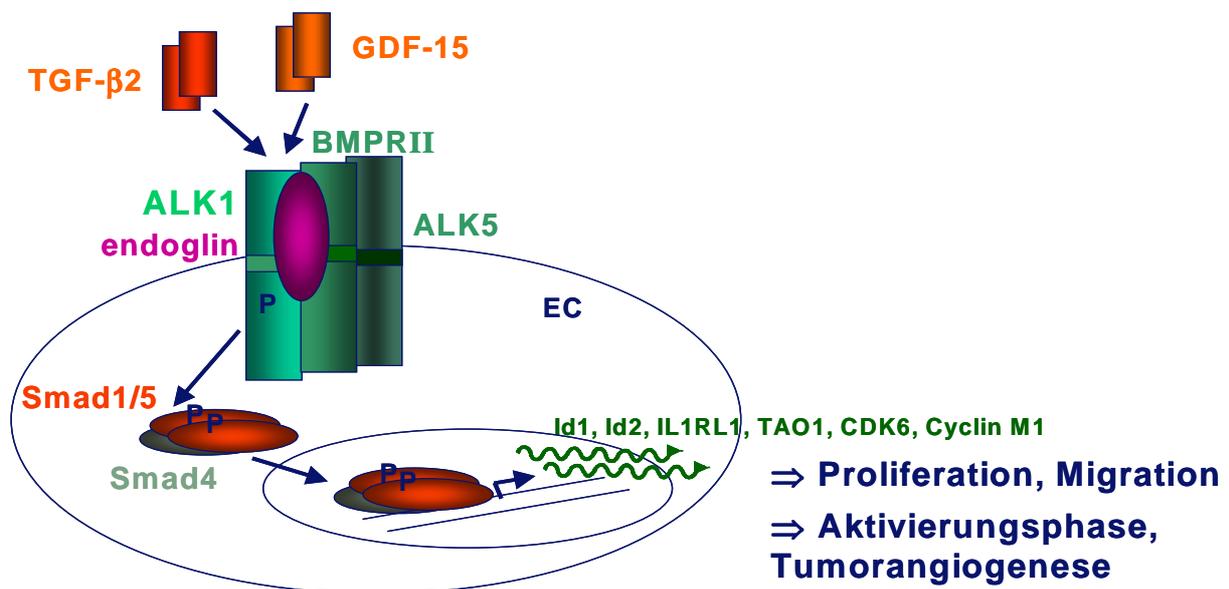


Abb. 4.2: Modell zur Signaltransduktion und Funktion von ALK1.