

Aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin

DISSERTATION

Molekulare Mechanismen der
epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Hendrik Nogai
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Lauster
2. Prof. Dr. Dr. M. Klein
3. Prof. Dr. med R. Paus

Datum der Promotion: 19. September 2008

Erklärung

Ich, Hendrik Nogai, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Molekulare Mechanismen der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Embryonalentwicklung des Gaumens (Palatogenese)	6
1.2	Die TGF- β Superfamilie.....	12
1.2.1	Überblick	12
1.2.2	Struktur und Wirkung der Proteine der TGF- β Superfamilie	14
1.2.3	Das Activin-Follistatin-System	16
1.3	Epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT)	17
1.3.1	Die Rolle der TGF- β Superfamilie bei der EMT	21
1.4	Ziel der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Murine Gewebe und Zellen	23
2.1.2	Plasmide.....	23
2.1.3	rekombinante Proteine	23
2.1.4	Oligonukleotide	23
2.1.5	Geräte	24
2.1.6	Software	24
2.1.7	Enzyme	24
2.1.8	Reaktionskits	25
2.1.9	Puffer.....	25
2.1.10	Chemikalien und Radiochemikalien.....	26
2.1.11	Medien.....	27
2.1.12	Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Analyse der Genexpression mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.2	Lokalisierung der Genexpression mittels in situ Hybridisierung	33
2.2.3	Analyse der in vitro Transdifferenzierung von NMuMG-Zellen.....	37
2.2.4	Analyse der Genexpression mittels quantitativer real-time RT-PCR	39
2.2.5	Analyse der Protein-Protein-Bindung mittels Oberflächenplasmonen-Resonanz	42
2.2.6	Analyse der Genexpressions mittels DNA-Microarray.....	43
3	Ergebnisse	46
3.1	Expressionsanalysen	46
3.1.1	Follistatin und Follistatin-like werden im embryonalen Gaumen exprimiert	46
3.1.2	Follistatin wird spezifisch im MEE exprimiert	48
3.1.3	Activin β A wird im subepithelialen Mesenchym exprimiert.....	50
3.1.4	Follistatin und Activin β A in späteren Stadien in angrenzendem Gewebe exprimiert ..	51
3.2	Funktionsanalysen	53
3.2.1	TGF- β 3 induziert die Transdifferenzierung von NMuMG-Zellen.....	53
3.2.2	Follistatin inhibiert die TGF- β 3 induzierte Transdifferenzierung von NMuMG-Zellen..	55
3.2.3	Follistatin bindet direkt an TGF- β 3.....	56
3.3	Genexpressionsanalyse	58
3.4	Veränderungen der Activin β A-Expression nach Stimulation der NMuMG-Zellen.....	61
3.4.1	Activin β A wird durch Stimulation mit TGF- β 3 induziert.....	61
3.4.2	Follistatin kann die Induktion von Activin β A unterdrücken	63
4	Diskussion	66
4.1	Verwendete Methoden	67
4.1.1	Expressionsanalysen	67
4.1.2	Funktionelle Analysen	68
4.1.3	Genomweite Expressionsanalyse.....	69
4.2	Übersicht über relevante Knock-out Mäuse	70

4.2.1	TGF- β 3 Knock-out Maus.....	70
4.2.2	Follistatin Knock-out Maus	71
4.2.3	Activin Knock-out Maus.....	71
4.2.4	Knock-out Mäuse weiterer Proteine.....	71
4.3	Untersuchte Faktoren	73
4.3.1	Die Rolle von TGF- β 3	73
4.3.2	Die Rolle von Follistatin.....	74
4.3.3	Die Rolle von Activin	75
4.4	Genomweite Expressionsanalyse	76
4.5	Schlussfolgerung.....	78
4.6	Ausblick	83
5	Zusammenfassung	86
6	Abstract	87
7	Lebenslauf.....	88
8	Danksagung	89

1 Einleitung

1.1 Embryonalentwicklung des Gaumens (Palatogenese)

Der Gaumen ist eine in weiten Teilen knöcherner Struktur, die von dem Oberkieferknochen ausgeht und eine Trennung zwischen den Luftwegen der Nase und des Mundes bildet. Der Säugling ist auf diese Trennung angewiesen, um einen Unterdruck im Mundraum für den Saugvorgang an der mütterlichen Brust aufzubauen. Außerdem ist der geschlossene Gaumen eine Voraussetzung für die Lautbildung, die Zahnentwicklung und die Ausbildung eines symmetrischen Gesichtsschädels.

Störungen der embryonalen Entwicklung können zu einer Spaltbildung und dadurch zu einer persistierenden Verbindung zwischen Mund- und Nasenhöhle führen. Die WHO gibt die Frequenz einer Gaumenspalte mit oder ohne begleitende Spaltbildung der Lippe weltweit mit 1:660 an. Weibliche Neugeborene sind häufiger von einer isolierten Spalte des Gaumens betroffen.

Die älteste beschriebene Gaumenspalte wurde an einer etwa 4000 Jahre alten ägyptischen Mumie gefunden¹. Aufgrund mangelnder therapeutischer Möglichkeiten waren die fehlgebildeten Säuglinge zu dieser Zeit nicht lebensfähig. Plutarch, ein Chronist des alten Sparta, berichtete von einem durch König Lyturg beschlossenen Gesetz, nach dem Neugeborene mit Gaumenspalten in die Schluchten des Taygetos-Gebirge gestürzt werden sollten.

Eine operative Behandlung wurde erstmals 1719 von dem deutschen Chirurgen Lorenz Heister niedergeschrieben, der diesen Eingriff in den Niederlanden beobachtete². Nach Beschneidung der Spaltränder zur Schaffung frischer Wundflächen wurden diese bis zur endgültigen Defektheilung durch Nadeln aneinander fixiert. Dieses Verfahren war auf den alleinigen Verschluss der Spalte ausgerichtet. Es musste im weiteren Verlauf mit ausgeprägten Wachstumsstörungen des kindlichen Gesichtsschädels gerechnet werden.

Durch die Entwicklung moderner Techniken einschließlich wenig belastender Narkoseverfahren ist es heute möglich, wesentlich bessere Ergebnisse zu erzielen. Der Einsatz eines Operationsmikroskops und die Anwendung subtiler Operationstechni-

ken erlaubt es, die einzelnen Gewebeschichten exakt zu vereinigen und so wesentliche Funktionen der Nase und der Mundhöhle zu erhalten.

Neben der Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten kommt heutzutage der Prophylaxe ein hoher Stellenwert zu. So konnten in der jüngeren Vergangenheit verschiedene exogene Noxen identifiziert werden, die die Wahrscheinlichkeit einer Gaumenspalte erhöhen³⁻⁵, wie zum Beispiel mütterlicher Nikotin- und Alkoholkonsum. Der genaue Mechanismus, über den diese Einflüsse eine Gaumenspalte induzieren, ist noch nicht bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass vor allem durch Zigarettenrauch eine Gewebshypoxie hervorgerufen wird, die die benötigte Zellteilung stört⁶. Experimentell wurde bei Mäusen nachgewiesen, dass Hypoxie die Entstehung einer Gaumenspalte fördern kann⁷.

Eine Reduktion der Fehlbildungsrate bei menschlichen Neugeborenen konnte durch die Substitution von Folsäure während der Schwangerschaft erreicht werden. Mehrere Studien fanden eine Risikoreduktion zwischen 25% und 65% durch eine regelmäßige prophylaktische Folsäuresubstitution⁸⁻¹⁰. Folsäure wird bei der DNA-Synthese benötigt. Bei einem Mangel kann es daher zu Störungen der DNA-Replikation und als Folge zu Defekten bei der Zellteilung kommen, die in einer Spaltbildung resultieren.¹¹

Da die Gaumenentwicklung aus einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren besteht, kann diese an vielen Punkten gestört werden. Die Gaumenspalte ist daher ein klassisches Beispiel für eine multifaktorielle Fehlbildung. Häufig liegt der Gaumenspalte ein genetischer Defekt zugrunde, der die Anfälligkeit für eine Spaltbildung erhöht. Das Risiko für Geschwister, an einer Gaumenspalte zu leiden, ist etwa 30 mal höher als in der Normalbevölkerung^{12;13}. Verschiedene Syndrome sind bekannt, wie z.B. Treacher Collins, Saethre Chotzen und Holoprosenzephalopathie, die mit einer Gaumenspalte vergesellschaftet sind. Genetische Studien konnten eine Reihe von Kandidatenloci identifizieren, darunter vor allem 2p13 und 6p24-23¹⁴⁻¹⁶.

Aufgrund des verbreiteten Auftretens und der Belastungen durch eine Gaumenspalte sind deren Prävention und Therapie Gegenstand der modernen Forschung. Ziel der Forschung ist, vor allem die molekularen Mechanismen, die der Gaumenentwicklung (Palatogenese) zugrunde liegen, besser zu verstehen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die physiologischen Vorgänge eines wichtigen Schrittes der Gaumenentwicklung: die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT). Ihr kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie einen äußerst anfälligen Entwicklungsschritt darstellt.

Der aktuelle Kenntnisstand der Palatogenese wird im Folgenden dargestellt (siehe auch Abbildung 1):

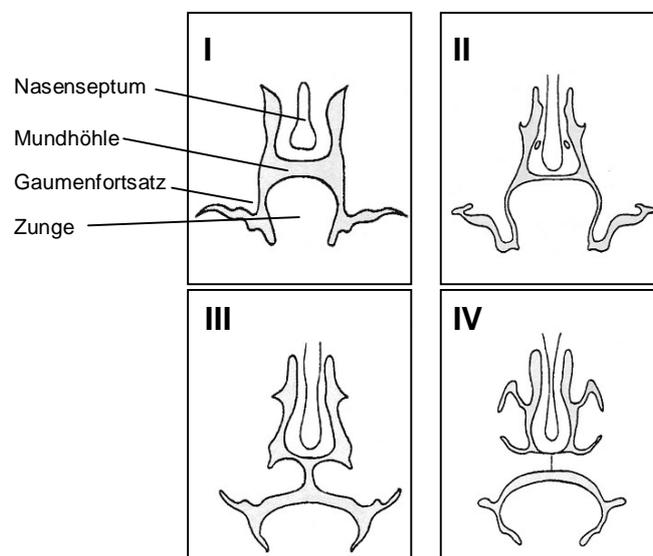


Abbildung 1: Die wichtigsten Schritte der embryonalen Entwicklung des Gaumens (Palatogenese). **I** An beiden Seiten entspringt ein Fortsatz vom Os maxillare. **II** Die Fortsätze beginnen, seitlich der Zunge in die vertikale Richtung zu wachsen. **III** Es folgt die Elevation über den Zungenrücken mit weiterem horizontalem Wachstum. **IV** Schließlich verschmelzen beide Seite durch eine Umwandlung des Epithels (Apoptose und epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung, EMT).

In der Embryonalphase beginnt die Entwicklung des Gaumens beim Menschen etwa um den 45. Schwangerschaftstag. Zu dieser Zeit wird eine Zellverdichtung am Os maxillare beobachtet. Diese Fortsätze nehmen an Größe zu und wachsen dabei in die vertikale Richtung. Später heben sie sich von der Seite der Zunge in eine horizontale Position über dem Zungenrücken (Elevation). Der schmale Spalt, der jetzt noch zwischen den beiden Seiten besteht, wird durch Proliferation des Bindegewe-

bes überbrückt, und die Oberflächen kommen in direkten Kontakt. Das Epithel, das diese Oberfläche bedeckt, wird als „Epithel der medialen Kante“ (*medial edge epithelium*, MEE) bezeichnet. Nachdem der Kontakt zwischen beiden Seiten hergestellt ist, verschwindet das MEE und es entsteht eine Gaumenplatte mit kontinuierlichem Bindegewebe. Die Luftwege der Nase und des Mundes sind nun voneinander getrennt. Die Epithelien, die zur Nasenhöhle gerichtet sind, differenzieren zu respiratorischem Epithel, während die Oberfläche der Mundhöhle von Schleimhautepithel bedeckt wird. Ausgehend von dem osteogenen Bindegewebe des Gaumens entwickelt sich ferner eine knöcherne Platte im harten Gaumen. Im weichen Gaumen dagegen entstehen Muskelzüge, die die Beweglichkeit ermöglichen.

Man kann die Palatogenese also in drei Schritte einteilen (Abbildung 1): Erstens das vertikale Wachstum der Fortsätze, zweitens die Elevation und drittens die Verschmelzung beider Seiten mit Verlust bzw. Transdifferenzierung des MEE. Die molekularen Mechanismen dieser Entwicklungsschritte sind bisher noch nicht im Detail entschlüsselt.

Vor allem bezüglich des ersten Schrittes, dem vertikalen Wachstum, liegen nur wenige experimentelle Daten vor. Allerdings ist gerade in dieser Phase die Entwicklung sehr anfällig für exogene Noxen wie Medikamente oder Zigarettenkonsum. Dies scheint an der gesteigerten DNA-Synthese im Rahmen einer verstärkten Proliferation zu liegen. Zwei Stadien während der Palatogenese zeigen eine besondere Aktivität der DNA-Polymerase als Zeichen einer gesteigerten Proliferation: das initiale Auswachsen der Platten vom Maxillarknochen und deren Ausdehnung in vertikaler Richtung¹⁷.

Der Mechanismus des zweiten Schrittes, der Elevation, wurde genauer untersucht. Hierbei handelt es sich um einen zeitlich sehr kurzen Schritt, der nur einige Stunden in Anspruch nimmt. Am ehesten ist die Induktion der mesenchymalen Produktion von Hyaluronsäure für die Elevation verantwortlich¹⁸. Hyaluronsäure ist ein Glykosaminoglykan mit starker elektrostatischer Ladung. Dadurch ist es in der Lage, große Mengen von Wasser zu binden. Während der Palatogenese führt dieser Volumenzuwachs dann zu einem raschen Aufrichten der Fortsätze. Der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) scheint dabei für die Stimulation zur Hyaluronsäuresynthese verantwortlich zu sein¹⁹. Obwohl die Mesenchymzellen des

Gaumens zu diesem Zeitpunkt schon in der Lage sind, sich zu kontrahieren, scheint dies nicht für die Kraft der Elevation entscheidend zu sein. Vielmehr ist diese Fähigkeit wichtig für die Richtungsgebung²⁰. Diese geschieht in Zusammenarbeit mit Kollagenfasern, die vom Maxillarknochen bis zur Spitze des Fortsatzes ziehen²¹. Der Platz für die Elevation in der Mundhöhle wird verfügbar, da der Fötus etwa in dieser Zeit beginnt, seine Zunge zu bewegen und herauszustrecken²².

Der am intensivsten untersuchte Schritt schließlich ist die Umwandlung des MEE. Um die Kontinuität der beiden embryonalen Gaumenfortsätze zu gewährleisten, ist es erforderlich, dass die trennende Epithelschicht verschwindet. Zwei Mechanismen wurden beschrieben, die dafür verantwortlich sind: Einige Zellen sterben durch Apoptose²³, während andere durch epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) einen neuen Phänotyp annehmen^{24;25}.

Von besonderem Interesse sind in dieser Arbeit die Zellen, die die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung durchlaufen (siehe Abschn. 1.3). Morphologisch lässt sich dabei eine Verdünnung der Basalmembran beobachten. Außerdem internalisieren die Epithelzellen ihre oberflächlichen Zytokeratine, verlieren den Kontakt zu den Nachbarzellen und exprimieren nun Vimentinfilamente, was einer Umwandlung in Mesenchymzellen entspricht. Prinzipiell kommen drei Möglichkeiten der Signalübermittlung in Frage, um die Umwandlung zu steuern: direkter Zell-Zell-Kontakt, Signalgebung über Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) sowie parakrine Signalgebung mittels löslicher Faktoren.

Aufgrund der intakten Basalmembran kommt es äußerst selten zu direktem Kontakt zwischen Epithel und darunterliegendem Bindegewebe. Damit ist eine Kommunikation auf direktem Wege eher unwahrscheinlich. Für die Beteiligung von Molekülen der extrazellulären Matrix sprechen die Beobachtungen bezüglich der Kollagene. Diese bilden den Hauptbestandteil der ECM. Bei der Analyse der Expression verschiedener Kollagentypen während der Palatogenese zeigte sich, dass Kollagen Typ IX zu Beginn der Fusion der beiden Fortsätze auf der Oberfläche des MEE detektierbar ist²⁴⁻²⁶. Diese Ergebnisse legen nahe, dass diesem Kollagentyp eine Vermittlerrolle bei der Palatogenese zukommt. Allerdings kann nicht gefolgert werden, dass er eine induzierende Wirkung hat. Die wichtigsten Schrittmacher stellen wohl lösliche Faktoren dar. Eine Vielzahl löslicher Wachstumsfaktoren wurde mit der Palatogenese in Zusammenhang gebracht (z.B. EGF, PDGF, FGF²⁷⁻²⁹), was für ein multifaktorielles Geschehen spricht. Besondere Bedeutung kommt allerdings TGF- β 3 zu.

Der Wachstumsfaktor TGF- β 3 wird spezifisch im MEE des unreifen Gaumens exprimiert^{30;31} (siehe Abbildung 2). Organkulturexperimente haben gezeigt, dass Antikörper gegen dieses Protein die Transdifferenzierung der Epithelien verhindern kann³². Einen weiteren Hinweis für die Bedeutung von TGF- β 3 lieferte die Analyse von Mäu-

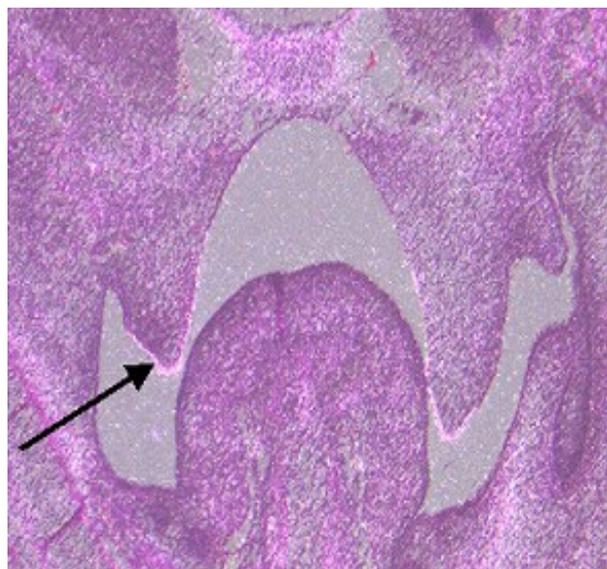


Abbildung 2: *In situ* Hybridisierung eines koronaren Schnittes durch den embryonalen Gaumen mit einer TGF β -3 Sonde. Die Pfeilspitze zeigt auf das Epithel der medialen Kante (*medial edge epithelium*, MEE). Die rot leuchtenden Punkte repräsentieren mRNA von TGF β -3, die durch die radioaktive Sonde sichtbar gemacht wurde. Das Expressionsmuster deutet auf die Beteiligung von TGF- β 3 an der Palatogenese hin.

sen, in denen das Gen für TGF- β 3 gezielt ausgeschaltet wurde. Man findet bei diesen neugeborenen Mäusen neben einer gestörten Entwicklung der Lunge eine isolierte Gaumenspalte ohne weitere Fehlbildungen des Gesichtsschädels^{33;34}. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang auch die Untersuchungen der Gaumen gesunder Vögel. Diese weisen postnatal eine physiologische Gaumenspalte auf, die ihnen die Lautbildung ermöglicht. Es fällt auf, dass bei Vögeln zu keinem Zeitpunkt der Embryonalphase eine TGF- β 3 Expression im Gaumen detektiert werden kann. In Kulturen von präparierten Gaumen von Vögeln verhörnen die Epithelien, ohne dass eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung stattfindet. Behandelt man nun diese Gaumen in Kultur mit TGF- β 3, kann die gleiche Entwicklung wie bei Säugern beobachtet werden: die Epithelien transformieren zu Mesenchymzellen, und es bildet sich ein konfluentes Bindegewebe³⁵.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse die EMT-induzierende Wirkung von TGF- β 3 und dessen Bedeutung bei der Palatogenese. Die weiteren Veränderungen der Epithelzellen im Rahmen der EMT werden in Abschnitt 1.3 beschrieben. Unklar bleibt jedoch die zeitliche Regulation der EMT. Denn TGF- β 3 wird schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Gaumenentwicklung im MEE exprimiert, wenn die Fortsätze noch in vertikaler Richtung wachsen. Andererseits bleibt das Epithel bis kurz vor der Fusion morphologisch unverändert. Ein direkter Kontakt der beiden Seiten ist für die Induktion der EMT nicht notwendig, wie Experimente mit isolierten Gaumen gezeigt haben³⁶. Die Regulation der Wirkung von TGF- β 3 ist demnach noch nicht ausreichend verstanden.

Aufgrund der Bedeutung von TGF- β 3 soll ein kurzer Überblick über die Familie der TGF- β Proteine und die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung gegeben werden.

1.2 Die TGF- β Superfamilie

1.2.1 Überblick

Sezernierte Proteine spielen eine Schlüsselrolle in Wachstums- und Entwicklungsprozessen, bei der Regeneration von Organen sowie bei ihrer Homöostase. Sie ermöglichen den Zellen, miteinander zu kommunizieren und sich dadurch zu synchronisieren und zelluläre Prozesse abzustimmen. Die Superfamilie der TGF- β Wachs-

tumsfaktoren umfasst eine große Gruppe solcher sezernierter Proteine, die sich aufgrund ihrer strukturellen und biologischen Ähnlichkeiten in mehrere Unterfamilien gliedern lassen: die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*growth and differentiation factors*, GDFs), die Knochenwachstumsfaktoren (*bone morphogenetic proteins*, BMPs), die transformierenden Wachstumsfaktoren (*transforming growth factors*, TGF- β s), die Activine und Inhibine sowie eine Reihe von Antagonisten, die die Wirkung der Wachstumsfaktoren regulieren.

TGF- β Wachstumsfaktoren sind sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten bekannt. Das Protein Decapentaplegic (Dpp) beispielsweise bildet das Homolog der *Drosophila* zum BMP-2 bzw. BMP-4 der Vertebraten. Dpp und BMP-2 sind sogar funktionell austauschbar³⁷.

Die ersten Mitglieder der TGF- β Superfamilie wurden aufgrund ihrer Fähigkeit entdeckt, in der Ratte ektopisches Knochenwachstum zu erzeugen³⁸⁻⁴⁰. Sie wurden von ihrem Entdecker entsprechend Knochenwachstumsfaktoren (*bone morphogenetic proteins*; BMPs) genannt. Diese Nomenklatur ist irreführend, wie die Forschungsergebnisse der vergangenen zwei Dekaden zeigen: Die Analyse der Expressionsmuster von mehr als 30 weiteren Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie sowie zahlreicher spontaner oder gezielter Genmutationen dieser Proteine ergab, dass die Aktivität von BMPs und ihren nächsten Verwandten keineswegs auf die Knochenentwicklung beschränkt ist⁴¹⁻⁴⁴. Vielmehr erfüllen TGF- β Moleküle in verschiedensten Geweben eine Vielzahl biologischer Funktionen. Sie kontrollieren so unterschiedliche Prozesse wie Zellwachstum und Wachstumsinhibition, Zelldifferenzierung, Apoptose, Organogenese, die Festlegung der dorso-ventralen Körperachse im Embryo oder auch die Sekretion extrazellulärer Matrixkomponenten⁴⁵⁻⁵⁰. Weiterhin zeigte sich, dass nicht alle BMPs (in der uneinheitlichen Nomenklatur oft auch als *osteogenic proteins*, OPs bezeichnet) in der Lage sind, Knochenwachstum zu induzieren. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die funktionelle Heterogenität dieser Proteinfamilie. Sie erklärt sich aus der zeitlich streng regulierten, gewebespezifischen Expression der einzelnen Mitglieder. Eine Fehlregulation der Expression kann schwere Folgen haben, wie am Beispiel des BMP-4 Gens eindrucksvoll zu erkennen ist: Die durch eine Mutation in einem genregulatorischen Bereich hervorgerufene erhöhte Expression dieses Gens durch infiltrierende Lymphozyten führt beim Menschen zu einer fort-

schreitenden Verknöcherung des Muskelapparates infolge ektopischer Knochenbildung. Die sogenannte Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) hat in der Regel den Tod des Patienten durch Infektion der atelektatischen Lunge zur Folge⁵¹.

1.2.2 Struktur und Wirkung der Proteine der TGF- β Superfamilie

Strukturell sind alle Mitglieder der Familie mit dem prototypischen Mitglied TGF- β 1 verwandt. Sie teilen sich als strukturelles Motiv einen Cysteinknoten, der eine feste Struktur an der Basis des Proteins bildet, wie die Analyse der Kristallstrukturen von TGF- β 2 und BMP-7 zeigte⁵²⁻⁵⁴. An der Bildung dieses Cysteinknotens sind sechs konservierte Cysteine beteiligt, die aufgrund ihres immer gleichen Abstandes maßgeblich die Gesamtstruktur des Proteins prägen. In der Regel besitzen TGF- β Wachstumsfaktoren ein weiteres konserviertes Cystein, welches an der Ausbildung von Homodimeren durch intermolekulare Disulfidbrücken beteiligt ist. Unter einem Homodimer versteht man ein Molekül, das aus zwei identischen Untereinheiten besteht. Dieses siebente konservierte Cystein fehlt jedoch bei einigen Familienmitgliedern, wie z.B. GDF-3 und GDF-9, was auf die fehlende Notwendigkeit einer kovalenten Bindung zur Dimerisierung hindeutet⁵⁵.

Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der TGF- β Superfamilie werden auf vielfältige Weise reguliert. Sie werden zunächst als große Vorläuferproteine mit einer sogenannten Proregion im N-Terminus synthetisiert. In der Zelle dimerisieren sie und werden durch die Konvertasen Furin bzw. PC6 prozessiert^{56;57}. Die proteolytische Spaltung erfolgt an der Konsensussequenz (Arg-X-X-Arg) und resultiert in der Freisetzung des C-terminalen Dimers, welches als reifes Protein in den extrazellulären Raum sezerniert wird. Die stromaufwärts neben der Schnittstelle liegende Sequenz beeinflusst die Effizienz der Spaltung, während die N-terminale Proregion die Stabilität des prozessierten, reifen Proteins kontrolliert. Im extrazellulären Raum unterliegen die Proteine weiteren Regulationsmechanismen: Eine Reihe von Antagonisten bindet die Wachstumsfaktoren und verhindert so die Signaltransduktion über den Rezeptor⁵⁸⁻⁶⁰.

Aktiviert TGF- β Wachstumsfaktoren wirken über heterodimere Komplexe von zwei Typ I und Typ II Transmembranrezeptoren mit Serin/Threonin Kinase Aktivität⁶¹. Acht Typ I und vier Typ II Rezeptoren sind bei Mensch und Maus bekannt. Verschiedene Kombinationen zwischen den Rezeptoren sind möglich, und oft können mehrere Liganden den gleichen Rezeptorkomplex binden. Nach Bindung des Liganden transphosphoryliert der Typ II den Typ I Rezeptor und aktiviert damit die Typ I Kinase⁶². Letztere aktiviert wiederum die intrazellulären Signaltransduktoren für TGF- β Wachstumsfaktoren, die Transkriptionsfaktoren der SMAD (*similar to MAD*, MAD ist ein Transkriptionsfaktor in *Drosophila*) Familie^{63,64}. Drei Klassen von SMADs konnten bisher identifiziert werden: die Rezeptor-regulierten R-SMADs, die common-mediator co-SMADs sowie die inhibitorisch wirkenden I-SMADs. Nach seiner Phosphorylierung dissoziiert das R-SMAD (SMAD1-3,5+8) vom Rezeptor und bildet einen heteromeren Komplex mit dem co-SMAD (SMAD4). Anschließend translozieren die SMADs in den Nukleus, wo sie mit Hilfe weiterer Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren die Expression von Zielgenen steuern⁶⁵⁻⁶⁷ (Abbildung 3).

Neben der oben besprochenen Signaltransduktion über SMADs, die bislang am intensivsten untersucht wurde, kann TGF- β auch über andere Wege, wie z.B. über Mi-

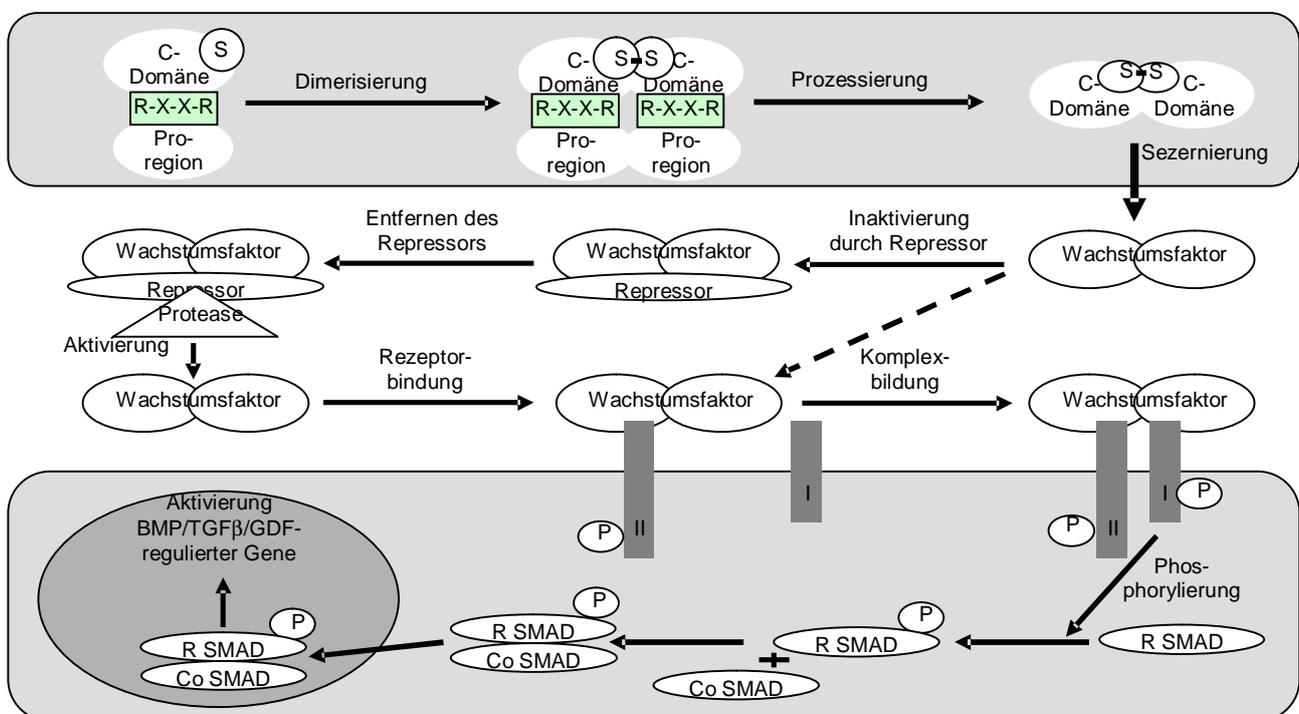


Abbildung 3: Wirkmechanismus der TGF- β Superfamilie. Erklärungen im Text.

togen-aktivierte Proteinkinasen (*MAPKs*) oder Phosphatidylinositol-3 Kinasen (*PI3K*) wirken, was unterschiedliche Effekte der Liganden nach sich zieht^{68;69}.

1.2.3 Das Activin-Follistatin-System

Ein Beispiel für einen Regelkreis innerhalb der TGF- β Superfamilie ist das Activin-Follistatin-System.

Dieses System wurde bereits vor etwa 70 Jahren erstmalig beschrieben^{70;71}. Auf der Suche nach einem gonadalen Gegenspieler des hypophysären Follikelstimulierenden Hormons (FSH) wurde damals ein wasserlöslicher Faktor aus dem Hoden isoliert, der die Bildung hypertrophierter FSH-sezernierender Zellen, sogenannte Kastrationszellen, nach Gonadektomie in der Hypophyse verhindert. Dieser Faktor wurde Inhibin genannt, dessen Funktion zunächst ausschließlich in der Regulation der FSH-Synthese und -Sekretion gesehen wurde. Nach Aufreinigung und Klonierung zeigte sich jedoch, dass Inhibin ein neues Mitglied der TGF- β Superfamilie mit einer Vielzahl von Funktionen darstellt⁷². Inhibin besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, die ein Heterodimer bilden. Bei weiteren Analysen wurde ein Homodimer aus den β -Untereinheiten von Inhibin gefunden, das eine gegensätzliche Wirkung in Bezug auf die FSH-Sekretion ausübt – das Activin. Activeine kommen in verschiedenen Formen vor, die durch die Kombination der verschiedenen β -Untereinheiten bestimmt werden. Durch Verbindung über Disulfidbrücken ergeben sie das vollständige Activin-Protein. Es existieren zwei unterschiedliche β -Untereinheiten: das Activin β A und das Activin β B. Entsprechend treten Activeine in den Varianten ActivinA, ActivinB und ActivinAB auf.

Inhibin und Activin sind maßgeblich an der Regulation der Follikulogenese des Ovars beteiligt. Als dritter Faktor, der dabei eine wichtige Rolle spielt, wurde Follistatin identifiziert. Es wirkt in diesem System als Antagonist des Activins und verhindert die Reifung der Follikel. Neben dem Ovar existiert eine Vielzahl weiterer Organsysteme, in denen Activin und Follistatin eine sich gegenseitig regulierende Funktion ausüben. Nicht nur in adultem Gewebe, sondern auch in der Embryonalentwicklung konnte dieses Activin-Follistatin-System identifiziert werden. Im menschlichen Fötus mittleren Gestationsalters konnten diese beiden Proteine zum Beispiel im sich entwickelnden Nervengewebe, in Herz- und Skelettmuskeln und in exokrinen Drüsen nachgewiesen werden⁷³. In der adulten Leber ist Activin für die Wachstumskontrolle der He-

patozyten verantwortlich. Es inhibiert dort die DNA-Synthese und kann Apoptose induzieren. Ein konstanter Follistatin-Spiegel der Nachbarzellen hält Regeneration und Zellzahl im Gleichgewicht. Bei einer Leberschädigung durch Zellgifte oder nach einer partiellen Hepatektomie steigt der Follistatin-Spiegel und hemmt damit die Activinwirkungen⁷⁴. Die DNA-Synthese nimmt also zu, und die Zellteilung und die Regeneration der Leber werden beschleunigt. Ähnliche Interaktionen wurden für die embryonale Entwicklung und die Wachstumsmodulation der Prostata beschrieben^{75;76}. Auch existieren Hinweise für eine Beteiligung dieses Activin-Follistatin-Systems in der systemischen Immunantwort⁷⁷.

Weitere Studien zeigten, dass Activine in ihren Zielzellen die Expression von Follistatin induzieren können^{78;79}. Demnach existiert nicht nur eine neutralisierende Wirkung von Follistatin auf Activin, sondern in der umgekehrten Richtung auch ein induzierender Effekt. Die Wirkung der Activine auf ihre Zielzellen ist abhängig von der Rezeptorausstattung und den vorhandenen Signaltransduktoren im Zytoplasma der Erfolgszellen.

1.3 Epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT)

Die Organe und das Stützgerüst embryonaler Lebewesen bestehen im Wesentlichen aus zwei Zellarten: den Epithel- und den Mesenchymzellen.

Das Epithel entwickelt sich aus dem äußeren Keimblatt, dem Ektoderm, und dient als Deck- und Schutzschicht. Zu diesem Zweck formen die Epithelien fortlaufende, fest zusammenhängende Zellschichten. Die einzelnen Zellen werden durch Adhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*; CAMs) in diesem Verbund gehalten. Als wichtigster Vertreter ist hier das E-Cadherin⁸⁰ zu nennen. Für den Austausch von Informationen stehen die Epithelzellen über Nexus (*gap junctions*) in Verbindung. Hierunter versteht man Membranproteine, die durch den Interzellulärraum hindurch kanalförmige Poren bilden. Dadurch wird eine direkte Kommunikation der Zellen durch Austausch von Ionen und kleinen Molekülen ermöglicht⁸¹. Ein weiteres Kennzeichen der Epithelzellen ist ihre apiko-basale Polarität. Die basale Seite der Zellen fixiert sie an der Basalmembran, während die apikale Seite für die Ausübung der Zellfunktion verantwortlich ist. Während die Epithelien an der Körperoberfläche flach und keratinisiert sind, besitzt der Apex im Gastrointestinaltrakt zum Beispiel Sialoglykoproteine und Mikrovilli für die schnelle Resorption von Nahrungsbestandteilen. Im Respirations-

trakt tragen die Epithelien Kinozilien, die den Transport des sezernierten Mukus oralwärts ermöglichen.

Das Mesenchym dagegen dient funktionell vor allem als Stützgerüst des Organismus. Dazu besteht es aus verzweigten, fortsatzreichen Zellen, die ein lockeres dreidimensionales Netzwerk bilden, zwischen dem sich große Mengen amorpher Interzellularsubstanz befinden. Eine mesenchymale Zelle zeichnet sich dadurch aus, dass sie in der Lage ist, die extrazelluläre Matrix (ECM) als individuelle Zelle zu durchqueren⁸². Dazu geht sie nur kurzzeitigen Kontakt mit ihren Nachbarzellen ein und sezerniert Enzyme, um die Matrixproteine der Interzellularsubstanz aufzuspalten. Die Plasmamembran an der Vorderseite wird im Rahmen der Motilität ständig neugebildet. Dabei zieht sich das Myosin-reiche Zytoplasma am fixierten Aktinkortex vorwärts und bewegt dadurch den gesamten Zellkörper. Der zurückbleibende Schwanz wird anschließend durch zelleigene Enzyme degradiert. Die Mesenchymzelle besitzt entsprechend ihrer Mobilität in der ECM nur wenige CAMs auf ihrer Oberfläche. Dagegen weist sie eine große Anzahl von Vimentinfilamenten im Zytoplasma auf, die durch ihre Verbindungen zum Zellkern und anderen Organellen eine strukturerhaltende Rolle spielen⁸³. Die Polarität der Mesenchymzellen orientiert sich an der amöboiden Bewegungsrichtung.

Die beiden beschriebenen Zellarten stellen in der Regel getrennte Entitäten dar. Ursprünglich wurde eine Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen für sehr unwahrscheinlich gehalten. Später stellte sich heraus, dass es Situationen gibt, in denen es zu einer solchen Umwandlung kommt. Hierbei spricht man von einer epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung (EMT).

Erstmalig kann die EMT in der frühen Embryonalentwicklung beobachtet werden⁸⁴. Primitivere Spezies bestehen ausschließlich aus Epithelien. Mesenchymale Zellen finden sich bei ihnen nicht. Bei höheren Spezies dagegen machen einige Zellen des Epiblasts eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung durch. Sie wandern anschließend durch die extrazelluläre Matrix und differenzieren nach ihrem Ortswechsel rasch zurück zu Epithelzellen (mesenchymal-epitheliale Transdifferenzierung, MET), wo sie das Notochord, die Somiten und das Mesoderm bilden. Diese Zellen werden als „primäres“ Mesenchym bezeichnet. Unter „sekundärem“ Mesenchym versteht man die Zellen, die in späteren Entwicklungsstadien aus dem Epiblast hervorgehen.

Das sekundäre Mesenchym wird auch als embryonales Bindegewebe bezeichnet, aus dem alle Binde- und Stützgewebe einschließlich des Endoskeletts, bestehend aus Knorpel und Knochen, sowie der überwiegende Teil der glatten Muskelzellen hervorgehen. Das sekundäre Mesenchym ist auch die Grundlage für die Entwicklung von Pigment- und Nervenzellen, die für die Bildung komplexerer Organismen wesentlich sind. Die größte Zahl der Zellen des Epiblasts behält allerdings ihren epithelialen Phänotyp und findet sich in Nierentubuli, Blutgefäßen und im Parenchym verschiedener Organe.

Neben dieser frühen Transdifferenzierung existieren auch Beispiele für eine Aktivierung der EMT in späteren Stadien der Embryogenese. Zum Beispiel wurde dies bei den Zellen des männlichen Müller-Ganges⁸⁵ und des „medial edge epithelium“ (MEE) des Gaumens beschrieben²⁵ (siehe Abschnitt 1.1).

Das Programm zur Transdifferenzierung kann durch externe Signale induziert werden. So ist bekannt, dass die Stimulation von Zellen des Somiten mit Sonic hedgehog (Shh) einen mesenchymalen Phänotyp induziert⁸⁶. Der Müller-Gang bei männlichen Feten wird durch Einfluss des Müller inhibiting factors (MIF) zurückgebildet. Bei der Palatogenese hat TGF- β 3 eine maßgebliche Funktion. Auch für Onkogene wie *src* und *fos* wurde ein ähnlicher Effekt beschrieben. Auf der anderen Seite können Antikörper, die gegen β 1-Integrine gerichtet sind, das mesenchymale Genprogramm inhibieren⁸⁷.

Die zellulären Veränderungen während der EMT lassen sich auch *in vitro* unter experimentellen Bedingungen mit reifen Zellen reproduzieren. Unter Umständen reicht dazu schon eine Veränderung der Umgebung. Setzt man Epithelzellen der Haut in ein dreidimensionales Kollagengitter, so ändern sie ihren epithelialen Phänotyp, ohne weitere Signale zu benötigen⁸⁸. Sie verlieren ihre kubische Form und beginnen, Filopodien zu bilden, die sich bis in die extrazelluläre Matrix ausdehnen. Danach wird auch der Zellkörper durch Motilitätsbewegungen in diese Matrix gezogen und verliert den Kontakt zum übrigen Gewebe. Die Adhäsionsmoleküle werden internalisiert und die Expression von E-Cadherin herunterreguliert. Außerdem gehen die Nexus und Keratine verloren. Es kann stattdessen eine große Anzahl von β 1-Integrinen detektiert werden. Die Zelle beginnt nun auch, Vimentinfilamente und Bestandteile der ECM zu exprimieren.

Es gibt Hinweise, dass es *in vivo* unter bestimmten Bedingungen auch postnatal zu einer Aktivierung dieses embryonalen Programms kommen kann. Erwähnenswert ist hier insbesondere die Wundheilung^{89;90} sowie pathologische Zustände wie die Kataraktbildung am Auge⁹¹, die renale Fibrose^{92;93} und die Invasion von Karzinomzellen⁹⁴⁻⁹⁶. Bei der Kataraktbildung nehmen die Epithelien den Phänotyp eines Fibroblasten an und bilden Kollagenfasern, was zur Trübung der Augenlinse führt. Auch ausgereifte Tubulusepithelien der Niere können eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung durchlaufen. In fibrosierten Nieren stammt ein großer Teil der Fibroblasten aus einer Umwandlung aus Epithelzellen⁹³. Eine gezielte Hemmung dieser Transdifferenzierung in einem Mausmodell reduzierte die fibrotischen Läsionen nach einem artefiziellen ischämischen Ereignis⁹⁷. Die Möglichkeit, eine EMT zu durchlaufen, korreliert schließlich auch mit dem metastatischen Potenzial von Tumorzellen^{98;99}. Besondere Einblicke konnten diesbezüglich bei der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms gewonnen werden¹⁰⁰. Adenome verzweigen sich durch Ausknospung bereits vorhandener Drüsen ohne Dissoziation von Einzelzellen. Dabei kann in den Epithelzellen eine starke Expression von E-Cadherin detektiert werden. Beim Übergang zu einem Karzinom können auch E-Cadherin negative Einzelzellen gefunden werden, die sich weiterhin verzweigen und in das Stroma einwachsen. Die Expression von zytoplasmatischem Fibronectin und Laminin-5 zeigt, dass diese Zellen bereits eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung durchlaufen haben. Diese Proteine sind für die Zellmotilität verantwortlich und ermöglichen der Zelle dadurch, in andere Organe zu metastasieren.

Neben ihrer Rolle bei der Palatogenese stellt die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung also ein wichtiges Phänomen sowohl in der physiologischen Entwicklung als auch in einer Vielzahl pathologischer Ereignisse dar. Nicht zuletzt können durch das Verständnis der Regulationsmechanismen der EMT neue therapeutische Ansätze gefunden werden. Der gezielte Einsatz von Wachstumsfaktoren erfordert jedoch genaue Kenntnisse in Bezug auf das Zusammenspiel der einzelnen Proteine und deren Wirkung.

1.3.1 Die Rolle der TGF- β Superfamilie bei der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung

Von einigen Molekülen der TGF- β Superfamilie ist bekannt, dass sie eine wesentliche Rolle bei epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierungen spielen.

Intensiv untersucht wurde diese Beteiligung zum Beispiel im Rahmen der Karzinogenese. Die Wirkungen von TGF- β bei der Karzinogenese sind vielfältig. Sowohl tumorsupprimierende als auch onkogene Eigenschaften wurden beschrieben. So ist vor allem für normale Zellen, aber auch für einige Tumorarten bekannt, dass TGF- β die Proliferation der Zellen bremst¹⁰¹, die terminale Differenzierung fördert¹⁰² und Apoptose induzieren kann¹⁰³. Bei der Mehrzahl der Zellen von malignen Tumoren gehen die wachstumshemmenden Eigenschaften jedoch verloren und TGF- β steigert die Potenz der Tumorzellen in Bezug auf ihre Invasivität und Fähigkeit zur Metastasierung⁹⁸.

Die Tumormetastasierung hängt im Wesentlichen von der Fähigkeit der Zellen ab, sich zu bewegen (Migration) und in das Stroma oder in Blut- und Lymphgefäße einzudringen (Invasion). Die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung der Tumorzellen hat bei der Erlangung dieser Fähigkeiten eine entscheidende Bedeutung⁹⁹. Es wurde gezeigt, dass TGF- β eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung in Kulturen von Brustepithelzellen¹⁰⁴⁻¹⁰⁸, Plattenepithelkarzinomen^{109;110}, ovariellen Adenosarkomzellen¹¹¹ und Melanomzellen¹¹² induzieren kann. Am genauesten wurden die Vorgänge in einer Brustepithelzellreihe, den NMuMG-Zellen, untersucht. Auf Expressionsebene werden während der EMT verschiedene Gene, wie E-Cadherin, ZO-1, Vinculin und Keratin herunterreguliert und die Expression von Vimentin und N-Cadherin induziert. Der Mechanismus, über den TGF- β die EMT induziert, ist komplex. Die PI3K Aktivierung scheint einen maßgeblichen Einfluss zu haben^{113;114}. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass TGF- β den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren kann. Dieser kontrolliert sowohl die Zellproliferation als auch die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung¹¹⁵. Es konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass die Inhibierung dieses Signaltransduktionsweges die Metastasierung von murinen Brustepithelzellen verhindern kann¹¹⁶.

Die Rolle von TGF- β bei der EMT in der Karzinogenese konnte auch für Zellen der Haut gezeigt werden. So steigerte die transgene Expression von aktiviertem TGF- β 1

die maligne Konversion in muriner Epidermis¹¹⁷. Die Expression eines defekten Rezeptors (T β RII) inhibierte dagegen die Induktion der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung und damit die Entstehung eines Malignoms in den gleichen Zellen¹⁰⁹.

Moleküle der TGF- β Superfamilie sind ferner an weiteren Vorgängen beteiligt, die eine EMT umfassen, wie zum Beispiel die Wundheilung oder die renale Fibrose. Schließlich ist von TGF- β 3 bekannt, dass es eine induzierende Wirkung auf die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung während der Gaumenentwicklung (Palatogenese) in der Embryonalphase besitzt. Dabei handelt es sich um einen physiologischen Vorgang, dessen Störung zu einer Fehlentwicklung des Embryos mit persistierender Gaumenspalte führt (siehe Abschnitt 1.1).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Regulation der TGF- β 3 abhängigen epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung an dem Modell der Palatogenese näher zu charakterisieren.

Folgende Hypothesen sollen überprüft werden:

1. Es sind Antagonisten von TGF- β 3 vorhanden, die die Transdifferenzierung regulieren.
2. Dieser Antagonist stammt aus der TGF- β Superfamilie. Kandidaten sind daher Gremlin, Chordin, Cerberus, Follistatin, Follistatin-like und Noggin.
3. Die Regulation entsteht durch eine Inhibition der Wirkung von TGF- β 3.
4. Die Inhibition lässt sich in anderen Zellsystemen reproduzieren.

Außerdem soll mittels DNA-Chip Experimenten untersucht werden, welche Änderungen der Genexpression in Epithelzellen durch TGF- β 3 induziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Murine Gewebe und Zellen

NMRI Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
NMuMG-Zellen	Peter ten Dijke, Universität von Leyden, Niederlande

2.1.2 Plasmide

- pBlueSK/ β -Actin Nde/Nsi (β -Actin 'Standard')
- pBlueSK/Cerberus (Cerberus 'Standard')
- pBlueSK/Chordin (Chordin 'Standard')
- pBlueSK/Follistatin (Follistatin 'Standard')
- pBlueSK/Follistatin-like (Follistatin-like 'Standard')
- pBlueSK/Gremlin (Gremlin 'Standard')
- pBlueSK/Noggin (Noggin 'Standard')

2.1.3 rekombinante Proteine

TGF- β 3	Peprtech, Rocky Hill, USA
Follistatin	R&D Systems, Wiesbaden, Germany

2.1.4 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma TibMolbiol in Berlin synthetisiert.

β -Actin Primer (cDNA-check)	5' gTggggCgCCCCAggCACCA 5' CTCCTTAATgTCAAgCACgATTTC
Cerberus Primer	5' GAT CGC ATA TGT TCA GAA AGG GCC CGG CG 5' GAA TCA TGC ATG TTG AGG TAA TTC ATG G
Chordin Primer	5' GAT CGC ATA TGC AGT GTC CTC GCC TGG CC 5' GAA TCA TGC ATC TAG GAG TGC TCC GCT TC
Follistatin Primer	5' GAT CGC TCC AAC ATC ACC TGG AAG GG 5' GAA TCA GCA TTG TCA CTG GCA CAG AC
Follistatin-like Primer	5' GAA GCA AAT CCA AGA TCT G 5' GGC GCA CTT CTT AGG AG
Gremlin Primer	5' GAT CGC ATA TGA ATC GCA CCG CAT ACA CT 5' GAT TCA TGC ATT TAA TCC AAG TCG ATG GA
Noggin Primer	5' GAT CGC GAA CGA TCT GAA CGA GAC GCT 5' GAA TCA TTA CAC TCG GAA ATG ATG GG
Activin β A Primer für Light Cyler	5' TGG GTC TTC GGG TGG TGG 5' TGC TCT TGG TCG GGG TCC
HPRT Primer	5' GGA CCT CTC GAA GTG TTG GAT AC

für Light Cyler	5' CTT GCG CTC ATC TTA GGC TT
Oligo dT (RT-PCR)	5' TTTTTTTTTTTTTT

2.1.5 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Gerät zur Messung der Oberflächenplasmonen-Resonanz	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Fotoapparat für PCR-Fotodokumentation	Cybertech/ peqlab, Erlangen
Gelelektrophorese-Kammern	peqlab, Erlangen
LightCycler Instrument	Roche, Mannheim
Mikrotom HM 500 OM	Mikrom, Heidelberg
Rotor-Stator Homogenisator	Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Stauffen
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
(Dunkelfeld-) Mikroskop	Carl Zeiss AG, Göttingen
Zentrifugen	Heraeus, Hanau
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, North Vancouver, Kanada
Bioanalyser (Best. der RNA-Qualität)	Agilent Technologies
GeneArray Scanner	Agilent Technologies

2.1.6 Software

RealQuant	Roche, Mannheim
BIAcore X Control Software 2.1	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
BIAevaluation 3.0.1	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Microarray Suite 5.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Data Mining Tool 3.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Access 2000	Microsoft, Redmond, USA

2.1.7 Enzyme

DNase	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim; NEBiolabs, Frankfurt a.M.; MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
SuperSCRIPT II (Reverse Transkriptase)	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
T3 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
T7 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	peqlab, Erlangen

Taq-Polymerase	Laboreigener Klon
----------------	-------------------

2.1.8 Reaktionskits

Jetsorb Gelextraction Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
LightCycler DNA Master SYBR Green	Roche, Mannheim
Oligotex mRNA Mini/Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini/Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Spin Columns	Qiagen, Hilden
Bioarray Highyield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo Diagnostics

2.1.9 Puffer

Beschichtungspuffer Objektträger (in situ Hybridisierung)	Aceton 2% APES
Hybridisierungspuffer (in situ Hybridisierung)	100% Formamid 5mM NaCl 1M Tris-HCl (pH 7,6) 0,5M EDTA 1M NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0) 40% Dextran Sulfat 50% Denhardts 10mg/ml Hefe RNA
Ligationspuffer (T4 Ligase)	peqlab, Erlangen
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS)	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O 1,4mM KH ₂ PO ₄
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit bovinem Serumalbumin (phosphate buffered saline with bovine serum albumine, PBS/BSA)	PBS 0,5% w/v BSA
20x SSC	175g NaCl 88g Na ₃ -Citrat
PCR Puffer	Genexpress, Berlin
Tris Acetat EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA
Tris gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline, TBS) (pH 7,4)	25mM Tris-HCl 150mM NaCl
Tris EDTA-Puffer (TE-Puffer)	10mM Tris-HCl, pH 8 0,1mM EDTA
Tris EDTA SDS-Puffer (TES-Puffer)	10mM Tris-HCl 1mM EDTA 0,1% SDS

Transkriptionspuffer (RT), DTT	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
Transkriptionspuffer (RNA Pol.)	Roche, Mannheim
HEPES gepufferte Kochsalzlösung (HEPES buffered saline with EDTA and Polysorbate, HBS-EP) (BIAcore)	10mM HEPES (pH 7,4) 150mM NaCl 3mM EDTA 0,005% Polysorbat 20

2.1.10 Chemikalien und Radiochemikalien

Acetanhydrid	Sigma, Steinheim
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose (Ultrapure)	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Steinheim
APES	Sigma, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Cyo-Einbettmedium Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
DEPC	Sigma, Steinheim
dNTPs	peqlab, Erlangen
DPX zum Einbetten histolog. Schnitte	Fluka/ Sigma, Steinheim
Entwickler D-19	Kodak, Stuttgart
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, Steinheim
Fixierer	Kodak, Stuttgart
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma, Steinheim
Glycogen	Roche, Mannheim
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Ionomycin	Sigma, Steinheim
LB Medium (Kapseln)	BIO 101, CA USA
Levamisol	Sigma, Steinheim
L-Glutamat	Seromed, Berlin
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Molekulargewichtsstandards (Marker VI+VII)	Roche, Mannheim
NaCl	Sigma, Steinheim
NaNO ₂	Sigma, Steinheim
Naphtol AS-Mix-Phosphat	Sigma, Steinheim
Neufuchsin	Sigma, Steinheim

NTPs	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim
PBS	Sigma, Steinheim
Penicillin	Seromed, Berlin
Photoemulsion NTB-2	Kodak, Stuttgart
Orange G (Probenpuffer für Agarose Gele)	Sigma, Steinheim
Propandiol	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
RNasin (40U/µl)	Roche, Mannheim
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Rotisol	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Seromed, Berlin
Triethanolamin (TEA)	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
TrypanBlue Solution (0,4%)	Sigma, Steinheim
UTP ³³	Amersham, Freiburg
Yeast RNA	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.1.11 Medien

Agar	LB Medium 1,5g Agar-Agar add 100ml aqua dest.
LB Medium	10g Trypton 5g Hefeextrakt 10g NaCl add 1l aqua dest.
DMEM plus (Kulturmedium mit Zusätzen)	DMEM (GIBCO/ BRL) 10% FCS 10 µg/ml Insulin 100 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin

2.1.12 Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien

Kanülen, Spritzen	Braun, Melsungen
Kunststoffschalen (zum Einbetten von Gewebe)	Miles Inc., Elkhart, USA
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Objektträger (Menzel)	Roth, Karlsruhe
Petrischalen, Pipetten, Zellkulturflaschen	Corning/Costar, Bodenheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
RNAse-freie Pipettenspitzen mit Filter	Fisher Scientific, Heidelberg

(ART)	
Zellschaber	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Analyse der Genexpression mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.2.1.1 Theoretische Grundlagen

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) stellt eine Methode zum Nachweis kleiner Mengen spezifischer DNA-Sequenzen beziehungsweise vollständiger Gene dar.

Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die Bezeichnung „Kettenreaktion“ folgt aus dem Ablauf der Reaktion in mehreren Zyklen. Ein Zyklus beginnt mit der Bindung der Primer an die DNA. Die Bindung findet bei einem Temperaturoptimum, der sogenannten Annealing Temperatur statt, die abhängig von der Nukleotid-Sequenz der Primer ist. Je höher der Gehalt an Guanin und Cytosin, desto niedriger ist die Annealing Temperatur. Nach erfolgter Bindung werden einzelne Nukleotide unter Einwirkung der DNA-Polymerase an die 3'-OH-Primer-Enden geheftet und so ein komplementärer Strang synthetisiert. Die entstandenen Produkte werden bei 94°C denaturiert und ein neuer Zyklus beginnt. Der Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen (z.B. Taq-Polymerase), die die Denaturierungsphase überstehen, ermöglicht eine Automatisierung der Zyklen, die 20-50mal wiederholt werden, wobei eine kleine Menge DNA um das Millionenfache amplifiziert wird. Mit der PCR kann also durch den Einsatz geeigneter Primer spezifische DNA in einer Probe nachgewiesen werden.

In jeder somatischen Zelle sind unabhängig von der jeweiligen Aktivität sämtliche Gene vorhanden und können daher mittels PCR detektiert werden. Um die tatsächliche Expression eines bestimmten Gens zu einem definierten Zeitpunkt zu untersuchen, muss die Analyse über das Vorhandensein der korrelierenden mRNA geführt werden. Die mRNA stellt ein Bindeglied auf dem Weg von dem Gen zu dem fertigen Protein dar und ist daher ein Maß für die Gen-Expression. Um die mRNA aus dem zu

untersuchenden Gewebe zu isolieren, muss dieses zunächst präpariert und homogenisiert werden. Das 3'-Ende eukaryotischer mRNA trägt ein sogenanntes Poly(A)-Ende, das aus etwa 50 bis 200 Adenyl-Resten besteht und wahrscheinlich einen Schutz vor enzymatischem Abbau darstellt. Die Aufreinigung der mRNA kann über dieses sogenannte Poly(A)-Ende erfolgen. Dazu wird das Homogenisat, das die mRNA enthält, mit Partikeln inkubiert, die über Thymidin-Reste verfügen und so an das Poly(A)-Ende binden können.

Da die PCR mit einer DNA-Polymerase arbeitet, ist es notwendig, die isolierte mRNA mithilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase, in cDNA umzuschreiben.

2.2.1.2 Praktische Durchführung

2.2.1.2.1 Isolation des embryonalen Gewebes

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde embryonales Gewebe mit bekanntem Alter benötigt. Dazu wurden weibliche NMRI-Mäuse im Tierstall des MPI für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem über Nacht mit einem Männchen verpaart. Das Vorhandensein eines vaginalen Pfropfes wurde als Zeichen der Befruchtung mit Hilfe einer Plastiksonde bestimmt. Die weiblichen Mäuse mit einem vaginalen Pfropf wurden isoliert und weiter beobachtet. Der erste Morgen nach der Verpaarung wurde als embryonaler Tag 0,5 (E0.5) definiert. Nur etwa ein Drittel der befruchteten weiblichen Mäuse entwickelte tatsächlich eine Schwangerschaft, was am zunehmenden Körperumfang erkennbar war. Diese Mäuse wurden weiter isoliert beobachtet, am embryonalen Tag 13 (E13) durch zervikale Dislokation getötet und in 70% Ethanol desinfiziert. Die Mäuse wurden auf dem Rücken fixiert und die Haut des Unterbauches abpräpariert, um eine Kontamination des darunterliegenden Gewebes zu vermeiden. Anschließend wurde der Uterus eröffnet und die Embryonen entnommen. NMRI-Mäuse zeichnen sich durch eine sehr hohe Anzahl von Nachkommen aus, so dass im Durchschnitt etwa 10-12 Embryonen gewonnen werden konnten.

Die Köpfe der Embryonen wurden direkt nach der Entnahme abgetrennt, auf eine sterile Petrischale gelegt und auf Eis gekühlt. Zur weiteren Präparation der Gaumen wurde unter 4facher Vergrößerung mithilfe von Feinpinzetten, -scheren und -skalpellen erst die Mandibula entfernt, um eine bessere Sicht auf die Gaumenfortsätze zu ermöglichen. Danach konnten die Gaumenfortsätze mit einer Pinzette von den Nasenmuscheln abgehoben und mit einer Schere abgetrennt werden. Bei der

Präparation wurde darauf geachtet, kein angrenzendes Gewebe mitzuentfernen, da es die folgende DNA-Analyse kontaminiert hätte. Die abgetrennten Gaumenfortsätze wurden zunächst in gekühltem RNase-freiem PBS aufbewahrt, um anschließend direkt der mRNA Präparation zugeführt zu werden.

Der Vorgang der Gaumenpräparation dauert etwa 10 Minuten. Da für eine ständige Kühlung gesorgt wurde und die Vorsichtsmaßnahmen zum RNase-freien Arbeiten (siehe Abschnitt 2.2.1.2.2) beachtet wurden, ist nicht davon auszugehen, dass in dieser Zeit ein nennenswerter Verlust von zytoplasmatischer RNA eintrat.

2.2.1.2.2 mRNA Präparation

Eine entscheidende Voraussetzung für den sensitiven Nachweis von Transkripten mittels RT-PCR bzw. *in situ* Hybridisierung ist die Qualität der RNA sowie ein konsequentes RNase-freies Arbeiten. Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme. Sie sind schwierig zu inaktivieren, und bereits kleinste Mengen sind ausreichend, um RNA zu zerstören. Beim Umgang mit RNA mussten daher einige Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, um eine RNase-Kontamination zu vermeiden:

- bei allen Arbeiten wurden RNase-freie Handschuhe getragen,
- wenn möglich, wurden sterile Einmal-Kunststoff-Artikel (Pipetten, Reaktionsgefäße, etc.) verwendet,
- benötigte Glaswaren wurden mind. 4 Std. auf 240°C erhitzt,
- alle Lösungen wurden mit speziell für RNA-Arbeiten vorbehaltenen Chemikalien angesetzt, 12 Std. mit 0,1% DEPC behandelt und anschließend 15min autoklaviert,
- Puffer, die Tris enthalten und daher nicht mit DEPC behandelt werden konnten, wurden mit DEPC-vorbehandeltem Wasser angesetzt.

Um aus Gesamtgeweben bzw. gereinigten Zellpopulationen mRNA zu gewinnen, wurden die Proben im ersten Schritt mit einem Rotor-Stator Homogenisator in Lysis-Puffer homogenisiert. Die mRNA wurde dann in zwei Schritten präpariert. Zunächst wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Midi Kits die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde das Oligotex mRNA Mini Kit verwendet, um die polyA⁺ RNA aus Gesamt-RNA zu gewinnen. Diese Vorgehensweise erlaubt in der Regel eine höhere Anreicherung

der mRNA, da eine Behinderung durch andere zelluläre Komponenten ausgeschlossen werden kann.

Die Präparation der Gesamt-RNA beruht auf der Bindung und späteren Elution der Ribonukleinsäuren unter spezifischen Pufferbedingungen auf einer speziell entwickelten Säule. Die mRNA Isolation erfolgte mit Oligo-dT-beschichteten Latex-Partikeln (Oligotex), welche unter Hochsalz-Bedingungen spezifisch an die polyA+ Bereiche der mRNA hybridisieren und auf einer Säule gebunden werden, von welcher die mRNA schließlich mit bidestilliertem Wasser eluiert werden kann.

2.2.1.2.3 cDNA Präparation

Für die cDNA Präparation wurde mRNA eingesetzt. Als Enzym wurde die RNase-freie Reverse Transkriptase *SuperScript II* der Firma BRL Gibco verwendet. Sie wird mit dem dazugehörigen Transkriptionspuffer (*5x First Strand Buffer*) und DTT geliefert. Nach den Angaben des Herstellers wurden für einen 20µl Ansatz folgende Komponenten in einem RNase-freien Reaktionsgefäß zusammengegeben:

- 1µl Oligo(dT)₁₅ (500µg/ml)
- 1µl dNTPs (10mM je dNTP)
- 200-500ng mRNA
- RNase-freies bidestilliertes Wasser add 12µl

Das Gemisch wurde im Thermocycler 5min bei 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

- 4µl *5x First Strand Buffer*
- 2µl 0,1M DTT

Es folgte eine 2minütige Erwärmung bei 42°C, bevor 1µl SuperScript (200U) dazugegeben wurde. Alle Komponenten wurden mit der Pipette gründlich vermischt und dann 50min bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Die RT-Reaktion wurde im Anschluss 10min bei 70°C Hitze-inaktiviert.

Bevor die fertige cDNA zur weiteren Analyse eingesetzt wurde, wurde ihre Qualität durch eine β-Actin PCR im Thermocycler überprüft. Für eine 20µl Reaktion wurden in der Regel 0,5µl der cDNA eingesetzt, und nach der PCR 10µl dieser Reaktion Gel-elektrophoretisch analysiert. Das PCR-Gemisch hatte folgende Zusammensetzung:

- 0,5µl cDNA
- 2µl 10x PCR Puffer
- 1µl MgCl₂ (25mM)

- 0,2 µl dNTPs (25mM)
- 0,4µl Taq Polymerase
- 0,4µl Primer βActin vorwärts (50µM)
- 0,4µl Primer βActin rückwärts (50µM)
- 15,1µl bidestilliertes Wasser

Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

95°C	1min	
95°C	1min	} 32x
62°C	1min	
72°C	1min	
72°C	10min	
4°C		

2.2.1.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Nach reverser Transkription der mRNA in cDNA wurden verschiedene PCRs durchgeführt, um das Vorhandensein spezifischer cDNAs zu untersuchen. Das Ergebnis konnte dann mit der Expression der mRNA korreliert werden.

Es wurden PCRs mit verschiedenen Primern für folgende Gene durchgeführt: Cerberus, Chordin, Follistatin, Follistatin-like, Gremlin und Noggin. Als Primer wurden die Oligonukleotide verwendet, wie sie in Abschnitt 2.1.4 aufgeführt sind. Das PCR-Gemisch wurde folgendermaßen angesetzt und mit der Pipette gründlich vermischt:

- 0,5µl cDNA
- 2µl 10x PCR Puffer
- 1µl MgCl₂ (25mM)
- 0,2 µl dNTPs (25mM)
- 0,4µl Taq Polymerase
- 0,4µl Primer vorwärts (50µM)
- 0,4µl Primer rückwärts (50µM)
- 15,1µl bidestilliertes Wasser

Der zeitliche Ablauf der PCR stellte sich im Thermocycler nach folgendem Muster dar:

95°C	1min	
95°C	1min	} 32x
Annealing Temperatur	1min	
72°C	1min	
72°C	10min	
4°C		

Die Annealing Temperaturen wurden entsprechend des GC-Anteils der Primer für jedes Gen gesondert auf Sensitivität und Spezifität ausgetestet. Im Einzelnen waren diese wie folgt:

Cerberus	62°C
Chordin	62°C
Follistatin	62°C
Follistatin-like	62°C
Gremlin	57°C
Noggin	60°C

Zur Verifizierung des PCR-Ergebnisses wurden bei jedem Lauf sowohl eine Negativ- als auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurden dem Standardansatz die entsprechenden Primer zugesetzt. Anstelle der cDNA wurde allerdings 1µl bidestilliertes Wasser dazugegeben. Bei der Positivkontrolle wurde dem gleichen Ansatz mit den Primern ein pBlueSK-Vektor zugeführt, in den das zu untersuchende Gen kloniert war (siehe Abschnitt 2.1.2).

2.2.2 Lokalisierung der Genexpression mittels *in situ* Hybridisierung

2.2.2.1 Theoretische Grundlage

Die *in situ* Hybridisierung ist ein Verfahren, das die Detektion spezifischer Nukleinsäuren in Gewebeschnitten ermöglicht. Dadurch wird nicht nur ein qualitativer Nachweis, sondern eine Lokalisation der Expression bestimmter Gene oder der korrespondierenden mRNA möglich.

Das Prinzip der *in situ* Hybridisierung basiert auf der Renaturierung komplementärer Nukleinsäuren. Der eine Strang befindet sich in seiner natürlichen Umgebung, während der andere Strang in einer zugesetzten, radioaktiv-markierten Sonde besteht.

Nach Anfertigung histologischer Schnitte und Vorbehandlung des Gewebes zur Erhöhung der Permeabilität werden im Anschluss die Nukleinsäuren des Gewebes denaturiert und mit den synthetisierten Sonden bei einem Temperatur-Optimum inkubiert. Dadurch kommt es zu einer Renaturierung der nachzuweisenden mRNA mit der radioaktiv-markierten Sonde.

Der Nachweis der hybridisierten, markierten Nukleinsäuren erfolgt über Belichtung eines Röntgenfilms bzw. Umwandlung einer Fotoemulsion durch die radioaktiven Sonden und die anschließende Beurteilung unter einem Fluoreszenzmikroskop.

In dieser Arbeit wurde die *in situ* Hybridisierung eingesetzt, um die TGF- β 3, Follistatin, Follistatin-like, Activin β A und Activin β B exprimierenden Zellen in der Kraniofazialregion darzustellen.

2.2.2.2 Praktische Durchführung

2.2.2.2.1 Anfertigung histologischer Gewebeschnitte

Um das Gewebe histologisch untersuchen zu können, muss es zuvor mit Hilfe eines Mikrotoms in geeignete Schnitte gebracht werden. Dazu ist eine Einbettung in Paraffin nötig. Die embryonalen Köpfe wurden dafür abgetrennt und für 24 Stunden in 4% PFA inkubiert. Danach wurden sie durch eine aufsteigende Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%) und abschließend in Xylol bei Raumtemperatur dehydriert. In dieser Form konnten sie über Nacht in flüssigem Paraffin verbleiben, um danach auf einer Plastikschiene in die richtige Orientierung gebracht zu werden, bevor das Paraffin auf einem Kühlblock erkaltete und fest wurde. Um einzelne Zellschichten aus diesen Blöcken zu gewinnen, wurden mit Hilfe eines Mikrotoms bei Raumtemperatur 6 μ m dicke Schnitte gefertigt und diese auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte etwa 1min bei 50°C auf einem Heizblock getrocknet. Nach dem vollständigen Trocknen an der Luft konnten die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung unter Kühlung gelagert werden.

2.2.2.2.2 In situ Hybridisierung

Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten, welche die Verwendung radioaktiver Nukleotide oder Puffer erforderten, wurden im Radioaktivlabor des MPI für Molekulare Genetik, Berlin, durchgeführt. Die Anfertigung von Gewebeschnitten für die *in situ* Hybridisierung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.2.1 beschrieben und genau wie alle folgenden Schritte bis einschließlich der Hybridisierung unter Einhaltung der Vorsichtsmaßnahmen zum RNase-freien Arbeiten (siehe Abschnitt 2.2.1.2.2).

Zur Vorbehandlung des Gewebes, um die Permeabilität zu erhöhen, wurden die Objektträger für die angegebenen Zeiten mit folgenden Lösungen inkubiert (Prähybridisierung):

1. 100% Ethanol 2min
2. 100% Ethanol 2min
3. 95% Ethanol 2min
4. 85% Ethanol 2min

5.	70% Ethanol	2min
6.	50% Ethanol	2min
7.	30% Ethanol	2min
8.	0,2N HCl	15min
9.	DEPC-H ₂ O	5min
10.	Proteinase K/ TE	4min
11.	PBS	5min
12.	4% PFA/ PBS pH 7	20min
13.	PBS	5min
14.	0,1M TEA/0,2% AAh	10min
15.	PBS	5min
16.	30% Ethanol	2min
17.	50% Ethanol	2min
18.	70% Ethanol	2min
19.	85% Ethanol	2min
20.	95% Ethanol	2min
21.	100% Ethanol	2min
22.	100% Ethanol	2min

Zur Synthese der radioaktiv-markierten RNA Sonden wurden Fragmente der zu untersuchenden Gene in den Vektor pBlueSK kloniert. Es wurden für die Klonierung die Schnittstellen folgender Kombinationen von Restriktionsenzymen innerhalb des Vektors verwendet:

- pBlueSK/Cerberus	NdeI / NsiI
- pBlueSK/Chordin	NdeI / NsiI
- pBlueSK/Follistatin	NdeI / NsiI
- pBlueSK/Follistatin-like	NdeI / NsiI
- pBlueSK/Gremlin	NdeI / NsiI
- pBlueSK/Noggin	NdeI / NsiI

Die Sequenzierung der Plasmide ergab jeweils eine 100%ige Übereinstimmung mit der Sequenz aus der Datenbank.

Die Herstellung der RNA-Sonden erfordert die Linearisierung des Plasmides, welches in der *in vitro* Transkription eingesetzt wird. Entsprechend der Orientierung des Inserts wurde der Vektor mit dem jeweiligen Restriktionsenzym linearisiert, um mit Hilfe der T7 RNA Polymerase die *antisense* Sonde herzustellen und mit der T3 Polymerase die *sense* Sonde zu generieren. Während die *antisense* Sonde komplementär zur spezifischen mRNA ist, dient die *sense* Sonde lediglich als Negativkontrolle für die *in situ* Hybridisierung.

Für die *in vitro* Transkription wurden die RNase-freien Komponenten wie folgt eingesetzt:

- 1µl (300ng) linearisiertes Template
- 2µl 10x Transkriptionspuffer
- 1µl (40U) RNAsin (RNase-Inhibitor)
- 2µl 5mM NTP-Mix (je 10nM CTP, GTP und ATP)
- 4µl UTP³³
- 2µl (20U) Polymerase (T7 bzw. T3)
- 8µl DEPC-H₂O

Die Inkubation erfolgte 90min bei 40°C im Heizblock. Nach der Inkubation wurde die DNA durch Zugabe von 2µl DNase (10U/µl) und weiteren 20min Inkubation bei 37°C inaktiviert, bevor die RNA-Sonden aus der Lösung präzipitiert wurden. Dazu wurden folgende Reagenzien beigefügt:

- 1µl Glycogen
- 4µl 4M LiCl
- 80µl DEPC-H₂O
- 250µl Ethanol

Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht. Anschließend wurde die radioaktiv markierte RNA durch Zentrifugation (30min, 14000rpm, 4°C) präzipitiert, das Pellet einmal mit Ethanol (80%) gewaschen und dann in 50µl TES resuspendiert. Der Hybridisierungspuffer wurde bei 65°C erwärmt und jeweils 1ml zu den Proben gegeben. Zur Denaturierung möglicher RNA Doppelstrangstrukturen wurde die Hybridisierungsmischung für 5min auf 95°C erhitzt und anschließend direkt auf Eis gestellt.

Zur Hybridisierung wurden 50-70µl der Hybridisierungsmischung auf dem vorbehandelten Gewebe verteilt und mit Plastikfolie bedeckt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen unter der Folie befinden. Anschließend wurden die Objektträger horizontal in Hybridisierungskammern platziert, etwas Formamid-getränkter Zellstoff (50% Formamid/ 5x SSC) dazugegeben und die Kammern luftdicht verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 60°C über Nacht.

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger in Einsätze sortiert und diese in mit 5x SSC (55°C) gefüllte Küvetten gestellt. Die Plastikfolien können durch leichtes Bewegen gelöst werden und lassen sich dann leicht entfernen. Folgende Waschschriffe wurden für jeweils 30min bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt:

5x SSC	55°C
2x SSC	55°C
20µl/ml RNase A	37°C
2x SSC,50% Formamid	55°C
2x SSC	55°C
2x SSC	55°C

Im Anschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigender Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100% Ethanol) wie zuvor dehydriert.

Über Nacht wurden die Objektträger auf eine Röntgenfolie gelegt, um die Stärke des radioaktiven Signals zu bestimmen. Nach Entwicklung der Röntgenfolien konnte somit die geeignete Zeit für die Exposition mit der Fotoemulsion abgeschätzt werden. Es wurden mindestens 2x2 Objektträger mit der dazugehörigen UTP³³ –antisense Sonde und 1x2 Objektträger mit der dazugehörigen UTP³³ –sense Sonde angesetzt, so dass mindestens zwei unterschiedliche Expositionszeiten möglich waren.

Die Beschichtung der Objektträger mit Photoemulsion erfolgte im Dunkelraum. Kodak NTB-2 wurde verwendet, welche zuvor in einem 37°C Wasserbad etwa 30min erwärmt wurde. Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer Photobox lichtdicht bei 4°C gelagert.

Die Objektträger der sense Hybridisierung wurden parallel zur als optimal erachteten Zeit für die Objektträger der antisense Hybridisierung entwickelt. Die Objektträger wurden dazu nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

Entwickler	15°C	5min
H ₂ O	RT	20sec
Fixierer	20°C	20min

Die Schnitte wurden in einer Küvette unter laufendem Leitungswasser mindestens 30min gespült und anschließend die Photoemulsion mithilfe einer Rasierklinge von der Rückseite des Objektträgers entfernt.

Die Gewebeschnitte wurden schließlich mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und mit DPX eingedeckt. Das Eindeckmedium wurde dazu auf den Schnitt aufgebracht und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgeschlossen.

2.2.3 Analyse der *in vitro* Transdifferenzierung von NMuMG-Zellen

2.2.3.1 Theoretische Grundlagen

Bei murinen NMuMG-Zellen handelt es sich um eine aus epithelialen Brusttumoren isolierte Zelllinie¹⁰⁸. Diese epithelialen Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach Stimulation mit TGF- β 1 einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser Vorgang ist ein Beispiel für eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung und wurde daher in dieser Arbeit als Modell verwendet.

Das Signal zur Einleitung der Transdifferenzierung beginnt mit der Bindung des im Zellmedium gelösten TGF- β 1 an den zugehörigen Rezeptor. Diese Bindung löst eine Kaskade unter Beteiligung der SMAD-Moleküle aus, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben wurde. Dies führt zu einer veränderten Genexpression, aus der eine Umwandlung in eine mesenchymale Zelle resultiert.

Da Epithelien eine kubische Zellform zeigen und in einem engen Zellverbund wachsen, während Mesenchymzellen ausgezogen und spindelförmig sind, existieren reproduzierbare morphologische Kriterien zur Bewertung der Transdifferenzierung. Die genannten phänotypischen Veränderungen der Zellen können unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops beurteilt werden.

2.2.3.2 Praktische Durchführung

2.2.3.2.1 Kultivierung der Zellen

Bei der Kultivierung von Zellen müssen verschiedene Vorkehrungen getroffen werden, um eine mikrobielle Kontamination der Kulturen zu vermeiden. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt, sämtliche Geräte, Medien und Puffer, die mit den Zellen in Kontakt kamen, wurden bei 180°C hitzesterilisiert, autoklaviert oder sterilfiltriert. Spezielle Kulturgefäße mit Kunststoffbeschichtung sind in sterilem Zustand im Handel erhältlich. Die Handhabung der Zellen (Ausplattieren, Ernährung, Passagieren) erfolgt unter sterilen Werkbänken, deren Keimfreiheit durch regelmäßige UV-Bestrahlung und Reinigung mit 70% Ethanol gewährleistet war.

Die Zellen konnten routinemäßig in Dulbecco's modified Eagle's Medium kultiviert werden. Dem Medium wurden 10% FCS, 10 μ g/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wuchsen bei einer Temperatur von 37°C unter einer Atmosphäre mit einem Gehalt von 5% CO₂.

2.2.3.2.2 Transdifferenzierung der NMuMG-Zellen

Um die Wirkung von TGF- β 3 *in vitro* zu testen, wurden in dieser Arbeit NMuMG-Zellen verwendet, die von Peter ten Dijke von der Universität in Leyden, Niederlande, zur Verfügung gestellt wurden.

Murine NMuMG-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.2.1 beschrieben kultiviert und in einer Dichte von 5x10⁴ Zellen/cm² in einer sterilen 75cm² Zellkulturflasche ausgesät.

Nach Ablauf von 24 Stunden wurden dem Medium Wachstumsfaktoren zur Stimulation zugesetzt. Nach Inkubation für weitere 36 Stunden wurde das Ergebnis unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Für die Analyse der Inhibition dieser Transdifferenzierung wurde neben dem Wachstumsfaktor zusätzlich Follistatin in Konzentrationen von 10ng/ml, 50ng/ml bzw. 100ng/ml in das Medium gegeben. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach Inkubation für 36 Stunden am Phasenkontrastmikroskop.

2.2.4 Analyse der Genexpression mittels quantitativer real-time RT-PCR

2.2.4.1 Theoretische Grundlagen

Die LightCycler Methode erlaubt es, während einer PCR Reaktion die Amplifikation simultan auf einem Monitor zu verfolgen und die Ergebnisse anschließend zu quantifizieren. Grundlage ist die Detektion eines Farbstoffes, der Licht emittiert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist. Es existieren zwei mögliche Verfahren, die zur Verwendung kommen können: SYBR Green, das an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle bindet und Sequenz-spezifische Hybridisierungs sonden, die mit den Farbstoffen Fluorescein und LC red 640 markiert sind. In dieser Arbeit wurde auf das SYBR Green Format zurückgegriffen.

Zu Beginn der Amplifikation erzeugt ungebundenes SYBR Green ein geringes Hintergrundsignal. Nach der Anlagerung der Primer binden wenige Farbstoffmoleküle an die dadurch entstandenen Doppelstränge, was sich in einem Anstieg des detektierten Fluoreszenz-Signals zeigt. Dieses Signal intensiviert sich im Laufe der Elongation, bis es sein Maximum erreicht. Der Wert dieses Maximums am Ende der Elongationsphase zeigt die zunehmende Menge des amplifizierten PCR-Produktes an. Bei der folgenden Denaturierung der DNA sinkt das messbare Fluoreszenzsignal wieder ab.

Der Vorteil der Messung im SYBR Green Format besteht darin, dass aufgrund der hohen Sensitivität auch bei niedrigen Kopienzahlen ein Signal detektiert werden kann. Außerdem ist es für jede DNA Sequenz geeignet, das heißt, es ist keine Anpassung des Farbstoffs erforderlich. Der Nachteil ist allerdings, dass die Bindung nicht sequenzspezifisch erfolgt: SYBR Green bindet an sämtliche doppelsträngigen DNA-Moleküle, also auch an Primerdimere. Um letztere zu erkennen, wird nach jedem Lauf eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Jedes PCR-Fragment hat eine

charakteristische Schmelztemperatur, die sowohl von der Länge des Fragments als auch von deren G/C-Gehalt abhängig ist. Definitionsgemäß liegen bei der spezifischen Schmelztemperatur 50% der DNA als Einzelstrang vor. Die Primerdimere zeichnen sich durch eine wesentlich niedrigere Schmelztemperatur aus und können deshalb anhand dieser Analyse identifiziert werden und bleiben unberücksichtigt.

2.2.4.2 Praktische Durchführung

Für die Activin β A-spezifische LightCycler Analyse wurde zuerst die geeignete Primerkombination für eine konventionelle PCR getestet. Eine Auswahl konnte durch Vorversuche mittels konventionellem Thermocycler gewonnen werden. Dazu wurden verschiedene Primer kombiniert und das Ergebnis der PCR auf einem Ethidiumbromid-Gel beurteilt. Primerdimere können zusätzlich zum Amplikon als sehr schnell laufende Bande erkannt werden. Die geeignet erscheinenden Kombinationen wurden danach mittels der Schmelzpunktanalyse weiter untersucht. Für die weitere Verwendung wurde die Primerkombination mit der geringsten Tendenz zur Bildung von Primerdimeren gewählt.

Die emittierte Fluoreszenz, die einmal pro Amplifikationszyklus am Ende der Elongationsphase gemessen wird, verhält sich proportional zu der Menge des spezifischen Templates, welches sich im Reaktionsgemisch befindet. Die LightCycler Software kalkuliert automatisch die fraktionelle Zykluszahl, nach der sich die gemessene Fluoreszenzintensität zum ersten Mal von der Hintergrundstrahlung abhebt. Diesen Punkt, an dem die PCR Reaktion in den gemessenen Proben die logarithmische Phase erreicht, nennt man crossing point (cp). Je weniger Template-Moleküle zu Beginn der Reaktion in einer Probe enthalten sind, desto mehr Amplifikationszyklen sind notwendig, bevor ein Fluoreszenzsignal messbar ist und der cp erreicht wird. Bei der relativen Quantifizierung ergeben sich die Unterschiede in der Templatekonzentration der einzelnen Proben entsprechend aus den Abständen ihrer cps (? cp).

Voraussetzung ist, dass die cDNA Proben zuvor normalisiert wurden: Da die Menge der cDNA in einer Probe trotz gleichbleibender Zellzahl aufgrund von unterschiedlicher Effizienz der Präparation schwanken kann, muss sie in allen Proben ausgeglichen werden, um direkt miteinander vergleichbar zu sein. Dies kann unter Zuhilfenahme von sogenannten Haushaltsgenen geschehen, deren Expression in den Zellen konstant ist. Sie geben also einen Hinweis auf die insgesamt vorhandene cDNA.

Vor der Bestimmung der Templatekonzentration des Ziel-Gens, hier Activin β A, wurden die cDNA Proben daher auf die Expression des Haushaltsgens HPRT normalisiert und in entsprechenden Konzentrationen eingesetzt. Zur genauen Berechnung der Templatekonzentration eines Ziel-Gens muss außerdem die Amplifikationseffizienz der Reaktion bekannt sein.

Letztere wurde für Activin β A durch eine Titrationsreihe berechnet, in welcher bekannte Verdünnungen der Activin β A enthaltenden cDNA eingesetzt wurden.

Theoretisch liegt die optimale Effizienz E einer PCR Reaktion bei Zwei – dies entspräche einer vollständigen Replikation des Templates pro Zyklus. Die reelle Amplifikationseffizienz E lässt sich mit folgender Formel bestimmen:

$$E = 10^{1/\Delta\text{cp}}$$

Die Amplifikationseffizienz für die Activin β A spezifische LightCycler PCR ergibt sich aus dem Mittelwert von Δcp für die Activin β A spezifische PCR Reaktion. Er ist 3,387. Entsprechend lässt sich die Amplifikationseffizienz für Activin β A ($E_{\text{Activin}\beta\text{A}}$) wie folgt berechnen:

$$\begin{aligned} E_{\text{Activin}\beta\text{A}} &= 10^{1/3,387} \\ &= 1,9735 \end{aligned}$$

Um die cDNA Proben zu normalisieren, ist es notwendig, die Amplifikationseffizienz für HPRT zu errechnen. Analog zu oben gezeigten Beispiel ergab dies einen Wert von $E_{\text{HPRT}}=1,92$.

Um Messfehler durch zufällig auftretende Schwankungen zu vermeiden, wurden pro Experiment mindestens zwei LightCycler Messungen durchgeführt und das Ergebnis gemittelt.

Die untersuchten Proben wurden aus Zellkulturen der NMuMG-Zellen gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.3.2.1). Die mRNA- bzw. cDNA-Präparationen wurden durchgeführt wie in den Abschnitten 2.2.1.2.2 und 2.2.1.2.3 beschrieben.

Das Reaktionsgemisch für die Activin β A LightCycler PCR hatte folgende Zusammensetzung:

- 2-5 μl cDNA (1:10 verdünnt)
- 2 μl 10x PCR Puffer
- 2,8 μl MgCl_2 (25mM), Endkonz. 3,5mM
- 1 μl dNTPs (10mM)
- 0,5 μl Taq Polymerase (5U/ μl)
- 0,4 μl BSA (6mg/ml)
- 1 μl Primer up (10 μM)
- 1 μl Primer down (10 μM)
- ad 20 μl Aqua bidest

Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

Denaturierung	95°C	9min	
Denaturierung	95°C	15sec	Quantifizierung
Annealing/Elongation	72°C	20sec	
Schmelzen	95°C	10sec	Schmelzpunktanalyse
	40°C	30sec	

2.2.5 Analyse der Protein-Protein-Bindung mittels Oberflächenplasmonen-Resonanz

2.2.5.1 Theoretische Grundlagen

Die Oberflächenplasmonen-Resonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) erlaubt die Analyse der Effizienz von Protein-Protein-Bindungen. Unter SPR versteht man ein Wellenphänomen der Elektronenladedichte, das an der Oberfläche eines metallischen Films entsteht, wenn Licht unter bestimmten Bedingungen reflektiert wird.

Wenn sich ein Lichtstrahl in einem Medium mit hohem Brechungsindex ausbreitet und jenseits eines kritischen Winkels auf ein Medium niedrigeren Brechungsindex trifft, so wird er vollständig zurück in das stärker brechende Medium reflektiert (Totalreflexion). Dabei dringt die elektromagnetische Komponente des Lichts einige Nanometer in das schwächere brechende Medium ein und verursacht eine kurzzeitige sogenannte Oberflächenplasmonen-Welle. Wenn das Licht polarisiert und der Übergang der unterschiedlich brechenden Medien mit einem geeigneten leitenden Material beschichtet ist, wird die Intensität des reflektierten Lichts aufgrund dieses Energietransfers geschwächt. Bei diesem Zustand spricht man von Oberflächenplasmonen-Resonanz. Die Resonanzbedingungen hängen von dem Winkel des auftreffenden Lichts, dem leitenden Material und dem Brechungsindex ab. Während das lei-

tende Material durch das Chipdesign definiert ist und eine konstante Größe darstellt, ändert sich der Brechungsindex mit Zunahme der gelösten Teilchen, bzw. gebundenen Moleküle, auf der Oberfläche des Chips. Der Winkel, der benötigt wird, um eine SPR bei dem jeweiligem Brechungsindex zu erzeugen, stellt in diesem System den Auswertungsparameter dar. Dieser wird von dem BIAcore-Gerät gemessen und ist direkt abhängig von der Menge der gebundenen Moleküle. Trägt man die Änderungen des Winkels gegen die Zeit in einem Diagramm auf, erhält man eine quantitative Messung der Interaktion zwischen dem Protein auf dem Chip und dem in dem Laufpuffer. SPR-Antworten werden in Resonance Units (RU) angegeben. Ein RU entspricht eine Änderung des Winkels des reflektierten Lichts um $0,0001^\circ$. Für die meisten Proteine stellt dies ungefähr eine Menge von 1pg/mm^2 gebundenem Protein dar.

2.2.5.2 Praktische Durchführung

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden in den Laboren der Schering AG in Berlin durchgeführt.

In dem in dieser Arbeit verwendeten System stellt ein dünner Goldfilm auf der Chipoberfläche das leitende Material dar. Die Probe wird in einer Flusskammer in Kontakt mit dem Chip gebracht und die Flusskammer nach jedem Lauf gespült und ständig von Puffer durchflossen.

TGF- β 1 und TGF- β 3 wurden kovalent über eine Standard-Aminbindung an die Oberfläche des CM5 Sensorchips der Firma BIAcore gekoppelt. Alle kinetischen Experimente wurden bei einer Temperatur von 25°C und einer Flussrate von $5\mu\text{l/min}$ ausgeführt. Verschiedene Konzentrationen von Follistatin wurden sowohl über die mit Protein beschichteten Oberflächen als auch über eine Kontrolloberfläche injiziert. Zur Regeneration vor jedem Lauf erfolgte eine Reinigung mit Glycin/HCl. Die Auswertung der Messwerte wurde mit der BIAcore X Control Software 2.1 und BIAevaluation 3.0.1 durchgeführt.

2.2.6 Analyse der Genexpressions mittels DNA-Microarray

2.2.6.1 Theoretische Grundlage

Um die Wirkung von Proteinen auf Zellen zu untersuchen, ist es hilfreich, über Daten der Genexpression vor bzw. nach Stimulation zu verfügen. Bis vor kurzem war die

Untersuchung des Expressionsprofils aufgrund des hohen Aufwandes einer quantitativen PCR auf einzelne vorher festgelegte Gene beschränkt.

Die DNA-Chip-Technologie ermöglicht es, durch Hybridisierung von Nukleinsäure-Strängen die Aktivität von Tausenden von Genen in einem Gewebe gleichzeitig zu messen. Genomweite Untersuchungen sind hilfreich bei der Analyse relevanter, aber bisher nicht beachteter Gene. Es wird geschätzt, dass eine Rate von 1-10% der Gene in Zellen unterschiedlichen Aktivitätsgrades differentiell exprimiert wird.

Unter DNA-Chips versteht man Objektträger, auf die durch eine spezielle Technologie eine große Anzahl von Oligo-Nukleotiden in hoher Dichte aufgebracht wurde. Die Oligo-Nukleotide, die spezifisch für bestimmte Gene sind, liegen als Einzelstränge vor und ermöglichen somit die Hybridisierung eines komplementären Stranges. Dieser wird aus dem zu analysierenden Gewebe isoliert und mit einem Farbstoff markiert, um die hybridisierten Oligo-Nukleotide später sichtbar zu machen. Die markierten Nukleinsäuren werden unter genau definierten Bedingungen mit den DNA-Chips inkubiert und können dabei an die spezifischen Oligo-Nukleotide binden. Gefolgt wird diese Inkubation von mehreren Waschschrritten zur Erhöhung der Spezifität. Schließlich werden alle auf dem DNA-Chip hybridisierten Oligo-Nukleotide, die nach den Waschschrritten einen mit Farbstoff gekoppelten komplementären Strang gebunden haben, sichtbar gemacht und ausgewertet.

2.2.6.2 Praktische Durchführung

In dieser Arbeit wurden Veränderungen in der genomweiten Genexpression während der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung der NMuMG-Zellen mit einem Murine Genome GeneChip U74Av2 der Firma Affymetrix bestimmt. Diese wurden gebrauchsfertig geliefert. Dieser Chip besteht aus einer Vielzahl von 25-meren DNA-Oligos, die spezifisch für etwa 6000 bekannte Gene und 6000 ESTs sind, darunter sämtliche bekannte Mitglieder der TGF- β Superfamilie. Die Detektion der Gene erfolgt über eine Bindung an das jeweilige Oligo. Jedes DNA-Oligo wurde vorher auf Sensitivität und Spezifität getestet. Außerdem sind auf jedem Chip interne Kontrollen enthalten und die Signalintensität wird mittels mehrerer Haushaltsgene normalisiert.

Für die Messung wurden NMuMG-Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät und nach Ablauf von 24 Stunden entweder mit 10 ng/ml TGF- β 3 stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen. Nach Ablauf von weiteren 36 Stunden wurden die

Zellen nach Beurteilung unter dem Phasenkontrastmikroskop aus der Zellkulturflasche gelöst und lysiert. Unter Nutzung des RNeasy-Kits der Firma Qiagen wurde die Gesamt-RNA dieser Zellen gewonnen. Die Integrität der präparierten RNA wurde mit einem Bioanalyser der Firma Agilent Technologies bestimmt. 5µg der Gesamt-RNA jeder Probe wurden für die Gen-Expressions Analyse unter Verwendung eines T7-(d)T24-Primers und der SuperScriptII reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Nach der Synthese des zweiten DNA-Strangs und Aufreinigung durch Phase-Lock Gels und Phenol-Chloroform-Extraktion wurde eine erneute *in vitro* Transkription in cRNA mit dem BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit durchgeführt. Diese so hergestellte und gleichzeitig biotinylierte cRNA wurde mittels RNeasy spin columns aufgereinigt. Eine Prüfung durch Hybridisierung für 16 Stunden bei 45°C auf den Affymetrix Test3 Array, der die Expression der Haushaltsgene kontrolliert, bestätigte die Qualität der markierten cRNA. In allen Proben war das 3'/5' Signalintensitätsverhältnis für GAPDH kleiner als 1,2 und zeigte damit die Intaktheit der Nukleinsäuren an.

Anschließend wurden die Proben für 16 Stunden bei 45°C auf den U74Av2 GeneChip hybridisiert. Nach dem Waschschrift wurden die Hybridisierungssignale durch Färbung mit Streptavidin-Phycoerythrin und Verstärkung des Signals mit einem Streptavidin-Antikörper sichtbar gemacht. Die Chips wurden mit einem GeneArray Scanner gescannt und die Daten mit der Affymetrix Microarray Suite 5.0 und Data Mining Tool 3.0 unter Anwendung der vom Hersteller empfohlenen Kriterien generiert. Die so erhaltenen numerischen Werte wurden in eine Microsoft Access 2000 Datenbank transferiert, um die signifikant veränderten Gene herauszufiltern.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, stellen die Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie Proteine dar, die ihre Wirkungen über die Bindung an Rezeptoren vermitteln. Zu einer systemischen Verteilung im Organismus kommt es nicht, da es im Gewebe eine Vielzahl von Proteasen gibt, die für den schnellen Abbau dieser Botenstoffe verantwortlich sind. Wichtiger noch ist die hohe Affinität dieser Moleküle zu Proteinen der extrazellulären Matrix, die eine Diffusion begrenzen. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines Gradienten, der für die Ausübung der Funktion wesentlich ist.

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie müssen also direkt in der Nachbarschaft ihrer Zielzellen exprimiert werden, um wirksam zu sein. Um die Beteiligung von Wachstumsfaktoren an Entwicklungs- und Differenzierungsschritten zu untersuchen, gibt die Analyse der lokalen Verteilung ihrer Expression daher erste wichtige Hinweise.

3.1.1 Follistatin und Follistatin-like werden im embryonalen Gaumen exprimiert

Die TGF- β Superfamilie enthält neben einer großen Anzahl von Agonisten ebenso eine Reihe antagonistisch wirkender Proteine. Diese binden direkt an ihre Gegenspieler und verhindern dadurch eine Bindung des Liganden an den entsprechenden Rezeptor. Diese Protein-Protein-Interaktionen sind bereits bei der Anlegung der embryonalen Körperachsen gut beschrieben^{118;119}. Neuere Untersuchungen zeigen eine Beteiligung der Antagonisten auch in späteren Stadien der Embryogenese und in der Gewebshomöostase in adultem Gewebe^{118;120;121}.

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die Wirkung von TGF- β 3 in der Palatogenese durch Antagonisten der TGF- β Superfamilie reguliert wird. Dazu wurden die Expressionsprofile der bekannten Antagonisten im embryonalen Gaumen untersucht.

Auf dem Weg von der DNA zum fertigen Protein wird das Gen in mRNA transkribiert. Durch Enzyme wird die mRNA dann in das entsprechende Protein translatiert. Da jedes Protein diesen Schritt durchlaufen muss, gibt das Vorhandensein der gebildeten spezifischen mRNA in einer Zelle Informationen über die Menge des exprimierten Proteins. Der Nachweis der Expression kann daher über eine PCR erfolgen.

Die Gaumen von embryonalen Mäusen wurden am Tag 13,5 post conceptionem (E13.5) unter Vergrößerung präpariert, und das dadurch gewonnene Gewebe wurde homogenisiert, um die mRNA isolieren zu können (siehe Abschnitt 2.2.1.2.2). In diesem Stadium der embryonalen Entwicklung sind die Gaumenfortsätze noch in einer vertikalen Position. TGF- β 3 wird im Epithelium der medialen Kante (*medial edge epithelium*, MEE) exprimiert (Abbildung 2). Dies ist aus anderen Untersuchungen bereits bekannt und konnte durch eigene *in situ* Hybridisierungen bestätigt werden.

Nach Transkription der mRNA in cDNA wurde eine PCR mit etablierten Primern für die bekannten Antagonisten Gremlin, Chordin, Cerberus, Follistatin, Follistatin-like und Noggin durchgeführt. Bekannte cDNA, die in einen Vektor kloniert wurde, wurde jeweils als Positivkontrolle eingesetzt; als Negativkontrolle diente destilliertes Wasser. Ist die mRNA der analysierten Gene in den Zellen des präparierten Gewebes vorhanden, so wird die cDNA nach Anlagerung der Primer durch die DNA-Polymerase amplifiziert und die DNA auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel in Form einer Bande sichtbar gemacht. Aus der Anwesenheit der mRNA wurde auf die Expression des fertigen Proteins zurückgeschlossen.

Wie in Abbildung 4 gezeigt, kann bei den PCR-Analysen nur mit zwei spezifischen Primerkombinationen eine Bande detektiert werden, die einem Transkript des jeweiligen Genes entspricht. Dabei handelt es um die Primer für Follistatin und Follistatin-like. Alle anderen Kombinationen zeigten ein negatives Resultat. Sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen bestätigten die Auswertbarkeit dieses Experiments.

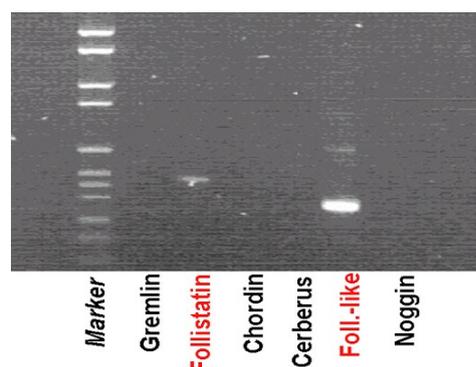


Abbildung 4: PCR der Kandidatengene. Es lässt sich lediglich ein Transkript für Follistatin und Follistatin-like nachweisen. Die anderen untersuchten Gene werden nicht in dem präparierten Gewebe exprimiert.

Diese Daten zeigen das Vorhandensein von Follistatin und Follistatin-like im embryonalen Gaumen. Die weiteren Analysen beschränkten sich daher auf diese beiden genannten Faktoren, da nur sie im direkt benachbarten Gewebe exprimiert werden und somit einen Einfluss auf TGF- β 3 bzw. die Zellen des MEE haben können.

Ein Nachteil der PCR-Analyse ist, dass sie mit homogenisiertem Material durchgeführt wird. Eine Bestimmung der genauen Lokalisation der Expression des entsprechenden Gens innerhalb des Gewebes ist damit nicht möglich. Um die Expressionen von Follistatin und Follistatin-like einem bestimmten Gewebe bzw. einer Region im embryonalen Gaumen zuzuordnen, wurden daher *in situ* Hybridisierungen durchgeführt.

3.1.2 Follistatin wird spezifisch im MEE exprimiert

Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht die Sichtbarmachung von mRNA auf histologischen Schnitten mithilfe von radioaktiv markierten komplementären mRNA-Strängen. Dazu wurden die Köpfe muriner Embryos am Tag E13.5 präpariert und in Paraffin eingebettet. Aus diesen Paraffinblöcken wurden Schnitte in koronarer Ebene angefertigt, die durch die Spitze der Gaumenfortsätze verliefen. Nach einer Vorbehand-

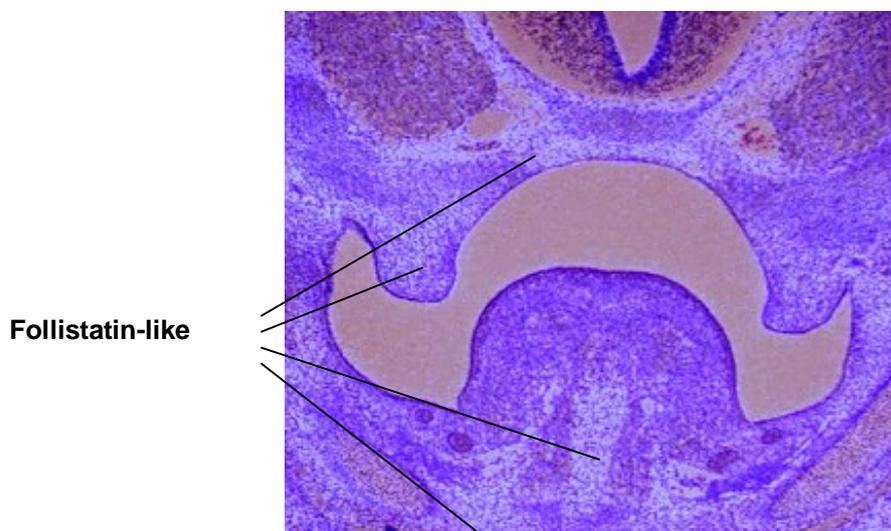


Abbildung 5: *In situ* Hybridisierung eines koronaren Schnittes durch den embryonalen Gaumen mit einer Follistatin-like Sonde. Das gesamte Gewebe zeigt ein deutliches Signal in den mesenchymalen Zellen bei der *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für Follistatin-like. Eine Beteiligung bei der Entwicklung des Gaumens ist unwahrscheinlich.

lung entsprechend Abschnitt 2.2.2.2.2 (Prähybridisierung) wurden diese mit radioaktiv markierten Sonden inkubiert. Die Sonden entsprechen Abschnitten der komplemen-

tären mRNA von Follistatin und Follistatin-like und binden spezifisch an die mRNA im Zytoplasma. Folglich werden solche Zellen radioaktiv markiert, die das zu untersuchende Gen exprimieren. Durch Behandlung mit einer Photoemulsion, die mit den radioaktiven Sonden reagiert, geben die markierten Zellen in der Dunkelfeld-Mikroskopie ein leuchtendes Signal.

Die *in situ* Hybridisierung mit der für Follistatin-like spezifischen Sonde erbrachte das in Abbildung 5 gezeigte Ergebnis. Man sieht, dass Follistatin-like im gesamten kraniofazialen Bindegewebe exprimiert wird. Ein spezifisches Muster ist nicht zu erkennen.

Im Gegensatz dazu werden Zellen, die mRNA von Follistatin im Zytoplasma aufweisen, spezifisch im MEE detektiert (Abbildung 6). Das Expressionsmuster entspricht der Verteilung der TGF- β 3 produzierenden Zellen (Abbildung 2). Daneben wird mRNA von Follistatin auch in der Muskulatur der Zunge, der Zahnknospe und in Zellverdichtungen der Mandibula gefunden.

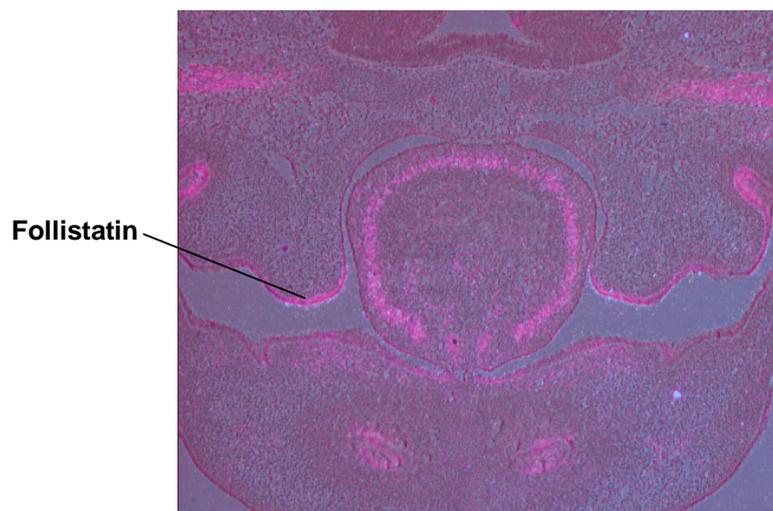


Abbildung 6: *In situ* Hybridisierung eines koronaren Schnittes durch den embryonalen Gaumen mit einer Follistatin-Sonde. Follistatin-produzierende Zellen sind in der Zunge und in osteogenem Bindegewebe vorhanden. Es fällt auf, dass auch die Zellen des MEE spezifisch Follistatin exprimieren, was auf eine Beteiligung bei der Palatogenese hinweist.

Die Übereinstimmung der Verteilung der TGF- β 3- und der Follistatin-produzierenden Zellen legt ein Zusammenspiel bei der Differenzierung des Epithels nahe. Follistatin ist bislang als Antagonist von TGF- β 3 nicht bekannt. Allerdings sind diese morphologischen Hinweise noch kein hinreichender Beleg für die Beteiligung von Follistatin am Prozess der Palatogenese. Sie geben auch noch keinen Aufschluss über die

funktionellen Eigenschaften von Follistatin. Dazu sind vielmehr Stimulationsexperimente mit geeigneten Zellen notwendig.

Im Gegensatz zu TGF- β 3 ist eine direkte antagonistische Verbindung zwischen Follistatin und Activin bekannt. Es sollte daher die Palatogenese auf eine mögliche Beteiligung dieses bekannten Activin-Follistatin-Systems überprüft werden.

3.1.3 Activin β A wird im subepithelialen Mesenchym exprimiert

Activine wurden ursprünglich als Gegenspieler der Inhibine beschrieben. In einer Reihe von Organsystemen wirkt Follistatin als Antagonist des Activins (siehe Abschnitt 1.2.3). Die Vermutung, dass das Activin-Follistatin-System auch in der Palatogenese beteiligt ist, sollte in den folgenden Experimenten geprüft werden.

Abschnitte der mRNA, die für die Untereinheiten Activin β A bzw. Activin β B codieren, wurden in Vektoren kloniert. Nach Linearisierung und Transkription konnten radioaktiv-markierte Sonden für die *in situ* Hybridisierung gewonnen werden.

Die Hybridisierung der Activin β B spezifischen Sonden zeigte, dass die Untereinheit Activin β B unspezifisch in einer Vielzahl von Geweben des Kraniofaziums exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des Verteilungsmusters ist von einer Beteiligung

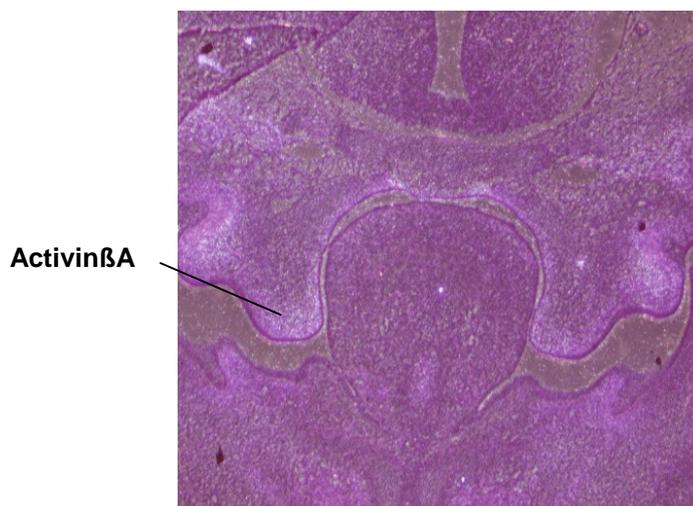


Abbildung 7: *in situ* Hybridisierung eines koronaren Schnittes durch den embryonalen Gaumen mit einer Activin β A Sonde. Die Zellen des subepithelialen Mesenchyms exprimieren Activin β A.

im Sinne eines Activin-Follistatin-Systems für diese Untereinheit nicht auszugehen. Im Gegensatz dazu wird Activin β A mRNA unter anderem spezifisch im Mesenchym

der Gaumenfortsätze exprimiert (Abbildung 7). Das heißt, dass die Zellen, die unter den Follistatin bzw. TGF- β 3 exprimierenden Zellen liegen, für die Expression von Activin β A verantwortlich sind.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Rolle von Activin in der Palatogenese hin. Da lediglich Activin β A und nicht Activin β B in unmittelbarer Nachbarschaft zu Follistatin exprimiert wird, kommt am ehesten ActivinA-Protein, das aus zwei Activin β A-Untereinheiten besteht, als maßgeblicher Faktor in Frage.

3.1.4 Follistatin und Activin β A werden auch in späteren Stadien in angrenzendem Gewebe exprimiert

Die vorangegangenen Experimente haben die qualitative und lokale Expression von TGF- β 3, Follistatin und Activin am Tag E13.5 untersucht. Die Entwicklung des Gaumens ist jedoch ein Prozess, der über einen Zeitraum von mehreren Tagen voranschreitet. Um zu untersuchen, wie sich die sekretorische Zellaktivität nach Fusion der Epithelien darstellt, wurden die Köpfe muriner Embryos am Tag E14.5 bzw. E15.5 präpariert und in Paraffin eingebettet. Aus diesen Paraffinblöcken wurden koronare Schnitte durch den Gaumen angefertigt. Es wurde die gleiche Schnittebene wie bei den Präparaten des Tages E13.5 gewählt. Auf den Schnitten ließ sich nach einfacher Färbung erkennen, dass sich die Gaumenfortsätze in der Mittellinie getroffen hatten und die Epithelzellen des MEE teilweise bereits verschwunden waren, so dass sich eine kontinuierliche Mesenchymschicht zeigte, die die Nasen- und Mundhöhle voneinander trennte. Bei den Embryos des Tages E14.5 konnten an der Ober- und Unterseite des Gaumens noch verbleibende dreieckige Epithelreste erkannt werden (Abbildung 9), während am E15.5 auch diese Epithelinseln verschwunden waren (Abbildung 8).

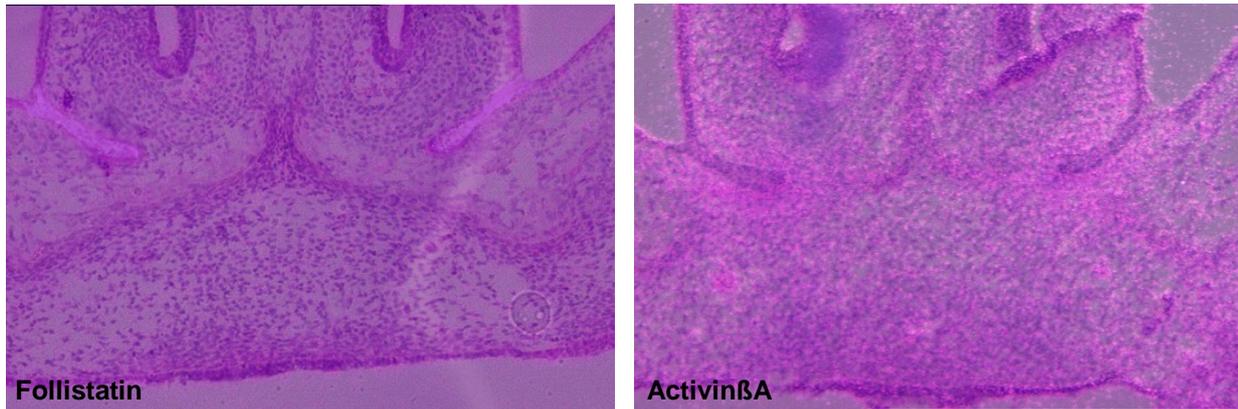


Abbildung 9: *In situ* Hybridisierungen koronarer Schnitte mit Follistatin (links) und Activin β A (rechts) am Tag E14.5. Man sieht, dass die Gaumenfortsätze in direktem Kontakt sind und die verbliebenen Epithelzellen noch Follistatin exprimieren. Auf der rechten Bildseite ist ein konsekutiver Schnitt gezeigt, der mit einer Activin β A Sonde hybridisiert wurde. Zellen, die unter dem verbliebenen Epithel liegen, exprimieren Activin.

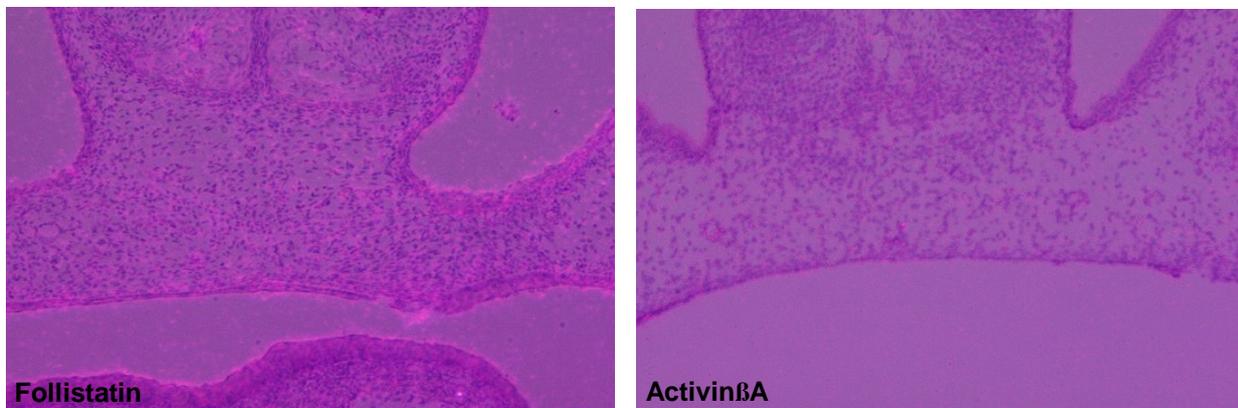


Abbildung 8: *In situ* Hybridisierungen koronarer Schnitte mit Follistatin (links) und Activin β A (rechts) am Tag E15.5. Wie auf dieser Abbildung zu erkennen ist, kann kein Epithel mehr zwischen den Gaumenfortsätzen gefunden werden. Weder mit einer Follistatin noch mit einer Activin β A Sonde kann ein Signal detektiert werden.

Mit den histologischen Schnitten wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt, um die Expression von Follistatin und Activin β A zu untersuchen. Die Abbildung 9 und Abbildung 8 zeigen die Verteilung der Expression beider Gene. Man erkennt in Abbildung 9, dass Follistatin am Tag 14.5 spezifisch in den Epithelzellen exprimiert wird. Es fällt weiterhin auf, dass die Mesenchymzellen in der Medianlinie des Gaumens, die noch am Tag E13.5 Activin β A exprimiert haben am Tag 14.5 kein Signal mehr zeigen. Nur solche Zellen, die in direktem Kontakt mit Follistatin-exprimierenden Zellen liegen, bilden noch Activin β A. Am Tag E15.5 sind keine Epithelzellen mehr vorhanden und es findet sich dementsprechend keine Expression von Follistatin oder Activin β A (Abbildung 8).

Folglich tritt eine Expression von Activin β A zu jedem untersuchten Zeitpunkt ausschließlich in direkter Nachbarschaft zu Follistatin auf.

Somit ist eine Beteiligung des Activin-Follistatin-Systems auch in der Palatogenese anzunehmen. Allerdings kann keine Aussage getroffen werden, welche Funktion dieses System dabei übernimmt.

3.2 Funktionsanalysen

Die vorangegangenen Experimente untersuchten die Expression verschiedener Faktoren im embryonalen Gaumen. Da die Proteine der TGF- β Superfamilie im Gewebe nur über kurze Distanzen wirken, lassen sich anhand der Expressionsprofile Rückschlüsse auf die mögliche Beteiligung dieser Proteine an Entwicklungs- und Differenzierungsschritten ziehen.

Durch reine Expressionsanalysen lässt sich jedoch keine Aussage über die tatsächliche Wirkung der Proteine treffen. In den folgenden Analysen sollte geprüft werden, ob sich ein inhibierender Effekt von Follistatin auf die TGF- β 3 induzierte Wirkung in einem Zellsystem von murinen Brustepithelkarzinomzellen bestätigen lässt.

3.2.1 TGF- β 3 induziert die Transdifferenzierung von NMuMG-Zellen

In einer Zellkultur lassen sich Einflüsse von Wachstumsfaktoren unter standardisierten Bedingungen beobachten. Das Medium und die Wachstumsbedingungen werden dabei konstant gehalten und idealerweise wird nur die Konzentration bzw. das Vorhandensein der Proteine als einzige Variable verändert. *In vitro* Zell-Experimente sind also geeignete Modelle zur funktionellen Analyse von Follistatin in der Embryogenese.

Für diese Arbeit wurden murine NMuMG-Epithelzellen gewählt. Hierbei handelt es sich um eine murine Zelllinie aus Brustepithelkarzinomzellen, die in einem Standardmedium wächst, ohne sich zu entdifferenzieren und ihre Eigenschaften zu verändern. Als besonderes Kennzeichen wurde von Piek et al. beschrieben, dass diese Zelllinie nach Stimulation mit TGF- β 1 transdifferenziert und einen mesenchymalen Phänotyp annimmt¹⁰⁸.

Zunächst sollte untersucht werden, ob TGF- β 3 ebenso wie TGF- β 1 in der Lage ist, eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung zu induzieren. Da beide TGF- β s

an die gleichen Rezeptoren binden, lag die Vermutung nahe, dass sie eine ähnliche Funktion ausüben können. Jedoch gibt es Beispiele aus der Entwicklungsbiologie, die zeigen, dass sie *in vivo* durchaus unterschiedliche Auswirkungen auf die gleiche Zellart haben können.

Um die Wirkung von TGF- β 3 auf NMuMG-Zellen zu überprüfen, wurden diese kultiviert und in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät. Nach Ablauf von 24 Stunden wurde dem Medium 10ng/ml TGF- β 1 bzw. verschiedene Konzentrationen von TGF- β 3 zugesetzt. Der Effekt der Stimulation wurde phasenkontrastmikroskopisch beurteilt. Bei der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung kann eine deutliche Veränderung der Morphologie der Zellen beobachtet werden: Epithelzellen zeigen einen kubischen Phänotyp; die Zellen sind rund und gleichmäßig und wachsen in Verbänden. Mesenchymale Zellen dagegen haben ein spindelförmiges Aussehen, das sich von epithelialen Zellen unterscheidet.

Bei den Zellen, die mit TGF- β 1 stimuliert wurden, konnte das Ergebnis von Piek et al.

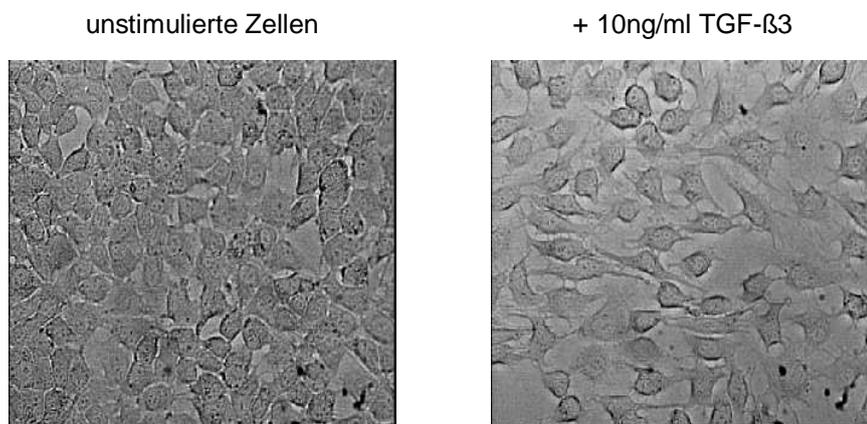


Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der NMuMG-Zellen. Auf der linken Bildseite sind die unstimulierten NMuMG-Zellen dargestellt. Sie weisen eine kubische Form auf und wachsen in einem engen Zellverbund. Die Zellen auf der rechten Bildseite wurden mit 10ng/ml TGF- β 3 stimuliert. Es ist eine deutliche Veränderung der Zellform zu erkennen. Die Zellen sind dünner und haben lange Ausläufer. TGF- β 3 ist also in der Lage, eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung in NMuMG-Zellen zu induzieren.

reproduziert werden: die NMuMG-Zellen wiesen nun einen spindelförmigen Charakter auf, wie es mesenchymalen Zellen entspricht. Auch die Zellen, deren Medium TGF- β 3 zugesetzt wurde, zeigten das gleiche spindelförmige Aussehen (Abbildung 10). 10ng/ml TGF- β 3 haben also die gleiche Potenz bei der Induktion der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung der NMuMG-Zellen wie TGF- β 1. Diese Zellen

wurden daher als Modell für die Entwicklung des sekundären Gaumens und für die Analyse der Auswirkungen von Follistatin auf die TGF- β 3 induzierte epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung verwendet.

3.2.2 Follistatin inhibiert die TGF- β 3 induzierte Transdifferenzierung von murinen NMuMG-Zellen

Im Folgenden sollte der Einfluss von Follistatin auf die TGF- β 3 induzierte epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung der NMuMG-Zellen untersucht werden. Dazu wurden Zellen entsprechend der Versuchsanordnung in 3.2.1 in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden drei verschiedene Versuchsbedingungen gewählt: Dem ersten Ansatz wurde kein Wachstumsfaktor zugesetzt und die Zellen wurden weitere 36 Stunden in Standardmedium kultiviert. Der zweiten Zellkultur wurde wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben 10ng/ml TGF- β 3 zugesetzt. Beim dritten Ansatz wurde zusätzlich zu TGF- β 3 rekombinantes Follistatin in verschiedenen Konzentrationen (10ng/ml; 50ng/ml; 100ng/ml) dem Zellmedium hinzugegeben. Nach Inkubation für 36 Stunden wurden die Zellen phasenkontrastmikroskopisch beurteilt.

Man sieht in Abbildung 11, dass die Zellen ohne jegliche Stimulation ihr kubisches

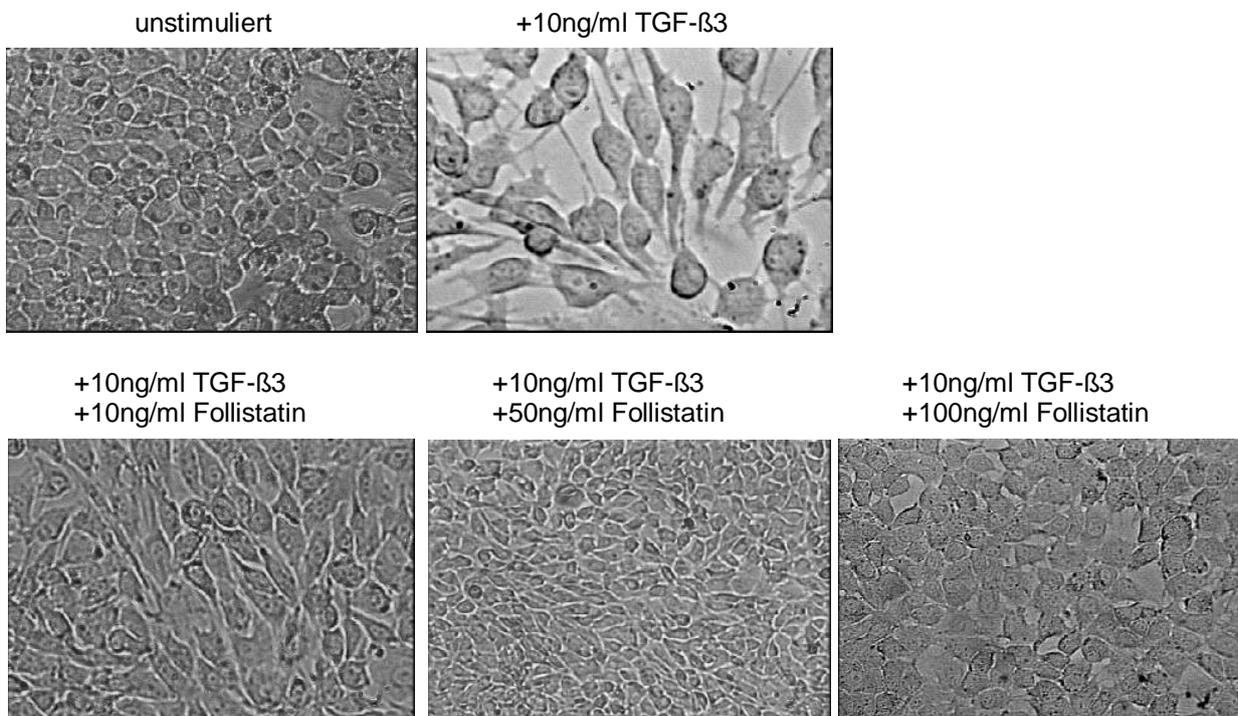


Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der unterschiedlich behandelten NMuMG-Zellen. Follistatin blockiert konzentrationsabhängig die TGF- β 3 induzierte epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung.

Aussehen und somit ihren epithelialen Phänotyp behalten. Die entsprechend dem Experiment in Abschnitt 3.2.1 durchgeführte alleinige Stimulation mit TGF- β 3 zeigte eine deutliche Transformation in mesenchymale Zellen. Demgegenüber zeigt der dritte Ansatz, dass Follistatin die TGF- β 3 induzierte Transdifferenzierung inhibiert: die Zellen behalten ihren epithelialen Charakter bei. Dieser hemmende Einfluss ist konzentrationsabhängig. Bei höheren Konzentrationen bewahren fast alle Zellen ihren epithelialen Charakter, während bei niedrigeren Konzentrationen einige Zellen die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung durchlaufen.

Für die beobachtete Inhibition von TGF- β 3 durch Follistatin sind mindestens zwei Mechanismen vorstellbar: entweder eine direkte Bindung der beiden Proteine aneinander oder eine Wirkung von Follistatin auf den Signaltransduktionsweg von TGF- β 3. Das folgende Experiment wurde durchgeführt, um den Wirkmechanismus näher zu analysieren.

3.2.3 Follistatin bindet direkt an TGF- β 3

Das BIACore-System nutzt die Oberflächenplasmon-Resonanz (surface plasmon resonance, SPR), um Affinitäten, also Bindungskapazitäten, zweier Proteine zu bestimmen (siehe Abschnitt 2.2.5). Ein Protein wird auf einem Sensor Chip durch eine Aminbindung immobilisiert. Das zweite Protein wird in PBS gelöst und über den beschichteten Sensor Chip gegeben, so dass beide Proteine in direkten Kontakt zueinander kommen. Besitzen sie die chemischen Voraussetzungen, eine unmittelbare Interaktion einzugehen, wird ein Teil des zweiten Proteins aufgrund der Bindung an das immobilisierte Protein auf dem Sensor Chip haften bleiben, was als Massenzunahme detektiert werden kann. Dadurch ist es möglich, die Affinitäten zweier Proteine zu bestimmen.

In diesem Experiment wurde TGF- β 3 an eine CM5 Sensor Chip Oberfläche gekoppelt. Auf diesen Chip wurde in PBS gelöstes Follistatin gegeben. Es wurden Konzentrationen von 10ng/ μ l, 20ng/ μ l, 40ng/ μ l und 100ng/ μ l gewählt. Wie in Abbildung 12 gezeigt ist, lässt sich eine deutliche Zunahme der Menge des gebundenen Follistatins in Abhängigkeit von dessen Konzentration beobachten. Bei einer Konzentration von 10ng/ μ l wurden 20RUs bei der Bindung an TGF- β 3 gemessen, was einer Menge von etwa 20pg/mm² gebundenem Follistatin entspricht. Bei zunehmender

Konzentration wurde entsprechend mehr Follistatin an die TGF- β s auf dem Chip gekoppelt. Das Maximum fand sich bei einer Konzentration von 100ng/ μ l, bei dem 1406RUs bei der Bindung an TGF- β 3, entsprechend etwa 1406pg/mm², gemessen wurden. Als Kontrolle wurde PBS mit BSA injiziert. Dabei wurde kein stärkeres SPR-Signal, also keine Massenzunahme beobachtet. Ebenso ist auf dem Chip eine Flusskammer ohne gekoppeltes Protein vorhanden, die als interne Kontrolle und Referenz zur Errechnung der gebundenen Masse verwendet wird. Auch hier wurde keine Zunahme des Signals detektiert.

Es fällt auf, dass der Anstieg nicht linear erfolgt, sondern eine exponentielle Steige-

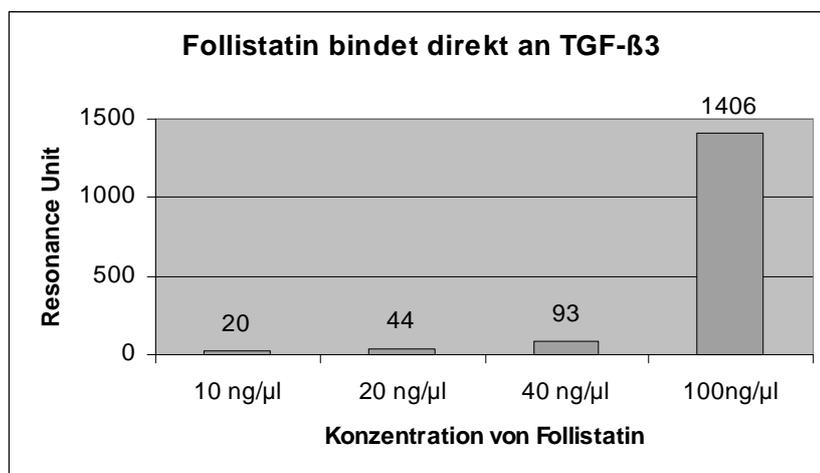
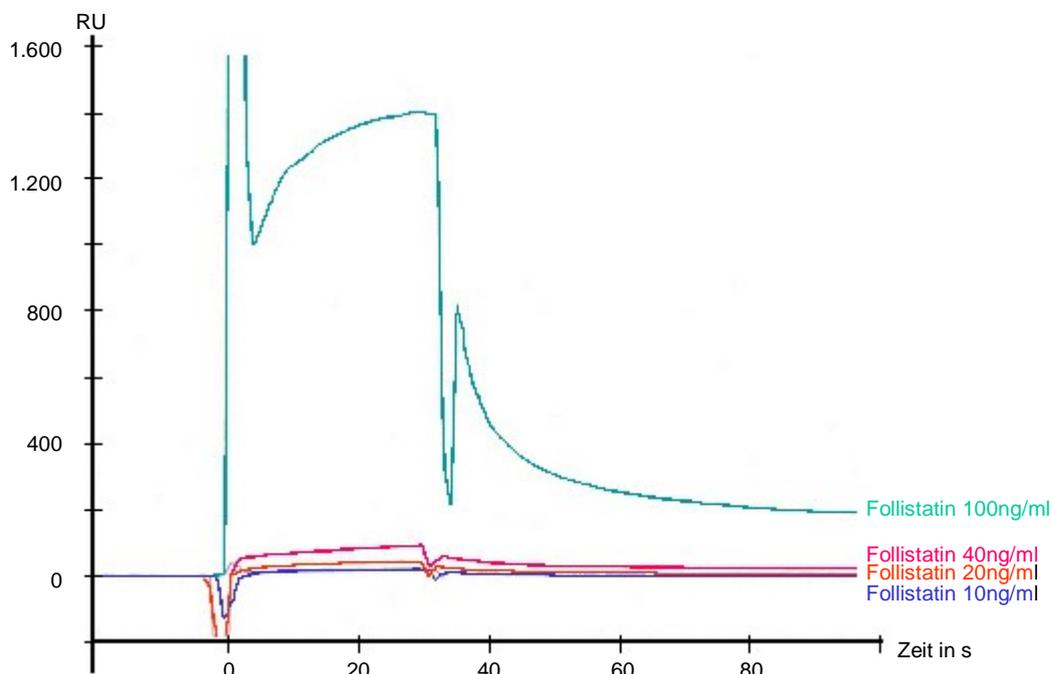


Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse der BIAcore-Analyse. In der oberen Abbildung sieht man den zeitlichen Verlauf der Bindung von Follistatin an den mit TGF- β 3 beschichteten Chip. In der unteren Abbildung sind die Maximalwerte der Bindung bei unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt.

nung des gebundenen Proteins zeigt. Dieses Ergebnis demonstriert eine direkte Bindung von Follistatin an TGF- β 3. Es zeigt außerdem, dass Follistatin eine hinreichend hohe Affinität hat, um auch in niedrigeren Konzentrationen eine Bindung an TGF- β 3 einzugehen.

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich keine Aussage über die Art der Bindung treffen. Es kann nicht geschlossen werden, ob Follistatin eine Konformationsänderung des TGF- β s bewirkt und dadurch eine weitere Anlagerung des Follistatins begünstigt.

3.3 Genexpressionsanalyse

Der Vorgang der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung muss eine Vielzahl von Änderungen der Genexpression auslösen, um die Umwandlung der Epithelzellen in Mesenchym zu bewirken. Von den meisten Genen, die dabei reguliert werden, ist eine Beteiligung an der EMT bislang noch nicht bekannt. Um diese Veränderungen der Genexpression, die durch die Stimulation mit TGF- β 3 hervorgerufen werden, näher zu untersuchen, wurde eine Untersuchung mit einem DNA-Chip durchgeführt, der die simultane Analyse von etwa 6000 Genen erlaubt. Aus Gewebe oder Zellkulturen gewonnene RNA wird markiert und auf den Chip hybridisiert. Für jedes Gen kann ein Signal detektiert werden, dessen Intensität von der Stärke der Expression in den präparierten Zellen abhängig ist.

Für dieses Experiment wurden NMuMG-Zellen jeweils in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Der erste Ansatz wurde nach einem Wechsel des Zellmediums, dem TGF- β 3 hinzugesetzt wurde, für weitere 36 Stunden inkubiert. Bei dem zweiten Ansatz wurde lediglich das Medium gewechselt, ohne dass Wachstumsfaktoren hinzugefügt wurden. Nach Ablauf der 36 Stunden wurden die Zellen beider Ansätze homogenisiert und die RNA präpariert, um für die Hybridisierung der Chips verwendet zu werden.

Die in Tabelle 1 gezeigten Daten repräsentieren die Genexpression in stimulierten gegenüber unstimulierten Zellen. So können diejenigen Gene bestimmt werden, die durch TGF- β 3 induziert bzw. supprimiert werden. Alle Gene, die um mindestens den Faktor 1,8 hoch- bzw. herunterreguliert wurden, wurden als signifikant gewertet. Alle 464 signifikanten Transkripte waren auf mindestens 75% der Chips vorhanden, und

die Expressionsstärke betrug wenigstens 50 auf mindestens einem Chip. Die Auswertung erfolgte mit der von dem Hersteller empfohlenen Software (Microarray Suite5.0, Data Mining Tool 3.0, Microsoft Access 2000). Alle in Tabelle 1 genannten Gene kodieren Zytokine, Chemokine oder Transkriptionsfaktoren, die am Aufbau der extrazellulären Matrix, an der Apoptose oder der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Der komplette Datensatz wurde bei der MIAMEexpress Datenbank des EMBL EBI hinterlegt.

Die Daten spiegeln die genetischen Grundlagen der mit der Transdifferenzierung einhergehenden morphologischen und funktionellen Veränderungen der Zellen wider: Einerseits zeigt sich, dass Gene, die die Proliferation von Zellen steuern, wie zum Beispiel E2F 8, DNA Primase, die Topoisomerase sowie die Gene Id-1 und Id-2, von denen außerdem bekannt ist, dass sie Differenzierungsvorgänge inhibieren können, herunterreguliert werden. Andererseits werden als Kennzeichen der verstärkten Produktion der mesenchymalen extrazellulären Matrix fünf Kollagen-Moleküle sowie Glykan und die Hyaluronsynthetase hochreguliert, die jeweils zum Aufbau von vernetztem Bindegewebe benötigt werden. Desweiteren konnte beobachtet werden, dass die Zellen ihre epithelialen Marker verlieren. Zum Beispiel verlieren sie das Oberflächenmolekül E-Cadherin, welches für die Adhärenz von Epithelzellen verantwortlich ist. Weitere epitheliale Marker, die herunterreguliert werden, sind zum Beispiel Keratin 19, Amphiregulin und EMP-1. Es wurde zuvor beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor Snail für die Einleitung einer epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung verantwortlich ist^{122;123}. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Snail durch die Stimulation TGF- β 3 hochreguliert wird. Neben diesen Veränderungen, die typisch für die EMT sind, werden auch proapoptotische Gene wie Programmed cell death 4, Gadd45a und Gadd45g hochreguliert. Das Gen, das am stärksten induziert wird, ist Clusterin. Dieses Glykoprotein wurde sowohl als pro- als auch als antiapoptotisches Gen identifiziert. Die unterschiedliche Wirkung scheint mit der Akkumulierung entweder im Nukleus (proapoptotisch) oder im Zytoplasma (antiapoptotisch) zu korrelieren. Die Veränderungen der Genexpression zeigen, dass sowohl Gene, die die Proliferation hemmen als auch Gene, die für die Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps verantwortlich sind, hochreguliert werden. Allerdings scheinen die Zellen im Rahmen der Transdifferenzierung auch anfällig für die Einleitung einer Apoptose zu werden. die am weiteren Differenzierungsverlauf bzw. an der

Bezeichnung des Gens	Acc.No	FC	Bezeichnung des Gens	Acc.No	FC
Inhibitor of differentiation 2	NM_010496	-17,63	Replication factor C	XM_132348	-2,23
Chemokine CXC 5	NM_009141	-4,96	Cyclin B1	NM_172301	-2,19
Keratin 19	NM_008471	-4,38	Mesothelin	NM_018857	-2,19
EGFR pathway substrate 8	NM_007945	-4,23	Eph receptor A2	NM_010139	-2,19
E2F transcription factor 8	NM_001013368	-3,34	Widely-interspaced ZFM	NM_011717	-2,17
Chemokine CXC 1	NM_008176	-3,27	Topoisomerase II alpha	NM_011623	-2,16
Amphiregulin	NM_009704	-3,05	Kinesin family member 11	NM_010615	-2,14
Epithelial membr. protein 1	NM_010128	-3,03	Birc5	NM_001012273	-2,13
Kruppel-like factor 5	NM_009769	-3,01	Mtm1	NM_019926	-2,11
Semaphorin	NM_013657	-2,97	HMG2	NM_008252	-2,11
Rhopilin	NM_027897	-2,95	Fidgetin-like 1	NM_021891	-2,10
Fos-like antigen 1	NM_010235	-2,87	CDC 46	NM_008566	-2,10
Retinol binding protein 4	NM_011255	-2,83	Transferrin receptor	NM_011638	-2,10
Inhibitor of differentiation 1	NM_010495	-2,81	IGFBP 3	NM_008343	-2,06
Lectin	NM_025622	-2,75	Helicase	NM_008234	-2,04
Transferrin receptor	NM_011638	-2,60	Ubiquitin spec. peptidase 1	NM_146144	-2,04
Cell division cycle 6	NM_001025779	-2,53	Proliferation-assoc. 2G4	NM_011119	-2,01
Epiregulin	NM_007950	-2,45	Hsp40	NM_134081	-2,00
Transferrin receptor	NM_011638	-2,41	FGF-16	NM_030614	-2,00
RAD51	NM_011234	-2,39	Laminin B	NM_008482	-2,00
Periplakin	NM_008909	-2,36	Geminin	NM_020567	-1,90
Ceruloplasmin	NM_007752	-2,33	Sox-6	NM_021790	-1,80
IFN activated gene 203	NM_001033450	-2,25	FGF-15	NM_008003	-1,80
Bezeichnung des Gens	Acc.No	FC	Bezeichnung des Gens	Acc.No	FC
Clusterin	NM_013492	12,04	Programmed cell death 4	NM_011050	2,41
Adarb1	NM_001024837	8,51	Peripheral myelin protein	NM_008885	2,38
Crif1	NM_018827	7,62	Latent TGFβ BP 1	NM_019919	2,38
Natriuretic peptide R 3	NM_001039181	4,26	Hip1r	NM_145070	2,31
Endothelin 1	NM_010104	4,11	Gelsolin	NM_146120	2,31
BHLH B2	NM_011498	3,92	Apbb2	NM_009686	2,27
Interleukin 11	NM_008350	3,89	Cathepsin E	NM_001040080	2,27
Myosin VIIa	NM_008663	3,89	Tenascin C	NM_011607	2,22
Max dimerization protein 4	NM_010753	3,66	Calponin 2	NM_007725	2,22
Adssl1	NM_007421	3,66	Fhod3	NM_175276	2,20
Procollagen 7	NM_007738	3,63	St5	NM_001001326	2,19
Gadd45a	NM_007836	3,61	TAP binding protein	NM_001025313	2,19
VEGF C	NM_009506	3,46	IGFBP 7	NM_008048	2,17
Plakophilin 1	NM_019645	3,32	Sat1	NM_009121	2,16
Hyaluronan synthase 2	NM_008216	3,27	Annexin A8	NM_013473	2,14
Nuclear protein 1	NM_019738	3,27	BMP-1	NM_009755	2,14
Nerve growth factor beta	NM_013609	3,18	PDGF alpha	NM_008808	2,14
Wisp1	NM_018865	3,12	Plakophilin 1	NM_019645	2,14
Txnip	NM_001009935	3,07	Hsd3b7	NM_001040684	2,10
Spsb1	NM_029035	3,03	Desmoplakin	XM_621314	2,07
Ras suppressor protein 1	NM_009105	2,95	Chemokine CXC 12	NM_001012477	2,07
Adenylate kinase 1	NM_021515	2,85	Prion protein	NM_011170	2,04
Ass1	NM_007494	2,83	chemokine CXXC 5	NM_133687	2,04
TIMP 3	NM_011595	2,83	Serpine1	NM_008871	2,03
Gadd45g	NM_011817	2,83	Plakophilin 2	NM_026163	2,00
VEGF A	NM_001025250	2,77	Procollagen 5	NM_015734	1,90
Akap12	NM_031185	2,71	Chemokine CC 7	NM_013654	1,90
CTLA2A	NM_007796	2,69	Procollagen 15	NM_009928	1,90
Ndr1	NM_008681	2,64	Zfhx-1	NM_011546	1,90
Adam12	NM_007400	2,60	Procollagen 4	NM_009931	1,80
Myomegalin	NM_001039376	2,57	SNAIL	NM_011427	1,80
Thrombospondin 1	NM_011580	2,48	Wnt 7b	NM_009528	1,80
Inhibin beta A	NM_008380	2,48	Alk 1	NM_007394	1,80

Tabelle 1: Auswahl während der EMT regulierter Gene. In der oberen Tabelle sind die negativ regulierten Gene, in der unteren sind die positiv regulierten Gene dargestellt. Die Spalte der Bezeichnung FC (*fold change*) gibt den Faktor der Änderung an.

Aufrechterhaltung des mesenchymalen Phänotyps beteiligt sind.

Anhand der Ergebnisse kann außerdem gesehen werden, dass die Zellen ihr Zytokinmuster und die Rezeptorausstattung verändern. Zum Beispiel wird die Expression von Activin β A deutlich hochreguliert. In Übereinstimmung mit der Induktion von Activin β A ist hierbei die deutliche Hochregulierung seines Typ II-Rezeptors Alk-1 zu erwähnen. Durch die veränderte Rezeptorausstattung kann gefolgert werden, welche Gene am weiteren Differenzierungsverlauf beziehungsweise an der Aufrechterhaltung des mesenchymalen Phänotyps beteiligt sind.

3.4 Veränderungen der Activin β A-Expression nach Stimulation der NMuMG-Zellen

Wie anhand der Daten des DNA-Chip-Experimentes erkennbar ist, wird die Activin β A-Expression durch Stimulation der NMuMG-Zellen mit TGF- β 3 hochreguliert. Diese Daten sollten unter Verwendung einer alternativen Methode reproduziert werden, um die Ergebnisse der DNA-Chip-Experimente zu verifizieren.

3.4.1 Activin β A wird durch Stimulation mit TGF- β 3 induziert

Als Ergänzung zu dem DNA-Chip wurde eine quantitative real-time RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden, wie auch schon im Vorexperiment, NMuMG-Zellen für 36 Stunden mit TGF- β 3 stimuliert, anschließend lysiert und die RNA präpariert.

Die quantitative RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers erlaubt es, die exakte Menge eines Transkriptes in einer bestimmten Probe zu ermitteln. Es kann somit beurteilt werden, ob und wie ein zu untersuchendes Gen durch Stimulation einer Zellkultur mit Wachstumsfaktoren reguliert wird. In dieser Arbeit sollte die Veränderung der Activin β A-Expression der NMuMG-Zellen nach Stimulation mit TGF- β 3 analysiert werden.

3.4.1.1 Etablierung der quantitativen real-time RT-PCR

Vor der Durchführung der eigentlichen Experimente wurden die Versuchsbedingungen für die quantitative real-time RT-PCR etabliert. Entscheidende Parameter sind dabei die Primerkombination, die Annealing-Temperatur und -Zeit und die MgCl₂-Konzentration (siehe Abschnitt 2.2.4).

Bevor die cDNA am LightCycler untersucht werden kann, muss die am besten geeignete Primerkombination gefunden werden. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass sie erstens eine ausreichende Sensitivität und Spezifität aufweist und zweitens eine geringe Neigung zur Bildung von Primerdimeren. Neben der optimalen Primerkombination wurde vor den Experimenten am LightCycler auch die ideale Annealingtemperatur ausgetestet, die für die hier verwendeten TGF- β 3 spezifischen Primerkombinationen bei 72°C lag. Diese Vorversuche wurden an einem herkömmlichen ThermoCycler durchgeführt und die Ergebnisse auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel ausgewertet. Die Primerkombination wurde außerdem im Rahmen der Schmelzpunktanalyse am LightCycler verifiziert (siehe Abschnitt 2.2.4).

Nach Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen in Bezug auf Primer und Annealing Temperatur musste im SYBR Green Format die MgCl₂-Konzentration, die die höchste Sensitivität ergab, ermittelt werden. Dazu wurde eine Versuchsreihe mit 2mM, 3mM, 3,5mM, 4mM und 5mM MgCl₂ angesetzt. Der Vergleich der Amplifikations- und Schmelzkurven zeigte das beste Ergebnis bei einer MgCl₂-Konzentration von 3,5mM. Alle weiteren Versuche wurden daher mit dieser Konzentration durchgeführt.

Als letzter Parameter wurde am LightCycler die ideale Annealing Zeit ermittelt. Nach Testung verschiedener Zyklusdauern ergab sich die geringste Neigung zu unspezifischen Bindungen mit einer ausreichenden Sensitivität bei einer Dauer von 20sec. Damit wurden alle nötigen Parameter für die Durchführung der quantitativen PCR bestimmt. Die unter diesen Bedingungen erhaltene Amplifikationseffizienz lag bei 1,9735.

3.4.1.2 Messung der Activin β A-Expression

Bei den *in situ* Hybridisierungen der embryonalen Gaumen wurde bereits festgestellt, dass Activin β A in dem subepithelialen Mesenchym exprimiert wird (siehe Abschnitt 3.1.3). Im Abschnitt 3.3 wurde ferner beschrieben, dass im Zuge der TGF- β 3 induzierten epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung in NMuMG-Zellen dieses Gen signifikant hochreguliert wird. Zur Verifizierung der Ergebnisse der DNA-Chip-Analyse mittels einer alternativen Methode wurde eine quantitative real-time RT-PCR durchgeführt, die ein spezifisches und sensitives Verfahren darstellt.

Zwei Ansätze von NMuMG-Zellen wurden in einer Dichte von jeweils 5×10^4 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Ablauf von 24 Stunden wurde bei der einen Kultur lediglich das Standardmedium gewechselt; in das frische Medium der anderen Kultur wurden 10ng/ml TGF- β 3 gegeben und die Zellen für weitere 36 Stunden inkubiert. Die Kontrolle mit einem Phasenkontrastmikroskop zeigte eine Veränderung der stimulierten Zellkultur zu spindeligen Einzelzellen im Sinne einer epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung (siehe Abschnitt 3.2.1). Beide Ansätze wurden der mRNA-Präparation zugeführt und diese in cDNA transkribiert. Somit lagen, wie auch für die DNA-Chip-Analysen, zwei unterschiedliche cDNA-Sätze vor, die nun miteinander verglichen werden konnten. Der cDNA-Satz des ersten Ansatzes zeigte die Genexpression der unstimulierten, nativen Zellen, der cDNA-Satz des zweiten Ansatzes zeigte die Genexpression der stimulierten, bereits transdifferenzierten Zellen.

Zur Messung und Quantifizierung der Activin β A-Expression im LightCycler wurden die Bedingungen gewählt, wie sie bei der Etablierung ausgetestet wurden (s. 2.2.4). Um die cDNAs zu normalisieren, das heißt, sie aufgrund ihrer unterschiedlichen absoluten Menge von DNA-Molekülen vergleichbar zu machen, wurden die erhaltenen Ergebnisse in Relation zu einem Haushaltsgen gesetzt. In dieser Arbeit wurde das Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) gewählt, ein Enzym, welches an der Nukleotidsynthese beteiligt ist.

Die sich aus den Rohdaten ergebenden Unterschiede in der Activin β A Templatekonzentration sind in Abbildung 13 gezeigt. Unstimulierte Zellen zeigen eine nur geringe Expression von Activin β A (normalisiertes Verhältnis von 1:0,16). Nach Stimulation mit TGF- β 3 und dadurch induzierter epithelio-mesenchymaler Transdifferenzierung war die Activin β A-Expression etwa um den Faktor 5,6 gesteigert.

Folglich wird die Activin β A-Expression durch TGF- β 3 induziert. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Daten der DNA-Chip-Experimente.

3.4.2 Follistatin kann die Induktion von Activin β A unterdrücken

In den *in vitro* Stimulationsexperimenten (s. 3.2.2) wurde gezeigt, dass Follistatin in der Lage ist, die TGF- β 3 induzierte epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung zu inhibieren. Diese antagonisierende Funktion wurde mittels morphologischer Beurtei-

lung der Zellen im Phasenkontrastmikroskop ermittelt. Da neben dem Phänotyp der Zellen auch die Activin β A-Expression einer TGF- β 3 abhängigen Veränderung unterliegt, sollte überprüft werden, ob Follistatin auch die Induktion des Activin β A-Gens inhibieren kann.

Fünf unterschiedliche Ansätze der NMuMG-Zellen wurden unter den oben genannten Bedingungen ausgesät. Nach Ablauf der oben genannten Inkubationszeit wurde bei dem ersten Ansatz das Standardmedium erneuert; bei dem zweiten Ansatz wurden ausschließlich 10 ng/ml TGF- β 3 in das frische Medium hinzugegeben; beim dritten bis fünften Ansatz wurde dem frischen Medium neben dem TGF- β 3 zusätzlich Follistatin in verschiedenen Konzentrationen (10ng/ml; 50ng/ml; 100ng/ml) zugefügt. Nach Inkubation für weitere 36 Stunden wurden die Kulturen unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Im ersten Ansatz fanden sich unveränderte NMuMG-Zellen. Die mit TGF- β 3 stimulierten Zellen zeigten langgezogene Zellausläufer, was für das Durchlaufen einer epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung sprach. Die zusätzlich mit Follistatin inkubierten Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Inhibition der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung: die Zellen behielten ihren epithelialen Charakter bei.

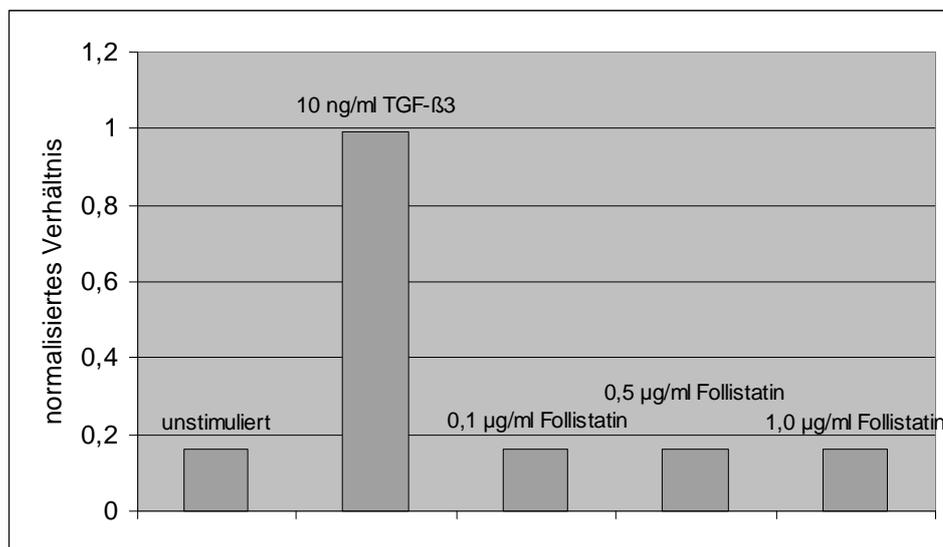


Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse der LightCycler-Analyse. Follistatin ist in der Lage, die Expression von Activin β A nach Addition von TGF- β 3 herunterzuregulieren.

Aus den Zellen sämtlicher Ansätze wurde die mRNA präpariert und in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde unter oben genannten Bedingungen der LightCycler Analyse zugeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 gezeigt. In dem Ansatz der unstimulierten Zellen konnte nur eine geringe Activin β A-Expression gemessen werden (vgl. auch Abschnitt 3.4.1). Durch Stimulation mit TGF- β 3 kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Menge des Activin β A Transkripts. Man sieht in den Ansätzen, denen Follistatin zugesetzt wurde, dass dieses Protein in der Lage ist, die TGF- β 3 induzierte Expression von Activin β A zu inhibieren. Alle getesteten Konzentrationen von Follistatin waren in der Lage, die Wirkung von TGF- β 3 in Bezug auf Activin β A komplett zu blockieren.

4 Diskussion

Die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung komplexer Organismen. Erst durch sie wird die Entstehung mesenchymaler Zellen während der Embryogenese ermöglicht, die sich in ihren Eigenschaften deutlich von Epithelien unterscheiden. Durch sie kann ein Gerüst aus Stützgeweben wie Knorpel, Knochen und Muskeln gebildet werden.

Ein wichtiges Kennzeichen der Mesenchymzellen ist ihre Fähigkeit, durch die Extrazellulärsubstanz zu migrieren. Im Gegensatz zu Epithelien haben sie die Möglichkeit, den starren Zellverbund zu verlassen und sich als individuelle Zelle fortzubewegen. Die Anlagen einer Vielzahl von Geweben und Organen sind auf eine Migration und Zusammenlagerung von mesenchymalen Zellen an den dafür bestimmten Stellen als sogenanntes Blastom angewiesen.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung kein Phänomen ist, das auf die Embryogenese beschränkt ist. Kommt es zum Beispiel aufgrund von Ischämien zu einer Schädigung der Tubulusepithelien der Niere, so können diese Zellen ihren epithelialen Phänotyp verlieren und als mesenchymale Zelle in das interstitielle Gewebe einwandern⁹³. Dort entgehen sie der drohenden Apoptose und wandeln sich in Myofibroblasten um, was langfristig eine renale Fibrose zur Folge hat. Auch bei der Metastasierung von malignen Tumoren spielt die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung eine entscheidende Rolle^{95;124} (siehe auch Abschnitt 1.3).

In dieser Arbeit wurden die physiologischen Vorgänge bei der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung des embryonalen Gaumens (Palatogenese) untersucht. Die beiden aus den Maxillarknochen entspringenden Fortsätze wachsen aufeinander zu und treffen sich in der Mittellinie. Bei der darauf folgenden Fusion der beiden Seiten verschwinden die Epithelzellen des MEE (*medial edge epithelium*). Dieser Vorgang wird sowohl durch Apoptose als auch durch eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung erzielt. Die durch die Analyse der Palatogenese gewonnenen Daten bezüglich der an der Transdifferenzierung beteiligten Proteine wurden in einem *in vitro* Modell unter Verwendung von murinen NMuMG-Zellen überprüft und bestätigt.

4.1 Verwendete Methoden

4.1.1 Expressionsanalysen

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, wonach ein Antagonist der TGF- β Superfamilie für die Regulation der TGF- β 3 induzierten epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung bei der Palatogenese verantwortlich ist. Dazu wurden zunächst die Expressionen der bekannten Antagonisten untersucht.

Die Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie vor allem über kurze Distanzen wirken, da sie durch Proteasen im Gewebe und im Blutkreislauf sehr schnell abgebaut werden und vor allem eine Bindung an die extrazelluläre Matrix eingehen, die für die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten entscheidend ist. Eine Beteiligung an den verschiedenen Entwicklungsschritten kommt also nur in Betracht, wenn die Proteine in unmittelbarer Umgebung der Zielzellen exprimiert werden. Die Untersuchung der Expression durch PCR und *in situ* Hybridisierung ist also eine geeignete Methode, um die Wachstumsfaktoren auf ihre Beteiligung bei der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung zu testen.

Aufgrund unterschiedlicher Regulationsmechanismen auf der Ebene der Translation, der Prozessierung und der Sekretion von Proteinen ist es schwierig, von der Expression eines Gens auf das Vorhandensein des aktiven Proteins zu schließen. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten das Verhältnis von translatiertem und sezerniertem Protein zu der Menge an zytoplasmatischer mRNA¹²⁵⁻¹²⁷. Die Autoren fanden Unterschiede in der Menge der mRNA verglichen mit dem sezernierten Protein bis zu einem Faktor von 20. Allerdings wurde in keiner der vorliegenden Arbeiten ein qualitativer Unterschied zwischen Detektion von mRNA und Anwesenheit des Proteins gefunden. Diesen Daten folgend, kann also kein Rückschluss auf die Menge, wohl aber auf das Vorhandensein des Proteins gezogen werden.

In dieser Arbeit wurden die Expressionsanalysen als Screeningverfahren angewendet, um die Kandidatengene aus der TGF- β Superfamilie zu testen. Auf eine Messung auf Proteinebene, zum Beispiel mittels eines Western Blots, wurde hier verzichtet. Zum einen ist die PCR als Screeningverfahren geeigneter, da sie ein vergleichsweise sensitiveres Verfahren darstellt, zum anderen wurden die aus den Expressi-

onsanalysen mittels *in situ* Hybridisierung gewonnenen Daten in einem funktionellen Assay mit NMuMG-Zellen verifiziert.

4.1.2 Funktionelle Analysen

Obwohl das Expressionsprofil eines Proteins der TGF- β Superfamilie bereits erste wichtige Anhaltspunkte für dessen Funktion liefert, ist eine Beteiligung an einer Vielzahl von Differenzierungsschritten möglich. Eine regulierende Wirkung von Follistatin auf die TGF- β 3 induzierte epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung kann also durch reine Expressionsanalysen nicht belegt werden.

Um eine Beteiligung tatsächlich nachweisen zu können, mussten funktionelle Hinweise gefunden werden, die aus definierten, reproduzierbaren Versuchsanordnungen resultieren. Die Ergebnisse, die am besten mit den *in vivo* Verhältnissen korrelieren, ergeben sich aus Versuchen, die mit dem unveränderten embryonalen Gewebe, also den primären Zellen, durchgeführt werden.

Zellen weisen je nach Differenzierungsgrad und Stimulation durch Wachstumsfaktoren eine unterschiedliche Ausstattung mit Rezeptoren und zytoplasmatischen Signaltransduktoren auf. Nur bei primären Zellen ist davon auszugehen, dass sie die gleichen Proteine exprimieren wie das originäre embryonale Gewebe. Ein entscheidender Nachteil der primären Zellen ist jedoch deren instabiler Phänotyp. Kommt es zu Änderungen in ihrer Mikroumgebung, reagieren sie darauf mit Differenzierungsvorgängen und Modifikationen ihrer Rezeptorausstattung.

Für die Transdifferenzierungsexperimente war es jedoch erforderlich, unter möglichst standardisierten Bedingungen eine längere Zeitspanne zu beobachten. In dieser Arbeit wurde daher auf eine Zelllinie, die NMuMG-Zellen, zurückgegriffen. NMuMG-Zellen sind murine Brustepithelzellen, die nach Stimulation mit TGF- β 1 zu Mesenchymzellen differenzieren. Dieser Vorgang wurde in verschiedenen Arbeiten untersucht und gleicht den phänotypischen Veränderungen während der Fusion der Gaumenfortsätze^{105;108}. Da die NMuMG-Zellen schon eine lange *in vitro* Passage durchlaufen haben und es sich um Karzinomzellen handelt, also um Zellen, die einen pathologischen Phänotyp aufweisen, ist dieser Ansatz zwar artefizieller als die Arbeit mit primären Zellen. Jedoch zeichnen sich NMuMG-Zellen durch einen sehr stabilen Phänotyp aus und lassen sich problemlos über einen längeren Zeitraum kultivieren. Ferner existieren verschiedene Hinweise, dass die Veränderungen der NMuMG-

Zellen im Rahmen der EMT auch *in vivo* gefunden werden. Die Genexpression dieses Prozesses wurde in einer aktuellen Arbeit in Bezug auf die Signaltransduktion untersucht¹²⁸. Dabei zeigte sich, dass eine Vielzahl der regulierten Gene bereits als Prognose- oder Metastasierungsmarker in malignen, humanen Tumoren beschrieben wurden. Außerdem zeigte ein Vergleich dieser Daten mit dem Expressionsprofil humaner HMEC- und HaCaT-Zellen, dass eine Vielzahl der Gene ein konserviertes Regulationsmuster zeigt, das auch bei murinen NMuMG-Zellen zu finden ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass neben TGF- β 1 auch TGF- β 3 in der Lage ist, in diesen Zellen eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung zu induzieren. Somit steht mit dieser Zelllinie ein geeignetes Modell zur Verfügung, um die EMT zu untersuchen, so dass zugunsten reproduzierbarer Ergebnisse unter Standardbedingungen auf diese Zelllinie zurückgegriffen wurde.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsanalysen mittels BIAcore-Technologie konnte eine direkte Interaktion zwischen TGF- β 3 und Follistatin gefunden werden. Bei dieser Methode werden zwei Proteine in engen räumlichen Kontakt gebracht und die gebundene Menge quantifiziert. Da die Konzentrationen der einzelnen Proteine beliebig gewählt werden können, bleibt durch diese Methode ungeklärt, ob die gefundene Interaktion physiologisch relevant ist. In den vorliegenden *in vitro* Stimulationsexperimenten wurde ein inhibitorischer Effekt von Follistatin auf die TGF- β 3 induzierte epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung jedoch bereits bei einem etwa 3-fachen molaren Überschuss gesehen. Es ist davon auszugehen, dass diese Konzentrationen in der physiologischen Entwicklung erreicht werden.

4.1.3 Genomweite Expressionsanalyse

Durch die DNA Microarray Technologie ist es möglich, die Expression bzw. Regulation einer Vielzahl von Genen eines Gewebes in nur einem Versuchsablauf zu testen.

Hier wurden die Expressionsmuster von unstimulierten NMuMG-Zellen mit denen von mit TGF- β 3 stimulierten verglichen. Da die Expressionsdaten indirekt über normalisierte Haushaltsgene quantifiziert werden können, lässt der Vergleich beider Expressionsmuster Rückschlüsse auf die Regulation der untersuchten Gene zu. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass eine quantitative Änderung noch kein Beweis für die tatsächliche Beteiligung an den untersuchten Veränderungen ist.

Die bereits erwähnte Arbeit von Valcourt führte eine genomweite Expressionsanalyse zur Untersuchung der Signaltransduktionswege und der Rezeptorausstattung während der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung von NMuMG-Zellen durch¹²⁸. Dabei wurden auch einige der Gene untersucht, die sich auf dem in dieser Arbeit verwendeten DNA-Chip befinden. Bezüglich des Expressionsmusters dieser Gene konnten übereinstimmende Veränderungen festgestellt werden. Dies unterstützt die Verwertbarkeit der vorliegend gewonnenen Daten.

Bezüglich der Spezifität von DNA-Chip Experimenten existiert bislang nur eine begrenzte Anzahl systematischer Analysen. Daher wurden die Ergebnisse dieser Arbeit einerseits mit einer alternativen Methode mittels quantitativer RT-PCR verifiziert (siehe Abschnitt 3.4) und werden andererseits im folgenden in den Kontext mit den aus der Literatur bekannten Daten gestellt, einschließlich der Phänotypen der entsprechenden Knock-out Mäuse. Hieraus ergeben sich Übereinstimmungen, die in die abschließend formulierte Hypothese Eingang gefunden haben (siehe Abschnitt 4.5).

4.2 Übersicht über relevante Knock-out Mäuse

Hinweise auf die Funktion einzelner Proteine erhält man durch die gezielte Mutagenese in Mäusen. Dabei werden die zu analysierenden Gene in den Stammzellen deletiert. Die auf diese Weise mutierten Nachkommen, die sogenannten Knock-out Mäuse, werden mit den gesunden Neugeborenen verglichen. Durch den Phänotyp und die Art der Malformationen gewinnt man Einblicke in die Wirkprofile der Proteine.

Die Analyse der in der Literatur verfügbaren Daten zu Mitgliedern der TGF- β Superfamilie und anderen Faktoren gibt Informationen über die Beteiligungen der verschiedenen Proteine.

4.2.1 TGF- β 3 Knock-out Maus

Die TGF- β 3 Knock-out Maus stirbt bereits innerhalb der ersten 10-20 postpartalen Stunden^{33,34}. Als Todesursache wird die Unfähigkeit der Neugeborenen angenommen, sich an der Mutter zu säugen. Diese Unfähigkeit resultiert aus einer persistierenden Gaumenspalte, die den Aufbau eines Unterdrucks in der Mundhöhle verhindert. Neben dieser isolierten Gaumenspalte fallen die Mäuse durch eine unreife Lunge mit alveolärer Hypoplasie und Surfactant-Mangel aufgrund des Fehlens von Alveolarzellen vom Typ II auf. Die knöchernen Strukturen des Gesichtsschädels zeigen

abgesehen von der Gaumenspalte allerdings keine weiteren Anomalien, was die spezifische Beteiligung an der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung in der Palatogenese unterstützt.

4.2.2 Follistatin Knock-out Maus

Bei der Follistatin Knock-out Maus wurde festgestellt, dass die Neugeborenen wachstumsretardiert sind und eine glänzende, straffe Haut aufgrund einer deutlichen Hyperkeratose haben¹²⁹. Die Muskelmasse ihres Zwerchfells und der Interkostalmuskulatur ist vermindert. Die Entwicklung ihrer Schnurrhaare und der Zähne ist gestört, und die Mäuse weisen eine Gaumenspalte auf. Neben dem Expressionsprofil und der Wirkung auf TGF- β 3, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, ist der fehlende Verschluss des Gaumens ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Follistatin bei der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung im Rahmen der Palatogenese. Die anderen genannten Malformationen zeigen das breite Wirkspektrum dieses Antagonisten, der in vielen Organen des Embryos gefunden werden kann und dort verschiedene Differenzierungsschritte beeinflusst.

4.2.3 Activin Knock-out Maus

Wird Activin β A in Mäusen gezielt deletiert, kommt es neben Störungen in der Zahnentwicklung ebenfalls zu einer Gaumenspalte¹³⁰. Dies ist in Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit gefundenen Expressionsmuster, das eine Beteiligung in der epithelio-mesenchymalen Signalinteraktion nahe legt. Vergleicht man die Activin β A defiziente Maus mit der Follistatin Knock-out Maus, fällt auf, dass jeweils unterschiedliche Organe betroffen sind. Daraus wird ersichtlich, dass diese beiden Proteine über das Activin-Follistatin-System hinaus an unterschiedlichen Entwicklungsschritten beteiligt sind.

4.2.4 Knock-out Mäuse weiterer Proteine

Weitere Knock-out Mäuse, bei denen eine Gaumenspalte persistiert, sind zum Beispiel solche Mäuse, denen das Gen für Msx-1 und Lhx-8 fehlt.

Msx1 ist ein Protein, das aufgrund des Expressionsprofils in Verbindung mit epithelio-mesenchymalen Interaktionen gebracht werden kann. Die Msx1 Knock-out Maus¹³¹ weist neben der Fehlentwicklung des Gaumens weitere Störungen der Kraniofazialentwicklung auf, bei denen ein Zusammenspiel des Epithels und des Mesen-

chyms erforderlich ist, wie z.B. die Entwicklung der Zähne und des Malleolus im Mittelohr. Eine Msx-1 Expression findet sich in den Mesenchymzellen der Gaumenfortsätze¹³².

Bei Lhx-8 handelt es sich um ein Homöobox-Gen, das die Expression von abhängigen Genen steuert. Im Expressionsprofil zeigt sich, das Lhx-8 spezifisch im Mesenchym des embryonalen Gaumens exprimiert wird¹³³. Bei den Lhx-8 Knock-out Mäusen ist zu beobachten, dass sich der Gaumen normal entwickelt und in die Horizontale hebt. Danach kommt es allerdings zu einer Störung der Fusion beider gegenüberliegender Gaumenfortsätze¹³⁴, was eine Beteiligung bei der epithelomesenchymale Transdifferenzierung nahe legt.

Eine Gaumenspalte kann als Folge der Ausschaltung einer Reihe von Genen auftreten und wird daher auch bei vielen Knock-out Mäusen beschrieben. Dabei muss allerdings unterschieden werden, ob die Gaumenspalte aus einem intrinsischen Defekt der direkt daran beteiligten Strukturen entsteht oder nur indirekt durch Einflüsse, die entweder systemisch wirken oder auf die angrenzende Umgebung, wie z.B. den knöchernen Schädel, beschränkt sind. Kommt es zu einer Änderung der Geometrie des Gesichts, kann daraus indirekt die Fusion der Gaumenfortsätze verhindert werden. Daher ist zu überprüfen, ob die Gaumenspalte isoliert auftritt oder mit anderen Malformationen im Kraniofazium vergesellschaftet ist. Durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen im Rahmen der Palatogenese wie Proliferation, Elevation und Fusion (siehe Abschnitt 1.1) ist dieser Entwicklungsschritt besonders sensibel, und äußere Einflüsse können zu nahezu jedem Zeitpunkt eine Missbildung hervorrufen. Das verdeutlicht die Komplexität dieses Entwicklungsschrittes und erklärt auch die relative Häufigkeit dieser Fehlbildung beim Menschen.

Störungen der mesenchymalen Proliferation aufgrund von Alterationen der Sauerstoffbindungskapazität der Erythrozyten oder aufgrund der Einwirkung zytotoxischer Substanzen resultieren häufig in der Entstehung einer Gaumenspalte. So ist auch die Entstehung von Gaumenspalten bei Folsäuredefizienzen oder im Rahmen eines Nikotinabusus der Mutter zu erklären. Folsäure ist für die DNA-Synthese essentiell; ist es nicht in genügender Menge für den Embryo verfügbar, kommt es zu Proliferationsstörungen in den Gaumenfortsätzen, so dass diese keinen Kontakt in der Medianlinie eingehen können und eine Gaumenspalte persistiert. Beim Nikotinabusus

kommt es zu einer Verminderung der Sauerstoffbindungskapazität mit nachfolgender Störung der Proliferation des Mesenchyms. Ein direkter Einfluss durch Nikotin auf die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Schließlich können auch Defekte in den Genen des Retinolsäurerezeptors RAR alpha, der NADH Dehydrogenase und des Cytochroms P-450 zu einer Gaumenspalte führen¹³⁵.

4.3 Untersuchte Faktoren

4.3.1 Die Rolle von TGF- β 3

Die Expression von TGF- β 3 während der Palatogenese wurde bereits in mehreren Studien sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene untersucht^{31;136}. Es findet sich übereinstimmend eine spezifische Expression von TGF- β 3 in den Zellen des MEE. Obwohl die Fusion der beiden Gaumenfortsätze nicht vor dem Tag E14.5 stattfindet, beschreiben die Autoren früherer Studien eine Detektion des TGF- β 3 Transkripts bereits in den noch vertikal gerichteten Fortsätzen am Tag E13.5. Dieses Transkript kann so lange gefunden werden, bis die Epithelzellen transdifferenzieren und dadurch ein konfluentes Mesenchym gebildet wird. Diese Daten geben erste Hinweise auf die Fähigkeit von TGF- β 3, eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung zu induzieren. In dieser Arbeit konnten die bekannten Expressionsdaten mittels PCR und *in situ* Hybridisierung reproduziert werden.

Für NMuMG-Zellen wurde beschrieben, dass eine Stimulation mit TGF- β 1 zu einer epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung führt¹⁰⁸. Informationen zu anderen Isotypen von TGF- β lagen bislang noch nicht vor.

Vorliegend konnte gezeigt werden, dass auch TGF- β 3 in der Lage ist, eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung in NMuMG-Zellen zu induzieren. Dieser Effekt war nicht unerwartet, da die Isotypen bekanntermaßen über den gleichen Rezeptor wirken können und deshalb häufig gleichartige Veränderungen in den Zielzellen hervorrufen. Aber erst der Nachweis, dass auch TGF- β 3 für die Induktion verwendet werden kann, macht die NMuMG-Zellen zu einem geeigneten Modell für die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung.

4.3.2 Die Rolle von Follistatin

Durch die Expressionsanalysen an Geweben des embryonalen Gaumens mittels PCR konnte die Beteiligung der meisten untersuchten Antagonisten der TGF- β Superfamilie an der Palatogenese ausgeschlossen werden, da keine Transkripte detektiert werden konnten. Wie oben bereits erwähnt, wurde auf eine Messung auf Proteinebene verzichtet. Aufgrund der höheren Sensitivität der PCR kann jedoch bei negativem PCR-Ergebnis bereits die Expression eines Proteins ausgeschlossen werden.

Einzig die mRNA von Follistatin und seinem engen Verwandten Follistatin-like wurde mittels PCR detektiert. Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten *in situ* Hybridisierung ließen eine Funktion für Follistatin-like allerdings unwahrscheinlich erscheinen, da dieses Protein unspezifisch im gesamten Mesenchym des Kraniofaziums exprimiert wird. Es erscheint bei dieser Verteilung unwahrscheinlich, dass Follistatin-like an einem Entwicklungsschritt teilnimmt, der nur eine streng limitierte Region wie das MEE betrifft. Dagegen konnte Follistatin mittels PCR im Gewebe des embryonalen Gaumens nachgewiesen werden. Wie die *in situ* Hybridisierung zeigte, wird es spezifisch lokal im MEE und vor allem zeitlich in der kritischen Phase vor der Fusion der Gaumenfortsätze exprimiert. Das Expressionsprofil weist also auf eine Beteiligung von Follistatin bei der Palatogenese hin, weshalb Follistatin im Rahmen eines funktionellen Assays mit NMuMG-Zellen als möglicher Inhibitor und zeitlicher Regulator der durch TGF- β 3 induzierten epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung während der Palatogenese näher untersucht wurde.

NMuMG-Zellen, die mit TGF- β 3 stimuliert werden, weisen nach 36 Stunden eine deutliche Änderung ihrer Morphologie auf, die eine stattgefundene Transdifferenzierung anzeigt. Wird bei diesen Zellen neben TGF- β 3 auch Follistatin ins Medium gegeben, so bleibt der epitheliale Phänotyp bestehen. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der Wirkung von TGF- β 3.

In der Literatur finden sich weitere Beispiele, in denen Follistatin Differenzierungsvorgänge beeinflusst, indem es Wachstumsfaktoren antagonisiert^{58;121;137}. Die am genauesten untersuchte Interaktion besteht zwischen Follistatin und Activin (siehe Abschnitt 1.2.3).

Doch auch andere Mitglieder der TGF- β Superfamilie können durch Follistatin antagonisiert werden. Beispielsweise differenziert in der Embryogenese das Mesoderm in

das sogenannte ventrale und das dorsale Mesoderm. Aus dem ventralen Mesoderm gehen schließlich unter anderem Blutzellen, Somiten und Muskelgewebe hervor. Von BMP-4 ist bekannt, dass es das Mesoderm ventralisiert¹³⁸⁻¹⁴⁰. Außerdem wurde gezeigt, dass BMP-4 die neuralisierende Potenz des Ektoderms unterdrücken kann^{141;142}. Kompetentes Gewebe ist in der Lage, zu neuronalen Strukturen zu differenzieren, wenn es in Nachbarschaft zum Mesoderm gebracht wird. Dafür ist die Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren nicht notwendig. Die Funktion von BMP-4 besteht in der Blockierung dieser neuronalen Differenzierung. Untersuchungen mit Follistatin haben gezeigt, dass dieses Molekül die anti-neuralisierende Wirkung von BMP-4 aufheben kann und außerdem das Mesoderm dorsalisiert. Studien von Fainsod haben gezeigt, dass die Wirkung von Follistatin auf einer Antagonisierung von BMP-4 beruht. Diese Wirkung wird durch eine direkte Bindung dieser beiden Proteine vermittelt¹³⁷.

Das oben genannte Beispiel zeigt die Wirkung von Follistatin in anderen Systemen und weist auf die Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit hin, die eine direkte Wechselwirkung von Follistatin und TGF- β 3 nahelegen.

Mithilfe von Protein-Protein-Bindungsuntersuchungen mittels BIAcore wurde in dieser Arbeit ergänzend zu den *in situ*-Expressionsuntersuchungen in den embryonalen Gewebeschnitten und den funktionellen Untersuchungen der Zelllinien gezeigt, dass Follistatin eine direkte Interaktion mit TGF- β 3 eingeht. In Verbindung mit den Zellkulturexperimenten konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass Follistatin eine inhibierende Wirkung auf TGF- β 3 ausübt und dass diese auf einer Bindung von Follistatin an TGF- β 3 beruht, was vermutlich zu einer Inaktivierung des Liganden führt.

4.3.3 Die Rolle von Activin

In der Literatur existiert eine Vielzahl von Untersuchungen des sogenannten Activin-Follistatin-Systems. Nachdem eine spezifische Expression von Follistatin im MEE festgestellt wurde, wurde daher explizit nach dieser Interaktion gesucht. Die *in situ* Hybridisierungen mit histologischen Schnitten des Gaumens des Tages E13.5 zeigten ein spezifisches Verteilungsmuster der Activin β A-exprimierenden Zellen. Die Mesenchymzellen, die ein positives Signal für eine Activin β A-Expression geben, befinden sich genau im Gewebe unter den Follistatin-exprimierenden Epithelien. Im weiteren zeitlichen Verlauf bleibt die Expression dieser beiden Gene auch am Tag E14.5

auf die enge räumliche Nachbarschaft beschränkt. Sobald am Tag E15.5 das Mesenchym konfluent geworden ist, kann weder eine Activin- noch eine Follistatin-Expression detektiert werden. Diese Beobachtungen sprechen für eine gemeinsame Beteiligung an der in dieser Arbeit untersuchten epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung. Wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben wurde, gibt es verschiedene bekannten Interaktionen zwischen Follistatin und Activin. Diese können sowohl in der Inhibition des Activins durch Follistatin als auch in einer Induktion der Follistatin-Genexpression durch Activin liegen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die Rolle des Follistatins in der Inhibition des TGF- β 3 liegt. Somit ist eine zusätzliche Inhibition von Activin durch Follistatin nicht wahrscheinlich. Die Funktion von Activin in der Palatogenese liegt daher eher in der Regulation der Expression von Follistatin, wie dies in anderen Zellsystemen bereits beschrieben wurde^{78;79}.

Diese Annahme wird durch Untersuchungen gestützt, die gezeigt haben, dass Activin keinen direkten Einfluss auf die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung hat¹²⁸. Daher ist eine indirekte Funktion über die Induktion der Follistatin-Expression eher wahrscheinlich.

4.4 Genomweite Expressionsanalyse

Es war bekannt und ist in dieser Arbeit reproduziert worden, dass TGF- β 3 die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung induziert^{30;84;105}. Mit welchen weiteren Veränderungen der Genexpression dieser Schritt einhergeht, wurde bisher jedoch nicht umfassend analysiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Chip-Analysen der Genexpression vor und nach der Stimulation von NMuMG-Zellen mit TGF- β 3 erbrachte Informationen über die Beteiligung zahlreicher weiterer Gene, die die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung einleiten und den mesenchymalen Phänotyp aufrecht erhalten.

Bei der Auswertung der Daten der Chips wurden nur die Gene als signifikant gewertet, die eine Veränderung der Expression um mindestens den Faktor 1,8 und eine ausreichende Stärke auf mindestens 75% der Chips aufweisen. Eine Auswahl von Genen mit ihren Funktionen, so sie bekannt sind, ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Daten zeigen, dass die Zellen parallel zur Veränderung ihres Phänotypes ihre epithelialen Marker wie E-Cadherin und Keratine verlieren. Entsprechend findet sich eine verstärkte Expression von Kollagenmolekülen und der Hyaluronsynthetase, die für

die Extrazellulärmatrix von mesenchymalen Zellen charakteristisch sind. Sie werden im Anschluss an die EMT für die Funktion der Mesenchymzelle und die Aufrechterhaltung des Phänotyps benötigt.

Es zeigte sich ferner, dass die proliferatorischen Gene, E2F 8, die DNA Primase und die Topoisomerase herunterreguliert werden. Dies legt nahe, dass die Zellen in ihrer Proliferation gehemmt werden. Gleichzeitig wird die Differenzierung eingeleitet, indem Inhibitoren der Zelldifferenzierung wie Id-1 und Id-2 ebenfalls herunterreguliert werden. Es ist bekannt, dass diese Gene die weitere Differenzierung epithelialer Zellen inhibieren¹⁴³. Ebenso werden proapoptotische Marker hochreguliert. Hier ist vor allen Dingen auf Clusterin hinzuweisen, dessen Expression durch TGF- β 3 signifikant stimuliert wird. Es wurde beschrieben, dass dieses Protein, wenn es im Zytoplasma akkumuliert, einen Schutz vor Apoptose und eine Resistenz von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika bietet^{144;145}. Hierzu laufen bereits verschiedene tierexperimentelle Studien^{146;147}. Im Gegensatz dazu hat eine Anreicherung von Clusterin im Nukleus eine proapoptotische Wirkung¹⁴⁸. Anhand der Chip-Daten ist die Lokalisation des fertigen Proteins nicht zu bestimmen. Allerdings zeigen die Daten, dass die Induktion von Clusterin mit weiteren proapoptotischen Genen wie Programmed cell death 4, Gadd45a und Gadd45g assoziiert ist, so dass am ehesten von einer gemeinsamen Einleitung einer Apoptose auszugehen ist.

Neben der bereits erwähnten Induktion proapoptotischer Gene fällt auf, dass Snail signifikant durch TGF- β 3 reguliert wird. Snail wurde in früheren Studien neben einer Reihe weiterer Kandidatengene als Induktor bzw. sogenanntes Mastergen der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung identifiziert^{122;149}. Das Snail-Protein ist ein Mitglied der Snail Familie, einer Gruppe von Zinkfingermolekülen mit ähnlichen strukturellen Eigenschaften¹⁵⁰. Allen gemeinsam ist die Fähigkeit zur sequenzspezifischen Bindung an nukleäre DNA. Snail wurde erstmals 1984 in *Drosophila* beschrieben¹⁵¹. Seither wurden Homologe in vielen Spezies gefunden, darunter in Zebrafisch, *Xenopus*, Maus und Mensch. Snail ist in der Lage, in der Zellkultur epitheliale Zellen zu Mesenchymzellen zu konvertieren. Es konnte gezeigt werden, dass dies durch eine Snail-induzierte Suppression der E-Cadherin-Expression vermittelt wird^{122;149}. Zudem wurde bei Snail-defizienten Tieren beobachtet, dass sie im Stadium der Gastrulation versterben. Dabei bilden sie eine mesodermale Schicht, die ausschließ-

lich aus epithelialen Zellen besteht. Als Ursache wird eine andauernde Expression von E-Cadherin in den mutierten Tieren angenommen¹²³. E-Cadherin ist bislang das einzige bekannte direkte Zielgen, das durch Snail beeinflusst wird. Genetische Analysen und Überexpressionsexperimente weisen allerdings auf weitere direkte oder indirekte Kandidatenziele hin. So werden epitheliale Marker wie Desmoplakin, Muc-1 und Zytokeratin-18 in Snail-transfizierten Zellen herunterreguliert¹⁵² und mesenchymale Marker wie Vimentin und Fibronectin werden hochreguliert. In dieser Arbeit wurde eine deutliche Hochregulation von Snail nach Stimulation mit TGF- β 3 beobachtet, was ein weiteres Kennzeichen der EMT darstellt.

In früheren Studien bei der Analyse der TGF- β 3 induzierten Veränderungen des MEE während der Palatogenese bezüglich der Rollen von EMT bzw. Apoptose uneinheitliche Beobachtungen gemacht: Während einige Studien vor allem durch *in vitro* Experimente mit Zelllinien oder aus Organkulturen mit Gaumenfortsätzen eindeutige Hinweise auf eine EMT lieferten^{24;25}, konnten in anderen Studien *in vivo* hauptsächlich apoptotische Vorgänge gesehen werden²³.

Betrachtet man die in dieser Arbeit mit Hilfe des DNA-Chips identifizierten Veränderungen der Genexpression, so lassen sich sowohl Hinweise auf eine Apoptose als auch auf eine EMT finden. Es ist also denkbar, dass *in vivo* beide Vorgänge parallel stattfinden. Durch die Supprimierung der Inhibitoren der Differenzierung (Id-1 und Id-2) werden die Zellen in einen instabilen Phänotyp versetzt. Dieser ermöglicht einerseits die Einleitung der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung, andererseits werden die Zellen anfällig für Fehldifferenzierung, die zu einer malignen Transformation führen können. Um dieses zu verhindern, wird die Schwelle, eine Apoptose zu durchlaufen, in diesen Zellen verringert. Dies könnte erklären, weshalb beide Vorgänge während der Palatogenese gefunden werden.

4.5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, Follistatin als einen physiologischen Inhibitor der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung zu identifizieren. Dieses Ergebnis konnte in einer *in vitro* Zellkultur bestätigt werden. Außerdem konnte durch weitergehende Untersuchungen gezeigt werden, dass diese Inhibition durch direkte Bindung an TGF- β 3 zustande kommt und konzentrationsabhängig ist. Neben der Rolle von Follistatin und TGF- β 3 wurden Hinweise auf eine Beteiligung von Activin β A

gefunden. Zum weiteren Verständnis der durch TGF- β 3 induzierten epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung wurden die verwendeten NMuMG-Zellen in Bezug auf die EMT durch genomweite Analysen der Genexpression mittels DNA-Chip näher charakterisiert.

Bei den Untersuchungen fanden sich zwischen Maus und Mensch konservierte Veränderungen der Genexpression. Außerdem wurden verschiedene Gene auch in anderen Zellsystemen mit der EMT in Verbindung gebracht¹²⁸. Es ist also möglich, dass es sich hierbei um einen allgemeingültigen Vorgang mit jeweils geringen Variationen handeln.

Anhand der nun vorliegenden Daten kann in dieser Arbeit ein neues hypothetisches Modell der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung vorgestellt werden. Diese Hypothese berücksichtigt sowohl Daten, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, als auch solche, die aus der Literatur bekannt sind. Sie soll die Regulation der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung erklären und Denkanstöße für die weitere Untersuchung des Phänomens der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung geben. Die Hypothese ist schematisch in Abbildung 14 gezeigt und wird im Folgenden weiter erläutert.

Demnach kann die Entwicklung des embryonalen Gaumens von dem Zeitpunkt der Elevation in die Horizontale bis zur endgültigen Fusion in drei Schritte eingeteilt werden (I-III in Abbildung 14).

I. Der Induktor der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung ist TGF- β 3^{32;34}. Die Expression dieses Wachstumsfaktors ist auf das MEE beschränkt. Da nur die Epithelzellen des MEE TGF- β 3 sezernieren, ist es wahrscheinlich, dass die Expression von exogenen Signalen abhängt. Vermutlich ist sie durch die Vermittlung von Proteinen aus dem subepithelialen Mesenchym bedingt. In diesem Fall sollte ein spezifischer Transkriptionsfaktor existieren, der von schnell proliferierenden Fibroblasten gebildet wird und die Transkription des Signals des subepithelialen Mesenchyms steuert. Entsprechend seinem Expressionsprofil könnte Lhx-8 diese Funktion übernehmen. Lhx-8 wird ab E13.5 im Mesenchym des Gaumens exprimiert, im Epithel dagegen wird es zu keinem Zeitpunkt detektiert¹³³. Die Beteiligung von Lhx-8 wird auch durch die Tatsache nahe gelegt, dass die Lhx-8 defiziente Maus eine Gaumenspalte aufweist¹³⁴.

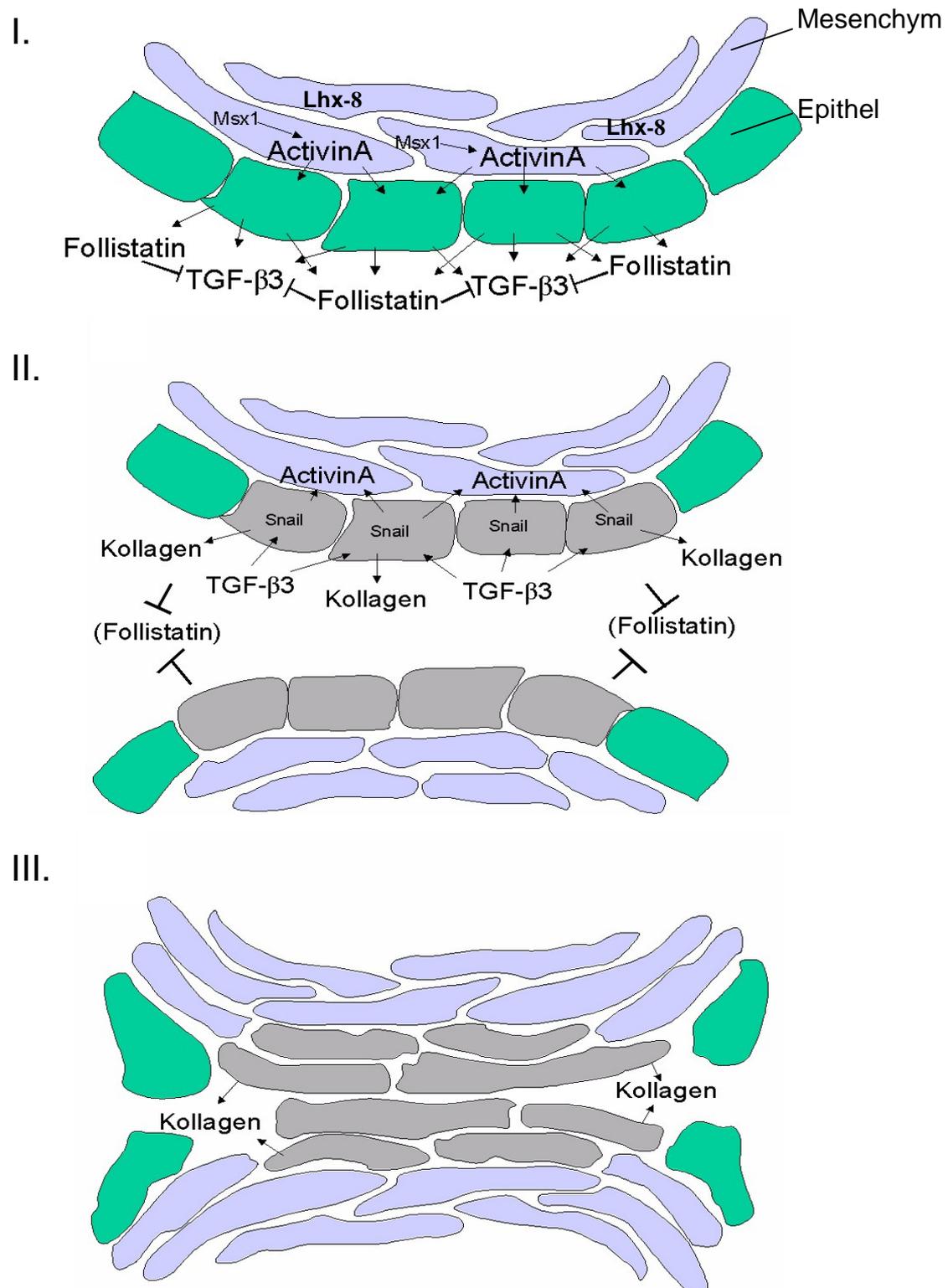


Abbildung 14:

I. Die mesenchymalen Zellen sezernieren, vermittelt durch Msx-1, ActivinA, das die Expression von Follistatin im Epithel induziert. Die TGF-β3-Expression wird durch Lhx-8, das ebenfalls im Mesenchym gebildet wird, induziert. Follistatin inhibiert zunächst die Wirkung von TGF-β3
 II. Nachdem die Follistatin-vermittelte Inhibition von TGF-β3 überwunden wurde, wird die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung induziert. Snail nimmt dabei eine wichtige Vermittlerrolle ein.
 III. Nach Abschluss der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung wird die ECM durch Sekretion von Kollagen aufgebaut.

Gemäß der hier vorgestellten Hypothese bewirkt die Bindung von ActivinA an die Epithelzellen des MEE eine Induktion der Genexpression von Follistatin. Am Beispiel der Zahnentwicklung konnte gezeigt werden, dass Msx-1 als Transkriptionsfaktors die Expression von Acitivin steuert. Auch bei der Entwicklung der Extremitäten spielt Msx-1 eine ähnliche Rolle. Durch Transplantationsexperimente, bei denen die Epithelschicht auf ektopes Gewebe verpflanzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Epithelien wiederum verantwortlich für die Msx-Expression sind¹⁵³. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde bei der Zahnknospe gefunden, bei der das Zahnepithel Signale an das Mesenchym sendet, die die Expression von Msx-1 bewirken und letztlich die Differenzierung in den Follikel und die Papille steuern¹⁵⁴. Msx-1 wird im Mesenchym des embryonalen Gaumens exprimiert und kommt daher als funktionelles Verbindungsstück in Betracht. Die Vermutung wird durch den Phänotyp der Msx-1 defizienten Maus gestützt, die unter anderem eine Gaumenspalte zeigt¹³¹. Die Regulation der Genexpression ist also auf das Zusammenspiel des Epithels und des Mesenchyms angewiesen.

Die Transdifferenzierung der Epithelien vor der Fusion durch Autostimulation mit TGF- β 3 wird zunächst durch die direkte Bindung von TGF- β 3 an Follistatin blockiert, das in diesen Zellen unter dem Einfluss von ActivinA gebildet wird. Sowohl das Expressionsprofil laut Analysen mittels PCR und *in situ* Hybridisierung als auch die direkte Bindung weist auf diese Funktion hin. Die Follistatin-Knock-out Maus zeigt ferner eine Gaumenspalte, was ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Follistatin an der Palatogenese ist. Die Unfähigkeit dieser Mäuse, eine zusammenhängende Gaumenplatte zu bilden, resultiert aus der vorzeitigen Differenzierung der Epithelzellen. Die komplexe epithelio-mesenchymale Signalinteraktion, die die weitere Proliferation der Gaumenfortsätze steuert, wird dadurch unterbrochen. Die Epithelzellschicht, die schließlich die rudimentären, postnatalen Gaumenfortsätze bedeckt, stellt also eher eine regenerierte Oberfläche im Sinne einer Defektheilung dar. Sie kann ihre Aufgabe der Signalvermittlung an das Mesenchym nicht mehr wahrnehmen.

II. Wie die hemmende Wirkung des Follistatins zum Zeitpunkt der physiologischen Fusion überwunden wird, ist nicht geklärt. Mindestens zwei Möglichkeiten sind denkbar: Entweder kommt es zu einer lokalen Anreicherung von TGF- β 3 in dem Moment,

in dem sich die Gaumenfortsätze beider Seiten nähern, oder der Inhibitor wird enzymatisch abgebaut. Organkulturrexperimente mit isolierten Gaumenfortsätzen haben gezeigt, dass ein Kontakt zwischen den beiden Seiten und dadurch eine lokale Anreicherung nicht notwendig ist³⁶. Am ehesten findet also ein enzymatischer Abbau statt. Ein derartiger enzymatischer Abbau ist für Chordin bekannt, einen Antagonisten der TGF- β Superfamilie, der an der Regulation des Haarfollikels beteiligt ist und durch die Protease BMP-1 abgebaut wird¹⁵⁵. Die vorliegenden Daten der Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass die beiden Proteasen BMP-1 und Furin bei der TGF- β 3 induzierten epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung der Palatogenese induziert werden. BMP-1 und Furin Knock-out Mäuse sterben jeweils intrauterin aufgrund einer Störung des Verschlusses der Bauchwand, ein Prozess, der ebenfalls EMT-abhängig ist^{156;157}. Beide Proteasen scheinen also einen Einfluss auf die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung zu haben.

Nach der Inaktivierung von Follistatin bindet TGF- β 3 an seinen Rezeptor, komplexiert diesen und führt, wie durch die Genexpressionsanalysen dieser Arbeit gezeigt wurde, zu einer Induktion von Snail, einem Mastergen der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung. Unter Berücksichtigung früherer Arbeiten ist anzunehmen, dass alle weiteren Veränderungen der Genexpression durch Snail induziert werden^{122;123}.

III. Die Stimulation mit TGF- β 3 führt zu einer kompletten Alteration der Zellmorphologie, zur Produktion von extrazellulärer Matrix, die charakteristisch für Bindegewebe ist, und dadurch zur Fusion der beiden Gaumenfortsätze. In diesem Stadium kann der Prozess durch Mutationen in den Kollagenmolekülen verhindert werden. Es ist anzunehmen, dass die durchlaufene epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung aufrechterhalten werden muss, um eine Umkehrung in den epithelialen Phänotyp zu verhindern. Bei der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung im Verlauf einer renalen Fibrose kann es durch Verabreichung von exogenem BMP-7 zu einer Reversion der EMT und Umwandlung der Mesenchymzellen in Epithelien kommen¹⁵⁸. Daraus wird deutlich, dass prinzipiell eine Redifferenzierung möglich ist. Möglicherweise wird die Aufrechterhaltung des mesenchymalen Phänotyps durch Mitglieder der Wnt Familie ausgeführt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Wnt7a in den transdifferenzierten Zellen hochreguliert ist. Es ist bekannt, dass dieses Protein in der

Lunge die mesenchymale Proliferation reguliert und an den *ror-2*-Rezeptor binden kann. Ein Rezeptor, dessen Mutation ebenfalls zu einer Gaumenspalte führt¹⁵⁹.

4.6 Ausblick

Das Verständnis der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung wird in Zukunft neue therapeutische Optionen eröffnen. In dieser Arbeit wurde dieses Phänomen am Modell der Gaumenentwicklung untersucht. Eine Gaumenspalte ist eine verhältnismäßig häufig auftretende Fehlbildung bei Neugeborenen, die eine Reihe von operativen Eingriffen und dadurch eine große Belastung des Kindes und der Eltern nach sich zieht. Therapeutische oder prophylaktische Möglichkeiten in Bezug auf diese Fehlbildung haben daher einen hohen Stellenwert in der Medizin. Das Verständnis der Palatogenese ist eine entscheidende Grundlage für die Entwicklung neuer Therapien. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung nur ein einzelner Schritt in einer aufeinander abgestimmten Abfolge von Ereignissen ist. So kann eine Reihe von Faktoren zur Ausbildung einer Gaumenspalte führen. Als Beispiel seien hier Defekte in den Genen des Retinolsäurerezeptors RAR alpha, der NADH Dehydrogenase und im Cytochrom P-450 genannt¹³⁵. Es ist außerdem bekannt, dass mütterlicher Folsäuremangel oder Nikotinkonsum zu einer Gaumenspalte führen können (siehe Abschnitt 1.1). Allen genannten Ursachen liegt am ehesten eine Induktion der Apoptose im Rahmen einer massiven Zellschädigung bzw. eine Nekrose aufgrund von Mangel essentieller Enzyme und Sauerstoff zugrunde¹⁶⁰. Folsäure wird außerdem für die DNA-Synthese benötigt, so dass ein Mangel Störungen der Proliferation verursachen kann.

Unter Berücksichtigung der Vielzahl von Ursachen, die zu einer Gaumenspalte führen, erscheint es schwierig, durch die isolierte Beeinflussung der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung die Inzidenz der Fehlbildung zu verringern. In Bezug auf die induzierende Wirkung von TGF- β 3 gibt es allerdings Ansätze, pränatal diagnostizierte Gaumenspalten durch rekombinantes TGF- β 3 zu behandeln¹⁶¹. In der zitierten Studie konnte gezeigt werden, dass TGF- β in der Lage ist, bei Mäusen die Plazentaschranke zu überwinden und daher eine Applikation bei der Mutter genügt, um einen Wirkspiegel im Embryo zu erreichen. Erste Erfolge konnten bei TGF- β 3 defizienten Mäusen bereits nachgewiesen werden. Allerdings bleibt ungeklärt, ob

eine Wirkung auch bei einer pathogenetisch anderen Ursache erzielt bzw. wie eine systemische Wirkung bei Mutter und Kind verhindert werden kann.

Eine weitere möglicherweise einfacher zu realisierende Anwendung, bei der die neuen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zur epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung von Nutzen sein können, ist die Verbesserung der Wundheilung. Hierbei muss die Anwendung nicht auf die Verbesserung des postoperativen Verlaufes bei einem Verschluss einer Gaumenspalte beschränkt bleiben. Es ist bekannt, dass fetale Wunden in einem Vorgang, der eher einer Regeneration als einer Reparatur ähnelt, ohne Narbenbildung abheilen können^{89;162}. Für diese besondere Form der Wundheilung sind Erklärungen wie das feuchte Milieu und die Abwesenheit von bakteriellen Infektionen nicht hinreichend, wie Studien gezeigt haben, bei denen adulte Haut unter fetalen Bedingungen kultiviert wurde¹⁶³. Neben den äußeren Bedingungen spielen endogene Faktoren wie die Chemotaxis von Entzündungszellen und die Expression von Wachstumsfaktoren, die die Zellteilung stimulieren und einen Einfluss auf die Bildung der extrazellulären Matrix haben, eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung¹⁶⁴. Die Expression der Isoformen und der Rezeptoren von TGF- β in fetalen und in adulten Wunden unterscheidet sich^{165;166}, was die Bedeutung dieser Wachstumsfaktoren bei der Wundheilung betont. Weitere Hinweise stammen aus Studien, bei denen nachgewiesen werden konnte, dass exogenes TGF- β 3 die Narbenbildung verhindern bzw. deutlich verringern kann¹⁶⁷.

Nicht nur für die Isoformen von TGF- β ist ein Einfluss auf die Wundheilung gezeigt worden. Auch die Veränderung der Activin-Expression während der Wundheilung ist in Studien untersucht worden. Dabei zeigte sich eine Induktion von ActivinA im Granulationsgewebe nach Hautverletzung¹⁶⁸. ActivinB wird ebenfalls induziert, jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt, dafür länger anhaltend. Die genaue Rolle dieser Faktoren ist noch ungeklärt. Die Wundheilung scheint ferner ein weiteres Beispiel eines Activin-Follistatin-Systems zu sein. Durch Überexpression von Follistatin in der Haut wurde gezeigt, dass dieses Protein in der Lage ist, einerseits zu einer verzögerten Wundheilung zu führen, auf der anderen Seite jedoch die Bildung des Granulationsgewebes zu reduzieren und einer Narbenbildung daher vorzubeugen¹⁶⁹.

Diese Daten zeigen die Ähnlichkeiten zu der in dieser Arbeit beschriebenen epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung am Beispiel der Palatogenese. Das genauere

Verständnis dieses Vorgangs kann somit in der Zukunft weitere Ansatzpunkte bei der Verbesserung der Wundheilung aufzeigen.

Die Bedeutung von TGF- β 3 und seine Regulation im Rahmen der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung ist weiterhin in Zusammenhang mit Fibrosen der Lunge, der Leber und der Nieren gezeigt worden¹⁷⁰. Bei der glomerulären Fibrose^{93;171} und der diabetischen Nephropathie zum Beispiel ist eine enge Korrelation zwischen Expression von TGF- β -Isoformen und der Progression der Erkrankung gezeigt worden^{172;173}. Antikörper gegen TGF- β sind in der Lage, den Fortschritt der Erkrankung – zumindest für einen begrenzten Zeitraum – aufzuhalten¹⁷⁴. Außerdem führt die Insulinbehandlung zu einer reduzierten Expression von TGF- β mit verzögertem Fortschritt der Fibrose¹⁷⁵. Daten bezüglich der Beteiligung anderer Wachstumsfaktoren sind noch spärlich, allerdings ist davon auszugehen, dass auch hier ein tieferes Verständnis der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung neue therapeutischen Optionen eröffnen kann.

Gleiches gilt für die Metastasierung maligner Tumore, bei der eine Rolle der EMT bereits beschrieben wurde^{95;124}. TGF- β 3, das sowohl eine Wachstums-inhibierende und Apoptose-induzierende Wirkung haben kann^{176;177} als auch die invasive und metastatische Potenz von Tumorzellen stimuliert¹⁷⁸, ist hierbei ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Karzinomen. Vor allem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B scheint für die letzteren Wirkungen verantwortlich zu sein¹¹⁶ (siehe Abschnitt 1.3.1). Es konnte gezeigt werden, dass die TGF- β induzierte Aktivierung eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung initiiert und den mesenchymalen Phänotyp aufrechterhält. Die Unterbrechung dieses Signaltransduktionsweges verhindert die Metastasierung von Brustepithelzellen in einem Mausmodell¹¹⁶. Eine Beeinflussung dieses TGF- β 3 abhängigen Schrittes auf der Ebene der Wachstumsfaktoren zum Beispiel durch die Anwendung von exogenem Follistatin als Inhibitor kann in Zukunft neben der zytostatischen Therapie eine weitere Option bei der Behandlung von Malignomen darstellen.

5 Zusammenfassung

Die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) wurde ursprünglich als ein Phänomen der Embryogenese beschrieben. Durch EMT erlangen Epithelzellen die Möglichkeit, als individuelle Zelle durch die extrazelluläre Matrix zu migrieren und die Somiten zu bilden. Dadurch wurde die Entstehung komplexerer Organismen erst möglich. Auch in späteren Stadien der Embryogenese findet man Beispiele für EMT, zum Beispiel bei der Involution des Müllerganges oder bei der Fusion der Gaumenfortsätze. Neben der Bedeutung während der Embryogenese spielt die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen des Erwachsenen, wie zum Beispiel bei der Karzinogenese oder der renalen Fibrose.

In dieser Arbeit wurden die physiologischen Regulationsmechanismen der EMT anhand der Palatogenese untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Follistatin spezifisch in den Epithelzellen exprimiert wird, die eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung durchlaufen. Außerdem ist Follistatin in der Lage, die TGF- β 3 induzierte Transdifferenzierung in einem *in vitro* Modell zu inhibieren. Diese Inhibition kommt durch direkte Bindung der beiden Proteine zustande, wie Analysen mithilfe der Oberflächenplasmonenresonanz gezeigt haben.

Um die Veränderungen der Genexpression zu untersuchen, die im Rahmen der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung durch TGF- β 3 induziert werden, wurden Analysen mit einem DNA-Microarray durchgeführt. Die Auswertung der so gewonnenen Daten ergab eine Reihe von Kandidatengenen, die an dem komplexen Prozess der epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung beteiligt sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse geben neue Einsichten in den Prozess der epithelio-mesenchymalen Transdifferenzierung und belegen erstmalig die inhibierende Rolle des Follistatins.

Schlagwörter: Epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung, Palatogenese, TGF- β , Follistatin

6 Abstract

Epithelio-mesenchymal transdifferentiation (EMT) is a phenomenon that was initially described in embryogenesis. Due to EMT, epithelial cells acquire the ability to migrate through the extracellular matrix as individual cells and subsequently form the somites. This was a prerequisite for the the emergence of more complex organisms. There are examples of EMT also in later stages of embryogenesis, such as during the involution of the Mullerian duct or the fusion of the palatal processes. Besides its relevance during embryogenesis, the epithelio-mesenchymal transdifferentiation is substantially involved in the pathogenesis of different diseases in adults, such as carcinogenesis or renal fibrosis.

In this work, the physiological mechanisms of EMT regulation during palatogenesis were studied. It was shown, that Follistatin is specifically expressed in epithelial cells that undergo epithelio-mesenchymal transdifferentiation. In addition, Follistatin is able to inhibit TGF- β 3 induced transdifferentiation in an *in vitro* model. This inhibition is mediated by direct binding of the proteins, as observed by surface plasmon resonance analyses.

To identify the changes of gene expression induced by TGF- β 3 during epithelio-mesenchymal transdifferentiation, analyses using DNA-microarrays were performed. Evaluation of the microarray data revealed a number of candidate genes that are involved in the complex process of epithelio-mesenchymal transdifferentiation.

The results presented in this study give new insights in the progress of epithelio-mesenchymal transdifferentiation and for the first time demonstrate the inhibiting role of Follistatin.

Key words: epithelio-mesenchymal transdifferentiation, palatogenesis, TGF- β , Follistatin

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Roland Lauster für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am DRFZ anzufertigen. Besonders möchte ich Roland für das entgegengebrachte Vertrauen, seinen Einsatz und die außergewöhnlich gute Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe danken. Nur dadurch war das selbständige Arbeiten an dieser Promotion möglich.

Ich danke den Mitgliedern der AG Lauster, die mich in die Geheimnisse der Laborarbeiten eingewiesen haben: Mark, der sich immer Zeit für meine Probleme genommen hat und seine Ruhe nur am Schlagzeug verliert; Daniel, der neben wichtigen fachlichen Diskussionen einen wesentlichen Beitrag zum seelischen Gleichgewicht durch gelegentliches „Daddeln“ leistete; Miriam, die mich hoffentlich durch regelmäßige „D-Mails“ weiterhin auf dem laufenden halten wird; und natürlich Luzie, die nicht nur aus jedem misslungenen Experiment noch einen positiven Klon zaubern kann, sondern wegen ihrer Fürsorge und Anteilnahme nicht zu ersetzen ist. Auch den anderen Mitarbeitern des DRFZ, die stets für Probleme und Fragen ein offenes Ohr hatten, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Außerdem möchte ich mich bei Gül Schmidt und Carola Lauster aus der Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie für ihre Unterstützung bedanken. Vor allem danke ich Carola für ihre Aufmunterungen auf unseren Reisen nach Göteborg und Leipzig.

Für die Hilfe bei der Durchführung der *in situ* Hybridisierungen möchte ich mich bei Frau Professor Andrea Vortkamp und Eleonora Minina bedanken, die damals noch am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik tätig waren. Besonders natürlich auch für die vielen interessanten Diskussionen in deren Arbeitsgruppe.

Das BIACore-System lernte ich durch Nils Debus und Mathias Steinach kennen, denen ich dafür herzlich danken möchte.

Und natürlich hätte ich nie die Möglichkeit gehabt, diese Arbeit durchzuführen ohne die Hilfe meiner Eltern während des Studiums und der Promotion. Ich bin auch meinem Bruder dankbar, der nicht nur einen kritischen Blick auf meine Dissertationsschrift geworfen hat, sondern stets ein wichtiger Ratgeber war.

Schließlich möchte ich Svenja für ihre Motivation und ihre nützlichen Ideen in allen Lebenslagen danken und vor allem dafür, dass sie meine unverzichtbare Begleiterin geworden ist bei allem, das noch auf uns zukommen mag...

Vielen Dank!

Referenzen

1. Hoffmann, H and Hudgins, PA. 2002.
2. Heister, L. Die Chirurgie. 1719.
3. Andrews, J. and J.M. McGarry. 1972. A community study of smoking in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* 79:1057-1073.
4. Werler, M.M., E.J. Lammer, L. Rosenberg, and A.A. Mitchell. 1991. Maternal alcohol use in relation to selected birth defects. *Am. J. Epidemiol.* 134:691-698.
5. Munger, R.G., P.A. Romitti, S. Daack-Hirsch, T.L. Burns, J.C. Murray, and J. Hanson. 1996. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology* 54:27-33.
6. Longo, L.D. 1982. Some health consequences of maternal smoking: issues without answers. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 18:13-31.
7. Millicovsky, G. and M.C. Johnston. 1981. Hyperoxia and hypoxia in pregnancy: simple experimental manipulation alters the incidence of cleft lip and palate in CL/Fr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78:5722-5723.
8. Tolarova, M. and J. Harris. 1995. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 51:71-78.
9. Shaw, G.M., E.J. Lammer, C.R. Wasserman, C.D. O'Malley, and M.M. Tolarova. 1995. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 346:393-396.
10. Czeizel, A.E., L. Timar, and A. Sarkozi. 1999. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics* 104:e66.
11. Wong, S.C., L. Zhang, T.L. Witt, S.A. Proefke, A. Bhushan, and L.H. Matherly. 1999. Impaired membrane transport in methotrexate-resistant CCRF-CEM cells involves early translation termination and increased turnover of a mutant reduced folate carrier. *J. Biol. Chem.* 274:10388-10394.
12. Gorlin, R.J. and J. Cervenka. 1974. Syndromes of facial clefting. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 8:13-25.
13. Mitchell, L.E. and N. Risch. 1993. Correlates of genetic risk for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Clin. Genet.* 43:255-260.
14. Ardinger, H.H., K.H. Buetow, G.I. Bell, J. Bardach, D.R. Van Demark, and J.C. Murray. 1989. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am. J. Hum. Genet.* 45:348-353.
15. Holder, S.E., G.M. Vintiner, B. Farren, S. Malcolm, and R.M. Winter. 1992. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. *J. Med. Genet.* 29:390-392.
16. Sassani, R., S.P. Bartlett, H. Feng, A. Goldner-Sauve, A.K. Haq, K.H. Buetow, and D.L. Gasser. 1993. Association between alleles of the transforming growth factor-alpha locus and the occurrence of cleft lip. *Am. J. Med. Genet.* 45:565-569.
17. Burdett, D.N., J.D. Waterfield, and R.M. Shah. 1988. Vertical development of the secondary palate in hamster embryos following exposure to 6-mercaptopurine. *Teratology* 37:591-597.
18. Pratt, R.M., J.F. Goggins, A.L. Wilk, and C.T. King. 1973. Acid mucopolysaccharide synthesis in the secondary palate of the developing rat at the time of rotation and fusion. *Dev. Biol.* 32:230-237.

19. Turley, E.A., M.D. Hollenberg, and R.M. Pratt. 1985. Effect of epidermal growth factor/urogastrone on glycosaminoglycan synthesis and accumulation in vitro in the developing mouse palate. *Differentiation* 28:279-285.
20. Zimmerman, E.F., R.L. Clark, S. Ganguli, and K. Venkatasubramanian. 1983. Serotonin regulation of palatal cell motility and metabolism. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 3:371-385.
21. Bulleit, R.F. and E.F. Zimmerman. 1985. The influence of the epithelium on palate shelf reorientation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 88:265-279.
22. Wragg, L.E., J.A. Smith, and C.S. Borden. 1972. Myoneural maturation and function of the foetal rat tongue at the time of secondary palate closure. *Arch. Oral Biol.* 17:673-682.
23. Martinez-Alvarez, C., C. Tudela, J. Perez-Miguelsanz, S. O'Kane, J. Puerta, and M.W. Ferguson. 2000. Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev. Biol.* 220:343-357.
24. Griffith, C.M. and E.D. Hay. 1992. Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development* 116:1087-1099.
25. Fitchett, J.E. and E.D. Hay. 1989. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev. Biol.* 131:455-474.
26. Fyfe, D.M., M.W. Ferguson, and R. Chiquet-Ehrismann. 1988. Immunocytochemical localisation of tenascin during the development of scleral papillae and scleral ossicles in the embryonic chick. *J. Anat.* 159:117-127.
27. Yoneda, T. and R.M. Pratt. 1981. Mesenchymal cells from the human embryonic palate are highly responsive to epidermal growth factor. *Science* 213:563-565.
28. Slack, J.M., B.G. Darlington, J.K. Heath, and S.F. Godsave. 1987. Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* 326:197-200.
29. Lynch, S.E., J.C. Nixon, R.B. Colvin, and H.N. Antoniades. 1987. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7696-7700.
30. Kaartinen, V., X.M. Cui, N. Heisterkamp, J. Groffen, and C.F. Shuler. 1997. Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev. Dyn.* 209:255-260.
31. Pelton, R.W., B.L. Hogan, D.A. Miller, and H.L. Moses. 1990. Differential expression of genes encoding TGFs beta 1, beta 2, and beta 3 during murine palate formation. *Dev. Biol.* 141:456-460.
32. Brunet, C.L., P.M. Sharpe, and M.W. Ferguson. 1995. Inhibition of TGF-beta 3 (but not TGF-beta 1 or TGF-beta 2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 39:345-355.
33. Proetzel, G., S.A. Pawlowski, M.V. Wiles, M. Yin, G.P. Boivin, P.N. Howles, J. Ding, M.W. Ferguson, and T. Doetschman. 1995. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat. Genet.* 11:409-414.
34. Kaartinen, V., J.W. Voncken, C. Shuler, D. Warburton, D. Bu, N. Heisterkamp, and J. Groffen. 1995. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* 11:415-421.

35. Sun,D., C.R.Vanderburg, G.S.Odierna, and E.D.Hay. 1998. TGFbeta3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. *Development* 125:95-105.
36. Ferguson,M.W., L.S.Honig, and H.C.Slavkin. 1984. Differentiation of cultured palatal shelves from alligator, chick, and mouse embryos. *Anat.Rec.* 209:231-249.
37. Padgett,R.W., J.M.Wozney, and W.M.Gelbart. 1993. Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:2905-2909.
38. Urist,M.R. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899.
39. Urist,M.R., H.Iwata, P.L.Ceccotti, R.L.Dorfman, S.D.Boyd, R.M.McDowell, and C.Chien. 1973. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 70:3511-3515.
40. Urist,M.R., A.Mikulski, and A.Lietze. 1979. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76:1828-1832.
41. Bottinger,E.P., J.J.Letterio, and A.B.Roberts. 1997. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int.* 51:1355-1360.
42. Ebendal,T., H.Bengtsson, and S.Soderstrom. 1998. Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain. *J.Neurosci.Res.* 51:139-146.
43. Harland,R.M. 1994. The transforming growth factor beta family and induction of the vertebrate mesoderm: bone morphogenetic proteins are ventral inducers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:10243-10246.
44. Wozney,J.M. 1992. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol.Reprod.Dev.* 32:160-167.
45. Ducy,P. and G.Karsenty. 2000. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* 57:2207-2214.
46. Graff,J.M. 1997. Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question. *Cell* 89:171-174.
47. Hogan,B.L. 1996. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 6:432-438.
48. Kawabata,M., T.Imamura, H.Inoue, J.Hanai, A.Nishihara, A.Hanyu, M.Takase, Y.Ishidou, Y.Udagawa, E.Oeda, D.Goto, K.Yagi, M.Kato, and K.Miyazono. 1999. Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 886:73-82.
49. Kingsley,D.M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8:133-146.
50. Reddi,A.H. 1997. BMPs: actions in flesh and bone. *Nat.Med.* 3:837-839.
51. de la Pena,L.S., P.C.Billings, J.L.Fiori, J.Ahn, F.S.Kaplan, and E.M.Shore. 2005. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. *J.Bone Miner.Res.* 20:1168-1176.
52. Schlunegger,M.P., N.Cerletti, D.A.Cox, G.K.McMaster, A.Schmitz, and M.G.Grutter. 1992. Crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant human transforming growth factor beta 2. *FEBS Lett.* 303:91-93.
53. Daopin,S., K.A.Piez, Y.Ogawa, and D.R.Davies. 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257:369-373.

54. Griffith, D.L., P.C. Keck, T.K. Sampath, D.C. Rueger, and W.D. Carlson. 1996. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:878-883.
55. McPherron, A.C. and S.J. Lee. 1993. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J. Biol. Chem.* 268:3444-3449.
56. Cui, Y., F. Jean, G. Thomas, and J.L. Christian. 1998. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J.* 17:4735-4743.
57. Constam, D.B. and E.J. Robertson. 1999. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J. Cell Biol.* 144:139-149.
58. Otsuka, F., R.K. Moore, S. Iemura, N. Ueno, and S. Shimasaki. 2001. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:961-966.
59. Phillips, D.J. 2000. Regulation of activin's access to the cell: why is mother nature such a control freak? *Bioessays* 22:689-696.
60. Reddi, A.H. 2001. Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN. *Arthritis Res.* 3:1-5.
61. Massague, J. and F. Weis-Garcia. 1996. Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv.* 27:41-64.
62. Liu, F., F. Ventura, J. Doody, and J. Massague. 1995. Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell Biol.* 15:3479-3486.
63. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.
64. Massague, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-791.
65. Massague, J. and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19:1745-1754.
66. Wrana, J.L. 2000. Regulation of Smad activity. *Cell* 100:189-192.
67. Roberts, A.B. and R. Derynck. 2001. Meeting report: signaling schemes for TGF-beta. *Sci. STKE.* 2001:E43.
68. de Caestecker, M.P., E. Piek, and A.B. Roberts. 2000. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92:1388-1402.
69. Yu, L., M.C. Hebert, and Y.E. Zhang. 2002. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* 21:3749-3759.
70. Mottram, J. C. and Cramer, W. On the general effect of exposure to radium on metabolism and tumour growth in the rat and the special effects on the testis and pituitary. 1923. *J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 13:209-229.
71. McCullagh, D. R. Dual endocrine activity of testes. 1932. *Science* 76:19.
72. Mason, A.J., H.D. Niall, and P.H. Seeburg. 1986. Structure of two human ovarian inhibins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135:957-964.
73. Tuuri, T., M. Eramaa, K. Hilden, and O. Ritvos. 1994. The tissue distribution of activin beta A- and beta B-subunit and follistatin messenger ribonucleic acids

- suggests multiple sites of action for the activin-follistatin system during human development. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 78:1521-1524.
74. Zhang, Y.Q., H.Mashima, M.Kanzaki, H.Shibata, and I.Kojima. 1997. Assessment of the role of activin A and transforming growth factor beta in the regulation of AML12 cell growth. *Hepatology* 25:1370-1375.
 75. Cancilla, B., R.A.Jarred, H.Wang, S.L.Mellor, G.R.Cunha, and G.P.Risbridger. 2001. Regulation of prostate branching morphogenesis by activin A and follistatin. *Dev.Biol.* 237:145-158.
 76. Wang, Q., S.Tabatabaei, B.Planz, C.W.Lin, and P.M.Sluss. 1999. Identification of an activin-follistatin growth modulatory system in the human prostate: secretion and biological activity in primary cultures of prostatic epithelial cells. *J.Urol.* 161:1378-1384.
 77. Phillips, D.J., K.L.Jones, J.Y.Scheerlinck, M.P.Hedger, and D.M.de Kretser. 2001. Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. *Mol.Cell Endocrinol.* 180:155-162.
 78. Bartholin, L., V.Maguer-Satta, S.Hayette, S.Martel, M.Gadoux, L.Corbo, J.P.Magaud, and R.Rimokh. 2002. Transcription activation of FLRG and follistatin by activin A, through Smad proteins, participates in a negative feedback loop to modulate activin A function. *Oncogene* 21:2227-2235.
 79. Tano, M., T.Minegishi, K.Nakamura, M.Nakamura, S.Karino, K.Miyamoto, and Y.Ibuki. 1995. Regulation of follistatin messenger ribonucleic acid in cultured rat granulosa cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 109:167-174.
 80. Prieto, A.L. and K.L.Crossin. 1995. Cell-cell adhesion molecules in epithelial-mesenchymal transformations. *Acta Anat.(Basel)* 154:21-33.
 81. Farquhar, M.G. and G.E.Palade. 1965. Cell junctions in amphibian skin. *J.Cell Biol.* 26:263-291.
 82. Erickson, C. Organization of cells into higher ordered structures: The role of the epithelial-mesenchymal transformation in the generation and stabilization of embryonic tissue. 1996. Textbook of Tissue Engineering .
 83. Lawrence, J.B. and R.H.Singer. 1985. Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acids Res.* 13:1777-1799.
 84. Hay, E.D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.(Basel)* 154:8-20.
 85. Dyche, W.J. 1979. A comparative study of the differentiation and involution of the Mullerian duct and Wolffian duct in the male and female fetal mouse. *J.Morphol.* 162:175-209.
 86. Marcelle, C., S.Ahlgren, and M.Bronner-Fraser. 1999. In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by Sonic Hedgehog. *Dev.Biol.* 214:277-287.
 87. Zuk, A. and E.D.Hay. 1994. Expression of beta 1 integrins changes during transformation of avian lens epithelium to mesenchyme in collagen gels. *Dev.Dyn.* 201:378-393.
 88. Overton, J. 1977. Response of epithelial and mesenchymal cells to culture on basement lamella observed by scanning microscopy. *Exp.Cell Res.* 105:313-323.
 89. Ferguson, M.W., D.J.Whitby, M.Shah, J.Armstrong, J.W.Siebert, and M.T.Longaker. 1996. Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair. *Plast.Reconstr.Surg.* 97:854-860.

90. O'Kane,S. and M.W.Ferguson. 1997. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29:63-78.
91. Kim,J.T., E.H.Lee, K.H.Chung, I.C.Kang, d.H.Lee, and C.K.Joo. 2004. Trans-differentiation of cultured bovine lens epithelial cells into myofibroblast-like cells by serum modulation. *Yonsei Med.J.* 45:380-391.
92. Iwano,M., D.Plieth, T.M.Danoff, C.Xue, H.Okada, and E.G.Neilson. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J.Clin.Invest* 110:341-350.
93. Zeisberg,M. and R.Kalluri. 2004. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J.Mol.Med.* 82:175-181.
94. Rosivatz,E., I.Becker, K.Specht, E.Fricke, B.Luber, R.Busch, H.Hofler, and K.F.Becker. 2002. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am.J.Pathol.* 161:1881-1891.
95. Thiery,J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat.Rev.Cancer* 2:442-454.
96. Yokoyama,K., N.Kamata, R.Fujimoto, S.Tsutsumi, M.Tomonari, M.Taki, H.Hosokawa, and M.Nagayama. 2003. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int.J.Oncol.* 22:891-898.
97. Liu,Y. 2004. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J.Am.Soc.Nephrol.* 15:1-12.
98. Akhurst,R.J. and R.Derynck. 2001. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 11:S44-S51.
99. Thiery,J.P. and D.Chopin. 1999. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 18:31-42.
100. O'Brien,M.J. and D.Gibbons. 1996. The adenoma-carcinoma sequence in colorectal neoplasia. *Surg.Oncol.Clin.N.Am.* 5:513-530.
101. Wollenberg,G.K., E.Semple, B.A.Quinn, and M.A.Hayes. 1987. Inhibition of proliferation of normal, preneoplastic, and neoplastic rat hepatocytes by transforming growth factor-beta. *Cancer Res.* 47:6595-6599.
102. Alexandrow,M.G. and H.L.Moses. 1995. Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. *Cancer Res.* 55:1452-1457.
103. Serra,R., S.Carbonetto, M.Lord, and H.C.Isom. 1994. Transforming growth factor beta 1 suppresses transformation in hepatocytes by regulating alpha 1 beta 1 integrin expression. *Cell Growth Differ.* 5:509-517.
104. Hosobuchi,M. and M.R.Stampfer. 1989. Effects of transforming growth factor beta on growth of human mammary epithelial cells in culture. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 25:705-713.
105. Miettinen,P.J., R.Ebner, A.R.Lopez, and R.Derynck. 1994. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J.Cell Biol.* 127:2021-2036.
106. Oft,M., J.Peli, C.Rudaz, H.Schwarz, H.Beug, and E.Reichmann. 1996. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.* 10:2462-2477.
107. Oft,M., K.H.Heider, and H.Beug. 1998. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr.Biol.* 8:1243-1252.

108. Piek, E., A. Moustakas, A. Kurisaki, C. H. Heldin, and P. ten Dijke. 1999. TGF- β type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 24):4557-4568.
109. Portella, G., S. A. Cumming, J. Liddell, W. Cui, H. Ireland, R. J. Akhurst, and A. Balmain. 1998. Transforming growth factor β is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ.* 9:393-404.
110. Caulin, C., F. G. Scholl, P. Frontelo, C. Gamallo, and M. Quintanilla. 1995. Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor- β 1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth Differ.* 6:1027-1035.
111. Kitagawa, K., A. Murata, N. Matsuura, K. Tohya, S. Takaichi, M. Monden, and M. Inoue. 1996. Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor- β 1. *Int. J. Cancer* 66:91-97.
112. Janji, B., C. Melchior, V. Gouon, L. Vallar, and N. Kieffer. 1999. Autocrine TGF- β -regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int. J. Cancer* 83:255-262.
113. Iglesias, M., P. Frontelo, C. Gamallo, and M. Quintanilla. 2000. Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene* 19:4134-4145.
114. Santibanez, J. F., P. Frontelo, M. Iglesias, J. Martinez, and M. Quintanilla. 1999. Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor β 1-induced migratory and invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes. *J. Cell Biochem.* 74:61-73.
115. Orlowski, R. Z. and A. S. Baldwin, Jr. 2002. NF- κ B as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol. Med.* 8:385-389.
116. Huber, M. A., N. Azoitei, B. Baumann, S. Grunert, A. Sommer, H. Pehamberger, N. Kraut, H. Beug, and T. Wirth. 2004. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest* 114:569-581.
117. Cui, W., D. J. Fowles, S. Bryson, E. Duffie, H. Ireland, A. Balmain, and R. J. Akhurst. 1996. TGF β 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86:531-542.
118. Thomsen, G. H. 1997. Antagonism within and around the organizer: BMP inhibitors in vertebrate body patterning. *Trends Genet.* 13:209-211.
119. Tam, P. P. and R. R. Behringer. 1997. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech. Dev.* 68:3-25.
120. Botchkarev, V. A., N. V. Botchkareva, M. Nakamura, O. Huber, K. Funa, R. Lauster, R. Paus, and B. A. Gilchrist. 2001. Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *FASEB J.* 15:2205-2214.
121. Smith, W. C. 1999. TGF β inhibitors. New and unexpected requirements in vertebrate development. *Trends Genet.* 15:3-5.
122. Cano, A., M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo, and M. A. Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epi-

- thelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2:76-83.
123. Carver, E.A., R. Jiang, Y. Lan, K.F. Oram, and T. Gridley. 2001. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Cell Biol.* 21:8184-8188.
 124. Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain. 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 29:117-129.
 125. Kern, W., A. Kohlmann, C. Wuchter, S. Schnittger, C. Schoch, S. Mergenthaler, R. Ratei, W.D. Ludwig, W. Hiddemann, and T. Haferlach. 2003. Correlation of protein expression and gene expression in acute leukemia. *Cytometry B Clin. Cytom.* 55:29-36.
 126. Chen, G., T.G. Gharib, C.C. Huang, J.M. Taylor, D.E. Misek, S.L. Kardia, T.J. Giordano, M.D. Iannettoni, M.B. Orringer, S.M. Hanash, and D.G. Beer. 2002. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell Proteomics.* 1:304-313.
 127. Anderson, L. and J. Seilhamer. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18:533-537.
 128. Valcourt, U., M. Kowanez, H. Niimi, C.H. Heldin, and A. Moustakas. 2005. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol. Biol. Cell* 16:1987-2002.
 129. Matzuk, M.M., N. Lu, H. Vogel, K. Sellheyer, D.R. Roop, and A. Bradley. 1995. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* 374:360-363.
 130. Matzuk, M.M., T.R. Kumar, A. Vassalli, J.R. Bickenbach, D.R. Roop, R. Jaenisch, and A. Bradley. 1995. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 374:354-356.
 131. Satokata, I. and R. Maas. 1994. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat. Genet.* 6:348-356.
 132. Ferguson, C.A., A.S. Tucker, L. Christensen, A.L. Lau, M.M. Matzuk, and P.T. Sharpe. 1998. Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev.* 12:2636-2649.
 133. Zhang, Y., T. Mori, H. Takaki, M. Takeuchi, K. Iseki, S. Hagino, M. Murakawa, S. Yokoya, and A. Wanaka. 2002. Comparison of the expression patterns of two LIM-homeodomain genes, Lhx6 and L3/Lhx8, in the developing palate. *Orthod. Craniofac. Res.* 5:65-70.
 134. Zhao, Y., Y.J. Guo, A.C. Tomac, N.R. Taylor, A. Grinberg, E.J. Lee, S. Huang, and H. Westphal. 1999. Isolated cleft palate in mice with a targeted mutation of the LIM homeobox gene *lhx8*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96:15002-15006.
 135. Johnston, M.C. and P.T. Bronsky. 1995. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6:368-422.
 136. Fitzpatrick, D.R., F. Denhez, P. Kondaiah, and R.J. Akhurst. 1990. Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development* 109:585-595.
 137. Fainsod, A., K. Deissler, R. Yelin, K. Marom, M. Epstein, G. Pillemer, H. Steinbeisser, and M. Blum. 1997. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech. Dev.* 63:39-50.

138. Koster, M., S. Plessow, J.H. Clement, A. Lorenz, H. Tiedemann, and W. Knochel. 1991. Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), a member of the TGF-beta family, in early embryos of *Xenopus laevis*: analysis of mesoderm inducing activity. *Mech. Dev.* 33:191-199.
139. Dale, L., G. Howes, B.M. Price, and J.C. Smith. 1992. Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* 115:573-585.
140. Jones, C.M., K.M. Lyons, P.M. Lapan, C.V. Wright, and B.L. Hogan. 1992. DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* 115:639-647.
141. Sasai, Y., B. Lu, H. Steinbeisser, and E.M. De Robertis. 1995. Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376:333-336.
142. Hemmati-Brivanlou, A. and G.H. Thomsen. 1995. Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev. Genet.* 17:78-89.
143. Parrinello, S., C.Q. Lin, K. Murata, Y. Itahana, J. Singh, A. Krtolica, J. Campisi, and P.Y. Desprez. 2001. Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:39213-39219.
144. Caccamo, A.E., M. Scaltriti, A. Caporali, D. D'Arca, F. Scorcioni, S. Astancolle, M. Mangiola, and S. Bettuzzi. 2004. Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate epithelial cells are associated with early accumulation of a 45 kDa nuclear isoform of clusterin. *Biochem. J.* 382:157-168.
145. Zhang, H., J.K. Kim, C.A. Edwards, Z. Xu, R. Taichman, and C.Y. Wang. 2005. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat. Cell Biol.* 7:909-915.
146. Hoeller, C., B. Pratscher, C. Thallinger, D. Winter, D. Fink, B. Kovacic, V. Sexl, V. Wacheck, M.E. Gleave, H. Pehamberger, and B. Jansen. 2005. Clusterin regulates drug-resistance in melanoma cells. *J. Invest Dermatol.* 124:1300-1307.
147. Gleave, M., H. Miyake, and K. Chi. 2005. Beyond simple castration: targeting the molecular basis of treatment resistance in advanced prostate cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56 Suppl 1:47-57.
148. Scaltriti, M., S. Bettuzzi, R.M. Sharrard, A. Caporali, A.E. Caccamo, and N.J. Maitland. 2004. Clusterin overexpression in both malignant and nonmalignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis. *Br. J. Cancer* 91:1842-1850.
149. Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida, and D.H. Garcia. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2:84-89.
150. Nieto, M.A. 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:155-166.
151. Nusslein-Volhard, C., H. Kluding, and G. Jurgens. 1985. Genes affecting the segmental subdivision of the *Drosophila* embryo. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50:145-154.
152. Garcia, De Herreros. 2001. Common Molecules in Development and Carcinogenesis .
153. Brown, J.M., S.E. Wedden, G.H. Millburn, L.G. Robson, R.E. Hill, D.R. Davidson, and C. Tickle. 1993. Experimental analysis of the control of expression of the

- homeobox-gene Msx-1 in the developing limb and face. *Development* 119:41-48.
154. Jowett, A.K., S.Vainio, M.W.Ferguson, P.T.Sharpe, and I.Thesleff. 1993. Epithelial-mesenchymal interactions are required for msx 1 and msx 2 gene expression in the developing murine molar tooth. *Development* 117:461-470.
 155. Botchkarev, V.A. 2003. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J.Invest Dermatol.* 120:36-47.
 156. Roebroek, A.J., L.Umans, I.G.Pauli, E.J.Robertson, F.van Leuven, W.J.Van de Ven, and D.B.Constam. 1998. Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 125:4863-4876.
 157. Suzuki, N., P.A.Labosky, Y.Furuta, L.Hargett, R.Dunn, A.B.Fogo, K.Takahara, D.M.Peters, D.S.Greenspan, and B.L.Hogan. 1996. Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by Bmp1, a mammalian gene related to Drosophila tollid. *Development* 122:3587-3595.
 158. Zeisberg, M., J.Hanai, H.Sugimoto, T.Mammoto, D.Charytan, F.Strutz, and R.Kalluri. 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat.Med.* 9:964-968.
 159. Takeuchi, S., K.Takeda, I.Oishi, M.Nomi, M.Ikeya, K.Itoh, S.Tamura, T.Ueda, T.Hatta, H.Otani, T.Terashima, S.Takada, H.Yamamura, S.Akira, and Y.Minami. 2000. Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes Cells* 5:71-78.
 160. Sulik, K.K., C.S.Cook, and W.S.Webster. 1988. Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. *Development* 103 Suppl:213-231.
 161. Taya, Y., S.O'Kane, and M.W.Ferguson. 1999. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* 126:3869-3879.
 162. Nodder, S. and P.Martin. 1997. Wound healing in embryos: a review. *Anat.Embryol.(Berl)* 195:215-228.
 163. Longaker, M.T., D.J.Whitby, N.S.Adzick, T.M.Crombleholme, J.C.Langer, B.W.Duncan, S.M.Bradley, R.Stern, M.W.Ferguson, and M.R.Harrison. 1990. Studies in fetal wound healing, VI. Second and early third trimester fetal wounds demonstrate rapid collagen deposition without scar formation. *J.Pediatr.Surg.* 25:63-68.
 164. Redd, M.J., L.Cooper, W.Wood, B.Stramer, and P.Martin. 2004. Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 359:777-784.
 165. Whitby, D.J. and M.W.Ferguson. 1991. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev.Biol.* 147:207-215.
 166. Cowin, A.J., T.M.Holmes, P.Brosnan, and M.W.Ferguson. 2001. Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur.J.Dermatol.* 11:424-431.
 167. Shah, M., D.M.Foreman, and M.W.Ferguson. 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J.Cell Sci.* 108 (Pt 3):985-1002.
 168. Hubner, G., Q.Hu, H.Smola, and S.Werner. 1996. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. *Dev.Biol.* 173:490-498.

169. Wankell, M., B. Munz, G. Hubner, W. Hans, E. Wolf, A. Goppelt, and S. Werner. 2001. Impaired wound healing in transgenic mice overexpressing the activin antagonist follistatin in the epidermis. *EMBO J.* 20:5361-5372.
170. Border, W.A. and N.A. Noble. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 331:1286-1292.
171. Liu, Y. 2004. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287:F7-16.
172. Okuda, S., L.R. Languino, E. Ruoslahti, and W.A. Border. 1990. Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J. Clin. Invest* 86:453-462.
173. Bollineni, J.S. and A.S. Reddi. 1993. Transforming growth factor-beta 1 enhances glomerular collagen synthesis in diabetic rats. *Diabetes* 42:1673-1677.
174. Yamamoto, T., N.A. Noble, D.E. Miller, and W.A. Border. 1994. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int.* 45:916-927.
175. Yamamoto, T., T. Nakamura, N.A. Noble, E. Ruoslahti, and W.A. Border. 1993. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:1814-1818.
176. Derynck, R. and X.H. Feng. 1997. TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1333:F105-F150.
177. Attisano, L. and J.L. Wrana. 2002. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296:1646-1647.
178. Jong, H.S., H.S. Lee, T.Y. Kim, Y.H. Im, J.W. Park, N.K. Kim, and Y.J. Bang. 2002. Attenuation of transforming growth factor beta-induced growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cell lines by cyclin D1 overexpression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:383-389.