

# Molekulare Mechanismen der Antiöstrogenwirkung beim Mammakarzinom

von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Miriam Buck

aus Hamburg

Hauptberichter: Prof. Dr. K. Pfizenmaier

Mitberichter: Prof. Dr. C. Knabbe

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2002

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart  
und  
Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut  
für Klinische Pharmakologie

2002

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt habe.

Miriam Buck

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>Material .....</b>	<b>26</b>
4.1	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme .....	26
4.2	Medien, Puffer, Lösungen .....	28
4.2.1	Medien.....	28
4.2.2	Puffer.....	29
4.2.3	Lösungen.....	31
4.3	Zelllinie.....	32
4.4	Primer und Hybridisierungs sonden .....	32
4.4.1	Primer für die kompetitive RT-PCR.....	32
4.4.2	Primer und Sonden für die quantitative LightCycler RT-PCR.....	32
4.4.2.1	Primer .....	32
4.4.2.2	Hybridisierungssonden .....	33
4.4.3	Primer für die Klonierung dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren .....	33
4.4.4	Sequenzierungsprimer .....	33
4.5	Plasmide.....	34
4.6	Antikörper.....	36
4.6.1	Primäre Antikörper.....	36
4.6.2	Sekundärer Antikörper .....	36
4.7	Geräte und Hilfsmittel .....	36
<b>5</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>38</b>
5.1	Zellbiologische Methoden .....	38
5.1.1	Kultivierung der humanen Mammakarzinomzelllinien.....	38
5.1.2	Proliferations-Assays .....	38
5.1.2.1	Adhärenter Proliferations-Assay.....	38
5.1.2.2	Softagar-Assay.....	39

# INHALTSVERZEICHNIS

5.1.3	Zellanzucht für Westernblot.....	39
5.1.4	Zellanzucht für die Gesamt-RNA-Isolierung.....	40
5.1.5	Transfektionen.....	40
5.1.5.1	Stabile Transfektionen.....	40
5.1.5.2	Transiente Transfektionen.....	41
5.1.6	Luciferase-Assay.....	41
5.2	Molekularbiologische Methoden.....	43
5.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	43
5.2.2	Kompetitive RT-PCR.....	43
5.2.3	Quantitative LightCycler RT-PCR.....	45
5.2.4	Herstellung der RNA-Standards für die kompetitive RT-PCR und die LightCycler RT-PCR.....	46
5.2.4.1	RT-PCR.....	46
5.2.4.2	Ligation.....	47
5.2.4.3	Transformation kompetenter Zellen.....	47
5.2.4.4	Identifizierung transformierter Zellen: Blau-Weiß-Selektion.....	48
5.2.4.5	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	48
5.2.4.6	Restriktionsverdau.....	49
5.2.4.7	Maxipräparation von Plasmid DNA.....	49
5.2.4.8	Einführung der Restriktionsschnittstellen in die Standards der kompetitiven RT-PCR.....	50
5.2.4.9	RNA-Transkription.....	53
5.2.5	Herstellung dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptorkonstrukte.....	54
5.2.5.1	cDNA-Synthese.....	54
5.2.5.2	PCR.....	54
5.2.5.3	Klonierung der PCR-Produkte, Transformation, Minipräparation.....	55
5.2.5.4	Sequenzierung.....	55
5.2.5.5	Umklonierung der dominant-negativen Rezeptor cDNAs in pcDNA3-Flag.....	56
	dKT $\beta$ RI.....	56
	dKT $\beta$ RII.....	56
5.2.5.6	Transformation, Plasmidpräparation.....	57
5.3	Immunbiochemische Methoden.....	58
5.3.1	Westernblot.....	58
5.3.1.1	Gesamtprotein-Isolierung.....	58
5.3.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	58
5.3.1.3	Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel.....	58
5.3.1.4	Westernblot.....	59
5.3.1.5	Beladungskontrolle.....	60
5.3.1.6	Westernblot-Analyse.....	60

5.4	Statistik .....	61
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
6.1	Etablierung quantitativer RT-PCRs .....	62
6.1.1	Kompetitive RT-PCR .....	62
6.1.2	Quantitative LightCycler RT-PCR .....	64
6.2	Untersuchungen zur antihormonellen Regulation des TGF $\beta$ -Systems .....	66
6.2.1	Zeitlicher Verlauf der Induktion .....	66
6.2.1.1	Basale Expression .....	66
6.2.1.2	4-Hydroxytamoxifen .....	67
6.2.1.3	ICI 182.780 .....	68
6.2.2	Dosisabhängigkeit der Induktion .....	71
6.2.2.1	4-Hydroxytamoxifen .....	71
6.2.2.2	ICI 182.780 .....	73
6.2.3	Induktion durch Tamoxifen-Metabolite .....	75
6.3	Untersuchung zur Beteiligung des TGF $\beta$ -Systems an der antihormonellen Wirkung .....	78
6.3.1	Induktion TGF $\beta$ -sensitiver Reporterplasmide durch Antiöstrogene .....	78
6.3.2	Beteiligung der TGF $\beta$ -Rezeptoren I und II an der antihormonellen Wirkung .....	80
6.3.2.1	Transiente Expression dominant-negativer Rezeptor-Konstrukte in MCF-7 Zellen .....	80
6.3.2.2	Auswirkung der Expression dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren auf die antiöstrogen-abhängige Induktion TGF $\beta$ -sensitiver Promotoren .....	81
6.3.2.3	Stabile Transfektion dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren in MCF-7 Zellen .....	83
6.3.2.4	Auswirkung der Expression dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren auf die Wachstumshemmung durch TGF $\beta$ .....	84
6.3.2.5	Auswirkung der Expression dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren auf die Wachstumshemmung durch Antiöstrogene .....	85
6.3.2.6	Auswirkung der Expression dominant negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren auf die Aktivierung von p3TP-lux .....	86
6.3.3	Beteiligung des Smad-Weges an der antihormonellen Wirkung .....	88
6.3.3.1	Transiente Expression dominant-negativer Smad4-Konstrukte in MCF-7 Zellen .....	88
6.3.3.2	Auswirkung der Expression dominant-negativer Smad4-Proteine auf die Induktion TGF $\beta$ -sensitiver Promotoren .....	89
6.3.3.3	Expression dominant-negativer Smad4-Konstrukte in MCF-7 Zellen .....	90
6.3.3.4	Auswirkung der Expression von Smad4 dN auf die Wachstumshemmung durch TGF $\beta$ 1 .....	92
6.3.3.5	Auswirkung der Expression von Smad4 dN auf die Wachstumshemmung durch Antiöstrogene .....	92

## *INHALTSVERZEICHNIS*

6.3.3.6	Auswirkung der Expression von Smad4 dN auf die Aktivierung von p3TP-lux .....	94
6.3.4	Beteiligung von MAP-Kinase-Wegen an der antihormonellen Wirkung .....	95
6.3.4.1	Auswirkung der Inhibition von MAP-Kinase-Signaltransduktionswegen auf die Wachstumshemmung durch Antiöstrogene .....	95
6.4	Untersuchungen zur Beteiligung von p38 an der antihormonellen Induktion von TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ RII .....	97
6.4.1.1	Induktion der mRNAs von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII .....	97
<b>7</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>100</b>
7.1	Antihormonelle Regulation des TGF $\beta$ -Systems.....	100
7.2	Beteiligung von TGF $\beta$ an der antihormonellen Wirkung.....	106
7.3	Schlussbetrachtung .....	115
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>126</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AMV	Reverse Transkriptase aus dem Affen-Myeloblastosis-Virus
as	<i>antisense</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bp	Basenpaare
CCS	von Steroiden befreites fötales Kälberserum
cDNA	<i>copy DNA</i>
CRE	<i>cAMP Response Element</i>
cRNA	<i>copy RNA</i>
dKT $\beta$ RI/II	dominant negativer T $\beta$ RI/II
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminditriphosphat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Erk	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
G418	Geneticin-Disulfat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
IGF-2	<i>Insulin like Growth Factor-2</i>
JNK	<i>c-JunN-terminal kinase</i>
kB	Kilobase

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

M	Molar
μ	mikro
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEK	<i>MAP/ERK-Kinase</i>
min	Minute
p	pico
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SAD	<i>Smad Activation Domain</i>
SAPK	<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>
SBE	<i>Smad Binding Element</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
se	<i>sense</i>
Smad	humanes MAD ( <i>Mothers Against Decapentaplegic</i> ) Homolog
TβRI/II/III	TGFβ Rezeptor Typ I/II/III
TGFα	<i>Transforming Growth Factor α</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	<i>TPA Response Element</i>
U	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

# 1 Abstract

Antiestrogens are very effective in the treatment of hormone responsive breast tumors. A major drawback of antiestrogen treatment however is the development of antiestrogen resistance. The mechanisms leading to antiestrogen resistance are largely unknown. A great progress in the understanding of antiestrogen action was made by the observation, that antiestrogenic treatment of hormone sensitive breast cancer cells leads to an activation of the inhibitory growth factor TGF $\beta$ .

In this study hormone responsive MCF-7 breast cancer cells were chosen as model system to further elucidate the involvement of the TGF $\beta$  signal transduction system in antiestrogen action. Both the nonsteroidal partial antiestrogen 4-hydroxytamoxifen and the steroidal antiestrogen ICI 182.780 were used. The results of this study will contribute to a better understanding of the interaction between hormones and growth factors and the associated mechanisms of antiestrogen resistance.

The first part of the study was focussed on the antiestrogen induced regulation of the TGF $\beta$  system. Expression of the ligands TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ 2, the receptors T $\beta$ RI and T $\beta$ RII and Smad7 were analyzed. Specific LightCycler RT-PCRs were developed for quantification of these mRNAs. It was shown that both TGF $\beta$ 2 and T $\beta$ RII are regulated by antiestrogens. The growth inhibitory potential of both antiestrogens was correlated with the induction of these mRNAs. Smad7 mRNA was only minimally induced under antiestrogen treatment, TGF $\beta$ 1 mRNA and T $\beta$ RI mRNA remained unchanged.

Furthermore it was analyzed, which parts of the complex TGF $\beta$  signal transduction system participate in the mediation of antiestrogen action. Activation of TGF $\beta$  responsive promoters was used as analytical endpoint. Antiestrogens induced the reporter plasmid p3TP-lux two times stronger than TGF $\beta$ . Using a coexpression system of dominant negative TGF $\beta$  receptors and dominant negative Smad4 proteins it could be demonstrated, that the antiestrogen induction of p3TP-lux is mediated by TGF $\beta$  via the Smad signal transduction pathway.

## *ABSTRACT*

ICI 182.780 has a more pronounced effect on the TGF $\beta$  system than 4-hydroxytamoxifen. Unexpectedly however activation of p3TP-lux did not differ between these two substances. Cooperation between a TGF $\beta$  activated Smad complex and c-jun / c-fos has been shown to be necessary for complete activation of p3TP-lux. Induction of c-fos is blocked by steroidal antiestrogens and is consequently thought to cause the only minimal induction of p3TP-lux by ICI 182.780.

It has been previously shown that TGF $\beta$  exerts its action not only by the Smad signal transduction pathway but also by MAP kinase cascades. Using specific inhibitors of the MAP kinases MEK and p38 evidence was obtained that p38 contributes to antihormonal growth inhibition via the induction of TGF $\beta$ 2 and T $\beta$ RII.

In conclusion, genes of the TGF $\beta$  signaltransduction pathway are differentially regulated by antiestrogens. This differential regulation is mediated by the activation of some pathways (Smad, p38) and the inhibition of others (Erk). Thus in breast cancer cells antiestrogen treatment leads to a modification of the TGF $\beta$  induced gene expression pattern by pathway specific promoter activation.

## 2 Zusammenfassung

Antiöstrogene haben sich als sehr effektiv in der Behandlung hormon-responsiver Mammakarzinome erwiesen. Im Verlauf der Therapie kommt es jedoch in der Regel zu einem Verlust der antihormonellen Wirkung. Die an der Entstehung der Antihormonresistenz beteiligten Mechanismen sind weitgehend ungeklärt. Ein entscheidender Schritt zur Aufklärung der antihormonellen Wirkung war die Beobachtung, dass die Behandlung hormonsensitiver Mammakarzinomzellen zu einer Aktivierung des inhibitorischen Wachstumsfaktors TGF $\beta$  führt.

Am Modell-System hormon-sensitiver MCF-7 Mammakarzinomzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung des TGF $\beta$ -Systems an der Wirkung des nicht-steroidalen, partiellen Antiöstrogens 4-Hydroxytamoxifen und des steroidalen, reinen Antiöstrogens ICI 182.780 untersucht. Die Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis der Interaktionen zwischen Hormonen und Wachstumsfaktoren und den damit im Zusammenhang stehenden Mechanismen der Antiöstrogenresistenz beitragen.

Im Mittelpunkt des ersten Teils der Arbeit stand die antiöstrogene Regulation des TGF $\beta$ -Systems. Untersucht wurde die Expression der Liganden TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2, der Rezeptoren T $\beta$ RI und T $\beta$ RII und von Smad7. Zur genauen Quantifizierung der mRNA-Expression dieser Gene wurden spezifische LightCycler RT-PCRs etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur TGF $\beta$ 2 sondern auch T $\beta$ RII einer antihormonellen Regulation unterliegt. Die Stärke der Induktion beider Gene korrelierte mit der wachstumshemmenden Wirkung der Antiöstrogene. Smad7 wurde nur schwach durch Antiöstrogen induziert, TGF $\beta$ 1 und T $\beta$ RI gar nicht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht Aufschluss darüber zu erhalten, welche Zweige des komplexen TGF $\beta$  Signaltransduktionssystems an der antiöstrogenen Wirkung beteiligt sind. Als Endpunkt wurde u.a. die Aktivierung TGF $\beta$ -sensitiver Promotoren untersucht. Das Reporterplasmid p3TP-lux wurde durch Antiöstrogene ca. 2fach stärker aktiviert als durch TGF $\beta$ . Über Koexpression dominant-negativer TGF $\beta$ -

## ZUSAMMENFASSUNG

Rezeptoren und dominant-negativer Smad4-Proteine konnte gezeigt werden, dass die antiöstrogene Aktivierung von p3TP-lux TGF $\beta$  vermittelt ist und über den Smad-Signaltransduktionsweg verläuft.

Obwohl das steroidale Antiöstrogen ICI 182.780 einen deutlich stärkeren Effekt auf das TGF $\beta$ -System hat als das partielle Antiöstrogen 4-Hydroxytamoxifen, war die Aktivierung von p3TP-lux durch beide Antiöstrogene annähernd gleich stark. Für eine vollständige Aktivierung von p3TP-lux ist eine Kooperation zwischen einem TGF $\beta$  aktivierten Smad-Komplex und c-Jun/c-fos notwendig. Die Induktion von c-fos wird jedoch durch steroidale Antiöstrogene blockiert und kommt daher als Ursache der geringen Induktion von p3TP-lux durch ICI 182.780 in Frage.

Da TGF $\beta$  seine Wirkung neben dem Smad-Signaltransduktionsweg auch über MAP-Kinase-Wege entfalten kann, wurde mit Hilfe spezifischer pharmakologischer Inhibitoren die Beteiligung des MEK/Erk- und des p38-MAP-Kinase-Weges an der antihormonellen Wachstumsinhibition untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der p38-Weg über die Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII an der antihormonellen Wachstumsinhibition beteiligt ist.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass Antiöstrogene verschiedene Gene des TGF $\beta$ -Signaltransduktionssystems differenziell regulieren. Die Untersuchungen zur Beteiligung der TGF $\beta$ -Signaltransduktionswege an der antihormonellen Wirkung weisen darauf hin, dass diese differenzielle Regulation, durch die spezifische Aktivierung einiger TGF $\beta$ -Signaltransduktionswege (Smad, p38) und gleichzeitige Inhibition anderer (MEK/Erk) erreicht wird. Da die Signaltransduktionswege in unterschiedlichem Ausmaß zur Aktivierung der verschiedenen Promotoren beitragen, kommt es unter Antiöstrogeneinfluss zu einer Modifizierung des TGF $\beta$  induzierten Genexpressionsmusters und der spezifisch antiöstrogenen Wirkung.

## 3 Einleitung

### *Das Mammakarzinom als hormonabhängiger Tumor*

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar und ist für fast 25 % aller Krebsneuerkrankungsfälle verantwortlich. In Deutschland erkranken jährlich über 46.000 Frauen, davon etwa 19.000 im Alter unter 60 Jahren (Arbeitsgemeinschaft-Bevölkerungsbezogener-Krebsregister-in-Deutschland, 2002).

Bei der Entstehung von Mammakarzinomen spielen neben anderen Faktoren besonders auch hormonelle Einflüsse eine Rolle. Etwa 70 % der Mammakarzinome sind Östrogenrezeptor-positiv. Östradiol reguliert über die Bindung an den Östrogenrezeptor die Expression verschiedener Gene, die Wachstum und Entwicklung des Brustgewebes beeinflussen. Mammakarzinomzellen unter der Kontrolle von Östradiol synthetisieren und sezernieren ihre eigenen Wachstumsfaktoren, welche die Tumorzellen oder angrenzende Stromazellen über auto- bzw. parakrine Mechanismen zur Teilung anregen. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören u.a. EGF, TGF $\alpha$ , IGF-2, PDGF and FGF (Lippman et al., 1986). Mammakarzinomzellen können aber auch Peptide sezernieren, die eine autokrin-inhibitorische Wirkung ausüben. Zu diesen gehören z.B. Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie. TGF $\beta$  ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, der u.a. die Proliferation epithelialer Gewebe inhibiert und die Proliferation stromaler Gewebe stimuliert.

Das maligne Potenzial eines Mammakarzinoms hängt stark vom Gleichgewicht wachstumsstimulierender und wachstumshemmender Faktoren ab, die von den Tumorzellen und den umgebenden Stromazellen gebildet werden. Die Behandlung des Mammakarzinoms mit Antiöstrogenen kann dieses Gleichgewicht zu Gunsten der wachstumshemmenden Faktoren verschieben.

## EINLEITUNG

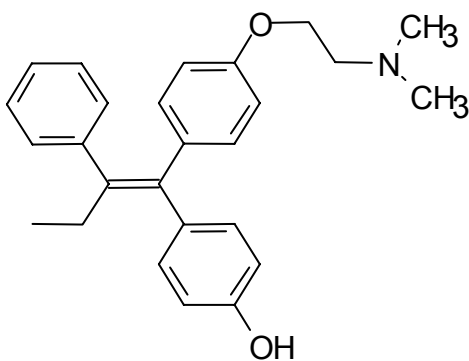
### Antiöstrogene

Antiöstrogene werden in der endokrinen Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt. Sie konkurrieren mit Östradiol um die Bindung an den Östrogenrezeptor.

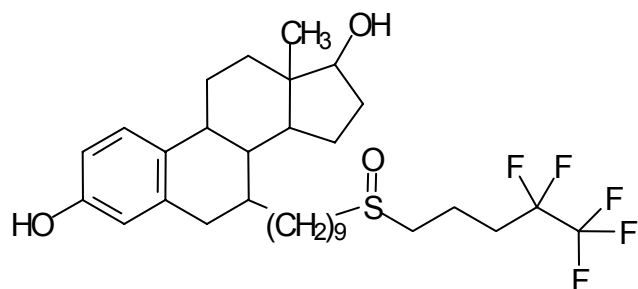
Abhängig von der Struktur des Liganden kann der Östrogenrezeptor nach der Bindung verschiedene Konformationen einnehmen, die unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität des Moleküls haben. Die Bindung von Östradiol führt zu einer vollständigen Aktivierung der zwei transaktivierenden Domänen (AF1 und AF2) des Rezeptors (Beekman et al., 1993).

Das Antiöstrogen Tamoxifen, ein Triphenylethylen-Derivat (Abb. 2.1 A), wirkt als selektiver Modulator des Östrogenrezeptors. Nach Bindung von Tamoxifen ändert sich die Konformation des Östrogenrezeptors so, dass lediglich die AF1 Domäne volle Funktionsfähigkeit erlangt, AF2 hingegen bleibt inaktiv. Der Östrogenrezeptor ist in diesem Zustand teilweise aktiv, Promotoren, die nur von AF1 abhängig sind, können aktiviert werden. Tamoxifen wirkt aus diesem Grund nur als partielles Antiöstrogen (McDonnell et al., 1995). In Brustgewebe zeigt Tamoxifen antiöstrogene Wirkung, in anderen Geweben, z.B. in Knochengewebe, kann es östrogenartige Wirkung zeigen (Jordan et al., 2001).

A:



B:



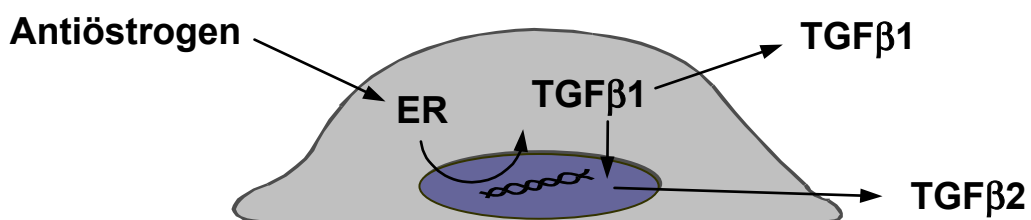
**Abb. 2.1:** Strukturformeln der Antiöstrogene 4-Hydroxytamoxifen (A) und ICI 182.780 (B)

Tamoxifen wird metabolisch zu 4-Hydroxytamoxifen aktiviert, dessen Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor der von Östradiol entspricht (Jordan et al., 1977). 4-Hydroxytamoxifen ist die Standardsubstanz für *in-vitro* Untersuchungen zur Wirkung von Antiöstrogenen.

Das steroidale Antiöstrogen ICI 182.780 (Faslodex) (Abb. 2.1 B) wirkt als reines Antiöstrogen. Bindung von ICI 182.780 an den Östrogenrezeptor führt zu einer vollständigen Inaktivierung sowohl von AF1 als auch von AF2 (McDonnell et al., 1995).

Bereits vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Zellwachstums durch Antiöstrogene unter anderem auf eine vermehrte Sekretion von aktivem TGF $\beta$  zurückzuführen ist (Knabbe et al., 1987). TGF $\beta$ 1 wird vermehrt in eine biologisch aktive Form überführt und sezerniert. Das aktivierte TGF $\beta$ 1 bewirkt eine vermehrte Expression von TGF $\beta$ 2 (Knabbe et al., 1996) (Abb. 2.2). Diese Beobachtungen konnten *in-vivo* bestätigt werden. Patientinnen, die auf eine Therapie mit Tamoxifen ansprechen, zeigen innerhalb der ersten vier bis acht Wochen nach Behandlungsbeginn einen deutlichen Anstieg des TGF $\beta$ 2-Plasmaspiegels (Knabbe et al., 1996). In Tumorgewebe ist unter Tamoxifen-Behandlung ein Anstieg der TGF $\beta$ 2 mRNA Expression zu beobachten (Brandt, 1998).

Die Wirkung von TGF $\beta$  erfasst auch Östrogenrezeptor-negative Mammakarzinomzellen, die der antihormonellen Wachstumsinhibition entzogen sind (Zugmaier et al., 1989).



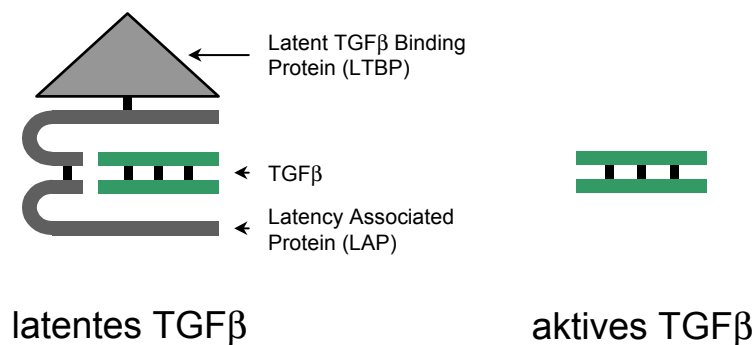
**Abb. 2.2:** Aktivierung von TGF $\beta$  in hormonsensitiven Mammakarzinomzellen nach Behandlung mit Antiöstrogenen

## EINLEITUNG

### *Transforming Growth Factor $\beta$*

TGF $\beta$  ist Teil einer großen Familie von Wachstumsfaktoren, zu denen u.a. auch Aktivin, Inhibin und Bone Morphogenetic Protein (BMP) gehören (Kingsley, 1994). Im Menschen wurden bislang drei TGF $\beta$ -Isoformen, TGF $\beta$  1, 2 und 3, beschrieben. Alle drei Isoformen werden als latentes Vorläufermolekül sezerniert, welches nicht in der Lage ist, zelluläre Rezeptoren zu binden. Latentes TGF $\beta$  besteht aus drei Komponenten: einem 125 - 160 kD schweren *Latent TGF $\beta$  Binding Protein (LTBP)*, dem *Latency Associated Protein (LAP)*, welches aus dem Rest des TGF $\beta$ -Vorläuferproteins besteht (ohne Signalpeptid und ohne aktives TGF $\beta$ ) und dem aktiven TGF $\beta$  selbst. Biologisch aktives TGF $\beta$  ist ein 25 kD schweres, dimeres Polypeptid aus zwei identischen Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Roberts and Sporn, 1990) (Abb. 2.3).

*In-vitro* kann latentes TGF $\beta$  durch Senkung des pH-Werts oder Behandlung mit Proteasen, aktiviert werden (Lyons and Moses, 1990). Die physiologischen Mechanismen der Aktivierung sind bislang noch weitgehend unbekannt.



**Abb. 2.3:** Aufbau von latentem und aktivem TGF $\beta$

TGF $\beta$  übt eine große Anzahl sehr unterschiedlicher Effekte auf eine Vielfalt von Zelltypen aus. Unter anderem beeinflusst TGF $\beta$  die Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen, die Produktion der extrazellulären Matrix und wirkt modulierend auf das Immunsystem (Roberts, 1998). *In-vitro* zeigen alle drei TGF $\beta$  Isoformen vergleichbare biologische Aktivitäten. Untersuchungen an Knockout-Mäusen

zeigen jedoch, dass es *in-vivo* Isoform-spezifische Aktivitäten gibt (Sanford et al., 1997).

Alle Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie starten intrazelluläre Signalübertragungsprozesse über die Aktivierung eines heteromeren Komplexes spezifischer transmembraner Rezeptoren.

### *TGF $\beta$ -Rezeptoren*

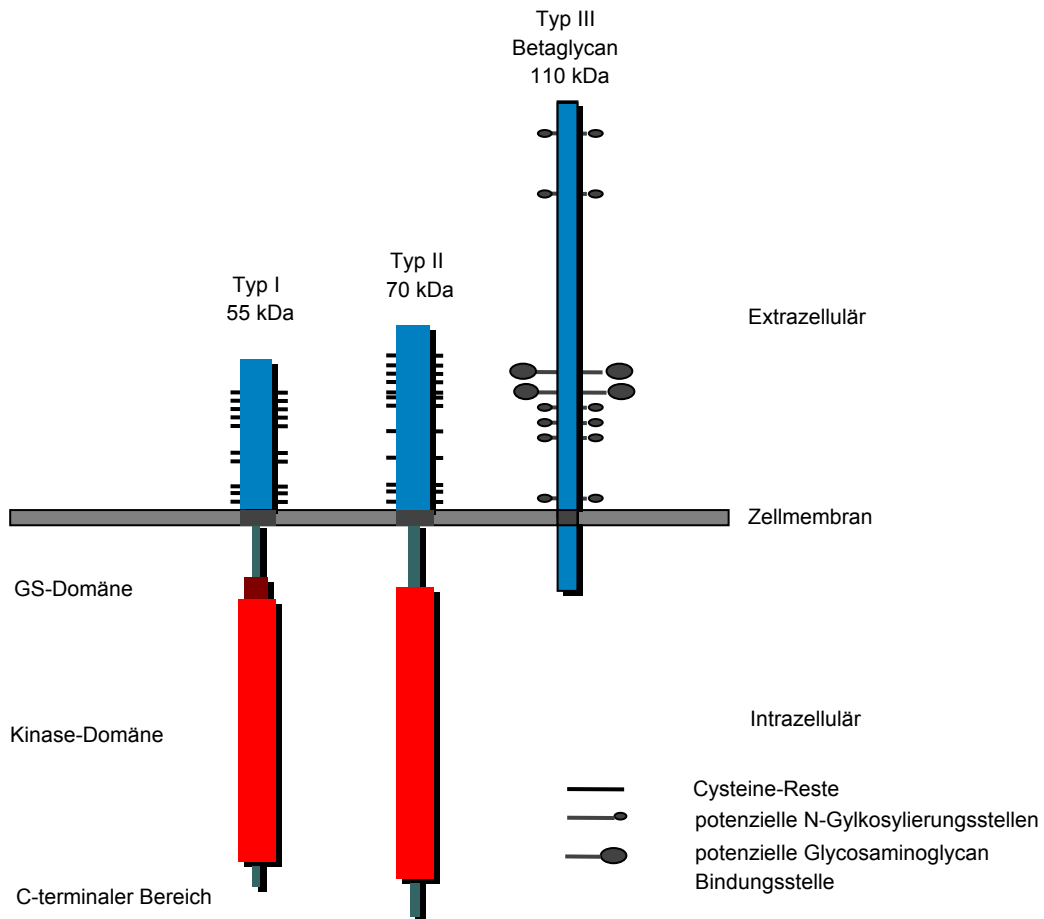
Die meisten Zellen exprimieren drei unterschiedliche Rezeptoren für TGF $\beta$ . Diese wurden aufgrund ihres Molekulargewichts benannt: TGF $\beta$ -Rezeptoren vom Typ I (T $\beta$ RI) sind ca. 50 kD schwer, Rezeptoren vom Typ II (T $\beta$ RII) ca. 70 kD und Rezeptoren vom Typ III (T $\beta$ RIII) ca. 110 kD. Alle drei Rezeptoren wurden kloniert und ihre Wirkung genau charakterisiert (Franzen et al., 1993; Lin et al., 1992; Wang et al., 1991).

T $\beta$ RI und II sind transmembrane Serin-Threonin-Kinasen mit einem kurzen extrazellulären und einem langen cytoplasmatischen Bereich. Charakteristisch für alle Rezeptoren der TGF $\beta$ -Superfamilie ist eine große Anzahl von Cystein-Resten im extrazellulären Bereich und ein Cluster von drei Cystein-Resten direkt oberhalb der Transmembran-Domäne. Der cytoplasmatische Bereich der Rezeptoren besteht fast ausschließlich aus der Kinase-Domäne, die juxtamembran und C-terminal von kurzen Bereichen flankiert ist (Abb. 2.4). Die T $\beta$ RII-Kinase-Domäne ist konstitutiv aktiv.

T $\beta$ RI unterscheidet sich durch einige Merkmale von T $\beta$ RII: Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors ist kürzer und der C-terminale Bereich im Anschluss an die Kinase-Domäne besteht nur aus wenigen Aminosäure-Resten. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Rezeptoren liegt jedoch in einer kurzen Region zwischen Transmembran- und Kinase-Domäne. Hier befindet sich die sogenannte GS-Domäne, ein in allen Typ I-Rezeptoren der TGF $\beta$ -Superfamilie hoch konserviertes SGSGSGLP-Motiv, welches in den Typ II-Rezeptoren nicht vorkommt (Franzen et al., 1993; Lin et al., 1992).

T $\beta$ RIII ist ein transmembranes Proteoglycan mit einer kurzen cytoplasmatischen Domäne, in der sich keine enzymatischen Motive befinden. T $\beta$ RIII hat daher vermutlich eine Funktion, die mit der Bindung und Präsentation des Liganden zusammenhängt, aber nicht mit der eigentlichen Signalübertragung (Wang et al., 1991) (Abb. 2.4).

## EINLEITUNG



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der TGFβ-Rezeptoren Typ I, Typ II und Typ III

### Signalübertragung

TGFβ-Signale werden über einen Komplex aus TβRI und TβRII in die Zelle weitergeleitet. Aktives TGFβ wird von TβRII gebunden. TβRII interagiert daraufhin mit TβRI und ein heterotetramerer Signalübertragungskomplex wird gebildet. Die konstitutiv aktive Kinase von TβRII phosphoryliert TβRI im Bereich der GS-Domäne. Hierdurch wird die TβRI Kinase aktiviert und die Weiterleitung des Signals in die Zelle ermöglicht (Wrana et al., 1992; Wrana et al., 1994).

Auf diesem Weg werden durch TGF $\beta$  Komponenten eine Reihe ganz unterschiedlicher Signaltransduktionswege aktiviert. Hierzu gehören die Smad-Proteine, MAP-Kinasen, Phosphoinositol-3-Kinase und PP2A (Bakin et al., 2000; Frey and Mulder, 1997b; Hanafusa et al., 1999; Heldin et al., 1997; Petritsch et al., 2000). Die Mechanismen der Aktivierung und der weitere Verlauf der Signaltransduktion ist für einen Teil dieser Wege weitgehend unbekannt. Sehr genau wurde jedoch in den letzten Jahren die Beteiligung der MAP-Kinasen und vor allem des Smad-Signaltransduktionsweges an der Wirkung von TGF $\beta$  untersucht (Abb. 2.5).

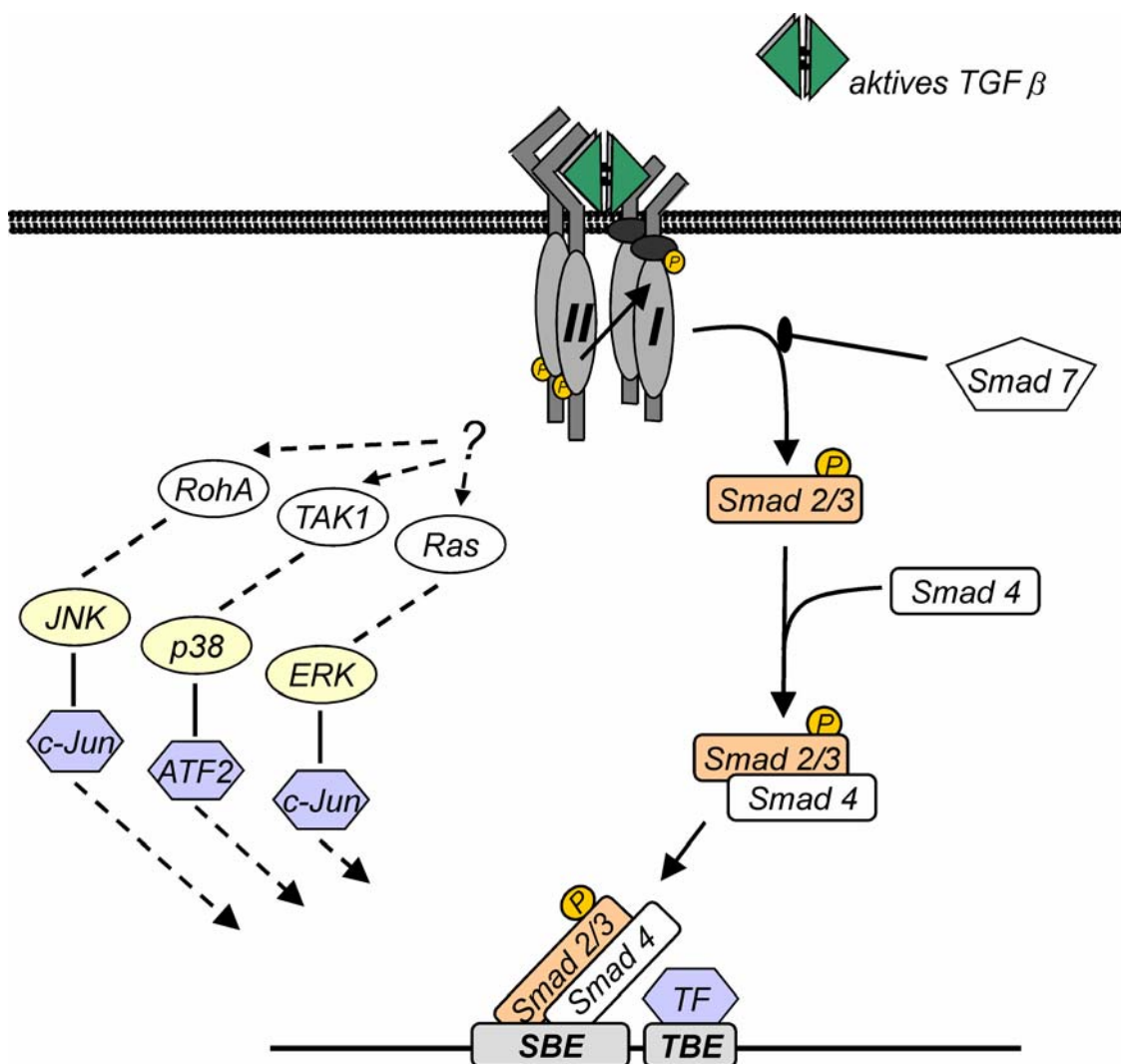


Abb. 2.5: TGF $\beta$ -Signaltransduktionswege

## EINLEITUNG

### *Smad-Signaltransduktionsweg*

Die Smad-Proteine sind Bestandteil eines evolutionär hoch konservierten Signaltransduktionswegs. Sie wurden im Verlauf der vergangenen Jahre isoliert und ihre Beteiligung an der Signaltransduktion durch Liganden der TGF $\beta$ -Superfamilie genau beschrieben (Heldin et al., 1997).

Die Smads sind gekennzeichnet durch zwei Regionen an ihrem N- und C-terminalen Ende, die in hohem Grad homolog zu dem verwandten Drosophila-Protein MAD sind. Diese Regionen wurden daher MAD-Homologie-Domäne 1 und 2 (MH1 und MH2) genannt. MH1 und MH2 sind durch eine weniger stark konservierte Prolin-reiche Domäne verbunden (de Caestecker et al., 1997).

Die funktionelle Charakterisierung der Smad-Proteine führte zu ihrer Gruppierung in drei Subfamilien:

- Rezeptor-aktivierte Smads (R-Smads): Smad 1, 2, 3, 5, und 8
- *common-mediator* Smads (Co-Smad): Smad 4
- inhibitorische Smads (I-Smads): Smad 6 und 7

Die R-Smads werden abhängig von Ligand und Typ II Rezeptor durch die Serin-Threonin-Kinase des Typ I Rezeptors aktiviert. Die C-terminale MH2 Domäne trägt die für die Wirkung der R-Smads notwendigen Funktionen. Im inaktiven Zustand bilden die MH1- und MH2-Domänen der R-Smads einen Komplex, in dem die N-terminale MH1-Domäne die Funktion der MH2-Domäne inhibiert und dadurch die Aktivierung des Signaltransduktionsweges in Abwesenheit des Liganden verhindert (de Caestecker et al., 1997). Die Phosphorylierung durch den Rezeptorkomplex erfolgt innerhalb eines konservierten SS(M/V)S-Motivs am C-terminalen Ende des R-Smads und bewirkt die Aufhebung der inhibitorischen Wirkung der MH1-Domäne (Abdollah et al., 1997; Souchelnytskyi et al., 1997).

Smad1 und 5 leiten Signale von BMP weiter, Smad2 und 3 Signale von TGF $\beta$  und Aktivin. Smad8 vermittelt Signale der Rezeptor Serin-Kinase ALK-2 (Nakao et al., 1997b).

Aktivierung der Smads durch ihre jeweiligen Rezeptoren induziert ihre Assoziation mit dem Co-Smad Smad4 (Lagna et al., 1996). Smad4 fehlt das C-terminale SS(M/V)S-Motiv der R-Smads und wird durch den aktivierten Rezeptorkomplex nicht phosphoryliert (Nakao et al., 1997b).

Der Komplex aus R-Smad/Smad4 wird in den Zellkern transportiert. Smad4 trägt in seiner Linker-Domäne ein nukleäres Export Signal und kann nur in Verbindung mit R-Smads dauerhaft in den Kern gelangen, R-Smads hingegen haben in ihren N-terminalen Domänen eine nukleäre Lokalisierungssequenz und können auch unabhängig von Smad4 in den Kern wandern (Xiao et al., 2000).

Smad4 spielt eine zentrale Rolle im Smad-Signaltransduktionsweg, da es nicht nur mit den durch TGF $\beta$ /Aktivin aktivierten Smad2 und Smad3 Proteinen interagiert, sondern auch mit Smad1, Smad5 und Smad8.

### *Kontrolle der Transkription durch Smads*

Aktivierte Smad-Proteine wirken als Transkriptionsfaktoren oder Transkriptions-Co-Faktoren. Die amino-terminale MH1 Domäne von Smad3 und Smad4 bindet spezifische DNA-Bereiche der Sequenzen CAGA, das so genannte Smad Binding Element (SBE) (Zawel et al., 1998). Das SBE befindet sich in einer Reihe TGF $\beta$  sensitiver Promotoren. Eine weitere Smad-Konsensus-Sequenz (GCCGnCGC) wird für die Aktivierung des humanen Typ VII Kollagen Promotors durch TGF $\beta$  verwendet (Vindevoghel et al., 1998). Smad2 kann aufgrund einer Insertion in der MH1-Domäne nicht direkt an DNA binden (Yagi et al., 1999).

Die C-terminale MH2-Domäne der R-Smads und Smad4 trägt eine transaktivierende Funktion (Liu et al., 1996). Für Smad4 wurde zusätzlich eine transaktivierende Domäne in der Linker-Region beschrieben, die sogenannte *Smad Activation Domain* (SAD) (de Caestecker et al., 1997).

SBEs befinden sich häufig in der Nähe von Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren. Da Smad3 und Smad4 nur schwach an DNA binden, liegt die Vermutung nahe, dass sie in erster Linie über die Interaktion mit anderen DNA bindenden Transkriptionsfaktoren zu ihren spezifischen Bindungsstellen gelangen (Shi et al., 1998). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Smads mit einer ganzen Reihe

## *EINLEITUNG*

von Transkriptionsfaktoren interagieren, u. a. ATF-2, c-Fos, c-Jun und JunD (Hanafusa et al., 1999; Liberati et al., 1999; Zhang et al., 1998).

Smads bilden darüber hinaus Komplexe mit Transkriptions-Co-Aktivatoren und -Repressoren. Als Co-Aktivatoren wirken zum Beispiel p300 und CBP. Beide Faktoren besitzen Histon-Acetyltransferase Aktivität, welche über die Acetylierung von Histonen die Kondensation der DNA verringert und die Bindung des Transkriptionsapparates erleichtert (Janknecht et al., 1998). TGIF ist ein Beispiel für einen Co-Repressor, der über das Einbringen von Histon-Deacetylasen in den Smad-Komplex wirkt. Die Bindung von p300/CBP und TGIF erfolgt über den gleichen Bereich in der C-terminalen Domäne der Smads und schließt sich gegenseitig aus. Auf diese Weise kann die TGF $\beta$  Signalintensität über das Verhältnis von p300/CBP und TGIF in der Zelle reguliert werden (Wotton et al., 1999).

### *Negative Regulation der R-Smads: I-Smads*

Die Dauer der TGF $\beta$ -Signale wird über die inhibitorischen Smads 6 und 7 reguliert. Smad7 inhibiert die Wirkung von TGF $\beta$ , Smad6 ist dem BMP Signaltransduktionsweg zugeordnet. Wie Smad4 fehlt auch bei Smad6 und Smad7 das C-terminale SS(M/V)S-Motiv; eine Phosphorylierung durch den aktiven Rezeptorkomplex findet nicht statt (Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997a).

Die I-Smads entfalten ihre Wirkung über die kompetitive Hemmung der Bindung der R-Smads an ihren jeweiligen Rezeptor (Hayashi et al., 1997). Smad6 konkurriert zusätzlich mit dem Co-Smad Smad4 um die Bindung an BMP-aktiviertes Smad1 (Hata et al., 1998). Kürzlich wurde ein weiterer Mechanismus der I-Smad Wirkung beschrieben: Smad7 interagiert mit den Ubiquitin-Ligasen Smurf1 und 2. Bindung des Smad7/Smurf-Komplexes an den aktivierten Rezeptorkomplex bewirkt die proteasomale Degradation von T $\beta$ RI (Ebisawa et al., 2001; Zhang et al., 2001).

### *MAP-Kinase Wege*

Neben dem Smad-Signaltransduktionsweg scheinen auch verschiedene MAP-Kinase-Kaskaden an der Wirkung von TGF $\beta$  beteiligt zu sein. In Zellen epithelialer Herkunft führt die Behandlung mit TGF $\beta$  zu einer schnellen Aktivierung von Ras (Mulder and

Morris, 1992). Ras ist ein GTP-bindendes Protein, das u.a. Signale von Rezeptor-Tyrosinkinasen und von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in das Cytoplasma weiterleitet. Ras aktiviert intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die sogenannten MAP-Kinase-Wege (MAPK, *Mitogene Activated Proteinkinase*).

Es wurden bislang drei MAP-Kinase-Gruppen beschrieben:

- Erks: *extracellular signal-regulated kinases*
- JNKs/Sapks: *c-JunN-terminal kinases / stress-activated protein kinases*
- p38

Die MAP-Kinasen sind Serin-Threonin-Kinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden. Die Phosphorylierung erfolgt über die sequenzielle Aktivierung zweier vorgeschalteter Kinasen. MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK, z.B. Raf, MEKK-1) werden direkt durch Ras phosphoryliert und aktiviert. Sie sind Serin-Threonin-Kinasen und aktivieren ihrerseits MAPK-Kinasen (MAPKK). MAPK-Kinasen phosphorylieren im Unterschied zu den anderen Kinasen der Kaskade ihre Substrate, die MAP-Kinasen, an Tyrosin- und Threonin-Resten (Kyriakis and Avruch, 2001).

Alle drei MAP-Kinasen können durch TGF $\beta$  aktiviert werden (Frey and Mulder, 1997a). Wie die beteiligten MAP-Kinase Kaskaden durch den TGF $\beta$  Rezeptorkomplex aktiviert werden, ist noch völlig unklar. Die verschiedenen Komponenten der TGF $\beta$  aktivierten MAP-Kinase Kaskaden sind erst teilweise bekannt.

Auf Ebene der MAPKKKs scheint die neu identifizierte *TGF $\beta$  Activated Kinase 1* (TAK1) eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von p38 zu spielen (Yamaguchi et al., 1995). Die MAPKKs MEK1 und MKK4 können die Aktivierung von JNK bzw. Erk durch TGF $\beta$  vermitteln (Yue and Mulder, 2000).

TGF $\beta$  aktivierte MAP-Kinasen können unabhängig vom Smad-Signaltransduktionsweg die Transkription von Genen aktivieren (Hocevar et al., 1999). Weitaus häufiger scheinen jedoch Interaktionen zwischen MAPK- und Smad-Signaltransduktionswegen vorzukommen.

## *EINLEITUNG*

### *Interaktion von Smad und MAP-Kinase Signaltransduktionswegen*

MAP-Kinase-Signaltransduktionswege können auf zwei unterschiedlichen Ebenen auf die Smad-Signaltransduktion einwirken:

- a) durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die mit aktivierten Smads interagieren
- b) durch direkte Phosphorylierung von Smads und einer damit verbundenen Änderung ihrer Aktivität

Smad- und MAPK/JNK-Signaltransduktionswege konvergieren auf der Promotorebene. Die Aktivierung des c-Jun Promotors durch TGF $\beta$  benötigt sowohl Smad3/4- als auch AP1-Bindungselemente (Wong et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren des AP1 Komplexes c-Jun und c-Fos direkt mit Smad3 und Smad4 interagieren (Zhang et al., 1998). Die MAPKKK TAK1 kann über die Aktivierung von p38 oder JNK die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 bewirken. Nach Aktivierung durch TGF $\beta$  wird ATF-2 durch Smad3/4 gebunden und die Induktion TGF $\beta$  sensibler Promotoren verstärkt (Sano et al., 1999).

MAP-Kinasen regulieren die Aktivität der Smad-Proteine jedoch auch durch direkte Phosphorylierung. In Endothelzellen wird Smad2 durch MEKK-1 außerhalb des SS(M/V)S-Motivs phosphoryliert. Dies bewirkt eine verstärkte Interaktion zwischen Smad2 und Smad4 und die Anhäufung des Komplexes im Zellkern (Brown et al., 1999). Auch negative Regulationen wurden beschrieben. In SW480.7 Colon Carcinom Zellen bewirkt ein hyperaktiver Ras Weg die Phosphorylierung von Smad2 und verhindert dadurch die Translokation in den Zellkern (Calonge and Massague, 1999).

### *Fragestellung*

Antiöstrogene haben sich als sehr effektiv in der Behandlung Hormon-responsiver Mammakarzinome erwiesen. Trotz nachweisbarer Östrogenrezeptoren ist jedoch schon initial bei fast einem Viertel der Patientinnen keine Wirkung zu beobachten (Jonat, 1991). Auch bei Tumoren, die anfänglich auf Tamoxifen ansprechen, kommt es in der Regel im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einem Verlust der anihormonellen

Wirkung. Die an der Entstehung von Antihormonresistenz beteiligten Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt.

Ein entscheidender Schritt zur Aufklärung der antihormonellen Wirkung war die Beobachtung, dass die Behandlung hormonsensitiver Mammakarzinomzellen zu einer Aktivierung des inhibitorischen Wachstumsfaktors TGF $\beta$  führt (siehe oben).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Beteiligung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion an der antihormonellen Wirkung genauer untersucht werden. Die Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis der Interaktionen zwischen Hormonen und Wachstumsfaktoren und den damit im Zusammenhang stehenden Mechanismen der Antiöstrogenresistenz beitragen. Als Modell-System für die Untersuchungen wurden Hormon-sensitive MCF-7 Mammakarzinomzellen verwendet.

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Etablierung quantitativer RT-PCRs zur schnellen und genauen Quantifizierung der Expression antiöstrogen-induzierter mRNAs. Im ersten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe der quantitativen LightCycler RT-PCRs untersucht, ob neben den Liganden auch weitere Komponenten des TGF $\beta$ -Systems einer antihormonellen Regulation unterliegen. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen standen die TGF $\beta$  Rezeptoren I und II, die gemeinsam die Signalübertragung durch TGF $\beta$  vermitteln und deren Expressionsniveau in einem direktem Zusammenhang mit der Sensitivität der Zellen gegenüber TGF $\beta$  steht. Zusätzlich wurde die Expression des inhibitorischen Smad7 untersucht, das einen wichtigen Einfluss auf die Dauer des TGF $\beta$  Signals hat.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde über die gezielte Hemmung der TGF $\beta$ -Rezeptoren, des Smad-Signaltransduktionsweges und zweier MAP-Kinasekaskaden versucht Aufschluss darüber zu erhalten, welche Zweige des komplexen TGF $\beta$  Systems an der antiöstrogenen Wirkung beteiligt sind. Die Hemmung der Signaltransduktionswege erfolgte über die Expression dominant negativer Signalmoleküle in den Zellen oder über die Behandlung mit spezifischen pharmakologischen Inhibitoren. Als Endpunkte wurde die Aktivierung TGF $\beta$ -sensitiver Promotoren und die antihormonelle Wachstumsinhibition untersucht.

## 4 Material

### 4.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

1 kb Plus DNA Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
100 mm Ø Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
2'-Deoxyadenosine 5'-Triphosphate	Amersham, Braunschweig
2'-Deoxycytidine 5'-Triphosphate	Amersham, Braunschweig
2'-Deoxyguanosine 5'-Triphosphate	Amersham, Braunschweig
2'-Deoxythymidine 5'-Triphosphate	Amersham, Braunschweig
24-Well-Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, DK
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
30% Acrylamid/Bis solution 37,5 : 1	Bio-Rad, München
4-Hydroxytamoxifen	Sigma, Deisenhofen
6-Well-Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, DK
Advantage-GC cDNA PCR Kit	Clontech, Heidelberg
Agarose Ultra Pure	Gibco BRL, Karlsruhe
Albumin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
AMV Reverse Transkriptase	Stratagene, Amsterdam, NL
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien
Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Bradford-Reagenz	BioRad, München
BSA	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Gibco BRL, Karlsruhe
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNase I	Amersham, Braunschweig
DTT	Sigma, Deisenhofen
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
ECL-Plus Western blotting detection reagents	Amersham, Braunschweig
EcoRI	Gibco BRL, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
G418	Sigma, Deisenhofen

## *MATERIAL*

Gentamycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
HindIII	Gibco BRL, Karlsruhe
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
ICI. 182.780	Tocris, Bristol, UK
Insulin	Gibco BRL, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Sigma, Deisenhofen
LB-Medium	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Roche, Mannheim
LightCycler Hybridisierungsproben	TIB Molbiol, Berlin
LightCycler-RNA Amplification Kit	
Hybridization Probes	Roche, Mannheim
Long Ranger	Biozym, Hess. Oldendorf
MS2-RNA	Roche, Mannheim
Na-Pyruvat	Gibco BRL, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NotI	NEB, Frankfurt a. M.
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
One-Phor-All Puffer	Amersham, Braunschweig
PD98059	Tocris, Bristol, UK
PMSF	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl Phosphat (pNPP)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Protein-Assay	Bio-Rad, München
PstI	Roche, Mannheim
PVDF-Membran	Roche, Mannheim
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rainbowmarker	Amersham, Braunschweig
Ready-To-Go T4 DNA Ligase	Amersham, Braunschweig
RNA Transcription Kit	Stratagene, Amsterdam, NL
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden
SB202190	Tocris, Bristol, UK
SB202474	Calbiochem, Darmstadt
SB203580	Tocris, Bristol, UK
SDS	Sigma, Deisenhofen
Silikonfett	Merck, Darmstadt
Sulfatase	Sigma, Deisenhofen
SuperScript First-Strand Synthesis	Gibco BRL, Karlsruhe
System for RT-PCR	
T75 Zellkulturflaschen	Corning, Wiesbaden
TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Karlsruhe
Temed	Roth, Karlsruhe
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham, Braunschweig

## MATERIAL

TGFβ1	R&D, Minneapolis, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
U0124	Calbiochem, Darmstadt
U0126	Toctris, Bristol, UK
Western Blocking Reagent	Roche, Mannheim
X-Gal	Roth, Karlsruhe
XhoI	NEB, Frankfurt a. M.

## 4.2 Medien, Puffer, Lösungen

### 4.2.1 Medien

DMEM 10 % FCS	DMEM	
	FCS	10 %
	Pyruvat	1 mM
	Gentamycin	50 µg/ml

DMEM 5 % CCS	DMEM	
	CCS	5 %
	Pyruvat	1 mM
	Gentamycin	50 µg/ml
	Insulin	50 ng/ml

CCS: Aktivkohle und Sulfatase behandeltes FCS für die Zellkultur:

500 ml FCS wird für 2 Stunden bei 37°C mit 2 U/ml Sulfatase inkubiert und zweimal für 30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert

SOC	Trypton	2 %
	Hefe-Extrakt	0,5 %
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glucose	20 mM

### 4.2.2 Puffer

DNase Puffer	Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	KCl	50 mM
Puffer P1: (Resuspensions-P.)	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Puffer P2: (Lysis-P.)	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Puffer P3: (Neutralisierungs-P.)	K-Acetat, pH 5,5	3 M
Puffer N3:	Neutralisierungs Puffer QIAprep Spin Miniprep Kit	
Puffer EB:	Tris-HCl, pH 8,5	10 mM
Puffer QBT: (Equilibrierungs-P.)	NaCl	750 mM
	MOPS, pH 7,0	50 mM
	Isopropanol	15 % (v/v)
	Triton X-100	0,15 % (v/v)
Puffer QC: (Wasch-P.)	NaCl	1,0 M
	MOPS, pH 7,0	50 mM
	Isopropanol	15 % (v/v)
Puffer QF: (Elutions-P.)	NaCl	1,25 M
	Tris-HCl, pH 8,5	50 mM
	Isopropanol	15 % (v/v)
Transkriptions Puffer: RT-PCR	Tris-HCl, pH 8,8	10 mM
	KCl	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	3 mM
	Gelatine	0,01 % (w/v)
Ligations Puffer 10x:	Tris-HCl, pH 7,5	60 mM
	MgCl <sub>2</sub>	60 mM
	NaCl	50 mM
	BSA	1 mg/ml
	β-Mercaptoethanol	70 mM
	ATP	1 mM
	DTT	20 mM
	Spermidin	10 mM

## *MATERIAL*

5x GC cDNA Puffer:	Tricin-KOH, pH 9,2	200 mM
	KOAcetat	75 mM
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	17,5 mM
	DMSO	25 %
	BSA	18,75 µg/ml
10x PCR Puffer:	Tris-HCl, pH 8,8	100 mM
	KCl	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	15 mM
	Gelatine	0,01 % (w/v)
Zell-Lysis-Puffer	Tris-HCl pH 7,6	50 mM
	NaCl	250 mM
	EDTA	5 mM
	Triton X-100	0,1 %
Transferpuffer:	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	SDS	0,037 %
	Methanol	20 %
	pH auf 9,1 einstellen	
TBS 10 x	NaCl	1,45 M
	KCl	25 mM
	Tris	250 mM
	pH 7,4 mit konz. HCl einstellen	
TBST 1 x	1:10 Verdünnung 10 x TBS-Konzentrat	
	+ Tween 20	0,2 %
Laufpuffer 10x	Tris	250 mM
	Glycin	2 M
	SDS	10 %
Stripping Lösung:	SDS	0,2 %
	β-Mercaptoethanol	400 µl
	1 x TBS ad 50 ml	
Lämmli-Puffer 2x	Tris-HCl	125 mM
	Glycerol	40 %
	SDS	4 %
	Bromphenolblau	2 %
	β-Mercaptoethanol	10 %
	pH 6,8	

### **4.2.3 Lösungen**

4-Hydroxytamoxifen	$10^{-4}$ M in 96% Ethanol
APS 10 %	1 g Ammoniumperoxiddisulfat ad. 100 ml aq. dest.
ICI 182.780	$10^{-6}$ M in 96% Ethanol
PD98059	1 mM in DMSO
SB202190	1 mM in DMSO
SB202474	5 mM in DMSO
SB203580	10 mM in DMSO
SDS 10 %	10 g Natriumdodecylsulfat ad 100 ml aq. dest.
Tris-HCl 0,5 M	30 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 6,8 mit konz. HCl einstellen, aq. dest ad 500 ml
Tris-HCl 1,5 M	90,75 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 8,8 mit konz. HCl einstellen, aq. dest ad 500 ml
U0124	1 mM in DMSO
U0126	100 $\mu$ M in DMSO
X-Gal 4 %	40 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid in DMF

## MATERIAL

### 4.3 Zelllinie

Alle Untersuchungen wurden mit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 durchgeführt (Soule et al., 1973).

### 4.4 Primer und Hybridisierungssonden

#### 4.4.1 Primer für die kompetitive RT-PCR

Name	Sequenz 5' ⇒ 3'
TβRI se	TCC TCG AGA TAG GCC GTT TGT A
TβRI as	TCC TCT TCA TTT GGC ACT CGA T
TβRI MS	TCA CCT GCA GTT GGT CCT GTG GA
TβRI MAS	ACC AAC TGC AGG TGA TGA CTT T
TβRII se	CCT CCA CAG TGA TCA CAC TC
TβRII as	TCG GTC TGC TTG AAG GAC TC
TβRII MSN	TTC CCT GCA GCT GGA CCC TA
TβRII MASN	TAG GGT CCA GCT GCA GGG AA

#### 4.4.2 Primer und Sonden für die quantitative LightCycler RT-PCR

##### 4.4.2.1 Primer

Name	Sequenz 5' ⇒ 3'
TGFβ 1 se	GCC GAC TAC TAC GCC AAG GA
TGFβ 1 as	AAC CCG TTG ATG TCC ACT TG
TGFβ 2 se	GTT TTT CTG TTG GGC ATT GA
TGFβ 2 as	TCT TCT GGG GGA CTG GTG AG
TβRI se	TCC TCG AGA TAG GCC GTT TGT A
TβRI as	TCC TCT TCA TTT GGC ACT CGA T
TβRII se	CCT CCA CAG TGA TCA CAC TC
TβRII as	TCG GTC TGC TTG AAG GAC TC
Smad7 se	CCC CCT CCT TAC TCC AGA TA
Smad7 as	ACG CAC CAG TGT GAC CGA TC
GAPDH se	CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT
GAPDH as	AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC
Transferrin Rez. se	TGA AGC TCA CTG TGA GCA ATG TG
Transferrin Rez. as	GCA CCA ACC GAT CCA AAG TCT

#### 4.4.2.2 Hybridisierungs sonden

Name	Sequenz 5' ⇒ 3'
TGFβ 1 FL	GCT TTC GCC TTA GCG CCC ACT
TGFβ 1 LC	TCC TGT GAC AGC AGG GAT AAC ACA CTG
TGFβ 2 FL	GCG CTT TTC TGA TCC TGC ATC TGG
TGFβ 2 LC	ACG GTC GCG CTC AGC CTG TCT AC
TGFβRI FL	TGT GCT TCG TCT GCA TCT CAC TCA TGT
TGFβRI LC	TGG TCT ATA TCT GCC ACA ACC GCA CT
TGFβRII FL	GAC CTA ACC TGC TGC CTG TGT GAC TTT
TGFβRII LC	CTT TCC CTG CGT CTG GAC CCT ACT
Smad7 FL	AAC CAA CTG CAG ACT GTC CAG ATG CT
Smad7 LC	TGC CTT CCT CCG CTG AAA CAG G
GAPDH FL	AGG GGT CAT TGA TGG CAA CAA TAT CCA
GAPDH LC	TTT ACC AGA GTT AAA AGC AGC CCT GGT G
Transferrin Rez. FL	CCT GGA GCT GCA AAA TCC GGT GT
Transferrin Rez. LC	CAC AGC TCT CCT ATT GAA ACT TGC CCA

FL Sonden sind 3' FAM markiert. LC Sonden sind 5' mit LightCycler Red 640 markiert und 3' phosphoryliert, um eine Elongation der Sonde zu verhindern. Die Hybridisierungs sonden wurden als 4 µM Stammlösung bei -20°C gelagert.

#### 4.4.3 Primer für die Klonierung dominant-negativer TGFβ-Rezeptoren

Name	Sequenz 5' ⇒ 3'
dKTβRI EcoRI	<u>GAA TTC</u> CGA GGT TTG CTG GGG TGA GG
dKTβRI NotI	<u>GCG GCC GCC</u> CAA ATC GAC CTT TGC CAA TGC
dKTβRII EcoRI	<u>GAA TTC</u> CTC GGT CTA TGA CGA GCA G
dKTβRII XhoI	<u>CTC GAG</u> CTG CTT CAG ATT GAT GTC TGA GAA

#### 4.4.4 Sequenzierungs primer

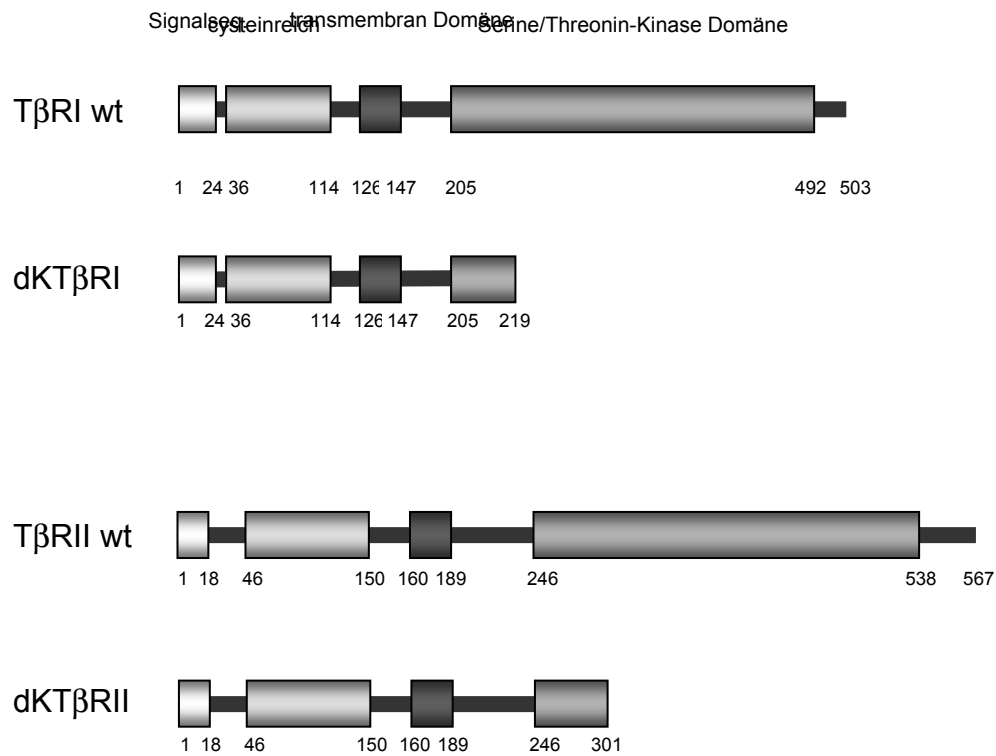
Name	Sequenz 5' ⇒ 3'
M13	CAG GAA ACA GCT ATG AC
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Die Sequenzierungs primer sind am 5'-Ende mit dem Infrarotfarbstoff IR 800 markiert. Alle Primer wurden als 100 µM Stammlösung bei -20°C gelagert.

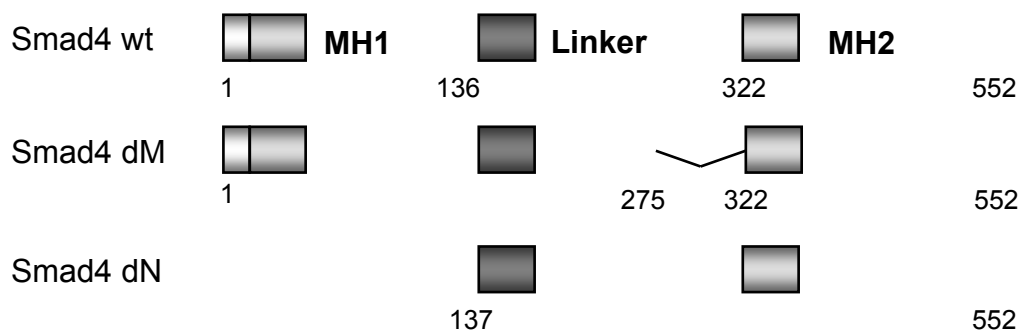
## MATERIAL

### 4.5 Plasmide

pCR2.1	TA Klonierungsvektor (Invitrogen, Groningen, Holland)
pcDNA3-Flag	eukaryontischer Expressionsvektor zur Herstellung von C-terminal mit einem Flag-Tag versehenen Proteinen
p3TP-Lux	TGF $\beta$ responsives Reporterplasmid, auf pGL3-Basic basierend (Wrana et al., 1992)
pSmad4-Flag	Expressionsvektor für Smad4, auf pcDNA3 basierend (de Caestecker et al., 1997)
pSmad4-dM-Flag	Expressionsvektor für eine Deletionsmutante von Smad4 (Aminosäurereste 275-322 fehlen), auf pcDNA3 basierend (de Caestecker et al., 1997)
pSmad4-dN-Flag	Expressionsvektor für eine Deletionsmutante von Smad4 (Aminosäurereste 1-137 fehlen), auf pcDNA3 basierend (de Caestecker et al., 1997)
p6SBE	auf pGL3-Promoter basierendes Reporterplasmid mit 6 Kopien des Smad Binding Elements (5'-GTCTAGAC-3') als Enhancer (Le Dai et al., 1998)
pGL3-Promoter	Reporter-Plasmid, enthält das <i>Firefly Luciferase</i> Gen ohne Promoter (Promega, Mannheim)
pGL3-Basic	Reporter-Plasmid, enthält das <i>Firefly Luciferase</i> Gen unter der Kontrolle eines SV40 Promotors (Promega, Mannheim)
pRL-TK	Kontroll-Plasmid für die Ermittlung von Transfektions-effizienzen, enthält das <i>Renilla Luciferase</i> Gen unter Kontrolle des <i>Herpes simplex</i> Thymidin Kinase Promotors (Promega, Mannheim)
pdKT $\beta$ RI-Flag	Expressionsvektor für eine Deletionsmutante von T $\beta$ RI (Aminosäurereste 220-503 fehlen, Abb. 3.1), auf pcDNA3 basierend. Konstruktion: siehe 4.2.5.
pdKT $\beta$ RII-Flag	Expressionsvektor für eine Deletionsmutante von T $\beta$ RII (Aminosäurereste 301-567 fehlen, Abb. 3.1), auf pcDNA3 basierend. Konstruktion: siehe 4.2.5.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der dominant negativen TGF $\beta$ -Rezeptorproteine dKT $\beta$ RI und dKT $\beta$ RII. Zum Vergleich sind die entsprechenden Wildtyp-Rezeptoren gezeigt. Die Zahlen geben Aminosäurereste an Beginn und Ende der jeweiligen Domänen an. Die Proteine werden von den Plasmiden pdKT $\beta$ RI-Flag und pdKT $\beta$ RII-Flag exprimiert.



**Abb. 3.2:** Schematische Darstellung der dominant negativen Smad4-Konstrukte. Zum Vergleich ist das Wildtyp-Smad4 gezeigt. Die Zahlen geben Aminosäurereste an Beginn und Ende der jeweiligen Domänen an. Die Proteine werden von den Plasmiden pSmad4-dM-Flag und pSmad4-dN-Flag exprimiert.

## MATERIAL

### 4.6 Antikörper

#### 4.6.1 Primäre Antikörper

anti-Flag	F3165, Maus, monoklonal, IgG1, Endkonz. 4,4 µg/ml Sigma, Deisenhofen
anti-Smad4	B-8, Maus, monoklonal, IgG1, Endkonz. 1 µg/ml Santa Cruz, Heidelberg

#### 4.6.2 Sekundärer Antikörper

Anti-Maus-IgG	DC02L, Ziege Oncogene, Darmstadt
---------------	-------------------------------------

### 4.7 Geräte und Hilfsmittel

Agarose-Gelkammer	B1A	PeqLab, Erlangen
Bakterienschüttler	HAT	Infors, Bottmingen
Blotting Kammer	Fast-Blot B33	Biometra, Göttingen
DNA-Messung	GenQuant	Pharmacia Biotech, Freiburg
Luminometer	Autolumat Plus	Berthold, Bad Wildbach
Pipetten	0,5-10µl, 10-100 µl, 200-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Röntgen-Filme	Hyperfilm	Amersham, Braunschweig
Sequenzier	Li-Cor 4000	MWG, Ebersberg
Software	GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Spannungsquellen	Power Pac P25 (Fast-Blot) Power Pac 3000 (PAGE) E143 (Agarose-Gele)	Biometra, Göttingen BioRad, München
Spektralphotometer	Diode Array Spectrophotometer 8452 A	Hewlet Packard, Waldbronn

*MATERIAL*

Thermo-Cycler	LightCycler MiniCycler PE9600 (Sequenzier-PCRs)	Roche, Mannheim MJ Research Perkin Elmer
Vertikal- elektrophoresekammer	Protean II xi Cell	BioRad, München
Zellzahlbestimmung	Casy-Counter	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Fellbach

## 5 Methoden

### 5.1 Zellbiologische Methoden

#### 5.1.1 Kultivierung der humanen Mammakarzinomzelllinien

Die MCF-7 Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und routinemäßig zweimal pro Woche passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zur Entfernung von Serumresten mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit Trypsin/EDTA überschichtet, um die Zellen durch Ablösung der Adhäsionsmoleküle von der Unterlage in Suspension zu bringen. Um die weitere Trypsinaktivität zu unterbinden, wurde dann serumhaltiges Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde verdünnt auf neue Gewebekulturflaschen verteilt.

Als Zellkulturmedium wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) unter Zusatz von 10 % (v/v) FCS, 1 mM Na-Pyruvat und 50 µg/ml Gentamycin verwendet.

Proliferations-Assays mit Antiöstrogenen wurden in DMEM mit 5 % CCS und 50 ng/ml Insulin durchgeführt. Die Zellen wurden vor der Verwendung in den Versuchen mindestens einmal in diesem Medium passagiert. Für alle anderen Versuche wurde das normale Zellkulturmedium verwendet.

#### 5.1.2 Proliferations-Assays

##### 5.1.2.1 Adhärenter Proliferations-Assay

In 24-Well-Zellkulturschalen wurden 20.000 Zellen pro Well ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen Medium mit den zu untersuchenden Testsubstanzen oder dem entsprechendem Lösungsmittel als Kontrolle ausgetauscht. Nach fünf Tagen

wurden die Zellen mit 1 ml PBS pro Well gewaschen und durch Inkubation mit 500 µl 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA von der Zellkulturplatte gelöst. Das Trypsin wurde anschließend mit 500 µl DMEM / 10 % FCS inaktiviert. Je nach Zelldichte wurden 100 oder 200 µl dieser Zellsuspension in 10 ml Isotonlösung überführt und mit einem Casy-Counter (Schärfe-System) ausgezählt.

Jede Substanz wurde in Triplikaten bestimmt, in mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### **5.1.2.2 Softagar-Assay**

2,4 g Bacto-Agar wurde in 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Durch Zugabe von 5 ml dieser Agar-Lösung in 35 ml DMEM / 10 % FCS wurde ein 0,6 %iger Grundagar hergestellt. In 24-Well-Zellkulturplatten wurden pro Well 250 µl des Grundagars pipettiert und zum Aushärten ca. 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Test-Ansatz setzte sich zusammen aus 480 µl Grundagar, 160 µl Zellsuspension und 160 µl DMEM / 10 % FCS mit der Testsubstanz oder dem entsprechenden Lösungsmittel. Der Testansatz wurde auf drei Wells aufgeteilt, pro Well wurden 200 µl pipettiert. Die Zellsuspension war so eingestellt, dass sich in jedem Well 5.000 Zellen befanden.

Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop alle Kolonien in einem Gesichtsfeld ausgezählt, die mehr als 4 Zellen aufwiesen.

### **5.1.3 Zellanzucht für Westernblot**

In 100 mm Ø Zellkulturschalen wurden 200.000 Zellen in 10 ml Medium ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen Medium mit den zu untersuchenden Testsubstanzen oder dem entsprechenden Lösungsmittel als Kontrolle ausgewechselt und für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS- 1,5 mM EDTA abgelöst. Die Zellzahl der Suspension wurde am Casy-Counter bestimmt. Die Zellsuspension wurde direkt für die Gesamtproteinisolierung weiterverwendet.

## *METHODEN*

### **5.1.4 Zellanzucht für die Gesamt-RNA-Isolierung**

In 6-Well-Zellkulturschalen wurden 50.000 Zellen pro Well in 2 ml Medium ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen Medium mit den zu untersuchenden Testsubstanzen oder dem entsprechendem Lösungsmittel als Kontrolle ausgewechselt. Für jede Substanz wurde eine 6-Well-Platte behandelt. Nach dem jeweiligen Behandlungszeitraum wurde zunächst von jeder Platte die Zellzahl eines Wells bestimmt, um die Auswirkung der Testsubstanz auf das Zellwachstum zu überprüfen. Die Zellen der restlich Wells wurden einmal mit PBS gewaschen und für die RNA-Isolierung weiterverwendet.

### **5.1.5 Transfektionen**

#### **5.1.5.1 Stabile Transfektionen**

In 6-Well-Zellkulturschalen wurden 100.000 Zellen pro Well ausplattiert und über Nacht inkubiert. Für den Transfektionsansatz wurde pro Well zunächst 3 µl des Transfektionsreagenz FuGENE6 mit 100 µl DMEM verdünnt. Anschließend wurde dieser Ansatz zu 2 µg des jeweiligen Vektor-Konstruktes hinzugegeben, für mindestens 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen pipettiert. 48 Stunden später wurden die Zellen abtrypsiniert und in 20 ml Zellkulturmedium mit 800 µg/ml G418 aufgenommen. Die G418 Konzentration war so gewählt, dass nur Zellen, die den Vektor stabil in ihre DNA integriert hatten, wachsen konnten. Die Zellsuspension wurde auf zwei 100 mm Ø Zellkulturschalen verteilt und weiter bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gegen frisches Medium mit 800 µg/ml G418 ausgetauscht. Nach ein bis zwei Wochen waren Kolonien mit G418 resistenten Zellen gewachsen. Diese wurden am Boden der Platte mit einem Filzschreiber markiert und mit Hilfe von Klonierungszyklindern von der Platte abgelöst. Hierfür wurde das Medium von den Platten entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Für jede Kolonie wurde ein Klonierungszylinder mit seiner Unterseite in Silikonfett getaucht über der Kolonie platziert. In den Zylinder wurden 200 µl Trypsin/EDTA gegeben und die Zellen durch leichtes Auf- und Abpipettieren von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurde dann in eine Vertiefung einer 24-Zellkulturplatte überführt, in der sich bereits 1

ml Medium / 800 µg/ml G418 befand. Die Klone wurden expandiert und in T75 Flaschen in Kultur gehalten.

### 5.1.5.2 Transiente Transfektionen

In 24-Well-Zellkulturschalen wurden 20.000 Zellen pro Well ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen Medium mit den zu untersuchenden Testsubstanzen oder dem entsprechendem Lösungsmittel als Kontrolle ausgewechselt. 72 Stunden später erfolgte die Transfektion mit FuGENE6. Bei Versuchen mit TGFβ wurden 50.000 Zellen pro Well ausplattiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte ebenfalls am nächsten Tag. Die Zellen wurden jedoch direkt nach der Behandlung transfiziert.

Pro Well wurde eine Gesamtmenge von 500 ng DNA transfiziert. Die Plasmide wurden in folgenden Mengen eingesetzt:

p6SBE / pGl3-Promoter: 150 ng/Well

p3TP-lux / pGl3-Basic: 300 ng/Well

pdKTβRI, pdKTβRII, pSmad4-dM, pSmad4-dN: 150 ng/Well

pcDNA3-Flag: variabel, zum Auffüllen auf 500 ng Gesamtmenge/Well

Als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pRL-TK verwendet, welches das *Renilla Luciferase* Gen trägt. In Transfektionen mit p6SBE / pGl3-Promoter wurden 50 ng pRL-TK/Well eingesetzt, in Transfektionen mit p3TP-lux / pGl3-Basic 5 ng/Well.

Für den Transfektionsmix wurde 9 µl FuGENE6 in 100 µl DMEM verdünnt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA hinzugefügt. Der FuGENE-DNA-Mix wurde dann für mindestens 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich zu den Zellen pipettiert. Ca. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 100 µl *Passive Lysis Buffer* lysiert.

### 5.1.6 Luciferase-Assay

Die Luciferase Aktivität in den Zelllysaten wurde mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* von Promega bestimmt. Dieses System ermöglicht die aufeinanderfolgende Messung von *Firefly Luciferase* und *Renilla Luciferase* innerhalb eines Ansatzes.

## METHODEN

In 40 µl Zelllysate wurde zunächst durch Zugabe von 100 µl *Luciferase Assay Reagent II* die Aktivität der *Firefly Luciferase* des jeweiligen Reporterplasmids gemessen. Durch Zugabe von 100 µl *Stop & Glo*<sup>®</sup> Reagenz wurde die Biolumineszenz der *Firefly Luciferase* gelöscht und die Biolumineszenz Reaktion der *Renilla Luciferase* initiiert. Die Lumineszenz von *Firefly* und *Renilla Luciferase* wurde für 10 Sekunden gemessen. Die *Firefly Luciferase* Aktivität wurde zum Ausgleich von Unterschieden in den Zellzahlen und der Transfektionseffizienz auf die *Renilla Luciferase* Aktivität normalisiert.

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen. 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden direkt in der Zellkulturplatte mit 350 µl RLT-Puffer lysiert. Das Lysat wurde mit 1 Volumen 70 % Ethanol versetzt und die RNA nach Angaben des Herstellers über die Spin-Säulen aufgereinigt. Die mit Wasser eluierte RNA wurde anschließend mit DNase I verdaut, um evtl. mit-isolierte DNA aus dem Ansatz zu entfernen. In einem End-Volumen von 100 µl DNase-Puffer wurde hierfür das gesamte Eluat mit 10 U DNase I für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. DNase und Salze wurden über RNeasy Mini Spin-Säulen in einem *Clean-up* nach Angaben des Herstellers entfernt und die RNA mit 30 µl Wasser eluiert.

### 5.2.2 Kompetitive RT-PCR

Bei der kompetitiven RT-PCR wird dem PCR-Ansatz vor der Amplifikation ein interner Standard zugegeben. Dieser unterscheidet sich nur geringfügig von dem zu untersuchenden Template, z.B. durch eine Restriktionsschnittstelle, und kann dadurch nach der Amplifikation vom Wildtyp-Template unterschieden werden.

Da die Sequenzen von Template und Standard nahezu identisch sind und beide durch die gleichen Primer amplifiziert werden, kann man davon ausgehen, dass auch die Amplifikationsbedingungen identisch sind. Theoretisch sollten daher die Mengenverhältnisse von Template und Standard die gesamte PCR hindurch gleich bleiben. Nach der Amplifikation und Auftrennung im Gel können die Mengen an Template und Standard miteinander verglichen werden. Ansätze, in denen vor der Amplifikation gleiche Mengen an Template und Standard vorhanden waren, zeigen entsprechend im Gel gleichstarke Banden. Zur genauen Quantifizierung müssen mehrere PCRs mit gleicher Menge Template und einer Verdünnungsreihe des Standards durchgeführt werden. Nach der Amplifikation werden die Produktbanden miteinander

## METHODEN

verglichen, und die Template Menge mit Hilfe der bekannten Standard-Mengen abgeschätzt.

Die Herstellung der internen Standards der kompetitiven RT-PCRs ist unter 4.2.4 beschrieben. Die Standards unterscheiden sich von der Wildtyp-Sequenz durch eine PstI-Schnittstelle. Die PstI-Schnittstelle befindet sich in der Mitte des PCR-Produktes, so dass durch den Verdau zwei gleich große Fragmente entstehen.

In einem Volumen von 20 µl wurden im gleichen Ansatz 200 ng Gesamt RNA und unterschiedliche Verdünnungen des jeweiligen RNA-Standards cDNA umgeschrieben. Der Transkriptionspuffer enthielt neben der RNA 2,5 pmole dNTPs, 20 pmole des antisense Primers und 250 mU AMV Reverse Transkriptase. Für die Transkription wurde die RNA zunächst bei 65°C denaturiert und anschließend für 30 min bei 52°C inkubiert. Nach Inaktivierung der AMV (1 Min. bei 99°C) wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt und vollständig für die nachfolgende PCR weiter verwendet. Diese wurde in einem Volumen von 100 µl mit je 20 pmolen des 5' und 3' Primers, 2,5 pmolen dNTPs und 2,5 U Taq Polymerase in Transkriptionspuffer mit einer MgCl<sub>2</sub> Konzentration von 1,5 mM durchgeführt. Die eingesetzten Primer waren für TβRI: TβRI se und TβRI as und für TβRII: TβRII se und TβRII as. Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen:

Denaturierung:	30 s bei 94°C
Annealing:	30 s bei 60°C (TβRI) oder 30 s bei 57°C (TβRII)
Elongation:	30 s bei 72°C

Nach der Amplifikation wurden 20 µl des PCR-Produktes mit 0,75 U PstI für 30 min bei 37°C verdaut. Nur PCR-Produkte, die von der Standard-cRNA stammen, besitzen eine PstI Schnittstelle und werden geschnitten. PCR-Produkte von der jeweiligen Rezeptor-mRNA bleiben unverändert. Der Restriktionsansatz mit den PCR-Produkten wurde schließlich in einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die Fragmente des verdauten Standards erschienen als eine Bande, die genau halb so groß war wie die Bande des Wildtyp-PCR-Produktes. Über die Stärke der Banden konnte die Menge der jeweiligen Rezeptor mRNA in dem PCR-Ansatz abgeschätzt werden.

### 5.2.3 Quantitative LightCycler RT-PCR

Die LightCycler PCR beruht auf einer optischen Detektion der amplifizierten PCR-Produkte. Zusätzlich zu den Primern werden zwei mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte, genspezifische Hybridisierungs sonden eingesetzt. Die Donor-Sonde ist am 5'-Ende mit LightCycler Red 640 markiert, die Akzeptor-Sonde am 3'-Ende mit Fluorescein. Die Sequenz der Hybridisierungssonden ist so gewählt, dass beide Sonden an den gleichen Strang binden und der Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Farbstoff nur 1-5 Nukleotide beträgt. Während des Annealings binden Primer und Sonden an die Template-DNA und die Fluoreszenzfarbstoffe gelangen in unmittelbare Nähe zueinander. Der Donor-Farbstoff wird durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlt die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Das Anregungsspektrum des Akzeptors entspricht dem Emissionsspektrum des Donors, so dass die abgegebene Energie bei ausreichender Nähe direkt vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden kann. Der Akzeptor gibt die aufgenommene Energie ebenfalls in Form von Licht wieder ab. Zum Nachweis des PCR-Produktes wird nach jeder Annealing-Phase das vom Akzeptor emittierte Licht gemessen. Die emittierte Lichtmenge verhält sich proportional zur Menge der entstandenen DNA und ermöglicht die direkte Überwachung der Amplifikation.

Die quantitativen LightCycler RT-PCRs wurden mit dem *LightCycler-RNA Amplification Kit Hybridization Probes* von Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es handelt sich um eine *one-step* RT-PCR. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Für jede PCR wurden 80 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Lediglich für die TGFβ2 PCR wurde wegen des niedrigen basalen Expressionsniveaus 160 ng Gesamt-RNA verwendet. Die MgCl<sub>2</sub> Konzentration betrug 8 mM (TGFβ1 5 mM). Primer und Sondenkonzentrationen sowie die jeweiligen Annealing-Temperaturen und Elongationszeiten sind unten aufgeführt. Die RT-Reaktion lief über 20 min bei 55°C. Die PCR begann mit einer initialen Denaturierung von 30 s bei 95°C. Die Amplifikations-Zyklen waren:

## METHODEN

Denaturierung:	2 s bei 95°C
Annealing:	10 s, Temp.: siehe Tabelle
Elongation:	Zeit: siehe Tabelle, bei 72°C

	<u>TGFβ1</u>	<u>TGFβ2</u>	<u>TβRI</u>	<u>TβRII</u>	<u>Smad7</u>	<u>GAPDH</u>	<u>TR</u>
Primer	0,5 μM	0,5 μM	0,5 μM	0,5 μM	0,5 μM	0,1 μM	0,1 μM
Sonden	0,3 μM	0,3 μM	0,3 μM	0,4 μM	0,15 μM	0,15 μM	0,3 μM
Annealing	57°C	62°C	60°C	60°C	60°C	64°C	62°C
Elongation	10 s	14 s	11 s	11 s	11 s	14 s	11 s

Die Amplifikation erfolgte über 40 Zyklen.

Die Bildung der Produkte wurde *on-line* über die Zunahme der emittierten Fluoreszenz-Signale verfolgt. Bei jeder PCR wurde eine Verdünnungsreihe (10 pg bis 1 fg) einer spezifischen Standard-RNA mitgeführt. Die Herstellung der Standards ist unter 4.2.4 beschrieben. Mit Hilfe der amplifizierten Standards wurde für jede PCR eine Standardkurve ermittelt und aus dieser die Menge der genspezifischen mRNA in der eingesetzten Gesamt-RNA berechnet. Die Induktion der mRNA wurde als Quotient der mRNA-Menge in den behandelten Zellen und den dazugehörigen unbehandelten Kontrollzellen berechnet.

### 5.2.4 Herstellung der RNA-Standards für die kompetitive RT-PCR und die LightCycler RT-PCR

Zur Herstellung der RNA-Standards für kompetitive und LightCycler RT-PCR wurden die jeweiligen PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 kloniert und mit Hilfe von T7 RNA-Polymerase (*RNA Transcription Kit* von Stratagene) in cRNA umgeschrieben.

In die klonierten PCR-Produkte für die kompetitive RT-PCR wurde zusätzlich eine PstI-Schnittstelle eingeführt, durch die das PCR-Produkt in zwei gleich große Fragmente geteilt werden kann.

#### 5.2.4.1 RT-PCR

In einem Volumen von 20 μl wurden 200 ng Gesamt RNA in cDNA umgeschrieben. Die eingesetzten Primer sind für die kompetitive RT-PCR unter 3.4.1 und für die

LightCycler RT-PCR unter 3.4.2 beschrieben. Der Transkriptionspuffer enthielt neben der RNA 2,5 pmole dNTPs, 20 pmole des as-Primers und 250 mU AMV Reverse Transkriptase. Für die Transkription wurde die RNA zunächst bei 65°C denaturiert und anschließend für 30 Min. bei 52°C inkubiert. Nach Inaktivierung der AMV (1 min bei 99°C) wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt und vollständig für die nachfolgende PCR weiter verwendet. Diese wurde in einem Volumen von 100 µl mit je 20 pmolen des se- und as-Primers, 2,5 pmolen dNTPs und 2,5 U Taq Polymerase in Transkriptionspuffer mit einer MgCl<sub>2</sub> Konzentration von 1,5 mM durchgeführt.

Die Amplifikation erfolgte über 35 Zyklen:

Denaturierung:	30 s bei 94°C
Annealing:	30 s bei 60°C
Elongation:	30 s bei 72°C

Die Größe der amplifizierten PCR Produkte wurde in einem 2 %igem Agarose-Gel überprüft.

### 5.2.4.2 Ligation

Die PCR-Produkte wurden mit dem *TA Cloning Kit* von Invitrogen kloniert. Die TA-Klonierung nutzt die Tatsache aus, dass viele thermostabile DNA-Polymerasen an das 3'-Ende des synthetisierten PCR-Fragmentes ein einzelnes überhängendes Adenosin-Nukleotid anfügen. PCR-Fragmente mit A-Überhängen lassen sich problemlos in einen linearisierten Vektor mit T-Überhängen (hier pCR2.1) ligieren.

Die Ligation wurde mit 1 µl des frischen PCR-Produktes, 1 µl 10x Ligationspuffer, 2 µl pCR2.1 Vektor (25 ng/µl), 5 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl T4 DNA Ligase (4 U) über Nacht bei 14°C durchgeführt.

### 5.2.4.3 Transformation kompetenter Zellen

2 µl Ligationsansatz wurden zu 50 µl kompetenten *E. coli* INVαF<sup>+</sup> Zellen pipettiert und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Sekunden bei 42°C inkubiert und für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC Medium wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 50 und 100 µl der Zellsuspension

## METHODEN

wurden auf X-Gal/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.2.4.4 Identifizierung transformierter Zellen: Blau-Weiß-Selektion

Den für die Transformation verwendeten INV $\alpha$ F' Zellen fehlt durch  $\Delta$ M15-Deletion im lacZ-Gen die Fähigkeit, eine aktive Form der  $\beta$ -Galaktosidase zu bilden. Der pCR2.1 Vektor enthält das lacZ $\alpha$  Fragment des Enzyms. Nach erfolgreicher Transformation des Vektors in die INV $\alpha$ F' Zellen kann durch Komplementation dieses Fragments mit dem  $\Omega$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase aus den Zellen eine biologisch aktive  $\beta$ -Galaktosidase gebildet werden. Das Substrat X-Gal kann in diesen Zellen zu einem blauen Indigofarbstoff umgesetzt werden. Plasmide, in die ein Insert eingebaut wurde, exprimieren das lacZ $\alpha$  Fragment nicht und bilden daher keine aktive  $\beta$ -Galaktosidase. X-Gal wird nicht umgesetzt, die Kolonien bleiben weiß. Weiße Kolonien wurden für die anschließende Plasmidisolierung verwendet.

### 5.2.4.5 Minipräparation von Plasmid-DNA

Plasmid-Minipräparationen wurden mit dem *QIAprep Miniprep Kit* durchgeführt. Diese Säulen arbeiten über selektive Adsorption der DNA an Silica-Gel Membranen unter spezifischen Salzkonzentrationen.

Es wurden 10 weiße Kolonien gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C inkubiert. 2 ml der Bakterienkultur wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 13.000 upm für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 250  $\mu$ l Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 250  $\mu$ l alkalischem Lyse-Puffer P2 für 5 min lysiert. Der Ansatz wurde durch Zugabe von 350  $\mu$ l Puffer N3 neutralisiert und das SDS ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 13.000 upm für 10 min wurde das SDS-Salz und die lysierten Zellen präzipitiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde auf die Spin-Säulen geladen und einmal mit 750  $\mu$ l Puffer PE gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde die Säule für 10 min bei 13.000 upm zentrifugiert, um Ethanol-Reste aus dem Ansatz zu entfernen. Für die Elution der Plasmid-DNA wurde die Säule für 1 min mit 50  $\mu$ l Puffer EB inkubiert und dann für 1 min bei 13.000 upm zentrifugiert.

#### 5.2.4.6 Restriktionsverdau

Über einen Restriktionsverdau wurde die Größe der in den pCR2.1-Vektor ligierten PCR-Produkte überprüft. pCR2.1 ist so konstruiert, dass sich auf beiden Seiten des eingefügten PCR-Produktes eine EcoRI Schnittstelle befindet. Durch einen Verdau mit EcoRI kann das PCR-Produkt aus dem Vektor ausgeschnitten werden.

Die Restriktionsansätze enthielten 16 µl der jeweiligen Miniplasmidpräparation in einem Endvolumen von 20 µl 1x *One-Phor-All* Puffer. Der Verdau erfolgte über 1 ½ Stunden bei 37°C mit 10 U EcoRI. Um die Größe des Inserts zu überprüfen, wurden die Ansätze anschließend in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

#### 5.2.4.7 Maxipräparation von Plasmid DNA

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid DNA wurde das Qiagen *Plasmid Midi Kit* verwendet. 2 l Erlenmeyer-Kolben mit 200 ml LB Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) wurden hierfür mit 200 µl der Bakterien-Vorkultur von der Minipräparation des jeweiligen Plasmids angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min bei 6.000 x g und 4°C in einer Sorvall Zentrifuge abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 4 ml alkalischem Lyse-Puffer P2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Mit 4 ml eiskaltem Puffer P3 wurde der Ansatz neutralisiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Präzipitiertes SDS wurde zusammen mit den lysierten Zellen bei 20.000 x g für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA auf die Midi-Säule geladen. Die Säulen waren zuvor mit 4 ml Puffer QBT equilibriert worden. Die Plasmid-DNA wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und schließlich mit 5 ml Puffer QF eluiert. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei > 15.000 x g für 30 min bei 4°C wurde die DNA ausgefällt. Salzreste wurden durch einen weiteren Waschschrift mit 70% Ethanol entfernt und die DNA in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. DNA-Konzentration und Reinheit wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt.

## METHODEN

### 5.2.4.8 Einführung der Restriktionsschnittstellen in die Standards der kompetitiven RT-PCR

In die PCR-Produkte von T $\beta$ RI (Primer T $\beta$ RI se / T $\beta$ RI as) und T $\beta$ RII (Primer T $\beta$ RII se / T $\beta$ RII as) wurde über mutierte Primer eine PstI-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das Vorgehen ist am Beispiel von T $\beta$ RI in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

Als Template dienten die in den pCR2.1 Vektor ligierten PCR-Produkte von T $\beta$ RI oder T $\beta$ RII. In zwei getrennten PCR-Ansätzen wurden zunächst zwei überlappende DNA-Fragmente hergestellt (Abb. 4.1 PCR 1). Hierfür wurden folgende Primerpaare verwendet:

T $\beta$ RI: Fragment A: T $\beta$ RI se / T $\beta$ RI MAS      Fragment B: T $\beta$ RI MS / T $\beta$ RI as  
T $\beta$ RII: Fragment A: T $\beta$ RII se / T $\beta$ RII MASN      Fragment B: T $\beta$ RII MSN / T $\beta$ RII as

Die Sequenz der Primer T $\beta$ RI MAS, T $\beta$ RI MS und T $\beta$ RII MASN, T $\beta$ RII MSN ist so verändert, dass in dem jeweiligen PCR-Produkt eine PstI-Schnittstelle entsteht.

Die überlappenden DNA-Fragmente A und B wurden gemeinsam in einer zweiten PCR als Template eingesetzt. Hierfür mußten zunächst die überhängenden Enden aufgefüllt werden. Nach einer initialen Denaturierung kommt es zu einer Anlagerung der komplementären Bereiche der zwei DNA-Fragmente. Die 3'-OH-Enden werden von der DNA-Polymerase als Primer erkannt und die fehlenden Bereiche in der Elongationsphase aufgefüllt. Die so entstandene Template-DNA kann nach Zugabe der äußeren Primer (T $\beta$ RI: T $\beta$ RI se/T $\beta$ RI as, T $\beta$ RII: T $\beta$ RII se/T $\beta$ RII as) in den folgenden Zyklen amplifiziert werden (Abb. 4.1).

Die durch die Primer T $\beta$ RI MAS, T $\beta$ RI MS und T $\beta$ RII MASN, T $\beta$ RII MSN eingeführte PstI-Schnittstelle befindet sich nun genau in der Mitte des jeweiligen PCR-Produktes, so dass diese durch einen Restriktionsverdau mit PstI in zwei gleichgroße Fragmente geschnitten werden können.

PCR 1:

Die Reaktionsmische bestanden aus 2  $\mu$ l Vektor als Template (pCR2.1-T $\beta$ RI oder pCR2.1-T $\beta$ RII, beide 500 ng/ $\mu$ l), 10  $\mu$ l 10x PCR Puffer, je 2  $\mu$ l der Primer (Primer-

Kombinationen siehe oben, Konz.: 10  $\mu$ M), 2  $\mu$ l dNTP-Mix (1,25 mM) und 2,5 U Taq DNA Polymerase in einem Endvolumen von 100  $\mu$ l. Die PCR wurde im Thermo-Cycler (MJ Research) nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95°C, 5 min.
Amplifikation 35 Zyklen:	95°C, 30 s / 60°C 30 s / 72°C 30 s.
Terminale Elongation:	72°C, 10 min.

Die PCR-Produkte wurden in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und bei 90°C in 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst.

### PCR 2:

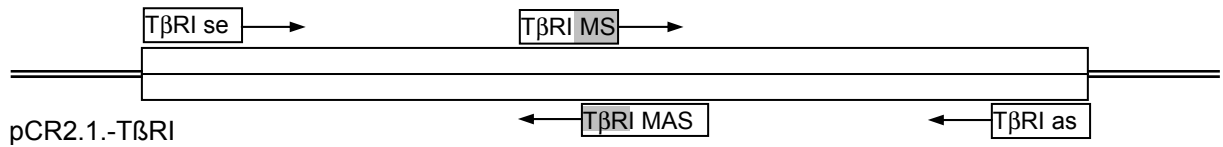
Die Reaktionsansätze entsprechen dem unter PCR 1 beschriebenen Mix, jedoch ohne Primer. Als Template wurden jeweils 10  $\mu$ l der aus dem Gel eluierten DNA-Fragmente eingesetzt. Für den T $\beta$ RI Standard waren dies die Fragmente T $\beta$ RI A und B und für den T $\beta$ RII Standard die Fragmente T $\beta$ RII A und B.

Es wurden 10 Zyklen nach dem unter PCR 1 beschriebenen Programm durchgeführt. Dann wurden die Primer zu den Ansätzen dazugegeben. Für den T $\beta$ RI Standard waren dies T $\beta$ RI se, T $\beta$ RI as und für den T $\beta$ RII Standard T $\beta$ RII se, T $\beta$ RII as. Die Größe der PCR-Produkte wurde in einem 2 %igen Agarose-Gel überprüft. Die PCR-Produkte wurden dann in den Vektor pCR2.1 ligiert.

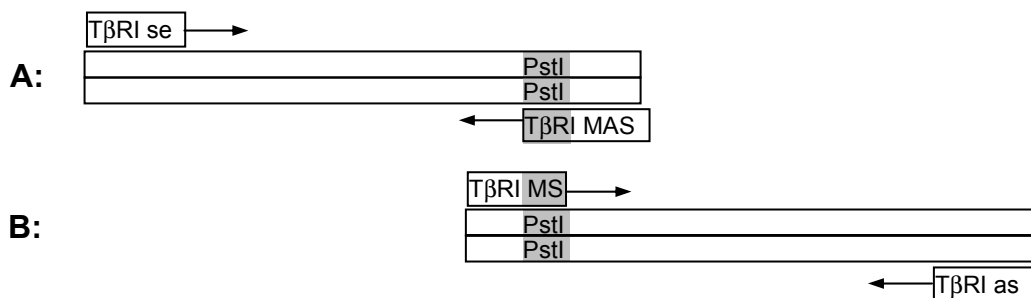
Wie unter 4.2.4.3 beschrieben wurden die ligierten PCR-Produkte in *E.coli* INV $\alpha$ F<sup>c</sup> Zellen transformiert. Weiße Kolonien wurden für Plasmid-Minipräparationen verwendet und die Inserts über einen Restriktionsverdau mit EcoRI überprüft. Von je einem Plasmid für T $\beta$ RI und T $\beta$ RII mit richtiger Insert-Größe wurde eine Maxi-Plasmidpräparation durchgeführt.

## METHODEN

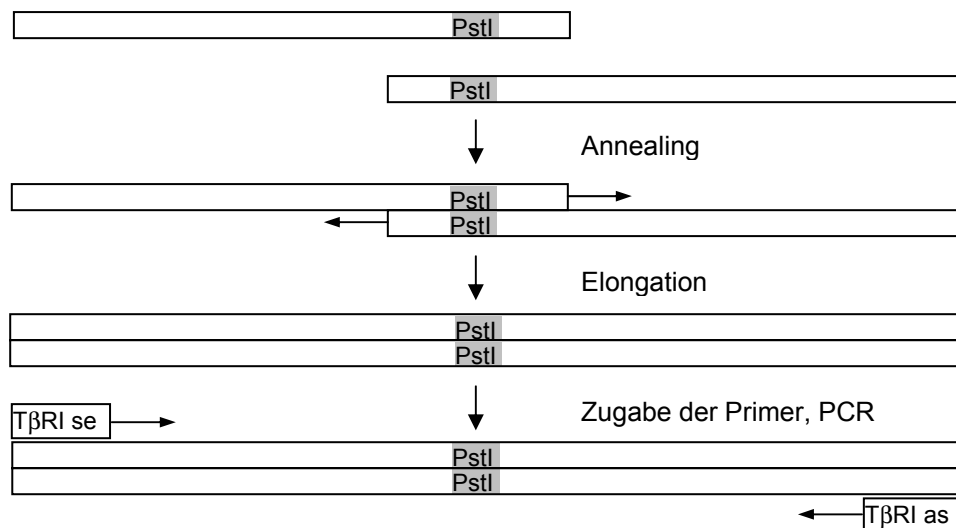
### Template und Primer:



### PCR 1:



### PCR 2:



**Abb. 4.1:** Einführung der Restriktionsschnittstellen in die Standards der kompetitiven RT-PCR am Beispiel des Standards von TβRI. Der genaue Ablauf ist in Kap. 4.2.4.8 erläutert.

#### 5.2.4.9 RNA-Transkription

Für RT-PCRs werden RNA-Standards benötigt. Die in pCR2.1 klonierten PCR-Produkte wurden daher schließlich noch mit dem *RNA Transcription Kit* von Stratagene in cRNA umgeschrieben.

Das jeweilige Plasmid wurde hierfür zunächst in einem Restriktionsverdau linearisiert. Der Verdau wurde in 20 µl 1 x React2 durchgeführt. 5 µg Plasmid-DNA wurden mit 20 U HindIII für 1½ Stunden bei 37°C inkubiert. 2 µl des Ansatzes wurden, um die Vollständigkeit des Verdau zu überprüfen, in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt. 16 µl des linearisierten Plasmids (4 µg) wurden für die RNA-Synthese eingesetzt. Diese wurde in 100 µl 1x Transkriptionspuffer durchgeführt. Der Ansatz enthielt neben der Plasmid-DNA je 0,4 mM rATP, rGTP, rCTP und rUTP, 30 mM DTT, 160 U RNase Inhibitor und 40 U T7 RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 40 U DNase I zu dem Ansatz gegeben und die Plasmid DNA für 45 min bei Raumtemperatur degradiert. Die cRNA wurde durch Aufreinigung über Qiagen RNeasy Spin-Säulen nach dem *Clean-up* Protokoll von Enzymen und Puffer getrennt und in 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

In einer anschließenden RT-PCR wurde die Amplifizierbarkeit der cRNA überprüft. Die RT-PCR wurde mit 1 ng der cRNA, wie oben beschrieben, durchgeführt. Um sicherzustellen, dass alle Reste von Plasmid-DNA aus dem Ansatz entfernt worden waren, wurde ein RT-Ansatz ohne Reverse-Transkriptase durchgeführt. Waren Amplifikationsprodukte in dem AMV negativen Ansatz sichtbar, wurde ein zweiter DNase Verdau durchgeführt.

Von der cRNA wurden 10µl Aliquots mit einer Konzentration von 5 pg/µl hergestellt und bei -80°C bis zur Verwendung in der LightCycler PCR gelagert. Für die Herstellung der Aliquots wurde Wasser mit 8 ng/µl MS2 RNA verwendet, um eine Adsorption der Standard-RNA an die Wände des Reaktionsgefäßes zu verhindern.

## METHODEN

### 5.2.5 Herstellung dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptorkonstrukte

#### 5.2.5.1 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurde *das SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von Gibco verwendet. In einem 10  $\mu$ l Ansatz wurden 5  $\mu$ g Gesamt-RNA (aus MDA-MB-263) mit 0,5 mM dNTPs und 0,5  $\mu$ g Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer zum Denaturieren der RNA für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis gekühlt. Zu diesem Ansatz wurden 9  $\mu$ l Reaktionsmix gegeben. Dieser bestand aus 1x RT-Puffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT und 40 U RNase Inhibitor. Der Ansatz wurde über 2 Minuten auf 42°C erwärmt und dann 50 Units *SuperScript II* Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die RT-Reaktion verlief über 50 Minuten bei 42°C und wurde durch Inkubation bei 72°C für 10 min beendet. Die RNA wurde durch eine Inkubation über 20 min bei 37°C mit 2 U *E. coli* RNase H aus dem Ansatz entfernt. Die cDNA wurde bei -20°C bis zur Verwendung in der PCR gelagert.

#### 5.2.5.2 PCR

Die Amplifikation der dominant negativen TGF $\beta$ -Rezeptor I cDNA wurde mit dem *Advantage-GC cDNA PCR Kit* (Clontech) durchgeführt. Der Reaktionsmix hatte ein Gesamt-Volumen von 50  $\mu$ l und setzte sich zusammen aus 2  $\mu$ l cDNA als Template, 10  $\mu$ l 5x GC PCR-Puffer, 10  $\mu$ l GC-Melt (5 M), je 1  $\mu$ l der Primer dKT $\beta$ RI EcoRI und dKT $\beta$ RI NotI (beide 10 mM), 1  $\mu$ l dNTP-Mix (je 10 mM) und 1  $\mu$ l des Advantage Polymerase-Mixes. Die PCR wurde im Thermo Cycler (MJ Research) nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 94°C, 5 min.

Amplifikation 35 Zyklen: 94°C, 30 s / 50°C, 1 min. / 68°C, 1 min.

Der Reaktionsmix für die Amplifikation der dominant negativen TGF $\beta$ -Rezeptor II cDNA setzte sich zusammen aus 2  $\mu$ l cDNA als Template, 5  $\mu$ l 10x PCR Puffer, je 1  $\mu$ l der Primer dKT $\beta$ RII EcoRI und dKT $\beta$ RII XhoI (beide 10 mM), 1  $\mu$ l dNTP-Mix (je 10 mM) und 2,5 U Taq DNA Polymerase in einem Endvolumen von 50  $\mu$ l. Die PCR wurde im Thermo Cycler (MJ Research) nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	94°C, 5 min.
Amplifikation 35 Zyklen:	94°C, 30 s / 50°C 30 s / 72°C 1 min.
Terminale Elongation:	72°C, 10 min.

In einem 1 %igen Agarose-Gel wurden je 5 µl der PCR-Ansätze aufgetrennt und die Größe des amplifizierten Produktes überprüft.

#### 5.2.5.3 Klonierung der PCR-Produkte, Transformation, Minipräparation

Die PCR-Produkte wurden wie unter 4.2.4.2 beschrieben mit dem *TA-Kloning Kit* von Invitrogen in den pCR2.1-Vektor ligiert und in *E.coli* INVαF<sup>c</sup> Zellen transformiert. Von jeweils 10 weißen Kolonien wurden Plasmid-Minipräparationen mit dem *QIAprep Miniprep Kit* durchgeführt.

#### 5.2.5.4 Sequenzierung

Die Sequenz der klonierten Rezeptor cDNAs wurde durch Sequenzierung mit dem *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* bestätigt. Die Sequenzierung wurde mit dem automatischen Sequenziergerät Li-Core 4000 von MWG durchgeführt.

Für die Sequenzierreaktion wurde zunächst ein Mix aus 14 µl Plasmid-DNA, 2 pmole Fluoreszenz-markierter Primer (M13 oder T7) und 1 µl DMSO hergestellt. Der Mix wurde mit H<sub>2</sub>O auf 26 µl aufgefüllt.

In einer 96-Well-PCR-Microtiterplatte wurde in separate Vertiefungen 2 µl des A-, C-, G- oder T-Reaktionsmixes vorgelegt und dann je 6 µl des Primer-Plasmid-Mixes hinzugefügt. Die Ansätze wurden mit einem Tropfen Rotwachs überschichtet.

Die Sequenzier-PCR wurde in dem Cycler PE 9600 nach folgendem Programm durchgeführt: 96°C, 2 min. / 25x (96°C, 5 s / 50°C, 5 s / 60°C, 4 min)

Nach Beendigung der PCR wurden 8 µl *Formamid Loading Dye* zu jedem Ansatz gegeben und dieser bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Auftrennung der Sequenzier-Produkte erfolgte in einem 0,2 mm dicken, 5 %igen Polyacrylamid-Gel, das gemäß dem Long Ranger-Protokoll von FMC hergestellt wurde. Die Gelkassette mit dem auspolymerisierten Gel wurde in der Sequenzgelkammer angebracht und ein 30 minutiger Vorlauf gestartet, um eine gleichmäßige Erwärmung des Gels auf 50°C zu erreichen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Nach dem

## METHODEN

Vorlauf wurden die Proben in die Geltaschen geladen und der Lauf gestartet. Die Laufzeit betrug 9 Stunden bei einer Spannung von 1.500 V und einer Stromstärke von 22 mA.

Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Bahnen mit Hilfe des Image IR-Programms von Licor ausgewertet und die Sequenz mit der in der *GenBank* hinterlegten Sequenz für die jeweilige mRNA verglichen.

Es wurden nur Plasmide weiterverwendet, deren Inserts mit den hinterlegten Sequenzen übereinstimmten.

### 5.2.5.5 Umklonierung der dominant-negativen Rezeptor cDNAs in pcDNA3-Flag dKTβRI

In einem Restriktionsverdau mit NotI und EcoRI wurde das Insert mit der dominant-negativen Rezeptor cDNA aus dem Plasmid pCR2.1-dKTβRI ausgeschnitten und der Expressionsvektor pcDNA3-Flag linearisiert.

Die Restriktionsansätze enthielten 16 µl der Miniplasmidpräparation von pCR2.1-dKTβRI oder 10 µg von pcDNA3-Flag in einem Endvolumen von 20 µl *2x One-Phor-All* Puffer. Der Verdau erfolgte über 1 ½ Stunden bei 37°C mit 20 U NotI und 10 U EcoRI. Die Ansätze wurden anschließend in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die Banden mit dem linearisierten pcDNA3-Flag und dem dKTβRI-Fragment wurden aus dem Gel ausgeschnitten, über das *QIAquick Gel Extraction Kit* Protokoll aufgereinigt und in 50 µl Puffer EB eluiert. 5 µl des Vektors pcDNA3-Flag und 15 µl der dKTβRI cDNA wurden mit *Ready-To-Go T4 DNA Ligase* über Nacht bei 16°C ligiert.

### dKTβRII

In einem Restriktionsverdau mit EcoRI und XhoI wurde das Insert mit der dominant-negativen Rezeptor cDNA aus dem Plasmid pCR2.1-dKTβRII ausgeschnitten und der Expressionsvektor pcDNA3-Flag linearisiert.

Die Restriktionsansätze enthielten 16 µl der Miniplasmidpräparation von pCR2.1-dKTβRII oder 10 µg von pcDNA3-Flag in einem Endvolumen von 20 µl *1x REact2*-Puffer. Der Verdau erfolgte über 1 ½ Stunden bei 37°C mit 14 U XhoI und 10 U EcoRI. Die Ansätze wurden anschließend in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Die Banden mit dem linearisierten pcDNA3-Flag und dKTβRII-Fragment wurden aus dem Gel ausgeschnitten, über das *QIAquick Gel Extraction Kit* Protokoll aufgereinigt und in 50 µl Puffer EB eluiert. 5 µl des Vektors pcDNA3-Flag und 15 µl der dKTβRII cDNA wurden mit *Ready-To-Go T4 DNA Ligase* über Nacht bei 16°C ligiert.

#### **5.2.5.6 Transformation, Plasmidpräparation**

Die Ligationsansätze wurden wie unter 4.2.4.3 beschrieben in *E.coli* INVαF<sup>+</sup> Zellen transformiert. Eine Mini-Plasmid-Präparation wurde von jeweils 10 Kolonien durchgeführt, und über einen Restriktionsverdau (dKTβRI: mit EcoRI und NotI, dKTβRII EcoRI und XhoI) die Größe des Inserts überprüft. In einer Maxi-Plasmid-Präparation wurde schließlich aus jeweils einem Klon mit passendem Insert der Vektor pcDNA-dKTβRI-Flag und der Vektor pcDNA3-dKTβRII-Flag isoliert.

## **5.3 Immunbiochemische Methoden**

### **5.3.1 Westernblot**

#### **5.3.1.1 Gesamtprotein-Isolierung**

Die Zellsuspension (siehe 4.1.3) wurde für 5 Minuten bei 1.000 upm und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl Zell-Lysis-Puffer aufgenommen. Dem Lysis-Puffer wurden unmittelbar vorher die Protease-Inhibitoren Aprotinin (1 µg/ml), Leupeptin (100 ng/ml), DTT (1 mM) und PMSF (100 µM) hinzugegeben. Das Lysat wurde für 30 min auf Eis inkubiert und für weitere 30 min bei 13.000 upm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

#### **5.3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte nach der kolorimetrischen Methode von Bradford (Bradford, 1976).

Zur Erstellung der Eichkurve wurde BSA in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 16 µg/ml in 20 %igem Bradford-Reagenz gelöst. Die zu bestimmende Proteinprobe wurde in einem dem BSA-Standard entsprechenden Volumen in Bradford-Reagenz aufgenommen. Nach 5 min Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer (Hewlett-Packard, Waldbronn) bestimmt.

#### **5.3.1.3 Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel**

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Durch die Anlagerung der anionischen SDS-Moleküle an die Proteine werden die unterschiedlichen Ladungen der Proteine ausgeglichen und die dreidimensionale Struktur der Proteine zerstört. Dadurch ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe (Laemmli, 1970; Weber and Osborn, 1969).

Verwendet wurden diskontinuierliche Flachbett-Gele mit Acrylamidkonzentrationen von 4 % im Sammelgel und 8 % (für große Proteine) bzw. 12 % (für kleine Proteine) im Trenngel. Die Gele waren wie folgt zusammengesetzt:

	Sammelgel	Trenngel	Trenngel
	4 %	8 %	12 %
30 %iges Acrylamid/BIS	2,0 ml	8,0 ml	12,0 ml
0,5 M Tris pH	3,8 ml	-	-
1,5 M Tris pH 8,8	-	7,5 ml	7,5 ml
10 % SDS	150 µl	300 µl	300 µl
H <sub>2</sub> O	9,2 ml	13,9 ml	9,9 ml
TEMED	15 µl	18 µl	12 µl
10 % Ammoniumpersulfat	150 µl	300 µl	300 µl

Die Zugabe von Ammoniumpersulfat ermöglicht die Polymerisation des Acrylamids. In Wasser gelöstes Ammoniumpersulfat bildet freie Radikale, die auf das Acrylamid übertragen werden. Das "aktivierte" Acrylamid reagiert dann in gleicher Weise mit anderen Acrylamidmolekülen unter Bildung einer langen Polymerkette. Die Quervernetzung der Ketten wird durch N',N'-Methylen-bis-Acrylamid gewährleistet. TEMED katalysiert die Polymerisationsreaktion.

Die Trenngellösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Das auspolymerisierte Trenngel war 160 mm hoch, 160 mm breit und 1,5 mm stark. Nach Abgießen des Wassers wurde das Sammelgel gegossen, in das mit Hilfe eines Kunststoffkammes 20-25 Probestaschen mit einem Fassungsvermögen von 50-70 µl eingelassen wurden. Für die Auftrennung der gesamten Extrakte wurden die Proteinproben mit reduzierendem 2 x Lämmli-Puffer im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min bei 95°C vollständig denaturiert.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden die Pufferreservoirs der Vertikalelektrophoresekammer mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden die Proteinproben in die Probestaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 130 Volt für 1 ½ h und 35 V für die restliche Zeit.

#### 5.3.1.4 Westernblot

Der Transfer der Proteine aus der Gelmatrix auf die PVDF-Membran beruht auf der Wanderung geladener Proteine im elektrischen Feld und wurde mit einer *Fast-Blot* Transferkammer durchgeführt.

Zwischen die Plattenelektroden der Kammer wurde ein *Sandwich* aus 2 Lagen Gel-Blotting-Papier, dem Gel, der PVDF-Membran und wieder 2 Lagen Blotting-Papier

## METHODEN

gebracht. Das *Sandwich* wurde mit Transferpuffer durchfeuchtet. Der Übertragung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 18 V für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

### 5.3.1.5 Beladungskontrolle

Als Beladungskontrolle wurde nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Der Filter wurde für 5 min in Färbelösung (0,1 % v/v Ponceau S in 1 %iger Essigsäure) inkubiert und dann kurz in H<sub>2</sub>O entfärbt. Die immobilisierten Proteine wurden dabei rot angefärbt. Unterschiedliche Proteinmengen spiegeln sich in verschiedenen Farbintensitäten wider.

### 5.3.1.6 Westernblot-Analyse

Die Methode beruht auf der spezifischen Detektion des auf der Membran immobilisierten Proteins durch den dagegen gerichteten Primärantikörper, der wiederum von einem Meerrettich-Peroxidase- (POD) gekoppelten Sekundärantikörper gebunden wird. In Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert die Peroxidase die Oxidation eines Diacylhydrazid-ähnlichen Luminols, wodurch ein aktiviertes Zwischenprodukt gebildet wird, das unter Emmission von Licht in seinen Grundzustand zurückkehrt (Thorpe et al., 1985). Eine Verstärkung der Lichtemission wird durch 4-Iodophenol erreicht, das als Radikaltransmitter zwischen den gebildeten Sauerstoffradikalen und dem Luminol fungiert. Für die Westernblot-Analyse wurde das *ECL-Plus-Western Blotting Kit* verwendet.

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde der Filter zunächst einmal mit TBST für 15 min auf einem Schüttler gewaschen, um Methanol-Reste von der Membran zu entfernen. Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden durch 60ig minütige Inkubation des Filters in 1 %iger Blockinglösung abgesättigt. Die Lösung wurde anschließend durch frische 0,5 %ige Blockinglösung ersetzt, die den primären Antikörper in der unter 3.6 aufgeführten Konzentration enthielt. Die Bindung des Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Dazu wurde der Filter mit ca. 5 ml Primärantikörper-Lösung luftblasenfrei in Schlauchfolie eingeschweißt und im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filter nach zwei 10minütigen Waschschritten mit TBST für 1 Stunde in 0,5 %igem Blockingreagenz geblockt und im Anschluss daran für 30 min mit dem POD-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Vor der Detektion wurde der Filter noch viermal für jeweils 15 min mit TBST

gewaschen. Die Chemilumineszenz-Detektion fand in einer Dunkelkammer statt. Die Membran wurde für 5 min in *ECL-Plus*-Detektionslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen und ein aufgelegter Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) in einer Autoradiographiekassette für 2 Sekunden bis 30 Minuten belichtet und danach entwickelt.

Sollten mit demselben Filter weitere Westernblot-Analysen mit anderen primären Antikörpern durchgeführt werden, wurde die Membran nach dem ersten Westernblot von gebundenen Primär- und Sekundärantikörpern vollständig befreit. Dies erfolgte durch Inkubation der Membran in Stripping-Lösung bei 52 °C für 30 min. Die Membran wurde anschließend viermal für 15 Minuten mit TBST gewaschen, für eine Stunde in 1 %iger Blockinglösung geblockt und dann wie oben beschrieben mit neuen Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert.

Die für die Westernblot-Analysen verwendeten primären und sekundären Antikörper sind unter 3.6 aufgeführt.

### **5.4 Statistik**

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Werte Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardfehler. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Für Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde ein t-Test durchgeführt. Zur Darstellung eines Zusammenhangs zwischen zwei Meßgrößen wurde eine lineare Regression berechnet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Etablierung quantitativer RT-PCRs

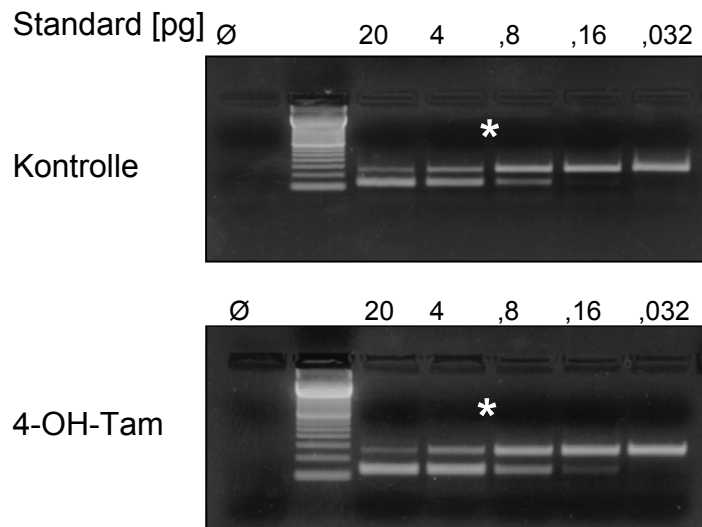
Ein Schwerpunkt des ersten Teils der Arbeit war die Etablierung von RT-PCRs, mit denen quantitativ die Änderung der Expression verschiedener Gene des TGF $\beta$ -Systems unter Einfluss von Antiöstrogenen bestimmt werden konnte.

#### 6.1.1 Kompetitive RT-PCR

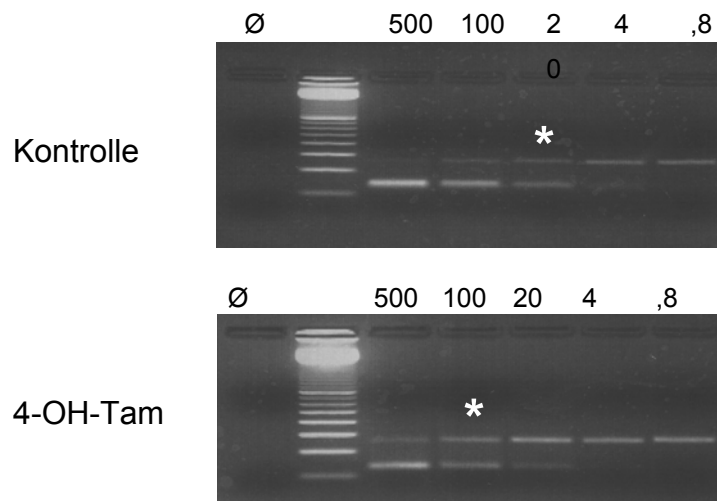
Zunächst wurden kompetitive RT-PCRs für T $\beta$ RI und T $\beta$ RII etabliert und der Einfluss von 4-Hydroxytamoxifen auf die Expression der Rezeptoren untersucht.

Abb. 5.1 zeigt das Gel einer repräsentativen kompetitiven RT-PCR für T $\beta$ RI. MCF-7 Zellen waren für diesen Versuch über fünf Tage mit  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen behandelt worden. Für die RT-PCR wurden 200 ng Gesamt-RNA zusammen mit unterschiedlichen Verdünnungen spezifischer T $\beta$ RI Standard-RNA (20 pg bis 32 fg) amplifiziert. Sowohl für die unbehandelte Kontroll-RNA als auch für die RNA aus behandelten Zellen ergab sich nach Amplifikation und Auftrennung im Gel das gleiche Bandenmuster. Die Expression der mRNA von T $\beta$ RI hatte sich durch die Behandlung nicht verändert.

Für die Bestimmung der Expression von T $\beta$ RII wurden 200 ng der behandelten Gesamt-RNA mit spezifischer T $\beta$ RII Standard-RNA (500 pg bis 800 fg) amplifiziert und im Gel aufgetrennt. Die Bandenmuster sind in Abb. 5.2 dargestellt. Gleiche Bandenintensitäten ergaben sich im Kontrollansatz bei 20 pg Standard und im behandelten Ansatz bei 100 pg Standard. Die mRNA von T $\beta$ RII wurde durch die Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen 5fach induziert.



**Abb. 5.1:** Kompetitive RT-PCR für TβRI: MCF-7 Zellen wurden über 5 Tage mit  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen (4-OH-Tam) oder 0,1 % Ethanol (Kontrolle) behandelt. 200 ng Gesamt-RNA aus den Zellen wurde mit verschiedenen Verdünnungen des TβRI-Standards amplifiziert. Nach Verdau mit PstI wurden je 10 µl PCR-Produkt in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die größere Bande bei 254 bp stammt von der Wildtyp TβRI mRNA, die kleinere Bande bei 127 bp von der verdauten Standard-RNA. Mit \* ist die Standard-Konzentration gekennzeichnet, bei der die Banden von TβRI mRNA und Standard gleich stark sind.



**Abb. 5.2:** Kompetitive RT-PCR für TβRII: MCF-7 Zellen wurden über 5 Tage mit  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen (4-OH-Tam) oder 0,1 % Ethanol (Kontrolle) behandelt. 200 ng Gesamt-RNA aus den Zellen wurde mit verschiedenen Verdünnungen des TβRII-Standards amplifiziert. Nach Verdau mit PstI wurden je 10 µl PCR-Produkt in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die größere Bande bei 260 bp stammt von der Wildtyp TβRII mRNA, die kleinere Bande bei 130 bp von der verdauten Standard-RNA. Mit \* ist die Standard-Konzentration gekennzeichnet, bei der die Banden von TβRII mRNA und Standard gleich stark sind.

### 6.1.2 Quantitative LightCycler RT-PCR

Mit Entwicklung der optischen PCR-Systeme, wie z.B. LightCycler und TaqMan, ist seit neuestem eine sehr schnelle und genaue Quantifizierung spezifischer Templates möglich. Da im Verlauf dieser Arbeit ein LightCycler-Gerät angeschafft wurde, erfolgte eine Umstellung der Expressionsanalysen auf dieses System.

Es wurden quantitative RT-PCRs für folgende Komponenten des TGF $\beta$ -Signaltransduktionssystems etabliert:

- für die Liganden TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2
- für die Rezeptoren T $\beta$ RI und T $\beta$ RII
- für das inhibitorische Smad7

Zur Kontrolle der Spezifität der untersuchten Effekte und der Integrität der eingesetzten Gesamt-RNA wurden zusätzlich zwei Kontroll-PCRs etabliert:

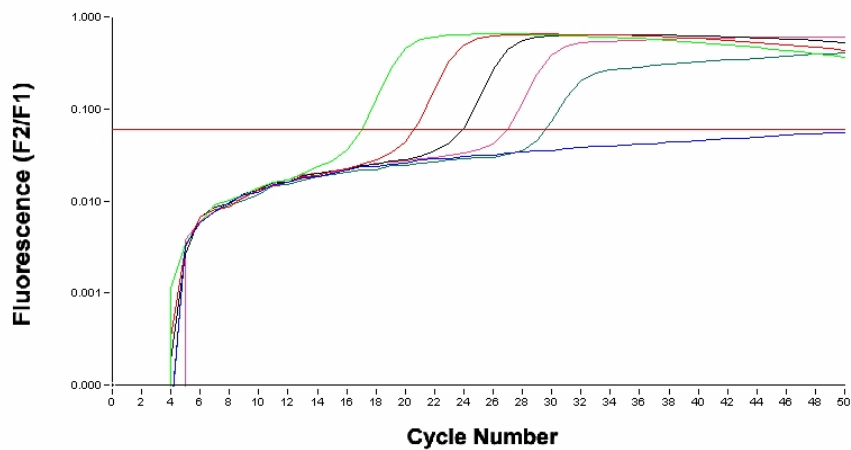
- für GAPDH
- und für den Transferrin Rezeptor.

Bei den optischen PCR-Systemen wird zur Quantifizierung die Zykluszahl herangezogen, bei der die Amplifikation des PCR-Produktes sich am Beginn der exponentiellen Amplifikations-Phase befindet und das Fluoreszenzsignal des Produktes sich gerade deutlich vom Hintergrund abhebt ( $C_T$ -Wert). Neben den Proben werden unterschiedliche Verdünnungen eines spezifischen Standards parallel amplifiziert. Aus den  $C_T$ -Werten der Standards wird eine Standardkurve berechnet. Mit Hilfe dieser Standardkurve und den  $C_T$ -Werten der Proben können schließlich die in den Proben ursprünglich vorhandenen Template-Mengen ermittelt werden.

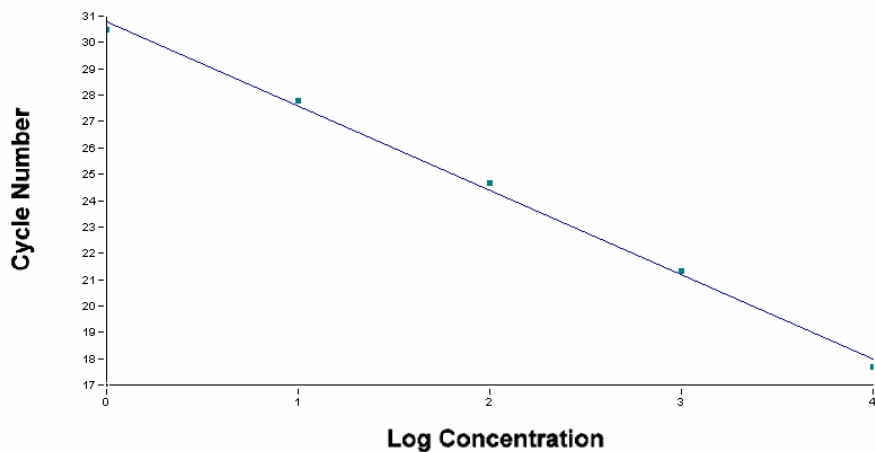
Zur Veranschaulichung des Prinzips ist nachfolgend die LightCycler RT-PCR für T $\beta$ RII ausführlicher beschrieben: Abb. 5.3 zeigt die Amplifikation der T $\beta$ RII-Standards. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenz aufgetragen, auf der X-Achse die Anzahl der Zyklen. Die Standards wurden in 1:10 Schritten verdünnt und im Bereich von 10 pg bis 1 fg eingesetzt. Für jeden Standard wurde der Zyklus bestimmt, bei dem die Amplifikation in die exponentielle Phase eintrat ( $C_T$ -Wert). Aus den  $C_T$ -Werten wurde dann eine Standardkurve ermittelt (Abb. 5.4). Aus dieser ist ersichtlich, dass die Amplifikation der Standards über einen Bereich von 5 Zehnerpotenzen linear verlief. Mit Hilfe der

Standardkurve ist es möglich die Templatemenge in parallel amplifizierten, unbekanntenen Proben über die Bestimmung des  $C_T$ -Wertes der Probe zu errechnen.

Die hier gezeigte quantitative T $\beta$ R $\text{II}$  LightCycler RT-PCR ist repräsentativ für alle in dieser Arbeit etablierten LightCycler RT-PCRs.



**Abb. 5.3:** T $\beta$ R $\text{II}$  LightCycler RT-PCR, Amplifikation einer Verdünnungsreihe des T $\beta$ R $\text{II}$  Standards. Dargestellt ist die Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zyklenzahl. Die Standard-RNA wurden in 10er Schritten verdünnt und von 10 pg bis 1 fg eingesetzt. Die PCR-Bedingungen sind unter 4.3.2 beschrieben.



**Abb. 5.4:** Standardkurve der LightCycler PCR für T $\beta$ R $\text{II}$ , ermittelt aus den  $C_T$ -Werten (Zyklus bei dem die PCR in die exponentielle Phase eintritt) der in Abb. 5.3 dargestellten PCR. Die  $C_T$ -Werte sind gegen den Logarithmus der jeweiligen Standardkonzentration aufgetragen.

## **6.2 Untersuchungen zur antihormonellen Regulation des TGF $\beta$ -Systems**

### **6.2.1 Zeitlicher Verlauf der Induktion**

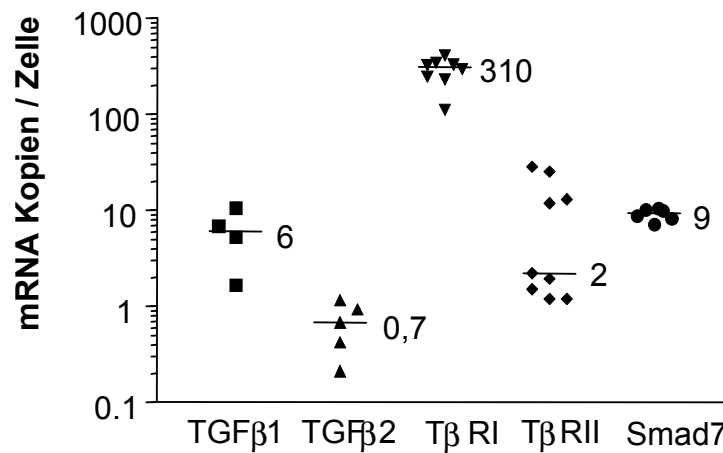
Die LightCycler PCRs wurden eingesetzt um den zeitlichen Verlauf der Induktion des TGF $\beta$ -Signaltransduktionssystems durch Antiöstrogene nachzuvollziehen. Neben den Liganden wurden weitere Komponenten des TGF $\beta$ -Systems untersucht, bei denen eine Regulation auf mRNA-Ebene durch Antiöstrogene möglich erschien. Hierbei handelte es sich um die TGF $\beta$ -Rezeptoren Typ I und II und das inhibitorisch auf den TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweg wirkende Smad7.

In jedem der Experimente wurde vor Extraktion der RNA zunächst eine Bestimmung der Zellzahl durchgeführt, um die inhibitorische Wirkung der Antöstrogene zu überprüfen und um einen Zusammenhang zwischen Wachstumsinhibition und mRNA-Induktion sicherzustellen.

#### **6.2.1.1 Basale Expression**

Da für jede der quantitativen LightCycler PCRs ein spezifischer Standard verwendet wurde, war es möglich, über die Berechnung der Kopienzahl pro Zelle einen Überblick über das basale Expressionsniveau der untersuchten mRNAs zu erhalten.

Abgesehen von T $\beta$ RI mit ca. 310 Kopien pro Zelle, waren alle mRNAs sehr niedrig exprimiert. TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII lagen mit nur 0,7 Kopien bzw. 2 Kopien pro Zelle am niedrigsten. TGF $\beta$ 1 und Smad7 waren etwas höher exprimiert mit 6 bzw. 9 Kopien pro Zelle (Abb. 5.5).



**Abb. 5.5:** Basales Expressionsniveau der mRNAs von TGFβ1, TGFβ2, TβRI, TβRII und Smad7. Zur Charakterisierung der Daten wurde der Median angegeben.

#### 6.2.1.2 4-Hydroxytamoxifen

Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit dem Antiöstrogen 4-Hydroxytamoxifen führte zu einer leichten Inhibition der Zellproliferation. Drei Tage nach Behandlung waren erste Unterschiede in den Zellzahlen behandelter und unbehandelter Zellen sichtbar. Der stärkste Hemmeffekt wurde nach fünf Tagen beobachtet (~ 60% der Kontrollzellzahl), nahm jedoch im weiteren Zeitverlauf leicht wieder ab (Abb. 5.6 A).

Die mRNAs von TGFβ1, TGFβ2, TβRI, TβRII und Smad7 wurde mit Hilfe der quantitativen LightCycler PCR gemessen. Die mRNA von TGFβ2 wurde durch 4-Hydroxytamoxifen stark induziert. Nach 72 h war die mRNA in den behandelten Zellen bereits vier Mal häufiger als in den Kontrollzellen. Die stärkste Aktivierung (~12fach) wurde nach fünftägiger Behandlung gemessen. Im Verlauf der nächsten 48 Stunden fiel dieser Wert jedoch um ungefähr die Hälfte wieder ab aufgrund eines Anstiegs der TGFβ2 mRNA in den Kontrollzellen.

Die Expression der mRNA von TGFβ1 wurde im Gegensatz zur mRNA von TGFβ2 durch 4-Hydroxytamoxifen nicht beeinflusst und blieb über den gesamten beobachteten Zeitraum auf dem Niveau der Kontrollzellen (Abb. 5.6 B).

Die mRNA von TβRII wurde durch 4-Hydroxytamoxifen leicht induziert. Die Induktion erfolgte kontinuierlich und erreichte nach siebentägigen Behandlungsdauer ein ca. zweifach höheres Niveau als in den Kontrollzellen.

## *ERGEBNISSE*

Die Expression der mRNAs von T $\beta$ RI und Smad7 wurde durch 4-Hydroxytamoxifen nicht verändert (Abb. 5.6 C und D).

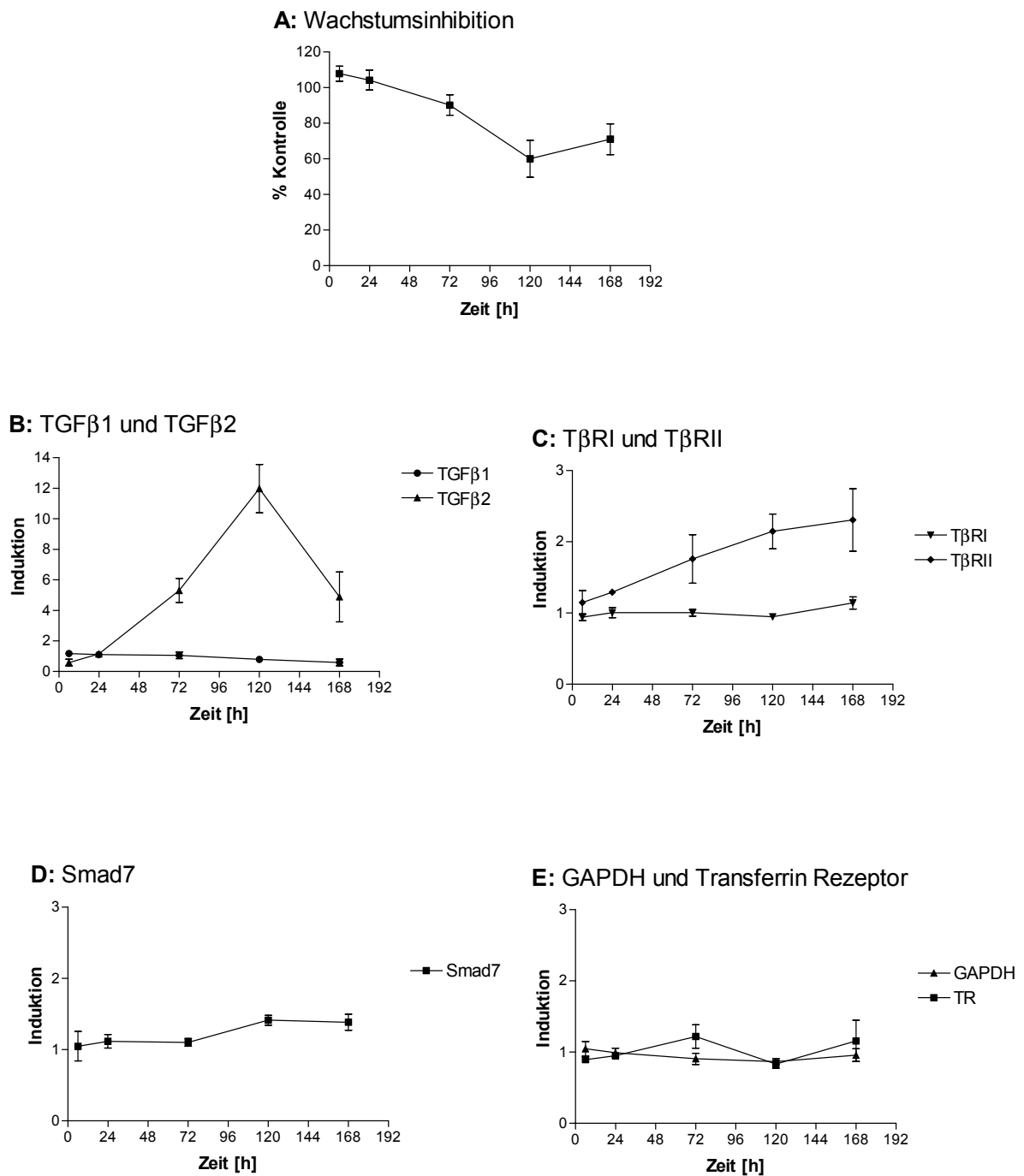
Zur Kontrolle der Spezifität der beobachteten Effekte wurden zusätzlich die mRNAs von Transferrin Rezeptor und GAPDH bestimmt. Die mRNAs beider Gene bleiben über den beobachteten Behandlungszeitraum unverändert (Abb. 5.6 E).

### **6.2.1.3 ICI 182.780**

Das steroidale Antiöstrogen ICI 182.780 inhibiert die Proliferation der MCF-7 Zellen deutlich stärker als das nicht-steroidale, partielle Antiöstrogen 4-Hydroxytamoxifen. Bereits nach dreitägiger Behandlung erreichte das Wachstum der behandelten Zellen nur noch 60% des Wertes der Kontrollzellen. Fünf Tage nach Behandlungsbeginn war die stärkste Hemmwirkung (20% der Kontrollzellen) erreicht, welche bis zum letzten beobachteten Zeitpunkt nach sieben Tagen erhalten blieb (Abb. 5.7 A).

Die stark wachstumshemmende Wirkung von ICI 182.780 spiegelte sich in einer sehr starken Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII wider. Bereits drei Tage nach der Behandlung war die mRNA von TGF $\beta$ 2 fast 10fach höher als in den Kontrollzellen. In den folgenden zwei Tagen kam es zu einem fast exponentiellen Anstieg der Expression, mit einer ca. 60fachen Induktion nach fünf Behandlungstagen. Dieser Wert blieb jedoch nicht erhalten sondern fiel im Verlauf der nächsten zwei Tagen um fast die Hälfte wieder ab (Abb. 5.7 B). Die Abnahme der Expression ist auf einen Anstiegs der TGF $\beta$ 2 mRNA in den Kontrollzellen zurückzuführen. T $\beta$ RII wurde kontinuierlich induziert und war nach siebentägiger Behandlungsdauer sechsfach höher als in den Kontrollzellen (Abb. 5.7 C). TGF $\beta$ 1 und T $\beta$ RI mRNA wurden durch ICI 182.780 nicht beeinflusst (Abb. 5.7 B und C). Die Expression von Smad7 stieg leicht an, wurde aber nie mehr als zweifach induziert (Abb. 5.7 D).

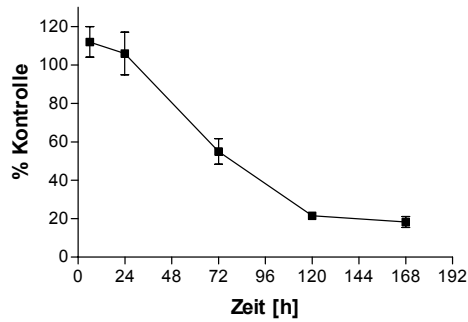
Die mRNA-Expression der Kontrollgene Transferrin Rezeptor und GAPDH wurde durch ICI 182.780 ebenfalls beeinflusst. Beide mRNAs wurden während der ersten drei Behandlungstage leicht inhibiert (Abb. 5.7 E).



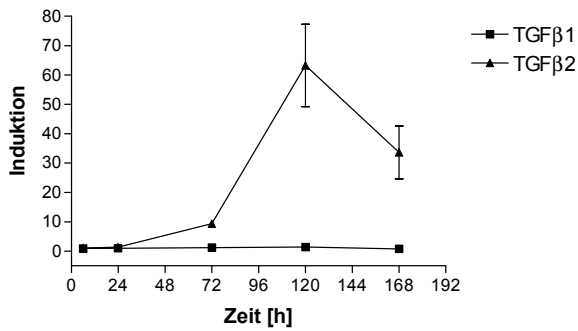
**Abb. 5.6:** Einfluss des Antiöstrogens 4-Hydroxytamoxifen ( $10^{-7}$  M) auf Proliferation und mRNA-Expression von MCF-7 Zellen über einen Behandlungszeitraum von sieben Tagen. A: Inhibition der Proliferation B: Expression der mRNAs von TGFβ1 und TGFβ2 C: Expression der mRNAs von TβRI und TβRII D: Expression der mRNA von Smad7 E: Expression der mRNAs von Transferrin Rezeptor und GAPDH. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar.

# ERGEBNISSE

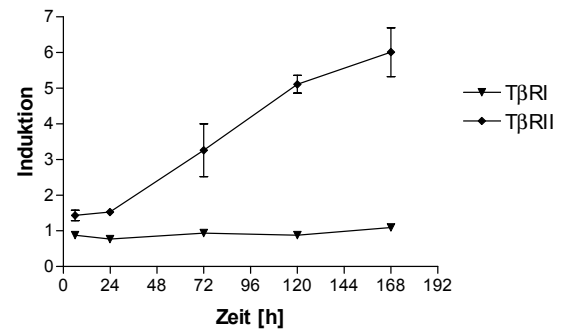
**A: Wachstumsinhibition**



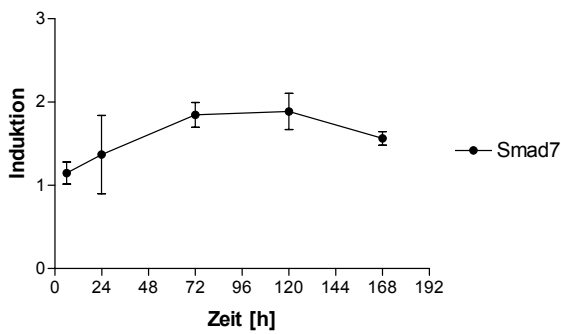
**B: TGFβ1 und TGFβ2**



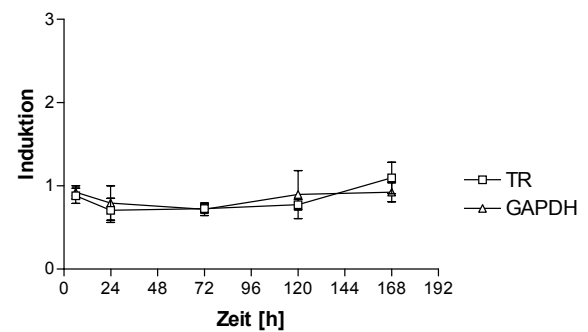
**C: TβRI und TβRII**



**D: Smad7**



**E: GAPDH und Transferrin Rezeptor**



**Abb. 5.7:** Einfluss des Antiöstrogens ICI 182.780 ( $10^{-9}$  M) auf Proliferation und mRNA-Expression von MCF-7 Zellen über einen Behandlungszeitraum von sieben Tagen. A: Inhibition der Proliferation, B: Expression der mRNAs von TGFβ1 und TGFβ2, C: Expression der mRNAs von TβRI und TβRII, D: Expression der mRNA von Smad7, E: Expression der mRNAs von Transferrin Rezeptor und GAPDH. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar.

## 6.2.2 Dosisabhängigkeit der Induktion

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der eingesetzten Antiöstrogenkonzentration und der Induktion von TGFβ2 und TGFβRII. Da die Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Induktion gezeigt haben, dass eine Behandlung über fünf Tage die deutlichsten Unterschieden zwischen behandelten und unbehandelten Zellen bewirkt, wurde dieser Zeitraum ausgewählt.

Die Antiöstrogene wurden im Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  M bis  $10^{-10}$  M eingesetzt.

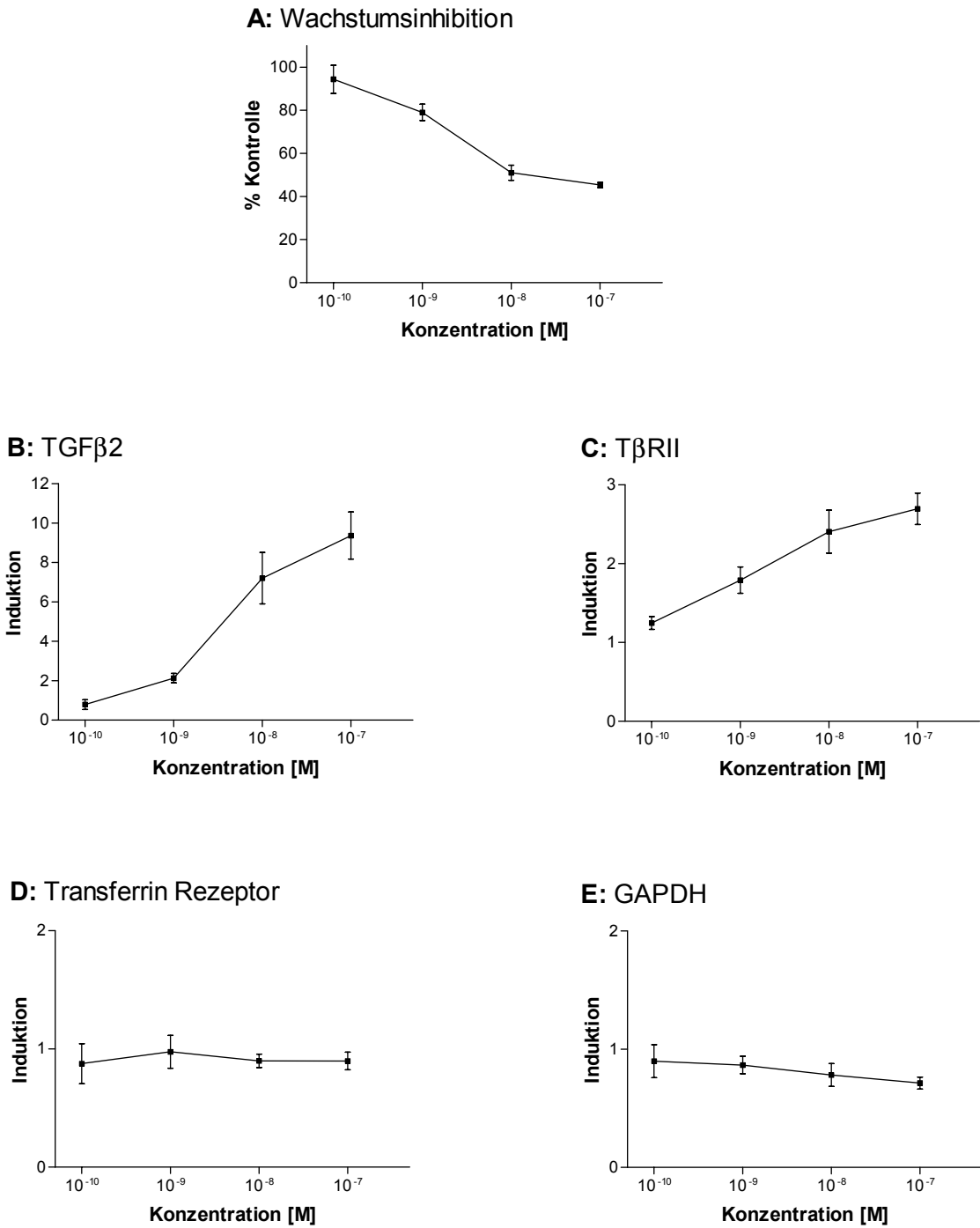
### 6.2.2.1 4-Hydroxytamoxifen

Mit steigender Konzentration nahm die wachstumsinhibitorische Wirkung von 4-Hydroxytamoxifen zu. Der stärkste Hemmeffekt (ca. 50 %) wurde mit der höchsten untersuchten Konzentration ( $10^{-7}$  M) erreicht (Abb. 5.8 A).

Auch die Stärke der Induktion von TGFβ2 und TβRII war abhängig von der 4-Hydroxytamoxifen Konzentration. Die niedrigste Konzentration ( $10^{-10}$  M) war ohne Wirkung. Im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-7}$  M erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg der Expression. TGFβ2 wurde durch  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen fast 10fach induziert, TβRII 2,5fach (Abb. 5.8 B und C).

Die mRNAs der Kontrollgene zeigen keine (TR) oder nur sehr geringe (GAPDH) Änderungen über den untersuchten Konzentrationsbereich (Abb. 5.8 D und E).

## ERGEBNISSE



**Abb. 5.8:** Dosis-Abhängigkeit der Wachstumsinhibition (A) von MCF-7 Zellen und der Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII mRNA nach fünftägiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von 4-Hydroxytamoxifen. Dargestellt ist die Aktivierung der mRNAs von B: TGF $\beta$ 2, C: T $\beta$ RII, D: Transferrin Rezeptor und E: GAPDH. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar.

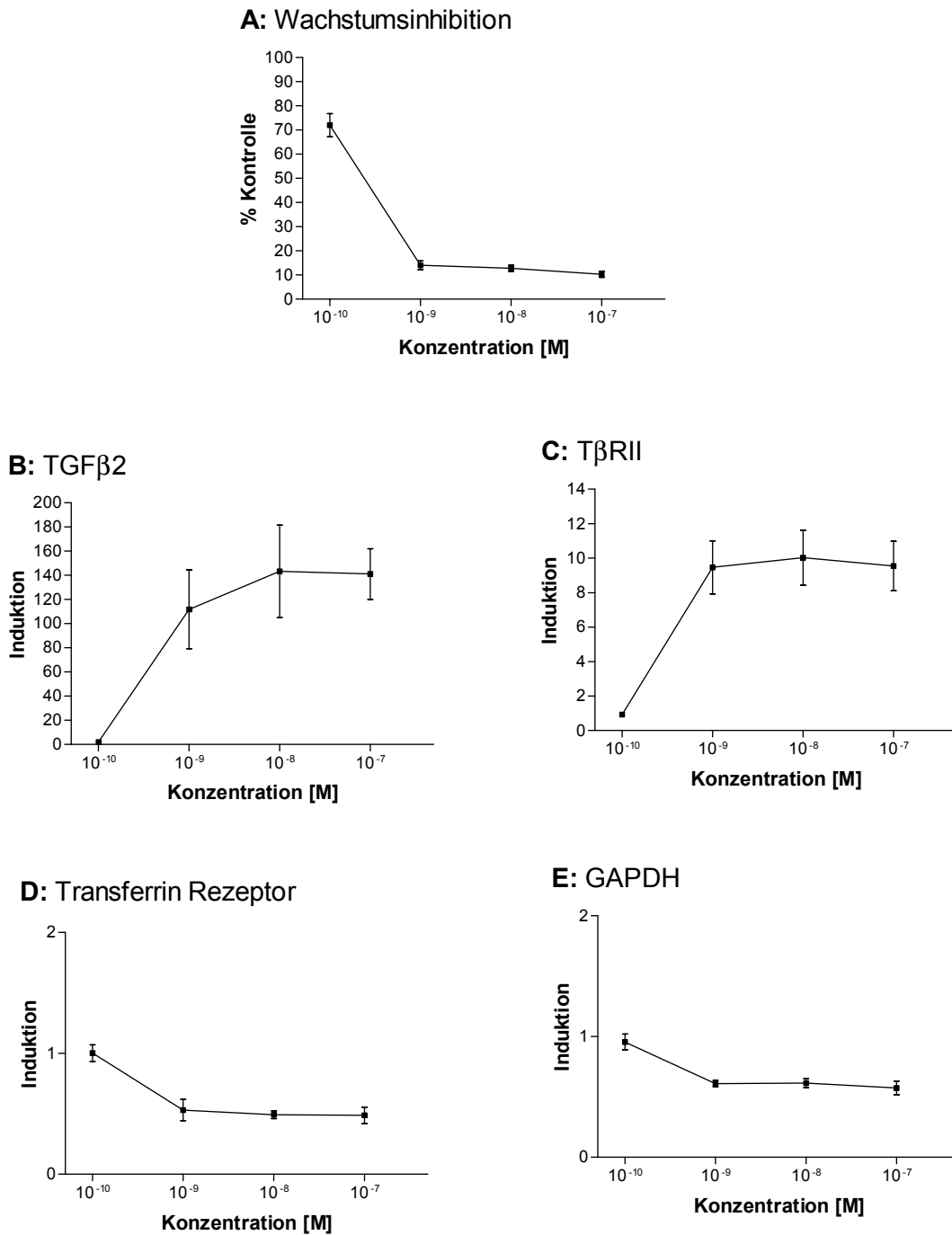
#### **6.2.2.2 ICI 182.780**

Im Gegensatz zu 4-Hydroxytamoxifen wirkte ICI 182.780 schon in der niedrigsten untersuchten Konzentration von  $10^{-10}$  M wachstumshemmend (30 % Hemmung). Die vollständige Wirkung war bei  $10^{-9}$  M ICI 182.780 (85 % Hemmung) erreicht (Abb. 5.9 A).

Der Verlauf der Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII spiegelte die wachstumshemmende Wirkung wider: Die niedrigste ICI 182.780 Konzentration ( $10^{-10}$  M) bewirkte nur eine schwache Induktion von TGF $\beta$ 2 (2fach) und hatte keinen Effekt auf die Expression von T $\beta$ RII.  $10^{-9}$  M ICI 182.780 bewirkte eine sehr starke Induktion beider mRNAs (TGF $\beta$ 2 112fach, T $\beta$ RII 10fach). Für T $\beta$ RII war mit diesem Wert die stärkste Induktion erreicht, TGF $\beta$ 2 wurde durch  $10^{-8}$  M ICI 182.780 noch etwas stärker induziert (143fach) (Abb. 5.9 B und C).

Auf die Kontrollgene Transferrin Rezeptor und GAPDH hatte ICI 182.780 im Bereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-9}$  M eine relativ starke inhibitorische Wirkung, die mRNA Expression war um ca. die Hälfte reduziert. Behandlung mit  $10^{-10}$  M hatte keine Wirkung (Abb. 5.9 D und E).

# ERGEBNISSE



**Abb. 5.9:** Dosis-Abhängigkeit der Wachstumsinhibition (A) von MCF-7 Zellen und der Induktion von TGFβ2 und TβRII mRNA nach fünftägiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von ICI 182.780. Dargestellt ist die Aktivierung der mRNAs von B: TGFβ2, C: TβRII, D: Transferrin Rezeptor und E: GAPDH. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar.

### 6.2.3 Induktion durch Tamoxifen-Metabolite

Tamoxifen wird umfangreich durch Cytochrom P-450 Enzyme metabolisiert. Neben den Hauptmetaboliten N-Desmethyldtamoxifen und Tamoxifen-N-oxid werden unter anderem noch N-Didesmethyldtamoxifen, 4-Hydroxytamoxifen und  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen gebildet (Milano et al., 1987; Poon et al., 1995). Alle Metabolite können potenziell an der antiöstrogenen Wirkung beteiligt sein. 4-Hydroxytamoxifen induziert TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII und wirkt inhibierend auf das Zellwachstum. Über die weiteren Metabolite liegen bislang keine Daten bezüglich ihrer Auswirkungen auf das TGF $\beta$ -System und nur vereinzelt Daten über ihre wachstumsinhibitorische Wirkung vor. MCF-7 Zellen wurden daher über fünf Tage mit einer  $10^{-7}$  M Konzentration der verschiedenen Metabolite behandelt und die wachstumsinhibitorische Wirkung sowie die Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII untersucht.

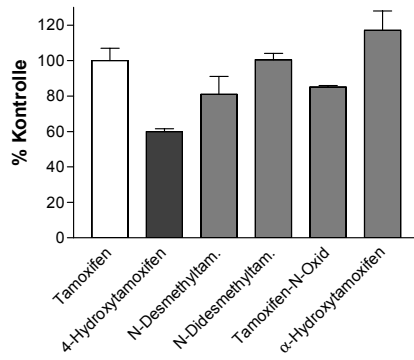
Die stärkste Wachstumsinhibition bewirkte 4-Hydroxytamoxifen. Eine leichte inhibitorische Wirkung zeigte auch die Hauptmetabolite N-Desmethyldtamoxifen und Tamoxifen-N-Oxid. Keinen Einfluss auf die Proliferation hatten Tamoxifen und N-Didesmethyldtamoxifen.  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen bewirkte eine leichte Stimulation der Proliferation (Abb. 5.10 A).

Die stärkste Induktion von TGF $\beta$ 2 wurde durch 4-Hydroxytamoxifen hervorgerufen. Nach Behandlung mit N-Desmethyldtamoxifen, Tamoxifen-N-Oxid und Tamoxifen konnte eine leichte Induktion von TGF $\beta$ 2 beobachtet werden, N-Didesmethyldtamoxifen und  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen zeigten keine Wirkung. Für die Induktion der mRNA von T $\beta$ RII ergab sich ein vergleichbares Bild (Abb. 5.10 C).

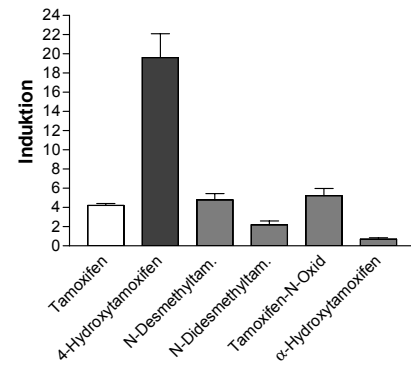
Zusammengefasst zeigen die Daten, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Induktion von TGF $\beta$ 2 bzw. T $\beta$ RII und der Wirkung der Tamoxifen-Metabolite auf das Zellwachstum besteht. Die wachstumsinhibitorische Wirkung korreliert mit der Stärke der Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII (Abb. 5.11).

## ERGEBNISSE

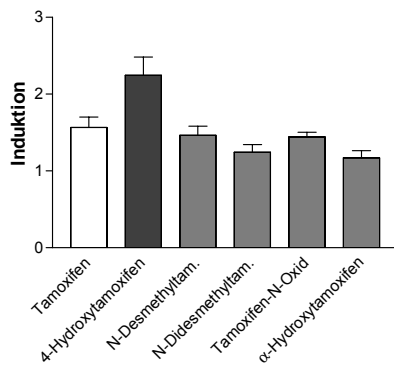
**A: Wachstumsinhibition**



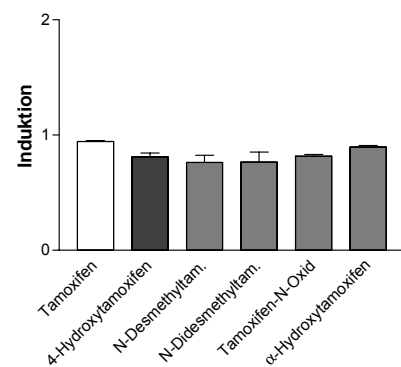
**B: TGFβ2**



**C: TβRII**

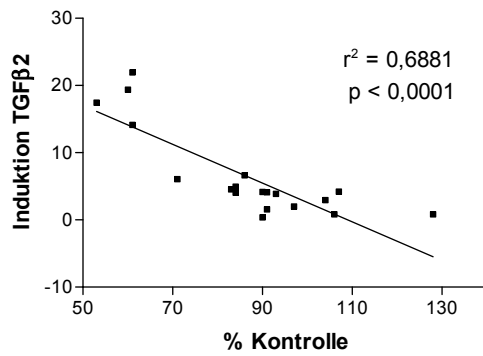


**D: GAPDH**

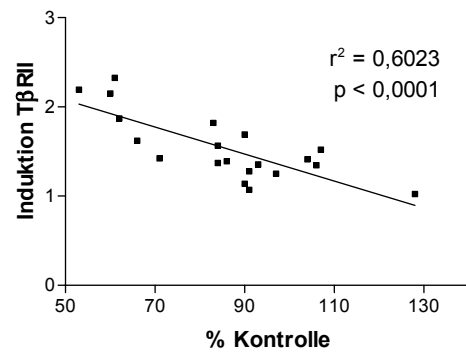


**Abb. 5.10:** Einfluss unterschiedlicher Tamoxifen-Metabolite auf das Wachstumsverhalten (A) und die Induktion von TGFβ2 (B) und TβRII (C) mRNA in MCF-7 Zellen nach fünftägiger Behandlung. Zur Kontrolle wurde die mRNA von GAPDH (D) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

**A: TGFβ2**



**B: TβRII**



**Abb. 5.11:** Induktion von TGFβ2 (A) bzw. TβRII (B) in Abhängigkeit von der Wachstumsinhibition. Zusammenfassung der in Abb. 5.10 A und B bzw. A und C dargestellten Ergebnisse zur Wirkung der Tamoxifen-Metabolite.

### **6.3 Untersuchung zur Beteiligung des TGF $\beta$ -Systems an der antihormonellen Wirkung**

Die im vorangegangenen Kapitel 5.2 beschriebenen Untersuchungen zur Regulation des TGF $\beta$ -Systems haben gezeigt, dass Antiöstrogene sehr spezifisch sowohl auf Ebene der Liganden als auch auf Ebene der Rezeptoren das TGF $\beta$ -Signaltransduktions-System beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Induktion von TGF $\beta$ 2 sondern auch von T $\beta$ RII stark mit der wachstumsinhibitorischen Wirkung des jeweiligen Antiöstrogens korreliert.

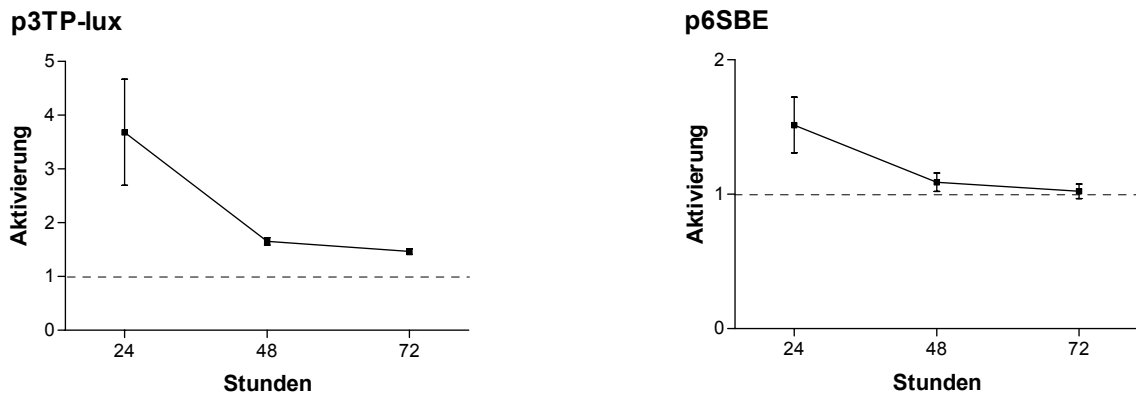
Mit den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, welchen Anteil TGF $\beta$  an der wachstumsinhibitorischen Wirkung der Antiöstrogene hat, und welche Zweige des komplexen TGF $\beta$ -Signaltransduktions-Systems durch Antiöstrogene aktiviert werden.

#### **6.3.1 Induktion TGF $\beta$ -sensitiver Reporterplasmide durch Antiöstrogene**

Zunächst wurde überprüft, ob TGF $\beta$ -sensitive Promotoren durch Behandlung mit Antiöstrogenen aktiviert werden können. Die verwendeten Reporterplasmide tragen das Firefly-Luciferase-Gen unter Kontrolle synthetischer Promotoren, welche spezifische TGF $\beta$ -sensitive Elemente enthalten. p3TP-lux (Wrana et al., 1992) besteht aus drei TRE Elementen (de Groot and Kruijer, 1990) vor einem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Promotorelement (Keeton et al., 1991). p6SBE enthält als Enhancer sechs Kopien des *Smad Binding Elements* vor einem SV40-Promotor (Le Dai et al., 1998).

In einem Vorversuch wurde sichergestellt, dass die Promotoren in MCF-7 Zellen durch TGF $\beta$  aktiviert werden. 24 Stunden nach der Behandlung mit 100 pM TGF $\beta$ 1 zeigte p3TP-lux eine ca. 3,5fache Aktivierung. Dieser Wert blieb jedoch im weiteren Zeitverlauf nicht erhalten. 48 Stunden nach der Behandlung war nur noch eine ca. 1,7fache Aktivierung nachweisbar, welche über die nächsten 24 Stunden weiter leicht abnahm (Abb. 5.12).

p6SBE wurde durch TGF $\beta$ 1 nur sehr schwach und über einen kurzen Zeitraum aktiviert. 24 Stunden nach der Transfektion war die Aktivierung ca. 1,5fach, weitere 24 Stunden später war sie bereits nicht mehr nachweisbar (Abb. 5.12)



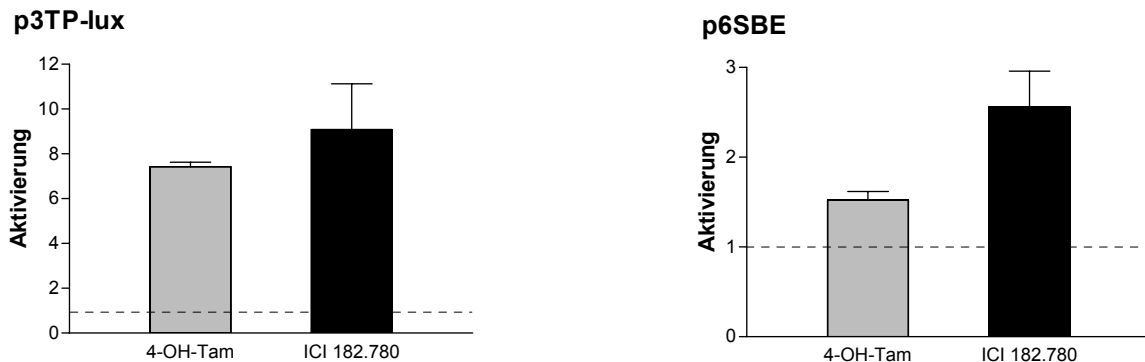
**Abb. 5.12:** Zeitverlauf der Aktivierung der TGF $\beta$ -sensitiven Reporterplasmide p3TP-lux und p6SBE nach Behandlung mit 100 pM TGF $\beta$ . Unterschiede in der Transfektionseffizienz und den Zellzahlen wurden über die Aktivität des Renilla-Luciferase-Koreporters ausgeglichen. Die Luciferase-Werte von p3TP-lux und p6SBE wurden auf die Luciferase-Werte der dazugehörigen Grundvektoren (pGl3-Basic bzw. pGl3-Promoter) normalisiert. Die Aktivität der Promotorkonstrukte in unbehandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen.

Als nächstes wurde die Aktivierung der zwei Promotorkonstrukte durch Antiöstrogene untersucht. Die MCF-7 Zellen wurden über fünf Tage mit Antiöstrogenen behandelt, da aufgrund der quantitativen RT-PCRs nach diesem Behandlungszeitraum mit der stärksten Induktion des TGF $\beta$ -Systems zu rechnen war. Die Transfektion mit den Reporterkonstrukten erfolgte drei Tage nach der Behandlung.

Die Ergebnisse der Transfektionen sind in Abb. 5.13 dargestellt. p3TP-lux wurde durch  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen 7,4fach aktiviert und durch  $10^{-9}$  M ICI 182.780 ungefähr 9fach. 4-Hydroxytamoxifen bewirkte somit eine 2fach höhere und ICI 182.780 eine 2,5fach höhere Induktion des 3TP-Promotors als 100 pM TGF $\beta$ 1.

Das *Smad Binding Element* wurde durch 4-Hydroxytamoxifen 1,6fach aktiviert. Dieses entspricht dem Wert, der durch 100 pM TGF $\beta$ 1 erreicht wurde. ICI 182.780 bewirkte eine 2,6fache Aktivierung des Promotors und hatte damit einen 1,7fach stärker induktiven Effekt als TGF $\beta$ 1.

## ERGEBNISSE



**Abb. 5.13:** Aktivierung der TGF $\beta$  sensitiven Reporterplasmide p3TP-lux und p6SBE nach Behandlung mit  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen oder  $10^{-9}$  M ICI 182.780. Unterschiede in der Transfektionseffizienz und den Zellzahlen wurden über die Aktivität des Renilla-Luciferase-Koreporters ausgeglichen. Die Luciferase-Aktivitäten von p3TP-lux und p6SBE wurden auf die Luciferase-Werte der dazugehörigen Grundvektoren (pGI3-Basic bzw. pGI3-Promoter) normalisiert. Die Aktivität der Promotorkonstrukte in unbehandelten Zellen (0,1 % Ethanol) wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen.

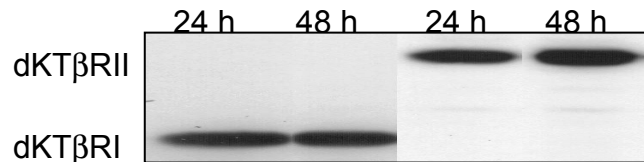
### 6.3.2 Beteiligung der TGF $\beta$ -Rezeptoren I und II an der antihormonellen Wirkung

TGF $\beta$ -Signale werden über einen heterotetrameren Komplex aus T $\beta$ RI und T $\beta$ RII in die Zelle weitergeleitet (Wrana et al., 1992). Um ein genaues Bild von der Beteiligung der TGF $\beta$ -Rezeptoren an der antihormonellen Wirkung zu erhalten wurde versucht, durch Expression dominant-negativer Rezeptorkonstrukte gezielt die TGF $\beta$ -Wirkung auf Ebene der Rezeptoren zu inhibieren. Der Aufbau der Rezeptorkonstrukte ist im Methoden-Teil beschrieben (Kap. 4.2.5). Sowohl dKT $\beta$ RI als auch dKT $\beta$ RII sind trunkierte Rezeptoren mit deletierter Kinase-Domäne (Abb. 3.1).

#### 6.3.2.1 Transiente Expression dominant-negativer Rezeptor-Konstrukte in MCF-7 Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob die Rezeptorkonstrukte korrekt in MCF-7 Zellen exprimiert werden. pdKT $\beta$ RI-Flag und pdKT $\beta$ RII-Flag wurden hierfür transient in MCF-7 Zellen transfiziert. 24 und 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und eine Gesamt-Protein-Isolierung durchgeführt. Die Expression der dominant-negativen Rezeptoren wurde im Westernblot mit einem Anti-Flag-Antikörper

nachgewiesen. Abb. 5.14 zeigt Banden in den erwarteten Größen von ~25 kD für dKTβRI und ~36 kD für dKTβRII. Das Expressionsniveau der trunktierten Rezeptoren ist über den untersuchten Zeitraum konstant.



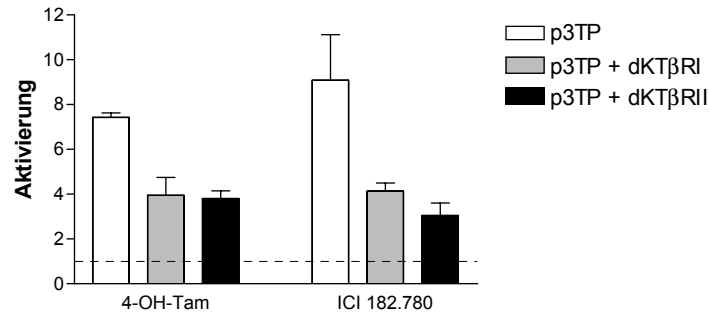
**Abb. 5.14:** Expression von dKTβRI und dKTβRII in MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden transient mit pdKTβRI-Flag und pdKTβRII-Flag transfiziert und die Expression der Rezeptorkonstrukte nach 24 und 48 Stunden im Westernblot mit einem Anti-Flag Antikörper bestimmt. dKTβRI ist ~25 kD groß, dKTβRII ~36 kD.

### 6.3.2.2 Auswirkung der Expression dominant-negativer TGFβ-Rezeptoren auf die antiöstrogen-abhängige Induktion TGFβ-sensitiver Promotoren

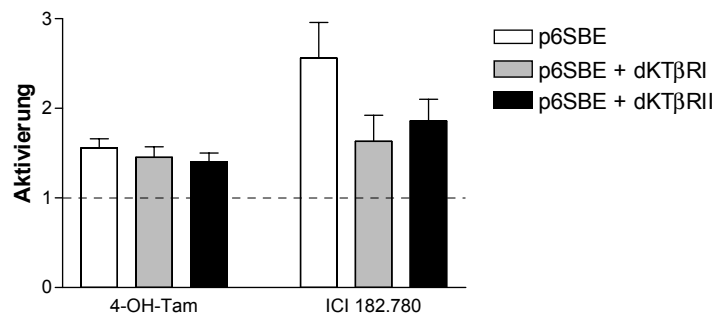
Die unter 5.3.1 (Abb. 5.13) gezeigte Induktion der TGFβ-sensitiven Reporterplasmide p3TP-lux und p6SBE durch 4-Hydroxytamoxifen und ICI 182.780 ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Induktion des TGFβ-Systems durch die Antiöstrogene zurückzuführen. Eine Inhibition des TGFβ-Signaltransduktionsweges auf Ebene der Rezeptoren sollte zu einem Verlust dieser Induktion führen. Um dies zu überprüfen wurden die dominant-negativen Rezeptorkonstrukte mit den TGFβ sensitiven Reporterplasmiden transient in MCF-7 Zellen kotransfiziert. Die Zellen waren zuvor mit Antiöstrogenen behandelt worden.

Die 7,4fache (4-Hydroxytamoxifen) bzw. 9fache (ICI 182.780) Aktivierung von p3TP-lux wurde durch die Kotransfektion der Konstrukte deutlich reduziert. In Zellen, die dKTβRI exprimierten bewirkte sowohl 4-Hydroxytamoxifen als auch ICI 182.780 nur eine 4fache Aktivierung des Promotors. In Zellen, die dKTβRII exprimierten, bewirkte 4-Hydroxytamoxifen ebenfalls eine 4fache, ICI 182.780 nur eine 3fache Induktion (Abb. 5.15).

## ERGEBNISSE



**Abb. 5.15:** Inhibition der Antiöstrogen-induzierten Aktivierung von p3TP-lux durch Kotransfektion mit den dominant-negativen TGFβ-Rezeptorkonstrukten dKTβRI und dKTβRII. Unterschiede in der Transfektionseffizienz und den Zellzahlen wurden über die Aktivität des Renilla-Luciferase-Koreporters ausgeglichen. Die Luciferase-Aktivitäten von p3TP-lux wurden auf die Luciferase-Werte des Grundvektors pGI3-Basic normalisiert. Die Aktivität von p3TP-lux in unbehandelten Zellen (0,1 % Ethanol) wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen.



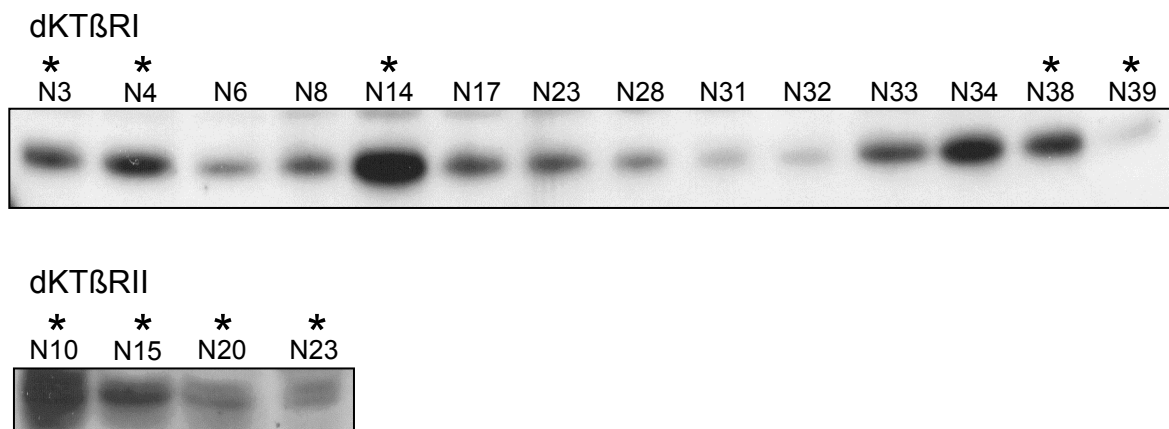
**Abb. 5.16:** Inhibition der Antiöstrogen-induzierten Aktivierung von p6SBE durch Kotransfektion mit den dominant-negativen TGFβ-Rezeptorkonstrukten dKTβRI und dKTβRII. Unterschiede in der Transfektionseffizienz und den Zellzahlen wurden über die Aktivität des Renilla-Luciferase-Koreporters ausgeglichen. Die Luciferase-Aktivitäten von p6SBE wurden auf die Luciferase-Werte des Grundvektors pGI3-Promoter normalisiert. Die Aktivität von p6SBE in unbehandelten Zellen (0,1 % Ethanol) wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen.

Die sehr schwache Aktivierung von p6SBE durch 4-Hydroxytamoxifen ließ sich durch Expression der dominant-negativen Rezeptorkonstrukte nicht beeinflussen. Die 2,6fache Aktivierung von p6SBE durch ICI 182.780 konnte durch beide Rezeptorkonstrukte

deutlich reduziert werden (dKTβRI: 1,6fache, dKTβRII: 1,9fache Aktivierung). Im Gegensatz zu den Versuchen mit p3TP-lux hatte in diesem Fall dKTβRI eine stärker inhibierende Wirkung als dKTβRII. (Abb. 5.16).

### 6.3.2.3 Stabile Transfektion dominant-negativer TGFβ-Rezeptoren in MCF-7 Zellen

Die vorangehenden Versuche haben gezeigt, dass Antiöstrogene TGFβ-sensitive Promotoren aktivieren können und dass diese Aktivierung zumindest teilweise durch die TGFβ-Rezeptoren I und II vermittelt wird. Die Versuche lassen jedoch keine Rückschlüsse darüber zu, ob auch die antihormonelle Wachstumsinhibition über TGFβ und die TGFβ-Rezeptoren verläuft.



**Abb. 5.17:** Expression der dominant negativen Rezeptoren dKTβRI (25 kD) und dKTβRII (36 kD) in stabil transfizierten MCF-7 Zellen. Anti-Flag-Westernblot. Mit \* markierte Klone wurden für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Die Inhibition des Wachstums von MCF-7 Zellen durch Antiöstrogene läßt sich am eindeutigsten durch eine direkte Bestimmung der Zellzahl überprüfen. Da eindeutige Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen erst nach ca. fünf Tagen erkennbar waren, wurden die dominant-negativen Rezeptorkonstrukte für diese Versuche stabil in MCF-7 Zellen transfiziert. Aus beiden Transfektionen wurden je 40 G418-resistente MCF-7 Klone isoliert. Über einen anti-Flag Westernblot wurden unter diesen Klonen diejenigen identifiziert, die dKTβRI oder dKTβRII stabil exprimierten. Insgesamt wurden 14 Klone isoliert, die dKTβRI exprimierten, und 3, die dKTβRII

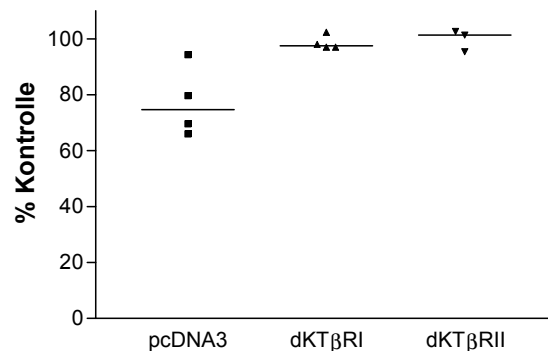
## ERGEBNISSE

exprimierten (Abb. 5.17). Die Expression von dKT $\beta$ RII war in den stabil transfizierten Zellen im Vergleich zu den transient transfizierten Zellen (Abb.5.14) sehr schwach.

Für die weiteren Experimente wurden vier der dKT $\beta$ RI-Klone und die drei dKT $\beta$ RII-Klone weiterverwendet (in Abb. 5.17 mit \* markiert). Als Kontrolle wurden MCF-7 Zellen eingesetzt, die mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3-Flag stabil transfiziert worden waren.

### 6.3.2.4 Auswirkung der Expression dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren auf die Wachstumshemmung durch TGF $\beta$

Zunächst wurden Proliferations-Assays mit TGF $\beta$  durchgeführt, um die dominant-negative Wirkung der Rezeptorkonstrukte auf die TGF $\beta$ -Signaltransduktion zu überprüfen. In Abb. 5.18 ist die Wachstumsinhibition der stabil transfizierten Rezeptorklone durch 2,5 pM TGF $\beta$ 1 dargestellt. Die Kontrollzellen wurden durch TGF $\beta$ 1 in ihrem Wachstum gehemmt. Die Expression der dominant-negativen Rezeptoren führte zu einer vollständigen Aufhebung dieser Inhibition.

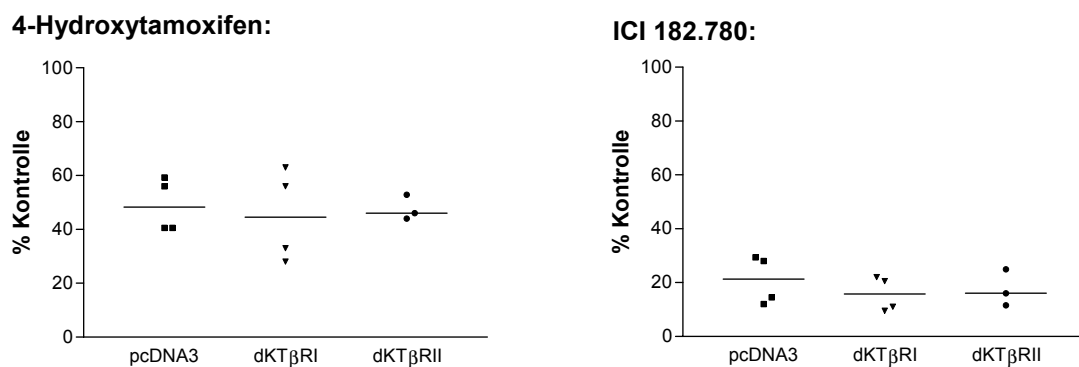


**Abb. 5.18:** Softagar-Assay: Mit dominant-negativen TGF $\beta$ -Rezeptorkonstrukten stabil transfizierte MCF-7 Zellen (dKT $\beta$ RI, dKT $\beta$ RII) und Kontrollen (pcDNA3 = mit dem leeren Vektor stabil transfiziert) wurden für 7 Tage mit 2,5 pM TGF $\beta$ 1 behandelt. Die Wachstumsinhibition ist in % unbehandelter Kontrollzellen angegeben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet.

### 6.3.2.5 Auswirkung der Expression dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren auf die Wachstumshemmung durch Antiöstrogene

Die Ergebnisse des Softagar-Assays mit TGF $\beta$ 1 haben gezeigt, dass die stabile Expression der dominant-negativen Rezeptoren in MCF-7 Zellen die Wirkung von TGF $\beta$ 1 blockieren kann. Als nächster Schritt sollte nun die Auswirkung der Hemmung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion auf den wachstumsinhibitorischen Effekt der Antiöstrogene untersucht werden.

Die stabil transfizierten Zellen wurden im adherenten Proliferationsassay über fünf Tage mit  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen oder  $10^{-9}$  M ICI 182.780 behandelt.

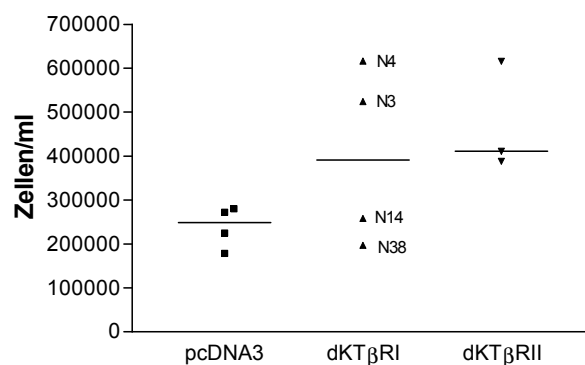


**Abb. 5.19:** Adhärenter Proliferations-Assay. Mit dominant-negativen TGF $\beta$ -Rezeptorkonstrukten stabil transfizierte MCF-7 Zellen (dKT $\beta$ RI, dKT $\beta$ RII) und Kontrollen (pcDNA3 = mit dem leeren Vektor stabil transfiziert) wurden für 5 Tage mit Antiöstrogenen behandelt. Die Wachstumsinhibition ist in % unbehandelter Kontrollzellen angegeben. 4-Hydroxytamoxifen:  $10^{-7}$  M, ICI 182.780:  $10^{-9}$  M. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet.

Überraschenderweise bewirkte die Expression der dominant negativen Rezeptoren keine Aufhebung der antihormonellen Wachstumshemmung. Die Klone wurden sowohl mit 4-Hydroxytamoxifen als auch mit ICI 182.780 genauso stark inhibiert wie die Kontrollzellen (Abb. 5.19). Bei einem Vergleich der unbehandelten Ansätze wurden jedoch Unterschiede im Wachstumsverhalten sichtbar: Die stabil mit den dominant-negativen Rezeptorkonstrukten transfizierten Zellen proliferierten teilweise deutlich

## ERGEBNISSE

schneller als die mit dem leeren Vektor transfizierten Kontrollzellen. Die dKT $\beta$ RII Klone teilten sich alle signifikant häufiger als die Kontrollzellen; die dKT $\beta$ R1 Klone zeigten ein variables Wachstumverhalten. Zwei Klone (N3 und N4) wuchsen signifikant schneller als die Kontrollzellen, zwei Klone (N14, N38) waren gleich schnell (Abb. 5.20). TGF $\beta$  im Serum des Zellkulturmediums könnte für dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten von Kontroll- und Rezeptorklonen verantwortlich sein.



**Abb. 5.20:** Zellzahlen der stabil transfizierten MCF-7 Zellen nach fünftägigen Wachstum. pcDNA3: Kontrollen, mit pcDNA3-Flag transfiziert; dKT $\beta$ R1 und dKT $\beta$ R2 mit den dominant-negativen TGF $\beta$ -Rezeptorkonstrukten transfiziert. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet.

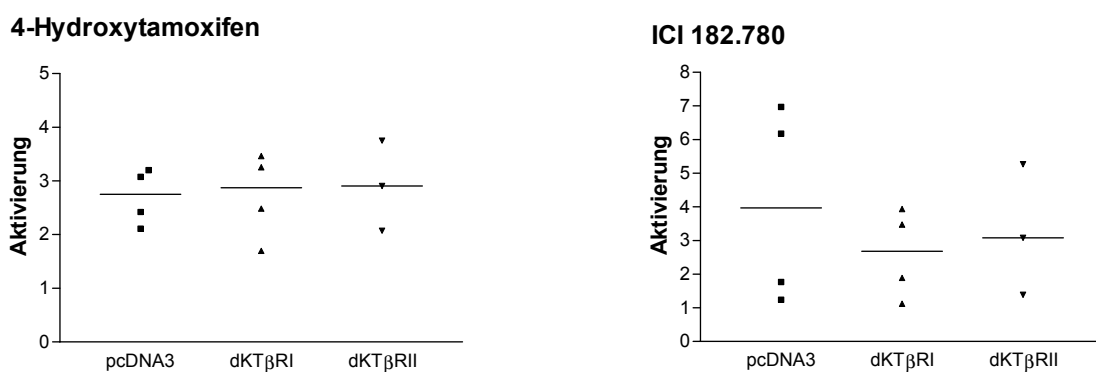
### 6.3.2.6 Auswirkung der Expression dominant negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren auf die Aktivierung von p3TP-lux

Die fehlende Wirkung der dominant-negativen Rezeptoren auf die antihormonelle Wachstumsinhibition war unerwartet. Wie in den vorangehenden Versuchen gezeigt werden konnte, bewirkt die Behandlung mit Antiöstrogenen nicht nur eine Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ R2, sondern auch eine Aktivierung unterschiedlicher TGF $\beta$ -Signaltransduktionswege. Da TGF $\beta$  auf MCF-7 Zellen wachstumsinhibitorisch wirkt, lag die Vermutung nahe, dass auch die wachstumsinhibitorische Wirkung der Antiöstrogene wenigstens teilweise durch TGF $\beta$  vermittelt wird.

Es wurde daher untersucht, ob das Expressionsniveau der dominant-negativen Rezeptoren in den stabil transfizierten MCF-7 Zellen ausreicht, Antiöstrogen-induzierte TGF $\beta$ -Wirkungen zu inhibieren. Hierfür wurde die Aktivierung von p3TP-lux durch

Antiöstrogene ausgenutzt. Unter 5.3.2.2 wurde gezeigt, dass eine transiente Expression der dominant-negativen Rezeptoren die Aktivierung dieses Promotors deutlich reduzieren kann.

Die dKT $\beta$ RI- und dKT $\beta$ RII-Klone wurden wie zuvor beschrieben mit Antiöstrogenen behandelt und anschließend mit p3TP-lux transient transfiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.21 dargestellt:



**Abb. 5.21:** Aktivierung von p3TP-lux nach Behandlung mit  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen oder  $10^{-9}$  M ICI 182.780 in stabil mit dKT $\beta$ RI oder dKT $\beta$ RII transfizierten Zellen und Kontrollzellen (pcDNA3 = mit dem leeren Vektor stabil transfiziert). p3TP-lux wurde transient in die Zellen transfiziert. Unterschiede in der Transfektionseffizienz und den Zellzahlen wurden über die Aktivität des Renilla-Luciferase-Koreporters ausgeglichen. Die Luciferase-Aktivitäten von p3TP-lux wurde auf die Luciferase-Werte des dazugehörigen Grundvektors pGl3-Basic normalisiert. Die Aktivität von p3TP-lux in unbehandelten Zellen (0,1 % Ethanol) wurde auf 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet.

In den Kontrollklonen wurde p3TP-lux im Mittel durch 4-Hydroxytamoxifen 2,8fach und durch ICI 182.780 4fach aktiviert. Die stabile Expression von dKT $\beta$ RI und dKT $\beta$ RII bewirkte keine Reduktion der Aktivierung durch 4-Hydroxytamoxifen und eine nur sehr geringe Reduktion der Aktivierung durch ICI 182.780 (Median: dKT $\beta$ RI: 2,7, dKT $\beta$ RII: 3,1). Das Expressionsniveau der dominant-negativen Rezeptoren war nicht ausreichend, um die antihormonelle Aktivierung von p3TP-lux zu hemmen.

## ERGEBNISSE

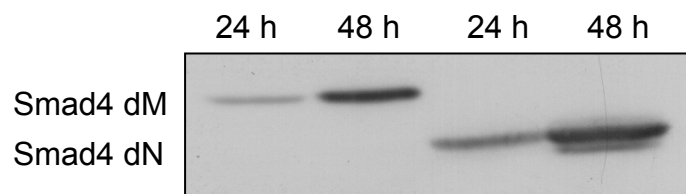
### 6.3.3 Beteiligung des Smad-Weges an der antihormonellen Wirkung

Eine zentrale Rolle in der Smad-vermittelten TGF $\beta$ -Signaltransduktion spielt der *common-mediator* Smad4. Durch Inaktivierung von Smad4 kann ein Großteil der über den Smad-Signaltransduktionsweg vermittelten TGF $\beta$ -Effekte ausgeschaltet werden (Nakao et al., 1997b).

In den nachfolgenden Versuchen wurde Smad4 durch die Expression von zwei dominant-negativen Smad4 Proteinen inaktiviert: Smad4 dM besitzt eine Deletion in der Linker-Region des Proteins. Der deletierte Bereich enthält die *Smad Activation Domain* (SAD), die für die Aktivierung der Transkription durch Smad4 notwendig ist. Smad4 dN ist ein trunkiertes Protein, dem die N-terminale Mad-Homologie Domäne 1 (MH1) fehlt. In der MH1-Domäne befinden sich Sequenzen, die für die Bindung von Smad4 an die DNA erforderlich sind (Abb. 3.2). Die Auswirkungen der Expression dieser dominant-negativen Smad4-Proteine auf die antihormonelle Wirkung wurde untersucht.

#### 6.3.3.1 Transiente Expression dominant-negativer Smad4-Konstrukte in MCF-7 Zellen

Die Expressionsvektoren pSmad4-dM-Flag und pSmad4-dN-Flag wurden zunächst transient in MCF-7 Zellen transfiziert, um die korrekte Expression der dominant-negativen Proteine in MCF-7 Zellen zu überprüfen. 24 und 48 h nach der Transfektion wurden Proteine isoliert und im Westernblot mit einem Anti-Flag-Antikörper analysiert. Abb. 5.22 zeigt die erwarteten Banden bei ~55 kD für Smad4 dM und ~46 kD für Smad4 dN. Die Expression der beiden Smad4 Proteine nimmt im beobachteten Zeitraum zu.



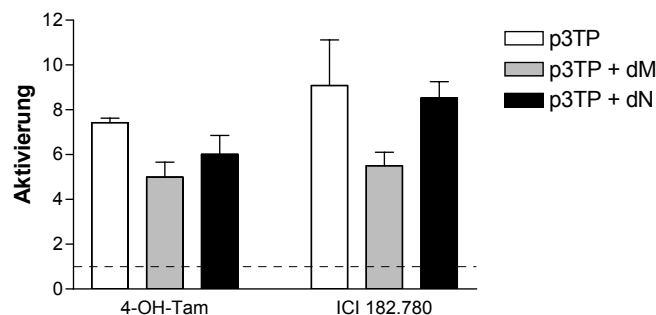
**Abb. 5.22:** Expression von Smad4 dM und Smad4 dN in MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden transient mit pSmad4-dM-Flag und pSmad4-dN-Flag transfiziert und die Expression der Rezeptorkonstrukte nach 24 und 48 Stunden im Westernblot mit einem Anti-Flag-Antikörper bestimmt. Smad4 dM ist ~55 kD groß, Smad4 dN ~46 kD.

### 6.3.3.2 Auswirkung der Expression dominant-negativer Smad4-Proteine auf die Induktion TGF $\beta$ -sensitiver Promotoren

In den unter 5.3.2.2 beschriebenen Versuchen wurde gezeigt, dass die Aktivierung TGF $\beta$  sensitiver Promotoren durch Antiöstrogene über die TGF $\beta$  Rezeptoren vermittelt wird. Mit Hilfe der dominant-negativen Smad4-Proteine sollte nun untersucht werden, ob der Smad-Signaltransduktionsweg ebenfalls an dieser Aktivierung beteiligt ist. In Kotransfektions-Experimenten wurden die Reporterplasmide p3TP-lux und p6SBE zusammen mit den Smad4-Konstrukten transient in MCF-7 Zellen transfiziert.

Die Aktivierung von p3TP-lux durch 4-Hydroxytamoxifen (7,4fach) wurde durch beide dominant-negativen Smad4-Proteine leicht reduziert. Unter Einfluss von Smad4 dM wurde p3TP-lux 5fach aktiviert, unter Einfluss von Smad4 dN 6fach.

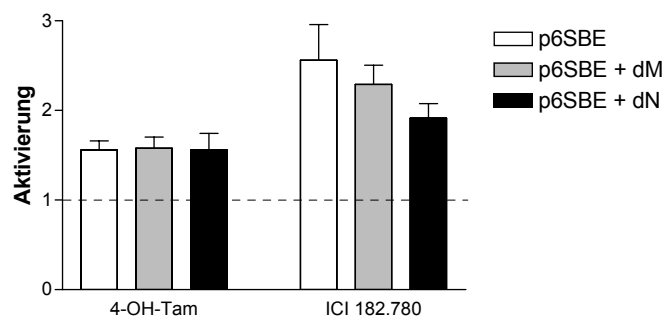
Die 9,1fache Aktivierung von p3TP-lux durch ICI 182.780 wurde nur durch die Expression von Smad4 dM reduziert (5,5fache Aktivierung). Smad4 dN hatte keine Auswirkung (8,5fache Aktivierung) (Abb. 5.23).



**Abb. 5.23:** Inhibition der antiöstrogen induzierten Aktivierung von p3TP-lux durch Kotransfektion mit den dominant-negativen Smad4-Konstrukten dM und dN. Unterschiede in der Transfektionseffizienz und den Zellzahlen wurden über die Aktivität des Renilla-Luciferase-Koreporters ausgeglichen. Die Luciferase-Aktivitäten von p3TP-lux wurden auf die Luciferase-Werte des Grundvektors pGl3-Basic normalisiert. Die Aktivität von p3TP-lux in unbehandelten Zellen (0,1 % Ethanol) wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen.

## ERGEBNISSE

Die Aktivierung von p6SBE durch 4-Hydroxytamoxifen (1,6fach) wurde weder durch Expression von Smad4 dM noch durch Expression von Smad4 dN beeinflusst. Die Aktivierung des Promotors durch ICI 182.780 wurde durch beide Smad4-Proteine leicht reduziert. Expression von Smad4 dM senkte die Aktivierung von 2,6fach auf 2,3fach; Expression von Smad4 dN senkte die Aktivierung auf 1,9fach (Abb. 5.24).



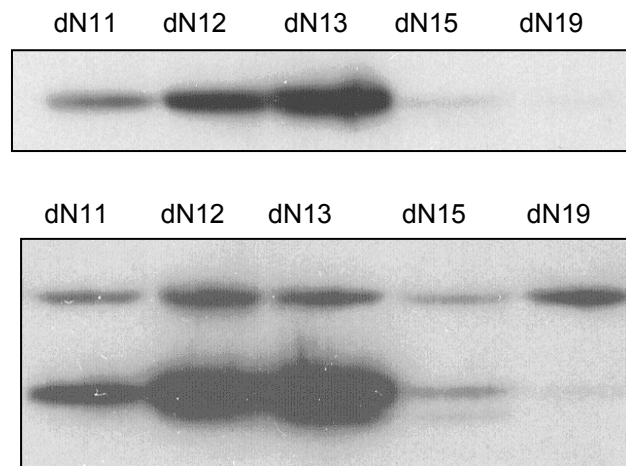
**Abb. 5.24:** Inhibition der antiöstrogen induzierten Aktivierung von p6SBE durch Kotransfektion mit den dominant-negativen Smad4-Konstrukten dM und dN. Unterschiede in der Transfektionseffizienz und den Zellzahlen wurden über die Aktivität des Renilla-Luciferase-Koreporters ausgeglichen. Die Luciferase-Aktivitäten von p6SBE wurden auf die Luciferase-Werte des Grundvektors pG13-Promoter normalisiert. Die Aktivität von p6SBE in unbehandelten Zellen (0,1 % Ethanol) wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen.

### 6.3.3.3 Expression dominant-negativer Smad4-Konstrukte in MCF-7 Zellen

Um Auswirkungen der dominant-negativen Smad4-Proteine auf die antihormonelle Wachstumsinhibition zu untersuchen, wurden die Expressionsvektoren für Smad4 dM und dN stabil in MCF-7 Zellen transfiziert. Aus beiden Transfektionen wurden je 30 G418-resistente Klone isoliert. Über einen Anti-Flag-Westernblot wurden unter diesen Klonen diejenigen identifiziert, die die Konstrukte stabil integriert hatten. Insgesamt konnten 5 Klone isoliert werden, die Smad4 dN exprimieren (Abb. 5.25 oben). Die Expression von Smad4 dM konnte in keinem der untersuchten G418 resistenten Klone nachgewiesen werden.

Der gegen Smad4 gerichtete monoklonale Antikörper B-8 erkennt neben dem Wildtyp auch die trunkierte dN-Variante des Proteins. Es war daher der direkte Vergleich der Expressionsniveaus beider Proteine möglich (Abb. 5.25 unten). In den Klonen 11, 12 und 13 ist Smad4 dN deutlich stärker exprimiert als der Wildtyp. In Klon 15 ist die Expression beider Proteine ungefähr gleich stark und in Klon 19 wird Smad4 dN deutlich schwächer exprimiert als der Wildtyp. Dieser Klon wurde daher in den nachfolgenden Versuchen nicht weiterverwendet.

Als Kontrollen wurden MCF-7 Zellen verwendet, die mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3-Flag stabil transfiziert worden waren.

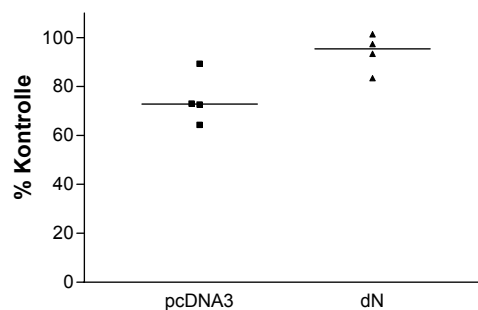


**Abb. 5.25:** Expression von Smad4 dN in stabil transfizierten MCF-7 Zellen. Westernblot. oben: Nachweis von Smad4-dN mit einem Anti-Flag-Antikörper, unten: Gleichzeitiger Nachweis von Wildtyp- und dN-Smad4 durch den spezifischen monoklonalen Antikörper B-8. Die obere Bande zeigt das Wildtyp Smad4 bei 60 kD, die untere Bande ist Smad4 dN bei 46 kD.

## ERGEBNISSE

### 6.3.3.4 Auswirkung der Expression von Smad4 dN auf die Wachstumshemmung durch TGF $\beta$ 1

Zunächst wurde die dominant-negative Wirkung der Smad4-Konstrukte auf die Wachstumshemmung durch TGF $\beta$  überprüft. Die Kontrollzellen wurden in ihrem Wachstum gehemmt, auf ca. 70 % der unbehandelten Zellen. In den Smad4 dN Zellen hingegen war die Wachstumsinhibition durch TGF $\beta$  in zwei Klonen vollständig und in zwei Klonen partiell aufgehoben. Im Mittel war die Wachstumsinhibition signifikant geringer als in den Kontrollzellen ( $p < 0,027$ ) (Abb. 5.26).



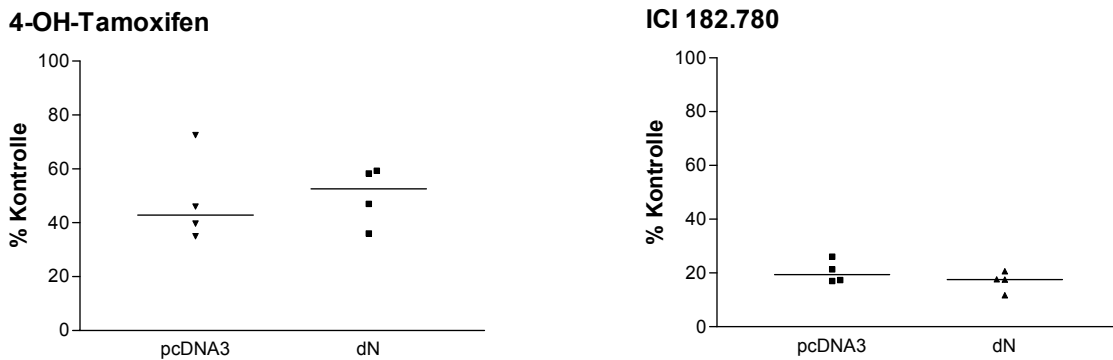
**Abb. 5.26:** Softagar-Assay: Mit dominant-negativen Smad4 dN stabil transfizierte MCF-7 Zellen und Kontrollklone (pcDNA3 = mit dem leeren Vektor stabil transfiziert) wurden für 7 Tage mit 2,5 pM TGF $\beta$ 1 behandelt. Die Wachstumsinhibition ist in % unbehandelter Kontrollzellen angegeben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet.

### 6.3.3.5 Auswirkung der Expression von Smad4 dN auf die Wachstumshemmung durch Antiöstrogene

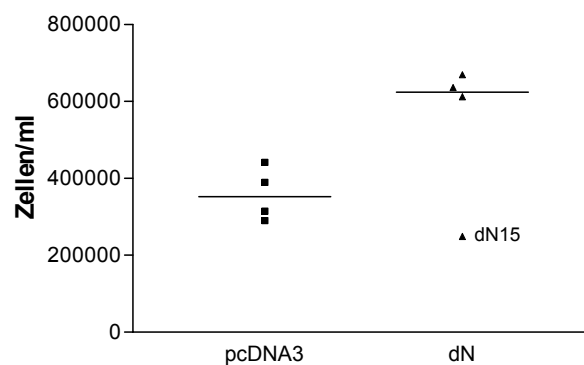
Der Proliferations-Assay mit TGF $\beta$  bestätigt, dass Smad4 dN sich in einer dominant-negativen Weise auf die TGF $\beta$  Signaltransduktion auswirkt. Die folgenden Proliferations-Assays sollten zeigen, ob der über Smad4 verlaufende TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweg auch an der antiöstrogenen Wachstumshemmung beteiligt ist.

Die stabile Expression von Smad4 dN bewirkte, wie die stabile Expression der TGF $\beta$ -Rezeptoren, keine Aufhebung der antihomonellen Wachstumshemmung. Die Zellen wurden durch beide Antiöstrogene in ihrem Wachstum ebenso gut gehemmt wie die Kontrollzellen (Abb. 5.27). Das Wachstum der unbehandelten Smad4 dN Zellen war jedoch signifikant schneller als das Wachstum der Kontrollzellen (Abb. 5.28). Lediglich

Smad4 dN15 verhielt sich wie die Kontrollzellen. Dieser Klon hatte jedoch auch das geringste Expressionsniveau des dominant-negativen Proteins (Abb. 5.25).



**Abb. 5.27:** Adherenter Proliferations-Assay. Mit dominant-negativen Smad4 dN stabil transfizierte MCF-7 Zellen und Kontrollklone (pcDNA3 = mit dem leeren Vektor stabil transfiziert) wurden für 5 Tage mit Antiöstrogenen behandelt. Die Wachstumsinhibition ist in % un behandelter Kontrollzellen angegeben. 4-Hydroxytamoxifen:  $10^{-7}$  M, ICI 182.780:  $10^{-9}$  M. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet.



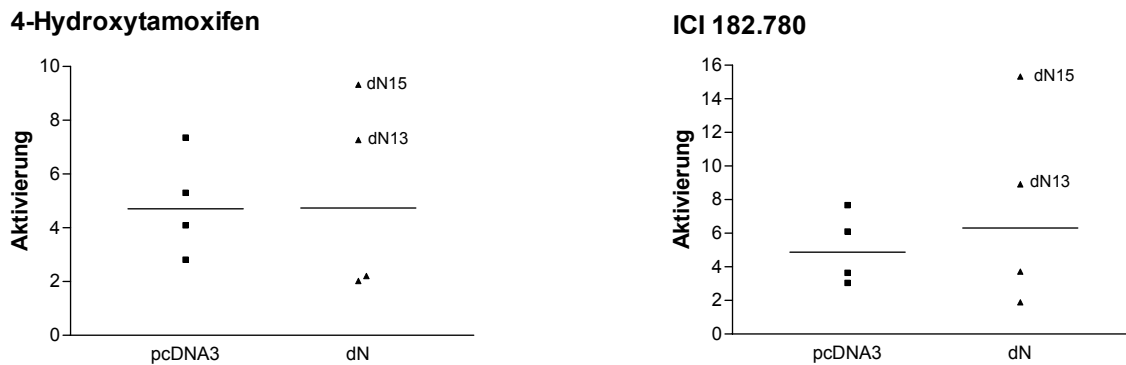
**Abb. 5.28:** Zellzahlen der stabil transfizierten MCF-7 Zellen nach fünftägigen Wachstum. pcDNA3: Kontrollen, mit pcDNA3-Flag transfiziert; dN mit den dominant-negativen Smad4 transfiziert. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet.

## ERGEBNISSE

### 6.3.3.6 Auswirkung der Expression von Smad4 dN auf die Aktivierung von p3TP-lux

Um sicherzustellen, dass das Expressionsniveau von Smad4 dN in den stabil transfizierten MCF-7 Zellen ausreicht, um Antiöstrogen-induzierte TGF $\beta$ -Wirkungen zu inhibieren, wurde die Aktivierung von p3TP-lux durch 4-Hydroxytamoxifen und ICI 182.780 in den Klonen untersucht.

Wie unter 5.3.3.2 gezeigt, kann die transiente Expression von Smad4 dN die Aktivierung von p3TP-lux reduzieren.



**Abb. 5.29:** Aktivierung von p3TP-lux nach Behandlung mit  $10^{-7}$  M 4-Hydroxytamoxifen oder  $10^{-9}$  M ICI 182.780 in stabil mit Smad4 dN transfizierten Zellen und Kontrollzellen (pcDNA3 = mit dem leeren Vektor stabil transfiziert). p3TP-lux wurde transient in die Zellen transfiziert. Unterschiede in der Transfektionseffizienz und den Zellzahlen wurden über die Aktivität des Renilla-Luciferase-Koreporters ausgeglichen. Die Luciferase-Aktivitäten von p3TP-lux wurde auf die Luciferase-Werte des dazugehörigen Grundvektors pGl3-Basic normalisiert. Die Aktivität von p3TP-lux in unbehandelten Zellen (0,1 % Ethanol) wurde auf 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet.

Die MCF-7 dN Klone wurden wie zuvor beschrieben mit Antiöstrogenen behandelt und anschließend mit p3TP-lux transient transfiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.29 dargestellt: In den Kontrollklonen bewirkte die Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen eine 4,8fache, die Behandlung mit ICI 182.780 eine 5,1fache Aktivierung von p3TP-lux. In den Smad4 dN Klonen war die Aktivierung von p3TP-lux im Mittel nicht von den Kontrollklonen zu unterscheiden. Zwei der Smad4 dN Klone zeigten jedoch eine deutlich stärkere (dN13 und dN 15) und zwei eine schwächere Aktivierung von p3TP-lux (dN11 und dN12).

### **6.3.4 Beteiligung von MAP-Kinase-Wegen an der antihormonellen Wirkung**

Ein Großteil der Wirkung von TGF $\beta$  wird über den Smad-Signaltransduktionsweg vermittelt, der in den vorangehenden Experimenten untersucht wurde. Für eine Reihe von TGF $\beta$ -aktivierten Genen konnte jedoch die Beteiligung des Smad-Weges an der Aktivierung ausgeschlossen werden. In Untersuchungen an Zelllinien unterschiedlicher Herkunft konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$  unter anderem auch MAP-Kinase-Signaltransduktionswege aktiviert (Frey and Mulder, 1997a; Hanafusa et al., 1999). Eine Beteiligung dieser Signaltransduktionswege an der antihormonellen Wachstumsinhibition ist möglich und wurde daher in den folgenden Experimenten genauer untersucht.

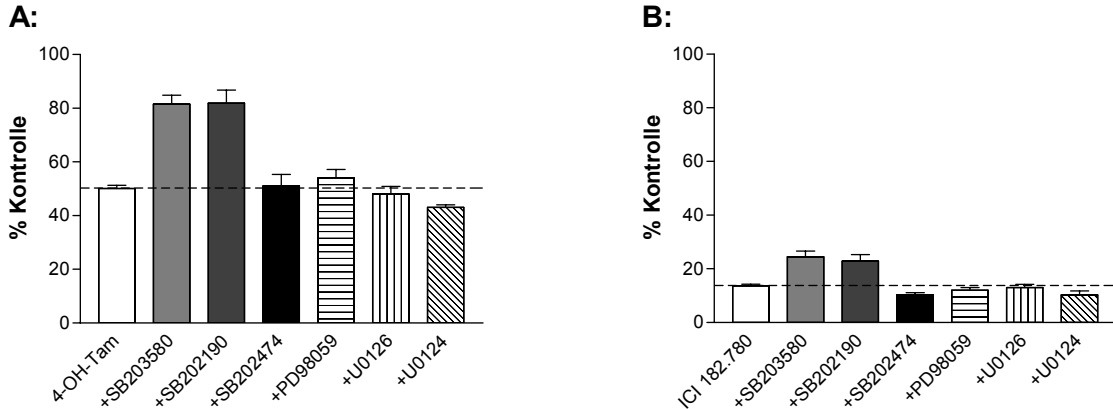
#### **6.3.4.1 Auswirkung der Inhibition von MAP-Kinase-Signaltransduktionswegen auf die Wachstumshemmung durch Antiöstrogene**

Die MAP-Kinase Signalkaskaden lassen sich zur Zeit in drei Hauptwege einteilen: den MEK/Erk-Weg, den JNK/SAPK-Weg und den p38-Kinase-Weg. Die Aktivierung von MEK und p38 kann durch spezifische Inhibitoren gezielt gehemmt werden. SB203580 und SB202190 sind Inhibitoren der p38-Kinase. PD98059 und U0126 sind MEK Inhibitoren. SB 202474 und U0124 sind Kontrollsubstanzen, die auch in hohen Konzentrationen keine Auswirkungen auf die untersuchten Kinasen zeigen (English and Cobb, 2002).

Im adherenten Proliferations-Assay wurden MCF-7 Zellen über fünf Tage mit diesen Inhibitoren in Kombination mit Antiöstrogenen behandelt und die Auswirkungen auf das Zellwachstum untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.30 dargestellt.

4-Hydroxytamoxifen bewirkte eine 50 %ige Inhibition des Wachstums der MCF-7 Zellen. Die Hemmung der p38-Kinase durch SB203580 oder SB202190 führte zu einer signifikanten Reduktion der wachstumshemmenden Wirkung von 4-Hydroxytamoxifen (beide:  $p < 0,0001$ ). Die Hemmung von MEK durch PD98059 oder U0126 hingegen zeigte keine Auswirkung auf das Wachstum der Zellen. Wie erwartet blieb auch die Behandlung der Zellen mit den Kontrollsubstanzen SB202474 und U0124 ohne Auswirkungen.

## ERGEBNISSE



**Abb. 5.30:** Adhärenter Proliferations-Assay. MCF-7 Zellen wurden über fünf Tage mit Antiöstrogenen in Kombination mit MAP-Kinase-Inhibitoren behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit den jeweiligen MAP-Kinase-Inhibitoren behandelt waren. A: Wachstumsinhibition durch 4-Hydroxytamoxifen in Kombination mit MAP-Kinase-Inhibitoren, B: Wachstumsinhibition durch ICI 182.780 in Kombination mit MAP-Kinase-Inhibitoren.

Die Substanzen wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Antiöstrogene: 4-Hydroxytamoxifen  $10^{-7}$  M, ICI 182.780  $10^{-9}$  M. p38-Inhibitoren: SB203580  $10\mu\text{M}$ , SB202190  $1\mu\text{M}$ . MEK-Inhibitoren: PD98059  $1\mu\text{M}$ , U0126  $0,1\mu\text{M}$ . Kontrollsubstanzen: SB202474  $5\mu\text{M}$ , U0124  $1\mu\text{M}$ .

Behandlung der MCF-7 Zellen mit ICI 182.780 führte zu einer fast vollständigen Inhibition des Wachstums. In Kombination mit den p38-Inhibitoren SB203580 oder SB202190 konnte eine partielle Aufhebung dieser Inhibition erreicht werden (beide:  $p < 0,0001$ ). Die MEK-Inhibitoren sowie die zwei Kontrollsubstanzen hatten keine Auswirkung auf die Wachstumsinhibition durch ICI 182.780 (Abb. 5.30).

## **6.4 Untersuchungen zur Beteiligung von p38 an der antihormonellen Induktion von TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ RII**

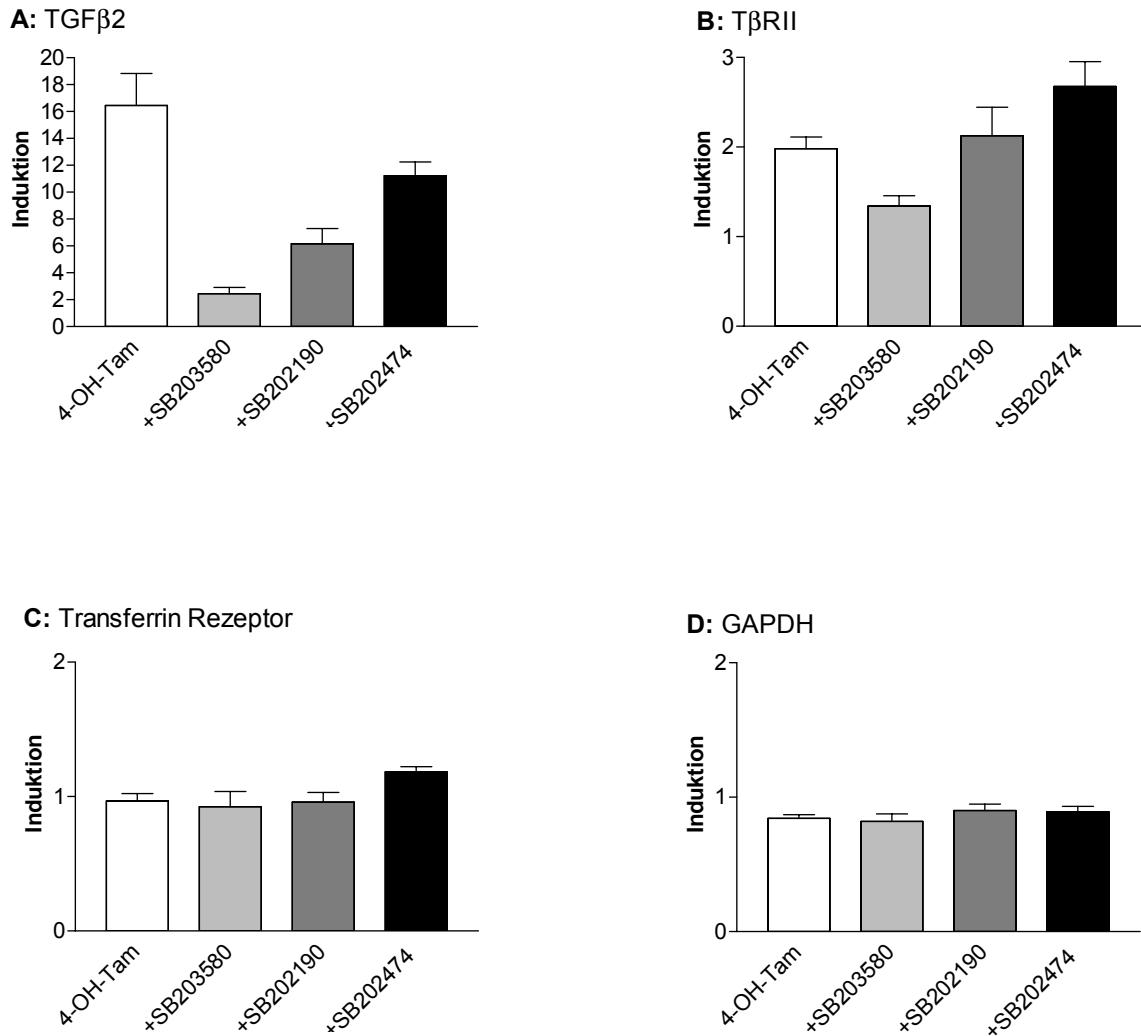
Der partielle Verlust der antiöstrogenen Wachstumsinhibition durch Hemmung der p38-Kinase könnte auf einen Verlust der Induktion von TGF $\beta$ 2 und/oder TGF $\beta$ RII zurückzuführen sein. Die Expression der mRNAs von TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ RII unter gleichzeitiger Behandlung mit Antiöstrogenen und MAP-Kinase-Inhibitoren wurde daher genauer untersucht.

### **6.4.1.1 Induktion der mRNAs von TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ RII**

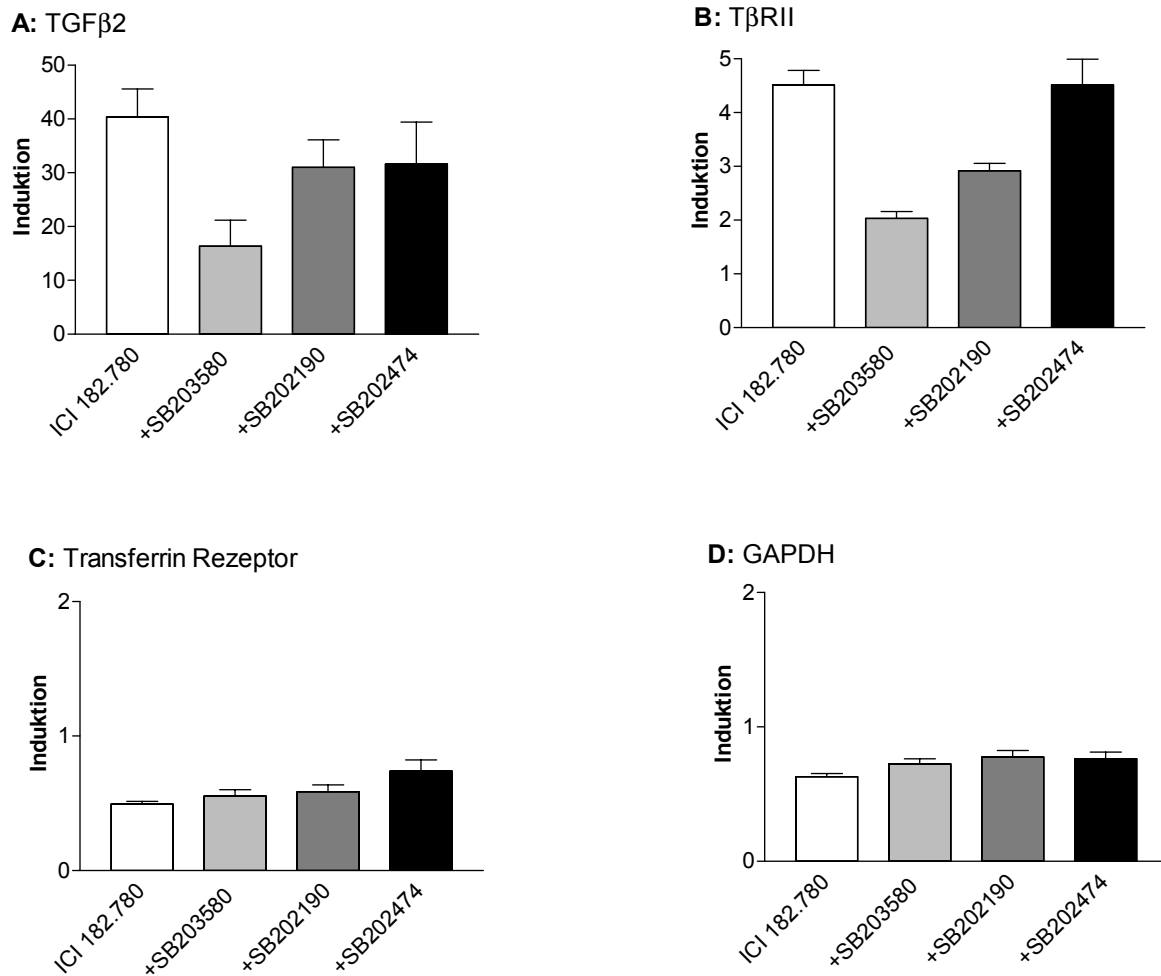
Die Induktion der mRNAs von TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ RII wurde mit Hilfe der quantitativen LightCycler PCRs gemessen. In Abb. 5.31 sind die Ergebnisse der Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen dargestellt. Die Inhibition der p38-Kinase Aktivität durch SB203580 führte zu einem fast vollständigen Verlust der Induktion von TGF $\beta$ 2 durch das Antiöstrogen. SB202190 hat einen ähnlichen Effekt, der jedoch nicht ganz so ausgeprägt war. Auch die Kontrollsubstanz SB202474 bewirkt eine leichte Reduktion der Aktivierung von TGF $\beta$ 2, der Unterschied zu den nur mit 4-Hydroxytamoxifen behandelten Zellen ist jedoch nicht signifikant. Die Aktivierung der mRNA von TGF $\beta$ RII wird ebenfalls fast vollständig durch Behandlung mit SB203580 aufgehoben. SB202190 hat keinen Effekt und SB202474 bewirkt eine leichte zusätzliche Aktivierung der mRNA.

Abb. 5.32 zeigt die Ergebnisse der Behandlung mit ICI 182.780. Die Aktivierung von TGF $\beta$ 2 wird durch gleichzeitige Behandlung mit SB203580 signifikant reduziert. SB202190 und SB202474 bewirken eine geringe Reduktion der TGF $\beta$ 2-Aktivierung durch ICI 182.780, die Werte unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von den Werten bei alleiniger Behandlung mit dem Antiöstrogen.

## ERGEBNISSE



**Abb. 5.31:** Quantitative LightCycler PCR. MCF-7 Zellen wurden für 120 h mit p38-Inhibitoren und 4-Hydroxytamoxifen oder 0,1% Ethanol (Kontrolle) inkubiert. Die mRNAs von A: TGFβ2, B: TβRII, C: Transferrin Rezeptor und D: GAPDH wurden quantifiziert. Die mRNA-Menge der Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Substanzen wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 4-Hydroxytamoxifen  $10^{-7}$  M, SB203580 10 μM, SB201290 1 μM, SB202474 5 μM.



**Abb. 5.32:** Quantitative LightCycler PCR. MCF-7 Zellen wurden für 120 h mit p38-Inhibitoren und ICI 182.780 oder 0,1% Ethanol (Kontrolle) inkubiert. Die mRNAs von TGFβ2, TβRII, Transferrin Rezeptor und GAPDH wurden quantifiziert. Die mRNA Menge der Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Substanzen wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Antiöstrogene: ICI 182.780  $10^{-9}$  M SB203580  $10\mu\text{M}$ , SB202190  $1\mu\text{M}$ , SB202474  $5\mu\text{M}$ .

## 7 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Modellsystem hormonsensitiver MCF-7 Zellen die Beteiligung des TGF $\beta$ -Signaltransduktions-Systems an der antihormonellen Wirkung genauer untersucht.

### 7.1 Antihormonelle Regulation des TGF $\beta$ -Systems

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss der Antiöstrogene auf das TGF $\beta$ -Signaltransduktions-System. Es wurde untersucht, ob neben den Liganden auch weitere TGF $\beta$ -Signaltransduktionskomponenten einer antihormonellen Regulation unterliegen.

#### *Antihormonelle Regulation von TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2*

Aus vorangehenden Arbeiten war bekannt, dass Antiöstrogene die Expression der mRNA von TGF $\beta$ 2 induzieren, während das Expressionsniveau der mRNA von TGF $\beta$ 1 unverändert bleibt. Die Induktion der mRNA von TGF $\beta$ 2 durch 4-Hydroxytamoxifen erfolgte kontinuierlich über einen Zeitraum von 5 Tagen (Knabbe et al., 1996). Diese aus Northernblot-Versuchen erhaltenen Daten konnten mit Hilfe der quantitativen LightCycler PCR im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die Behandlung mit ICI 182.780 führte zu einer im Vergleich mit 4-Hydroxytamoxifen 6fach stärkeren Induktion von TGF $\beta$ 2. Die Ergebnisse stimmen gut mit der Induktion von TGF $\beta$ 2 auf der Proteinebene überein, wo ICI 182.780 eine ca. 8fach stärkere Induktion von TGF $\beta$ 2 bewirkt als 4-Hydroxytamoxifen. Auch die Dosis-Abhängigkeit der mRNA-Induktion von TGF $\beta$ 2 stimmt mit dem Verlauf der Induktion des Proteins überein (Muller et al., 1998).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der quantitativen LightCycler RT-PCRs für TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2 zuverlässig die Änderung der mRNA-Expression unter Behandlung mit Antiöstrogenen gemessen werden kann. Die mRNA-Daten liefern darüber hinaus einen guten Anhaltspunkt zur Induktion der TGF $\beta$ -Isoformen auf der Proteinebene.

Die bereits in vorangehenden Arbeiten beobachtete differenzielle Induktion von TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2 unter Behandlung mit Antiöstrogenen konnte bestätigt werden (Knabbe et al., 1996). Die ausschließliche Induktion von TGF $\beta$ 2 scheint ein Antiöstrogen-spezifischer Effekt zu sein. Das Cytokin IL-1 $\beta$  induziert z.B. sowohl TGF $\beta$ 1 als auch TGF $\beta$ 2, mit einer geringer ausgeprägten Wirkung auf TGF $\beta$ 2 (Offner et al., 1996).

Die differentielle Induktion von TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2 ist auf die unterschiedliche Struktur der Promotoren zurückzuführen. Der TGF $\beta$ 1-Promotor ist gekennzeichnet durch das Fehlen einer TATAA-Box und die Anwesenheit vieler regulatorischer Bereiche, in denen u.a. Transkriptionsfaktoren der jun- und fos-Familien binden können (Kim et al., 1989). Der TGF $\beta$ 2 Promotor besitzt eine TATAA-Box und enthält als hauptregulatorisches Element eine CRE-ATF Bindungsstelle (O'Reilly et al., 1992).

Für TGF $\beta$ 1 wurde zusätzlich ein autoinduktorischer Regelkreis beschrieben (Kim et al., 1989). Da Antiöstrogene TGF $\beta$ 1 aktivieren (Knabbe et al., 1996), ist es merkwürdig, dass unter der Behandlung mit Antiöstrogenen nicht auch eine Induktion von TGF $\beta$ 1 auf der mRNA-Ebene zu beobachten ist. Wie die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit dem TGF $\beta$ -sensitiven Reporterplasmid p3TP-lux zeigen, sollte eine ausreichende Menge aktiven TGF $\beta$ s vorhanden sein. Der 3TP-lux-Promotor wird durch Antiöstrogene 2fach stärker aktiviert als durch 100 pM TGF $\beta$ 1. Yue et al. (2000) konnten zeigen, dass an der Aktivierung des TGF $\beta$ 1-Promotors durch TGF $\beta$  MAP-Kinase-Signaltransduktionswege (Erk und SAPKs) beteiligt sind, die über Aktivierung der AP-1 Transkriptionsfaktoren JunD und Fra-2 die mRNA-Synthese induzieren (Yue and Mulder, 2000). MAP-Kinase-Wege werden jedoch auch über den Östrogenrezeptor beeinflusst. Der aktive Östrogenrezeptor kann über direkte Bindung an Src Ras/Erk-Signaltransduktionskaskaden aktivieren; Antiöstrogene inhibieren diesen Effekt (Migliaccio et al., 1996). Transkriptionsfaktoren, die für die Induktion von TGF $\beta$

## *DISKUSSION*

notwendig sind, werden möglicherweise durch Antiöstrogene nicht aktiviert, so dass eine Autoinduktion nicht stattfinden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin der zeitliche Verlauf der Induktion von TGF $\beta$ 2 durch ICI 182.780 und 4-Hydroxytamoxifen verglichen und ein deutlicher Unterschied beobachtet: Unter Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen wurde TGF $\beta$ 2 kontinuierlich bis zum 5. Tag induziert. ICI 182.780 hingegen bewirkt bis zum dritten Tag nach der Behandlung nur eine leichte Induktion der mRNA; erst nach dieser Anlaufphase erfolgte dann ein sehr schneller Anstieg der Induktion.

Bereits auf der Ebene des Östrogenrezeptors zeigen ICI 182.780 und 4-Hydroxytamoxifen deutlich unterschiedliche Wirkmechanismen. Das nicht-steroidale 4-Hydroxytamoxifen ist ein partieller Antagonist und beeinflusst nur eine der zwei transaktivierenden Funktionen des Östrogenrezeptors, das steroidale ICI 182.780 hingegen bewirkt eine komplette Inaktivierung beider Funktionen (McDonnell et al., 1995). Zusätzlich ist die Wirkung der steroidalen und nicht-steroidalen Antiöstrogene antagonistisch. Bei gleichzeitiger Behandlung neutralisiert 4-Hydroxytamoxifen die Wirkung von ICI 182.780 (Muller et al., 1998).

Die beobachteten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Induktion von TGF $\beta$ 2 sind wahrscheinlich auf diese unterschiedlichen Wirkmechanismen zurückzuführen. Erste Untersuchungen des TGF $\beta$ 2-Promotors bestätigen dies: 4-Hydroxytamoxifen aktiviert den Promotor von TGF $\beta$ 2 nur sehr schwach (ca. 1,5fach), die Induktion der mRNA (12fach) beruht daher wahrscheinlich hauptsächlich auf posttranskriptionellen Prozessen. ICI 182.780 hingegen bewirkt eine über 10fache Aktivierung (persönliche Mitteilung J. Beisner) des Promotors. Die Induktion der mRNA (60fach) ist also überwiegend auf eine Steigerung der Transkriptionsrate zurückzuführen.

Werden MCF-7 Zellen länger als 5 Tage mit 4-Hydroxytamoxifen oder ICI 182.780 behandelt, fällt die Induktion der TGF $\beta$ 2 mRNA deutlich ab. Dieser Effekt ist auf einen Anstieg der TGF $\beta$ 2 mRNA in den unbehandelten Kontrollansätzen zurückzuführen. Die Kontrollzellen konnten im Gegensatz zu den behandelten Zellen ungehindert proliferieren und größere Zelldichten erreichen. Sowohl TGF $\beta$  als auch Zell-Zell-Kontakt führen über die Regulation der Bildung bzw. Aktivität von CyklinD2/Cdk-4

und Cyclin B1/Cdc-2 Komplexen zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1 Phase (Wu et al., 1996). TGF $\beta$ 2 wirkt in den Kontrollansätzen also unter Umständen als Vermittler des Zellzyklus-Arrests durch Kontaktinhibition.

#### *Antihormonelle Regulation der TGF $\beta$ -Rezeptoren I und II*

Mit Hilfe der quantitativen LightCycler PCRs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wirkung der Antiöstrogene nicht auf die Aktivierung bzw. Induktion der Liganden beschränkt ist. Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen oder ICI 182.780 wirkt sich auch auf den TGF $\beta$ -Rezeptor Typ II aus. Die Induktion von T $\beta$ RII spiegelt das wachstumsinhibitorische Potenzial der Antiöstrogene wider. 4-Hydroxytamoxifen bewirkt eine ca. 2fache und ICI 182.780 eine fast 6fache Induktion der T $\beta$ RII-mRNA. Die Expression von T $\beta$ RI hingegen ändert sich unter der Behandlung mit Antiöstrogenen nicht.

Die basale Expression von T $\beta$ RII ist im Vergleich zu T $\beta$ RI sehr niedrig. In MCF-7 Zellen finden sich nur etwa zwei Kopien T $\beta$ RII mRNA pro Zelle, aber mehr als 300 Kopien T $\beta$ RI mRNA. Die Erkennung und Bindung des aktiven Liganden erfolgt durch T $\beta$ RII. T $\beta$ RI bindet TGF $\beta$  nur in Verbindung mit dem Typ II Rezeptor (Wrana et al., 1994). Ein hohes Expressionsniveau von T $\beta$ RI bleibt in Abwesenheit von T $\beta$ RII ohne Effekt, sichert den Zellen aber eine hohe Flexibilität gegenüber der Wirkung von TGF $\beta$ . In Gegenwart von aktivem TGF $\beta$  kann bei ausreichender T $\beta$ RI-Menge schon ein geringer Anstieg der Expression von T $\beta$ RII zur vermehrten Bildung signalübertragender Komplexe führen und damit eine gesteigerte Sensitivität der Zellen gegenüber TGF $\beta$  bewirken.

#### *Antihormonelle Regulation des inhibitorischen Smad7*

Smad7 ist Teil eines negativen *Feedback-Loops*, über den die Dauer des TGF $\beta$ -Signals reguliert werden kann. Smad7 wird durch TGF $\beta$  induziert und verhindert kompetitiv die Bindung von Smad2 oder 3 an den aktiven Signalübertragungskomplex aus T $\beta$ RI und T $\beta$ RII (Nakao et al., 1997a).

## *DISKUSSION*

Da die Behandlung mit Antiöstrogenen zu einer Aktivierung von TGF $\beta$  führt, lag die Vermutung nahe, dass Antiöstrogene indirekt auch eine Induktion von Smad7 bewirken. Die Ergebnisse der quantitativen LightCycler PCRs zeigen jedoch, dass 4-Hydroxytamoxifen keine Auswirkung auf die mRNA-Expression von Smad7 hat. Auch ICI 182.780 bewirkt trotz starker Aktivierung von TGF $\beta$  nur eine geringe Induktion von Smad7.

Der TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweg ist stark verzweigt und unterliegt vielen regulatorischen Einflüssen (Engel et al., 1998). Für die Aktivierung einer Reihe TGF $\beta$  abhängiger Promotoren, ist eine Kooperation zwischen dem Smad2/3-Smad4-Komplex und weiteren Transkriptionsfaktoren, die u.a. über MAP-Kinase-Signalkaskaden aktiviert werden, essentiell. Auch für den Smad7-Promotor wurde eine solche Kooperation beschrieben: An der Induktion von Smad7 sind ein Smad-Binding-Element, sowie AP-1- und Sp1-Elemente beteiligt (Brodin et al., 2000; Nagarajan et al., 1999). Die Überexpression von dominant-negativen JNK oder c-Jun führte zu einer Abschwächung der Induktion von Smad7 durch TGF $\beta$  (Uchida et al., 2001).

Die Aktivierung von Smad7 zeigt Parallelen zur Autoinduktion von TGF $\beta$ 1, an der ebenfalls AP-1-Elemente beteiligt sind. Die Inhibition von Erk-Signaltransduktionswegen durch Antiöstrogene und eine dadurch fehlende Aktivierung beteiligter Transkriptionsfaktoren könnte auch bei Smad7 ein Grund für die nicht vorhandene Aktivierung sein.

### *Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII durch Tamoxifen-Metabolite*

Tamoxifen unterliegt einem umfangreichen Metabolismus durch Cytochrom P-450 Enzyme. Bislang war nur die Wirkung von 4-Hydroxytamoxifen auf die Induktion von TGF $\beta$  bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun auch die Wirkung weiterer Tamoxifen-Metabolite auf die Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass 4-Hydroxytamoxifen der einzige Tamoxifen-Metabolit ist, der eine starke Induktion des TGF $\beta$  Systems bewirkt. Tamoxifen, N-Desmethyltamoxifen und Tamoxifen-N-oxid haben nur einen schwachen Effekt, N-Didesmethyltamoxifen und  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen gar keinen. Es konnte gezeigt werden,

dass die Fähigkeit der Tamoxifen-Metabolite TGF $\beta$ 2 oder T $\beta$ RII zu induzieren gut mit ihrer wachstumshemmenden Wirkung korreliert ( $p < 0,0001$ ).

Grundlage für die uneinheitliche Wirkung der Metabolite ist wahrscheinlich ihre sehr unterschiedliche Affinität zum Östrogenrezeptor. Die stärkste Bindungsaffinität, vergleichbar mit der von 17 $\beta$ -Östradiol, hat 4-Hydroxytamoxifen. Tamoxifen bindet den Östrogenrezeptor ca. 25-50fach schwächer und N-Desmethyltamoxifen hat nur 1% der Affinität von Tamoxifen (Fabian et al., 1981). Die Bindungsaffinitäten der anderen Substanzen sind nicht bekannt.

Die Untersuchungen zur antihormonellen Regulation des TGF $\beta$ -Systems zeigen einen sehr weitreichenden Einfluss der Antiöstrogene auf die TGF $\beta$ -Signaltransduktion: Antiöstrogene aktivieren TGF $\beta$ 1 und induzieren die Expression von TGF $\beta$ 2, gleichzeitig erhöhen sie über die Induktion von T $\beta$ RII die Sensitivität der Zellen gegenüber dem zuvor aktivierten TGF $\beta$ . Die unterdrückte Induktion von Smad7 ermöglicht zusätzlich, dass TGF $\beta$ -Signale über einen längeren Zeitraum in die Zellen weitergeleitet werden können. Diese regulatorischen Einflüsse der Antiöstrogene sollten daher optimale Voraussetzungen für die Wirkung von TGF $\beta$  schaffen. Der Zusammenhang zwischen der Stärke der Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII und dem wachstumshemmenden Potential der Antiöstrogene bestätigt diese Vermutung.

## 7.2 Beteiligung von TGF $\beta$ an der antihormonellen Wirkung

Im zweiten Teil der Arbeit sollte geklärt werden, welchen Anteil TGF $\beta$  an der wachstumsinhibitorischen Wirkung der Antiöstrogene hat und welche Zweige des komplexen TGF $\beta$ -Signaltransduktions-Systems durch Antiöstrogene aktiviert werden.

Als Endpunkt der TGF $\beta$ -Wirkung wurde die Aktivierung TGF $\beta$ -sensitiver Reporterplasmide und die antihormonelle Wachstumsinhibition untersucht.

### *Antiöstrogen-vermittelte Aktivierung TGF $\beta$ -sensitiver Reporterplasmide*

p3TP-lux und p6SBE sind Standard-Reporterplasmide für die Untersuchung TGF $\beta$ -abhängiger Effekte. Der p3TP-lux Promotor besteht aus drei hintereinander geschalteten TRE-Sequenzen (*TPA Responsive Element*, TPA: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) und einem Fragment des PAI-1-Promotors. Die PAI-1 Promotor Sequenz enthält drei AP-1 Bindungsstellen (Keeton et al., 1991) und ein *Smad Binding Element* (Dennler et al., 1998). Sowohl die TRE-Sequenzen als auch das PAI-1-Fragment können durch TGF $\beta$  aktiviert werden (de Groot and Kruijer, 1990; Wrana et al., 1992). p6SBE besteht aus sechs Kopien eines spezifischen *Smad Binding Elements* (5'-GTCTAGAC-3') (Zawel et al., 1998).

Die Aktivierung von p3TP-lux kann sowohl durch TGF $\beta$  als auch durch andere Substanzen, wie z.B. TPA erfolgen. p6SBE hingegen ist durch den sehr einfachen Aufbau des Promotors nur über Smad-vermittelte TGF $\beta$ -Signaltransduktionswege aktivierbar.

p3TP-lux und p6SBE wurden durch TGF $\beta$  nur über einen sehr kurzen Zeitraum aktiviert. Die stärkste Induktion wurde 24 h nach der Behandlung beobachtet und war bereits 24 h später nicht mehr nachweisbar. Die Aktivierung von p3TP-lux (3,7fach) war deutlich stärker als die Aktivierung von p6SBE (1,5fach).

Die Aktivierung der Reporterplasmide durch Antiöstrogene wurde 120 h nach der Behandlung gemessen. Zu diesem Zeitpunkt war aufgrund der LightCycler Daten mit der stärksten Aktivierung des TGF $\beta$ -Systems zu rechnen.

Wie aufgrund der Untersuchungen zur antihormonellen Induktion des TGF $\beta$ -Systems erwartet werden konnte, bewirkten 4-Hydroxytamoxifen und ICI 182.780 eine stärkere Induktion des p3TP-lux-Promotors als TGF $\beta$ . 4-Hydroxytamoxifen aktiviert p3TP-lux

ca. 2fach, ICI 182.780 ca. 2,5fach stärker als TGF $\beta$ . p6SBE wurde durch 4-Hydroxytamoxifen genauso stark aktiviert wie durch TGF $\beta$ . ICI 182.780 hatte einen etwas ausgeprägteren Effekt und bewirkte eine ca. 1,7fach stärkere Induktion des Promotors als TGF $\beta$ .

Die sehr schwache Aktivierung von p6SBE durch 4-Hydroxytamoxifen ist vermutlich unspezifisch, da der Effekt weder durch die Expression dominant-negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren noch durch dominant-negatives Smad4 aufgehoben werden konnte. Die Aktivierung von p6SBE durch ICI 182.780 hingegen ist TGF $\beta$ -abhängig und wird durch Expression dominant negativer TGF $\beta$ -Rezeptoren fast vollständig und durch Expression dominant-negativer Smad4-Proteine teilweise aufgehoben.

Überraschend war die Beobachtung, dass die Aktivierung von p3TP-lux durch ICI 182.780 nur geringfügig stärker war als die Aktivierung durch 4-Hydroxytamoxifen, obwohl ICI 182.780 einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Expression von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII hat. Dieser Effekt könnte, wie schon für TGF $\beta$ 1 und Smad7 postuliert, auf fehlende Aktivierung von Signaltransduktionswegen zurückzuführen sein, die für die vollständige Induktion der TGF $\beta$ -abhängigen Elemente im p3TP-lux-Promotor notwendig sind: Nach Aktivierung durch TGF $\beta$  können Smad3/Smad4-Komplexe sowohl an das *Smad Binding Element* als auch an die AP-1-Sequenzen im p3TP-lux-Promotor binden (Dennler et al., 1998; Yingling et al., 1997). Der Komplex aus Smad3 und Smad4 ist ausreichend, um nach Behandlung mit TGF $\beta$  die Transkription zu aktivieren. Zusätzlich kann der Smad3/Smad4-Komplex mit den Transkriptionsfaktoren des AP-1-Komplexes, c-Jun und c-Fos, kooperieren und die TGF $\beta$ -abhängige Transkription des Promotors verstärken (Yingling et al., 1997; Zhang et al., 1998).

Die Kotransfektionsexperimente mit den dominant-negativen TGF $\beta$ -Rezeptoren zeigen, dass die Induktion von p3TP-lux durch ICI 182.780 oder 4-Hydroxytamoxifen nahezu vollständig durch TGF $\beta$  vermittelt wird. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass aktive Smad3/Smad4 Komplexe an der Induktion des Promotors beteiligt sind. Eine vollständige Aktivierung wäre jedoch nur in Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos möglich. In MCF-7 Zellen wird die Transkription von c-fos durch 17 $\beta$ -Östradiol induziert. Die Induktion kann durch steroidale Antiöstrogene blockiert werden (Duan et al., 1998). Folglich könnte eine

## *DISKUSSION*

fehlende Induktion von c-Fos eine Ursache für die relativ geringe Induktion von p3TP-lux durch ICI 182.780 darstellen.

### *Beteiligung von Smad4 an der antihormonellen Wirkung*

Der zur Zeit am genauesten untersuchte TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweg ist der Smad-Weg. Dieser ist jedoch nicht der einzige Signaltransduktionsweg, der durch TGF $\beta$  aktiviert wird (Frey and Mulder, 1997b), und die Aktivierung von Genen durch TGF $\beta$  kann auch ohne die Beteiligung von Smad-Proteinen erfolgen (Hocevar et al., 1999). Es stellte sich daher die Frage, welchen Anteil der Smad-Signaltransduktionsweg an der antihormonellen Wirkung hat. Die Induktion von p3TP-lux und p6SBE weist bereits darauf hin, dass dieser Signaltransduktionsweg durch Antiöstrogene aktiviert wird.

Über die Expression dominant-negativer Smad4-Proteine sollte die genaue Beteiligung des Signaltransduktionsweges untersucht werden. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Smad4-Konstrukte verwendet: Smad4 dM und dN. In Smad4 dM ist die p300 abhängige Transaktivierungs-Domäne deletiert. Smad4 dN fehlt die gesamte N-terminale MH1-Domäne mit den DNA-bindenden Bereichen (de Caestecker et al., 1997; de Caestecker et al., 2000).

Die Kofunktions von p3TP-lux und Smad4 dM führte zu einer deutlichen Reduktion der Aktivierung von p3TP-lux durch 4-Hydroxytamoxifen und ICI 182.780, Smad4 dN hingegen hatte nur eine geringe Auswirkung. Die Aktivierung des Promotors beruht also zu einem großen Teil auf der transaktivierenden Funktion von Smad4. Die Expression von Smad4 dM reduziert die Aktivierung durch beide Antiöstrogene auf den gleichen Wert, eine vollständige Aufhebung wird jedoch nicht erreicht. Dies lässt darauf schließen, dass weitere Transkriptionsfaktoren an der Aktivierung beteiligt sind. Am ehesten kommen Smad2 und Smad3 in Frage, da Smad4 nur im Komplex mit diesen Proteinen in den Zellkern gelangen kann (Nakao et al., 1997b), aber auch die Beteiligung von AP-1-Transkriptionsfaktoren kann nicht ausgeschlossen werden (Liberati et al., 1999; Zhang et al., 1998).

Die schwache Wirkung von Smad4 dN weist darauf hin, dass eine direkte Bindung von Smad4 an die DNA für die Vermittlung der antiöstrogenen Wirkung nicht unbedingt erforderlich ist. Smad4 kann im Komplex mit Smad2 oder Smad3 vorliegen (Nakao et al., 1997b). Smad2 hat eine Insertion in der DNA-bindenden Domäne, welche die

direkte Bindung an DNA verhindert (Lagna et al., 1996). Smad3 kann wie Smad4 DNA binden, beide Proteine zeigen aber unterschiedliche Bindungsspezifitäten. Smad3 und Smad4 binden an das *Smad Binding Element* (Zawel et al., 1998), aber nur Smad3 bindet auch an AP-1-Sequenzen (Zhang et al., 1998). Die Bindung von Smad4 dN kann daher entweder im Komplex mit Smad3 erfolgen oder in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren, z.B. aus dem AP-1 Komplex. Da c-fos allein DNA nicht bindet (Angel and Karin, 1991), kommt als weiterer Bindungspartner in erster Linie c-Jun in Frage. Sowohl Smad3 als auch Smad4 können mit allen Mitgliedern der Jun-Transkriptionsfaktor-Familie Bindungen eingehen (Liberati et al., 1999).

Für die Aktivierung von p6SBE durch ICI 182.780 ergibt sich ein umgekehrtes Bild: Smad4 dM hat eine nur schwach inhibierende Wirkung auf die Induktion von p3TP-lux, die transaktivierende Funktion muss von einem anderen Transkriptionsfaktor stammen. Fehlende Bindung von Smad4 an die DNA bewirkt hingegen eine stärkere Inhibition des Reporters. Im Promotorkontext des *Smad Binding Elements* hat Smad4 daher offensichtlich seine Hauptfunktion als DNA-bindender Partner. Die vollständige Abwesenheit von Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren lässt darauf schließen, dass die Transaktivierung durch Smad2 oder Smad3 erfolgt.

Die Untersuchungen zur Aktivierung der TGF $\beta$ -sensitiven Reporterplasmide zeigen, dass ein Großteil der antiöstrogenen Wirkung durch TGF $\beta$  vermittelt wird und über den Smad-Signaltransduktionsweg verläuft. Da aber weder die dominant negativen Rezeptoren noch die dominant negativen Smad4-Proteine eine vollständige Aufhebung der antiöstrogeninduzierten p3TP-lux Aktivierung bewirken, kann eine Beteiligung weiterer Signaltransduktionswege nicht ausgeschlossen werden.

#### *Beteiligung von TGF $\beta$ an der antihormonellen Wachstumsinhibition*

Die in den vorangehenden Versuchen verwendeten Reporterplasmide basieren auf synthetischen Promotoren, die am ehesten dem Bereich der extrazellulären Matrix zuzuordnen sind. Endpunkt der antiöstrogenen Wirkung ist jedoch die Wachstumsinhibition. Für die Untersuchung zur Beteiligung von TGF $\beta$  an der

## *DISKUSSION*

antihormonellen Wachstumsinhibition wurde daher die Änderung der Zellzahl als Marker verwendet.

Die Signaltransduktionswege wurden über die Expression der bereits beschriebenen dominant-negativen Proteine spezifisch gehemmt und ihre Beteiligung an der antihormonellen Wachstumsinhibition analysiert. Da signifikante Wachstumsunterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen erst ca. fünf Tage nach der Behandlung mit Antiöstrogenen auftraten, wurden die MCF-7 Zellen stabil transfiziert.

Da TGF $\beta$  wachstumsinhibitorisch auf MCF-7 Zellen wirkt, konnte davon ausgegangen werden, dass eine Inhibition von TGF $\beta$ -Signaltransduktionswegen den Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen würde. Eine stabile Transfektion der dominant-negativen Konstrukte erschien daher unproblematisch. Dies war jedoch nicht der Fall: Nur dKT $\beta$ RI ließ sich gut in MCF-7 Zellen transfizieren. Von Smad4 dN konnten lediglich vier und von dKT $\beta$ RII drei stabil transfizierte Klone isoliert werden. Dominant negatives Smad4 dM ließ sich gar nicht stabil transfizieren.

Alle vier Konstrukte basieren auf dem gleichen Expressionsvektor pcDNA3, die Grundbedingungen waren daher in allen stabilen Transfektionen gleich. In transienten Transfektionen konnten die vier dominant-negativen Proteine sehr spezifisch und auf hohem Niveau in MCF-7 Zellen exprimiert werden, so dass Fehler in den Konstrukten ausgeschlossen werden können. Die geringe Effizienz der stabilen Transfektionen ist daher vermutlich auf negative Auswirkungen der Inhibition des TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweges zurückzuführen. TGF $\beta$  ist ein Wachstumsfaktor, der an der Regulation vieler unterschiedlicher Funktionen der Zellen beteiligt ist (Roberts, 1998). Die Kontrolle der Proliferation ist hierbei nur ein Aspekt. Die Inhibition des TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweges in MCF-7 Zellen wirkt sich daher sicherlich nicht nur auf die Kontrolle der Proliferation sondern auch auf weitere zelluläre Prozesse aus, die offensichtlich für das Überleben von entscheidender Bedeutung sind. Möglicherweise geht den Zellen durch die Inhibition des TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweges die Fähigkeit zu klonalem Wachstum verloren.

Die im Vergleich zu den anderen dominant-negativen Proteinen sehr effizient verlaufene Transfektion von dKT $\beta$ RI hängt vermutlich mit dem hohen basalen

Expressionsniveau des Rezeptors zusammen. Um die Wirkung des endogenen T $\beta$ RI vollständig zu blockieren, müsste das dominant-negative Protein sehr hoch exprimiert werden.

Die unterschiedliche Transfektionseffizienz der zwei Smad4-Konstrukte hängt wahrscheinlich mit dem Wirkmechanismus von Smad4 zusammen: Da Smad4 auch über Smad3 oder andere Transkriptionsfaktoren an DNA binden kann (Johnson et al., 1999; Shioda et al., 1998), kommt der dominant-negative Effekt von Smad4 dN nur dann voll zum Tragen, wenn die Smad4-vermittelte DNA-Bindung für die Wirkung entscheidend ist. Fehlt hingegen die transaktivierende Funktion von Smad4 (Smad4 dM), hat dieses offensichtlich weiter reichende Auswirkungen.

### *Beteiligung von T $\beta$ RI, T $\beta$ RII und Smad4 an der antihormonellen Wachstumsinhibition*

Um die Beteiligung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion an der antihormonellen Wachstumsinhibition zu untersuchen, musste zunächst sichergestellt werden, dass die Expression der dominant-negativen Rezeptoren und Smad4-Proteine auch tatsächlich zu einer Inhibition der TGF $\beta$ -Wirkung führt. Dies konnte in Proliferationsassays bestätigt werden. Zusätzlich fiel auf, dass die stabil transfizierten Klone unbehandelt im Vergleich zu den Kontrollklonen (stabil transfiziert mit dem leeren Vektor pcDNA3) deutlich schneller wuchsen. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf das Zellkulturmedium zurückzuführen. Im Serum vorhandenes TGF $\beta$  hemmt das Wachstum der Kontrollzellen, hat aber keinen Effekt auf die stabil transfizierten Klone, in denen der TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweg ausgeschaltet ist.

Überraschenderweise hatte die Inhibition der TGF $\beta$ -Signaltransduktionswege keinerlei Auswirkungen auf die wachstumsinhibitorische Wirkung der Antiöstrogene. Als Ursache hierfür kam ein zu niedriges Expressionsniveau der dominant-negativen Konstrukte in Frage. Die Untersuchungen zur antihormonellen Regulation des TGF $\beta$ -Systems und die Versuche mit den TGF $\beta$ -sensitiven Reporterplasmiden zeigen, dass Antiöstrogene eine starke Induktion des TGF $\beta$ -Systems bewirken und die Zellen für die Wirkung von TGF $\beta$  sensitivieren. Der Promotor des Expressionsvektors pcDNA3 unterliegt jedoch keiner hormonellen Kontrolle. Unter antihormoneller Behandlung

## *DISKUSSION*

wird daher zwar das endogene TGF $\beta$ -System hochreguliert, das Expressionsniveau der dominant-negativen Konstrukte hingegen bleibt konstant und reicht nicht mehr aus für eine vollständige Aufhebung der TGF $\beta$ -Wirkung. Diese Vermutung wurde mit Hilfe des Reporterplasmids p3TP-lux überprüft.

In den transienten Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Antiöstrogene p3TP-lux aktivieren und dass die Koexpression der dominant-negativen TGF $\beta$ -Rezeptoren oder Smad4 Proteine zu einer Reduktion dieser Aktivierung führt. Ist die Expression der stabil transfizierten Konstrukte ausreichend hoch, um antiöstrogene TGF $\beta$  Wirkungen zu hemmen, sollte p3TP-lux in diesen Zellen unter Behandlung mit Antiöstrogenen schwächer aktiviert werden als in den Kontrollklonen. Dieses ist jedoch nicht der Fall. Die Versuche zeigen, dass weder das Expressionsniveau der dominant-negativen Rezeptoren noch des dominant negativen Smad4 ausreichen, um die antihormonelle Aktivierung von p3TP-lux zu hemmen.

Die Inhibition von TGF $\beta$ -Signaltransduktionswegen in Mammakarzinomzellen durch stabile Expression dominant-negativer Proteine scheint daher ungeeignet, um antihormonelle Effekte zu untersuchen. Das hohe Expressionsniveau der dominant-negativen Proteine, welches benötigt wird, um antihormonelle Wirkungen zu unterbinden, kann nicht erreicht werden, da es sich offensichtlich negativ auf das Überleben der Zellen auswirkt.

Dieses Problem könnte unter Umständen mit Hilfe eines induzierbaren Vektorsystems umgangen werden, mit dem die stabile Transfektion bei ausgeschalteter Expression und die nachfolgenden Versuche bei angeschalteter Expression durchgeführt werden können. Die Selektion im Anschluss an die Transfektion wäre dann ausschließlich abhängig vom Resistenzmarker des Expressionsvektors und nicht vom transfizierten Genkonstrukt. Kontinuierlich induzierbare Promotoren bieten schließlich noch die Möglichkeit, das Expressionsniveau des stabil transfizierten Konstrukts zu steuern und den jeweiligen Versuchsbedingungen anzupassen. Die Etablierung eines induzierbaren Vektorsystems ist jedoch schwierig und sehr zeitaufwendig. Eine weniger aufwendige Lösung bieten transiente Transfektionen mit Reporterplasmiden, die auf Promotoren von Zellzyklus-Genen basieren, z.B. Cyclin A oder p21. Auf diesem Weg können jedoch nur einzelne Aspekte der Zellzyklusregulation untersucht werden und nicht der Endpunkt der Wachstumsinhibition.

*Beteiligung von MAP-Kinase-Wegen an der antihormonellen Wachstumsinhibition*

MAP-Kinase-Kaskaden können sowohl durch TGF $\beta$  (Mulder, 2000) als auch durch Hormone aktiviert werden (Migliaccio et al., 1998). Die Aktivierung von Erk und JNK wurde in Mammakarzinomzelllinien im Zusammenhang mit der wachstumsinhibitorischen Wirkung von TGF $\beta$  beschrieben (Frey and Mulder, 1997a; Frey and Mulder, 1997b), eine Beteiligung dieses Weges an der antihormonellen Wachstumsinhibition könnte daher möglich sein. Erk kann in MCF-7 Zellen jedoch auch durch Östradiol aktiviert werden (Migliaccio et al., 1996), was gegen eine Beteiligung an der antihormonellen Wirkung sprechen würde.

Die Aktivierung des p38 MAP-Kinasewegs kann die Induktion TGF $\beta$ -abhängiger Gene verstärken (Hanafusa et al., 1999; Watanabe et al., 2001). p38 entfaltet seine Wirkung u.a. über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2. Smad3/4-Komplexe können mit ATF-2 interagieren und die Transaktivierungsaktivität von ATF-2 steigern (Sano et al., 1999). In Mammakarzinomzellen ist p38 an der wachstumsinhibitorischen Wirkung von Aktivin, einem Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie, beteiligt (Cocolakis et al., 2001).

Es stellte sich daher die Frage, ob Antiöstrogene direkt oder TGF $\beta$ -vermittelt über die Aktivierung von MEK/Erk- oder p38-Kinase-Kaskaden ihre Wirkung ausüben.

Um diese Frage zu klären, wurden pharmakologische Inhibitoren eingesetzt, mit denen die Aktivität einzelner MAP-Kinasen spezifisch gehemmt werden kann, ohne dabei die Aktivität verwandter Kinasen zu beeinflussen (English and Cobb, 2002). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Spezifität der MAP-Kinase-Inhibitoren nur für eine relativ kleine Gruppe von Kinasen tatsächlich getestet wurde (Davies et al., 2000) und ihr Wirkspektrum unter Umständen größer ist als momentan angenommen wird.

Zunächst wurde die Beteiligung der MAP-Kinase-Kaskaden an der antihormonellen Wachstumsinhibition untersucht:

Die spezifische Hemmung von MEK1 und MEK2 durch die Inhibitoren PD98059 und U0126 hatte keine Auswirkung auf die wachstumsinhibitorische Wirkung der Antiöstrogene. Gleichzeitige Behandlung der MCF-7 Zellen mit Antiöstrogenen und den p38-Inhibitoren SB203580 bzw. SB202190 bewirkte jedoch eine starke, signifikante Reduktion der inhibitorischen Wirkung von 4-Hydroxytamoxifen

## DISKUSSION

( $p < 0,0001$ ) und eine leichte, aber ebenfalls signifikante Reduktion der inhibitorischen Wirkung von ICI 182.780 ( $p < 0,0001$ ).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass p38- aber nicht MEK/Erk-Kinasekaskaden an der Vermittlung der antihormonellen Wachstumsinhibition beteiligt sind.

Die Untersuchungen zur Beteiligung von p38 an der antihormonellen Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII zeigen, dass die Reduktion der wachstumsinhibitorischen Wirkung der Antiöstrogene durch die p38 Inhibitoren mit einem Verlust der Induktion von TGF $\beta$ 2 und T $\beta$ RII einhergeht.

Im Promotor von TGF $\beta$ 2 befindet sich eine ATF-2 Bindungsstelle, die für die basale Expression des Gens eine entscheidende Rolle spielt (O'Reilly et al., 1992). Die Aktivierung von ATF-2 erfolgt über p38 (Li and Wicks, 2001). Die Induktion von TGF $\beta$ 2 durch Antiöstrogene könnte daher folgendermaßen ablaufen: Antiöstrogene aktivieren latentes TGF $\beta$ 1 über einen nicht transkriptionellen Mechanismus (Knabbe et al., 1996). Aktives TGF $\beta$ 1 aktiviert p38 und ATF-2 vermutlich über *TGF $\beta$  activated kinase 1* (TAK1) (Hanafusa et al., 1999). ATF-2 bewirkt dann letztendlich die Induktion von TGF $\beta$ 2 durch Bindung an den Promotor und Aktivierung der Transkription.

### 7.3 Schlussbetrachtung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$  in großem Umfang an der antihormonellen Wirkung beteiligt ist. Antiöstrogene induzieren nicht nur die Expression von TGF $\beta$ 2 sondern auch von T $\beta$ RII. Die Expression des inhibitorischen Smad7, das durch aktives TGF $\beta$  induziert werden kann, wird unter Behandlung mit Antiöstrogenen gar nicht oder nur sehr geringfügig aktiviert. Zusammen bewirken diese regulatorischen Einflüsse eine deutliche Sensitivierung der Zellen gegenüber antihormonell aktiviertem TGF $\beta$ .

Die Untersuchungen zur Beteiligung der TGF $\beta$  Signaltransduktionswege an der antihormonellen Wirkung weisen darauf hin, dass die beobachtete differenzielle Regulation durch die spezifische Aktivierung einiger TGF $\beta$  Signaltransduktionswege (Smad, p38) und die Inhibition anderer (MEK/Erk) erreicht wird. Antiöstrogene entfalten ihre Wirkung über TGF $\beta$  und verändern dabei gleichzeitig das TGF $\beta$ -Wirkspektrum.

Da die beteiligten Signaltransduktionswege in unterschiedlichem Ausmaß an der Aktivierung der verschiedenen Promotoren beteiligt sind, kommt es zu einer Abstufung der Genexpression unter antihormoneller Behandlung. Folgendes Bild zeichnet sich ab:

- Promotoren, an deren Aktivierung hauptsächlich Erk-Signaltransduktionswege beteiligt sind werden nicht aktiviert (TGF $\beta$ 1)
- Promotoren, an deren Aktivierung neben Erk- auch Smad-Signaltransduktionswege beteiligt sind werden teilweise aktiviert; die Stärke der Induktion hängt von der Aktivität des Smad-Signaltransduktionsweges ab (p3TP, Smad7)
- Promotoren, an deren Aktivierung p38-Signaltransduktionswege beteiligt sind werden stark aktiviert (TGF $\beta$ 2)

DISKUSSION

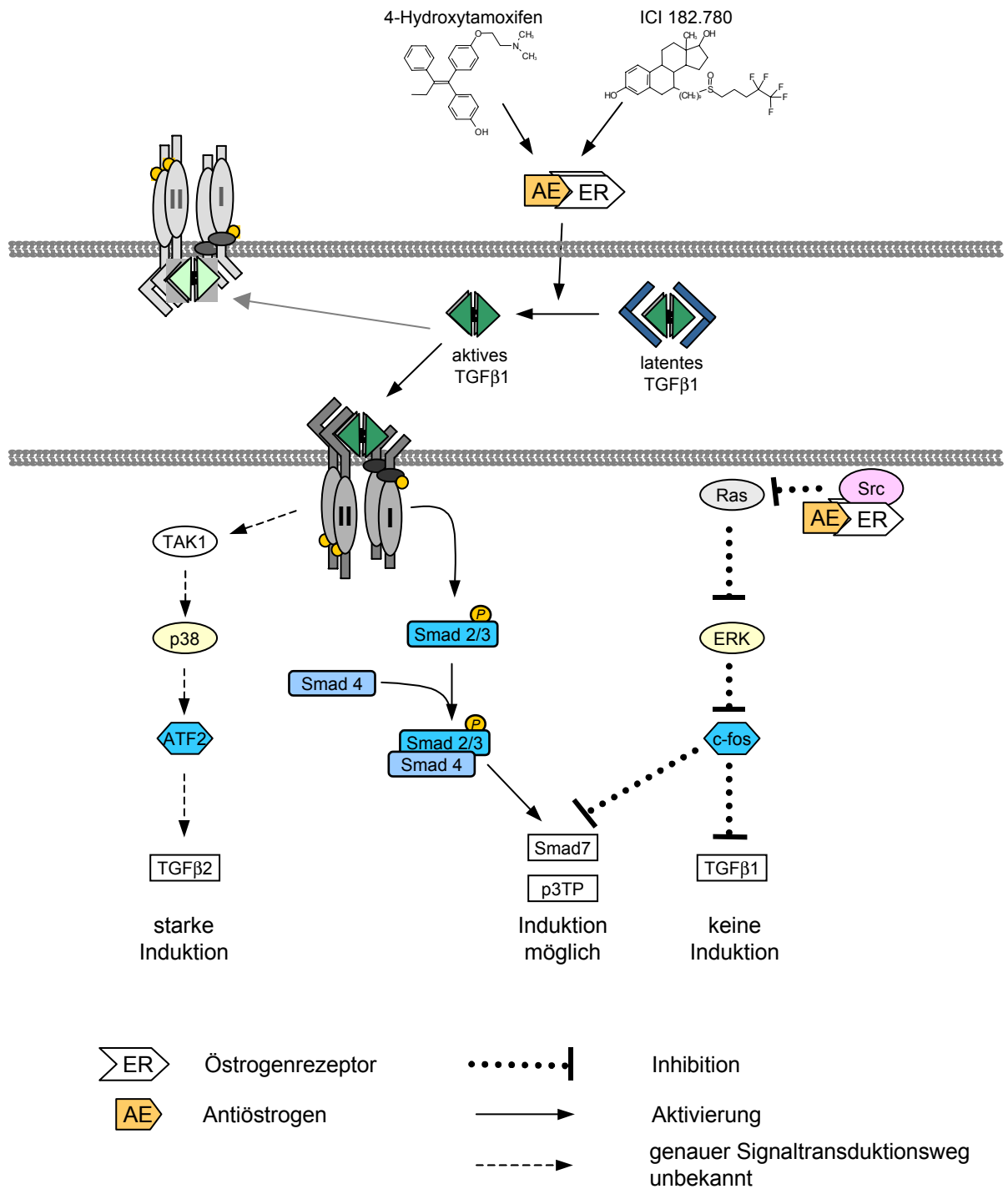


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagenen Beteiligung unterschiedlicher Signaltransduktionswege an der antihormonellen Wirkung.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abdollah, S., Macias-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1997) TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem*, **272**, 27678-27685.
- Angel, P. and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, **1072**, 129-157.
- Arbeitsgemeinschaft-Bevölkerungsbezogener-Krebsregister-in-Deutschland (ed.). (2002) *Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch-Institut, Saarbrücken.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L. and Arteaga, C.L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*, **275**, 36803-36810.
- Beekman, J.M., Allan, G.F., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1993) Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol*, **7**, 1266-1274.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brandt, S. (1998) TGF-beta 1 + 2-mRNA-Expression im Mammakarzinomgewebe und deren Beeinflussung durch Tamoxifen in vivo: Entwicklung einer PCR-gestützten Analyseverfahren und erste Ergebnisse. *Abteilung für Klinische Chemie, Medizinische Klinik*. Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg, p. 93.
- Brodin, G., Ahgren, A., ten Dijke, P., Heldin, C.H. and Heuchel, R. (2000) Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J Biol Chem*, **275**, 29023-29030.
- Brown, J.D., DiChiara, M.R., Anderson, K.R., Gimbrone, M.A., Jr. and Topper, J.N. (1999) MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, **274**, 8797-8805.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Calonge, M.J. and Massague, J. (1999) Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor-beta antiproliferative responses in colon cancer cells. *J Biol Chem*, **274**, 33637-33643.
- Cocolakis, E., Lemay, S., Ali, S. and Lebrun, J.J. (2001) The p38 MAPK pathway is required for cell growth inhibition of human breast cancer cells in response to activin. *J Biol Chem*, **276**, 18430-18436.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, **351**, 95-105.
- de Caestecker, M.P., Hemmati, P., Larisch-Bloch, S., Ajmera, R., Roberts, A.B. and Lechleider, R.J. (1997) Characterization of functional domains within Smad4/DPC4. *J Biol Chem*, **272**, 13690-13696.
- de Caestecker, M.P., Yahata, T., Wang, D., Parks, W.T., Huang, S., Hill, C.S., Shioda, T., Roberts, A.B. and Lechleider, R.J. (2000) The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem*, **275**, 2115-2122.
- de Groot, R.P. and Kruijer, W. (1990) Transcriptional activation by TGF beta 1 mediated by the dyad symmetry element (DSE) and the TPA responsive element (TRE). *Biochem Biophys Res Commun*, **168**, 1074-1081.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J.M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J*, **17**, 3091-3100.
- Duan, R., Porter, W. and Safe, S. (1998) Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology*, **139**, 1981-1990.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. and Miyazono, K. (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem*, **276**, 12477-12480.
- Engel, M.E., Datta, P.K. and Moses, H.L. (1998) Signal transduction by transforming growth factor-beta: a cooperative paradigm with extensive negative regulation [In Process Citation]. *J Cell Biochem Suppl*, **31**, 111-122.
- English, J.M. and Cobb, M.H. (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 40-45.

- Fabian, C., Tilzer, L. and Sternson, L. (1981) Comparative binding affinities of tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen, and desmethyltamoxifen for estrogen receptors isolated from human breast carcinoma: correlation with blood levels in patients with metastatic breast cancer. *Biopharm Drug Dispos*, **2**, 381-390.
- Franzen, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C.H. and Miyazono, K. (1993) Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell*, **75**, 681-692.
- Frey, R.S. and Mulder, K.M. (1997a) Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res*, **57**, 628-633.
- Frey, R.S. and Mulder, K.M. (1997b) TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells. *Cancer Lett*, **117**, 41-50.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Nishida, E. (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem*, **274**, 27161-27167.
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J. and Hemmati-Brivanlou, A. (1998) Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev*, **12**, 186-197.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L. and Falb, D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*, **89**, 1165-1173.
- Heldin, C.H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, **390**, 465-471.
- Hocevar, B.A., Brown, T.L. and Howe, P.H. (1999) TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J*, **18**, 1345-1356.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K. (1997) Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, **389**, 622-626.
- Janknecht, R., Wells, N.J. and Hunter, T. (1998) TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev*, **12**, 2114-2119.
- Johnson, K., Kirkpatrick, H., Comer, A., Hoffmann, F.M. and Laughon, A. (1999) Interaction of Smad complexes with tripartite DNA-binding sites. *J Biol Chem*, **274**, 20709-20716.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Jonat, W. (1991) Endokrine Therapie. In Schmidt-Matthiesen (ed.), *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe*. H. Urban & Schwarzenberg, Vol. 10, pp. 232-241.
- Jordan, V.C., Collins, M.M., Rowsby, L. and Prestwich, G. (1977) A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol*, **75**, 305-316.
- Jordan, V.C., Gapstur, S. and Morrow, M. (2001) Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1449-1457.
- Keeton, M.R., Curriden, S.A., van Zonneveld, A.J. and Loskutoff, D.J. (1991) Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta. *J Biol Chem*, **266**, 23048-23052.
- Kim, S.J., Jeang, K.T., Glick, A.B., Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1989) Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *J Biol Chem*, **264**, 7041-7045.
- 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.
- Knabbe, C., Kopp, A., Hilgers, W., Lang, D., Muller, V., Zugmaier, G. and Jonat, W. (1996) Regulation and role of TGF beta production in breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*, **784**, 263-276.
- Knabbe, C., Lippman, M.E., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Kasid, A., Derynck, R. and Dickson, R.B. (1987) Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell*, **48**, 417-428.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, **81**, 807-869.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. and Massague, J. (1996) Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*, **383**, 832-836.
- Le Dai, J., Turnacioglu, K.K., Schutte, M., Sugar, A.Y. and Kern, S.E. (1998) Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells. *Cancer Res*, **58**, 4592-4597.

- Li, H. and Wicks, W.D. (2001) Retinoblastoma protein interacts with ATF2 and JNK/p38 in stimulating the transforming growth factor-beta2 promoter. *Arch Biochem Biophys*, **394**, 1-12.
- Liberati, N.T., Datto, M.B., Frederick, J.P., Shen, X., Wong, C., Rougier-Chapman, E.M. and Wang, X.F. (1999) Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4844-4849.
- Lin, H.Y., Wang, X.F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A. and Lodish, H.F. (1992) Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase [published erratum appears in Cell 1992 Sep 18;70(6):following 1068]. *Cell*, **68**, 775-785.
- Lippman, M.E., Dickson, R.B., Bates, S., Knabbe, C., Huff, K., Swain, S., McManaway, M., Bronzert, D., Kasid, A. and Gelmann, E.P. (1986) 8th San Antonio Breast Cancer Symposium--Plenary lecture. Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **7**, 59-70.
- Liu, F., Hata, A., Baker, J.C., Doody, J., Carcamo, J., Harland, R.M. and Massague, J. (1996) A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator [see comments]. *Nature*, **381**, 620-623.
- Lyons, R.M. and Moses, H.L. (1990) Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem*, **187**, 467-473.
- McDonnell, D.P., Clemm, D.L., Hermann, T., Goldman, M.E. and Pike, J.W. (1995) Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol*, **9**, 659-669.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. and Auricchio, F. (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J*, **15**, 1292-1300.
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M. and Auricchio, F. (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *Embo J*, **17**, 2008-2018.
- Milano, G., Etienne, M.C., Frenay, M., Khater, R., Formento, J.L., Renee, N., Moll, J.L., Francoual, M., Berto, M. and Namer, M. (1987) Optimised analysis of tamoxifen and its main metabolites in the plasma and cytosol of mammary tumours. *Br J Cancer*, **55**, 509-512.
- Mulder, K.M. (2000) Role of ras and mapks in TGFbeta signaling [In Process Citation]. *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 23-35.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Mulder, K.M. and Morris, S.L. (1992) Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem*, **267**, 5029-5031.
- Muller, V., Jensen, E.V. and Knabbe, C. (1998) Partial antagonism between steroidal and nonsteroidal antiestrogens in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, **58**, 263-267.
- Nagarajan, R.P., Zhang, J., Li, W. and Chen, Y. (1999) Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J Biol Chem*, **274**, 33412-33418.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H. and ten Dijke, P. (1997a) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, **389**, 631-635.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C.H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997b) TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J*, **16**, 5353-5362.
- Offner, F.A., Feichtinger, H., Stadlmann, S., Obrist, P., Marth, C., Klingler, P., Grage, B., Schmahl, M. and Knabbe, C. (1996) Transforming growth factor-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. *Am J Pathol*, **148**, 1679-1688.
- O'Reilly, M.A., Geiser, A.G., Kim, S.J., Bruggeman, L.A., Luu, A.X., Roberts, A.B. and Sporn, M.B. (1992) Identification of an activating transcription factor (ATF) binding site in the human transforming growth factor-beta 2 promoter. *J Biol Chem*, **267**, 19938-19943.
- Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A. and Oft, M. (2000) TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev*, **14**, 3093-3101.
- Poon, G.K., Walter, B., Lonning, P.E., Horton, M.N. and McCague, R. (1995) Identification of tamoxifen metabolites in human Hep G2 cell line, human liver homogenate, and patients on long-term therapy for breast cancer. *Drug Metab Dispos*, **23**, 377-382.
- Roberts, A.B. (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*, **24**, 111-119.
- Roberts, A.B. and Sporn, M.B. (1990) *The transforming growth factor-beta*s. Springer Verlag, Heidelberg.

- Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L. and Doetschman, T. (1997) TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, **124**, 2659-2670.
- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. and Ishii, S. (1999) ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, **274**, 8949-8957.
- Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell*, **94**, 585-594.
- Shioda, T., Lechleider, R.J., Dunwoodie, S.L., Li, H., Yahata, T., de Caestecker, M.P., Fenner, M.H., Roberts, A.B. and Isselbacher, K.J. (1998) Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero- oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9785-9790.
- Souchelnytskyi, S., Tamaki, K., Engstrom, U., Wernstedt, C., ten Dijke, P. and Heldin, C.H. (1997) Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, **272**, 28107-28115.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-1416.
- Uchida, K., Suzuki, H., Ohashi, T., Nitta, K., Yumura, W. and Nihei, H. (2001) Involvement of MAP kinase cascades in Smad7 transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 376-381.
- Vindevoghel, L., Kon, A., Lechleider, R.J., Uitto, J., Roberts, A.B. and Mauviel, A. (1998) Smad-dependent transcriptional activation of human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, **273**, 13053-13057.
- Wang, X.F., Lin, H.Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H.F. and Weinberg, R.A. (1991) Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell*, **67**, 797-805.
- Watanabe, H., de Caestecker, M.P. and Yamada, Y. (2001) Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J Biol Chem*, **276**, 14466-14473.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **244**, 4406-4412.
- Wong, C., Rougier-Chapman, E.M., Frederick, J.P., Datto, M.B., Liberati, N.T., Li, J.M. and Wang, X.F. (1999) Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol*, **19**, 1821-1830.
- Wotton, D., Lo, R.S., Lee, S. and Massague, J. (1999) A Smad transcriptional corepressor. *Cell*, **97**, 29-39.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F. and Massague, J. (1992) TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, **71**, 1003-1014.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massague, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, **370**, 341-347.
- Wu, F., Buckley, S., Bui, K.C., Yee, A., Wu, H.Y., Liu, J. and Warburton, D. (1996) Cell cycle arrest in G0/G1 phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells. *Am J Physiol*, **270**, L879-888.
- Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y.I. and Lodish, H.F. (2000) A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7853-7858.
- Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M. and Miyazono, K. (1999) Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem*, **274**, 703-709.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*, **270**, 2008-2011.
- Yingling, J.M., Datto, M.B., Wong, C., Frederick, J.P., Liberati, N.T. and Wang, X.F. (1997) Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 7019-7028.
- Yue, J. and Mulder, K.M. (2000) Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a smad-dependent pathway [In Process Citation]. *J Biol Chem*, **275**, 30765-30773.
- Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Kern, S.E. (1998) Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell*, **1**, 611-617.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A. and Derynck, R. (2001) Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 974-979.
- Zhang, Y., Feng, X.H. and Derynck, R. (1998) Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature*, **394**, 909-913.
- Zugmaier, G., Ennis, B.W., Deschauer, B., Katz, D., Knabbe, C., Wilding, G., Daly, P., Lippman, M.E. and Dickson, R.B. (1989) Transforming growth factors type beta 1 and beta 2 are equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol*, **141**, 353-361.

## *DANKSAGUNG*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie der Med. Klinik am Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg und am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart unter der Anleitung von Prof. Dr. C. Knabbe durchgeführt.

Das Projekt wurde von der DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel (Hamburg) und in der Einzelförderung (Kn 228/1-1) sowie von der Robert Bosch Stiftung (Stuttgart) gefördert.

## **9 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. C. Knabbe danke ich für die Überlassung des Themas, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit, die wertvollen Diskussionen und seine großzügige und unkomplizierte Hilfe bei allen aufgetretenen Problemen.

Herrn Prof. K. Pfizenmaier danke ich für sein Interesse und die Bereitschaft, die Betreuung der Arbeit von Seiten der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. M. Eichelbaum danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem hervorragend ausgestatteten Institut anfertigen zu können.

Frau S. Büstorf, Frau S. Laukemann und Frau T. Peußner danke ich besonders herzlich für die ausgezeichnete technische Unterstützung.

Herrn Dr. H. van der Kuip und Herrn Dr. T. Mürdter danke ich für ihre hilfreiche Unterstützung bei der Durchsicht des Manuskripts.

Frau B. Grage danke ich für die Einführung in die Methoden der Molekular- und Zellbiologie.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanken.