

Universität Ulm  
Abteilung Innere Medizin I  
Leiter Prof. Dr. G. Adler

**Untersuchungen zur Funktion und Regulation der  
TIEG2-vermittelten Repression des Smad7-Onkogens  
in epithelialen Zellen und im Pankreaskarzinom**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.) der Medizinischen  
Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
Ana Juracy Harth  
aus Belo Horizonte  
im Jahr 2004

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin**

**1. Berichtserstatter: Prof. Dr. Thomas Gress**

**2. Berichtserstatter: PD Dr. Nikolaus Marx**

**Tag der Promotion: 16. Dezember 2005**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
2.1. Genetische und epigenetische Ereignisse im Pankreaskarzinom .....	4
2.2. Transkriptionsfaktoren .....	6
2.3. Die Sp/KLFartigen Transkriptionsfaktoren .....	6
2.4. Smad7 .....	13
2.5. Alterationen der TGF $\beta$ -Signalkaskade im Tumor .....	14
2.6. Ziel dieser Arbeit .....	15
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
3.1. E. coli-Stämme .....	16
3.2. Zelllinien .....	16
3.3. Antikörper .....	18
3.4. Konstrukte .....	19
3.5. Wachstumsfaktoren und Inhibitoren .....	20
3.6. Primer .....	20
3.7. Chemikalien .....	20
3.8. radioaktiv markierte Nukleotide .....	20
3.9. Methoden im Umgang mit DNA .....	20
3.10. Methoden im Umgang mit RNA .....	21
3.11. Methoden im Umgang mit Proteinen .....	25
3.12. Protein-DNA-Interaktion .....	30
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1. TIEG2 hemmt die Smad7-Expression .....	34
4.2. Der Smad7-Promoter verfügt über vier potentielle TIEG2-Bindungsstellen ....	35
4.3. TIEG2 bindet den mSmad7-Promotor .....	36
4.4. TIEG2 hemmt den mSmad7-Promotor .....	37
4.5. Die TIEG2-vermittelte Repression ist abhängig von der Interaktion mit dem Korepressor Sin3A .....	37
4.6. Smad7 ist im Pankreaskarzinom überexprimiert .....	39
4.7. In Tumorzellen geht die TIEG2-vermittelte Repression verloren .....	40

4.8. Phosphorylierung von TIEG2 durch hyperaktives ERK verhindert in Panc1-Zellen die Bindung von Sin3A .....	42
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>48</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>57</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>BMP</b>	bone morphogenetic protein
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>BKLF</b>	basic krüppel-like factor
<b>BTEB</b>	basic transcription element binding protein
<b>CBP</b>	Creb-binding protein
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary cells
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>CaPo<sub>4</sub></b>	Calciumphosphat
<b>CtBP</b>	COOH-terminal binding protein
<b>DNA</b>	desoxyribonucleic acid
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen
<b>DTT</b>	Dithiotretiol
<b>ECACC</b>	European Collection of American Cellculture
<b>E.coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetaz
<b>EGR</b>	Early growth response factor
<b>EKLF</b>	Erythroid krüppel-like factor
<b>EMSA</b>	Electromobility Shift assay
<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FKLF</b>	Fetal $\beta$ -like globin activating krüppel-like factor
<b>GKLF</b>	Gut krüppel-like factor
<b>GST</b>	Glutathion-Sepharyl-Transferase

---

<b>HBS</b>	Hepes buffer saline
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	Human Embryonic Kidney cells
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinethan-Sulfonsäure
HRP	Horse radish peroxidase
<b>IKLF</b>	Intestinal krüppel-like factor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>KCl</b>	Kaliumcyanid
KKLF	Kidney krüppel-like factor
KLF	krüppel-like factor
<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertani-Medium
LKLF	Lung krüppel-like factor
<b>MAD</b>	Mothers against dpp.
MAPK	Mitogen-activated-protein-kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MH	Mad-homology
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
Ncor	Nuclear hormone receptor corepressor
<b>PAH</b>	Paired Amphipathic Helix
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pf1	PHD (plant homodomain) factor 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

---

<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
RNAsin	Rnase-inhibitor
R-Smad	Rezeptor-Smad
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
SID	Sin3A-interacting domain
Ski	Sloan-kettering institute proto-oncogene
SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor
SnoN	Ski-related novel gene (isoform N)
SP	Specificity protein
<b>T<math>\beta</math>R</b>	TGF $\beta$ -Rezeptor
TBS	tris buffered saline
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TIEG	TGF $\beta$ -inducible early response gene
Tris	Trisaminomethan
<b>UKLF</b>	Ubiquitous krüppel-like factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
<b>VEGF</b>	Vascular/endothelial growth factor
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
<b>w/v</b>	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
<b>ZF</b>	Zinkfinger

## 2. Einleitung

### 2.1. Genetische und epigenetische Ereignisse im Pankreaskarzinom

Charakteristikum der Tumorentstehung ist ein gestörtes Gleichgewicht zwischen wachstumsstimulierenden und –hemmenden Faktoren. Während in einer gesunden Zelle entsprechend den zellulären Bedürfnissen eine koordinierte Regulation des Zellzyklus stattfindet, ist diese Homöostase in Tumorzellen zu Ungunsten wachstumshemmender Faktoren gestört. Krebszellen zeichnen sich durch uneingeschränktes Wachstum aus und besitzen somit einen Wachstumsvorteil gegenüber gesunden Zellen. In den letzten beiden Dekaden ist es gelungen, die molekularen Grundlagen der Tumorentstehung besser verstehen zu lernen und die Bedeutung genetischer und epigenetischer Alterationen für die Entwicklung und das Wachstumsverhalten solider Tumore weiter zu analysieren. Ausdruck genetischer Veränderungen können sowohl aktivierende Mutationen ("gain of function mutants") von Protoonkogenen als auch inaktivierende Mutationen ("loss of function mutants") von Tumorsuppressorgenen sein. Aktivierende Mutationen von Protoonkogenen (die dadurch zu Onkogenen werden) spielen eine wichtige Rolle in der Transformation von Zellen, wobei die transformierenden Eigenschaften sowohl redundant, synergistisch oder Zelltyp-spezifisch erfolgen können. Durch inaktivierende Mutationen von Tumor-Suppressorgenen wird sowohl die Entstehung spontan auftretender wie auch hereditärer Tumoren gefördert (Sherr, 1996; Weinberg, 1991). Für den tatsächlichen Funktionsverlust eines Tumor-Suppressorgens ist die Inaktivierung beider Kopien notwendig. Deshalb besteht bei einem heterozygoten Verlust eines Tumor-Suppressorgens, dessen Phänotyp klinisch völlig unauffällig ist, ein erhöhtes Krebsrisiko: Eine Mutation im anderen Genlocus kann jedoch zum Ausfall des Gens führen ("loss of heterocycosity", LOH) und somit zur Krebsentstehung beitragen.

Im Pankreaskarzinom sind sowohl aktivierende Mutationen von Protoonkogenen als auch inaktivierende Mutationen von Tumorsuppressoren bekannt. Aktivierende Punktmutationen des K-ras Onkogens gelten als ein frühes Ereignis in der Karzinogenese des Pankreas und werden in über 90% der intraduktalen Pankreaskarzinome gefunden. Folge dieser aktivierenden Mutationen ist eine konstitutive Aktivierung der proliferativen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade und konsekutiv ein gesteigertes Zellwachstum. Ebenso von Bedeutung in der Entstehung



des Pankreaskarzinoms ist eine Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 und des Genlokus CDKN2A, der für die Tumorsuppressoren p16 und p14 kodiert. Inaktivierende Mutationen dieser wichtigen Zellzyklusregulatoren werden in über 80% der Karzinome gefunden und gehen ebenfalls mit einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen einher (Ellenrieder et al., 2002a; Schneider und Schmid, 2003). Mutationen von Onkogenen und Tumor-Suppressorgenen führen zu einer veränderten Aktivität wachstumsfördernder oder -hemmender Signalwege und beeinflussen den Aktivierungsstatus von Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits die Expression wichtiger Zellzyklus- oder Apoptose regulierender Gene kontrollieren.

Neben genetischen Veränderungen spielen auch epigenetische Ereignisse im Pankreaskarzinom eine entscheidende Rolle. Diese finden auf allen zellulären Ebenen statt und beeinflussen letztlich ebenfalls die funktionelle Antwort einer Zelle auf extrazelluläre oder intrazelluläre Signale. Hierzu zählen beispielsweise veränderte Methylierungs- und Acetylierungszustände kodierender DNA-Sequenzen sowie DNA-bindender Proteine (wie z.B. Histone), die Einfluss auf den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu definierten DNA-Abschnitten ausüben und somit die transkriptionell regulierte Prozesse modifizieren. Darüber hinaus führen post-translationelle Veränderungen von Rezeptoren, Signalmolekülen, Kinasen, Phosphatasen oder Transkriptionsfaktoren zu einer Änderung ihrer Aktivitäten und folgerichtig zu einer veränderten Antwort einer Tumorzelle auf intra- oder extrazelluläre Signale, und dies auf allen Ebenen von der Zelloberfläche bis in den Zellkern. Folge dieser gestörten Balance intrazellulärer Signalwege und transkriptioneller Mechanismen sind u.a. eine gesteigerte Expression mitogener Rezeptoren und deren Liganden wie der „epidermal growth factor“ (EGF-) Rezeptorfamilie oder eine Aktivierung wichtiger intrazellulärer Signalmoleküle, wie z.B. des Pi3K-Akt-Signalweges. Gesteigerte Aktivierung proliferativer Signalwege, wie z.B. des Pi3K-AKT-Signalweges oder der mitogenen Raf-MEK-ERK-Signalkaskade können mit einer dramatischen Störung der Funktion von Transkriptionsfaktoren einhergehen und somit Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen ausüben. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Auswirkung proliferativer Signalwege auf die Funktion wachstumshemmender Transkriptionsfaktoren. Jüngste Untersuchungen sprechen dafür, dass neben genetischen Alterationen von tumorsupprimierenden Transkriptionsfaktoren v.a. deren funktioneller Hemmung eine zentrale Bedeutung für das phänotypische Verhalten von Tumorzellen zukommt.

## **2.2. Transkriptionsfaktoren**

Entsprechend struktureller und funktioneller Homologien werden Transkriptionsfaktoren in verschiedene Familien unterteilt. Hierzu gehören beispielsweise Proteine der Helix-Loop-Helix Familie (z.B. E2A, Hairy und Id1), Leucine-Zipper Faktoren (z.B. Jun, Fos oder CREB) oder Zinkfinger-Proteine (Sp1-artige Proteine, Steroidhormonrezeptoren oder PPAR). Unterschieden werden Transkriptionsfaktoren zusätzlich in ubiquitäre oder Signalkaskaden-regulierte Proteine. Allen gemeinsam sind drei Merkmale, die einen Transkriptionsfaktor als solchen charakterisieren:

1. eine konstitutive oder induzierte nukleäre Lokalisation,
2. eine DNA-Bindungsdomäne und
3. eine Transaktivierungsdomäne.

Die Transkriptionsaktivität eines Transkriptionsfaktors wird durch eine Vielzahl von Faktoren kontrolliert, die Einfluss auf die DNA-Bindungsaffinität oder die Aktivität der transkriptionsregulierenden Domäne nehmen. Hierzu zählen Partnerproteine, die entweder selbst Transkriptionsfaktoren darstellen oder auch Kofaktoren, die zwar selbst keine DNA-Bindungsaktivität besitzen, aber den Zugang eines Transkriptionsfaktors zur DNA modulieren. Handelt es sich bei diesem Kofaktor um einen Koaktivator, so unterstützt er die Transkriptionsaktivität entweder durch eine gesteigerte DNA-Bindung, oder er wirkt als Adapterprotein und ermöglicht der Transkriptionsmaschinerie über Histonacetylierung die erfolgreiche Initiierung der Transkription. Im Gegensatz zu Koaktivatoren ist über die Funktion von Korepressoren nur wenig bekannt, eine Modifikation des Histonacetylierungsstatus scheint aber auch hier von zentraler Bedeutung zu sein. Tatsächlich konnte für eine Reihe verschiedener Korepressoren eine Bindung an spezifischen Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, die mit einer Deacetylierung der Histone einherging. Einige Korepressoren liegen als große Multiproteinkomplexe vor und besitzen selbst Deacetylaseaktivität, andere scheinen über Bindung von Histondeacetylasen Einfluss auf die Repression der Genexpression auszuüben.

## **2.3. Die Sp/KLFartigen Transkriptionsfaktoren**

Die Familie der Sp/KLF-artigen Transkriptionsfaktoren gehört zu den Zinkfingerproteinen und wird in zwei Untergruppen unterteilt: die Sp-artigen Faktoren Sp1 bis Sp8 und die KLF-artigen Faktoren KLF1 bis KLF16. Allen gemeinsam ist eine

drei-Zinkfinger umfassende DNA-Bindungsdomäne, über die GC- oder GT reiche Promotersequenzen erkannt und gebunden werden. Putative Bindungsstellen für Sp/KLF-artige Transkriptionsfaktoren sind in einer Vielzahl von Genen vorhanden, die wichtige Funktionen in der Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Metabolismus ausüben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt unser Interesse insbesondere Proteinen der KLF-Subfamilie.

### 2.3.1. KLF-artige Transkriptionsfaktoren

Tabelle 1: Übersicht über die KLF-artigen Transkriptionsfaktoren

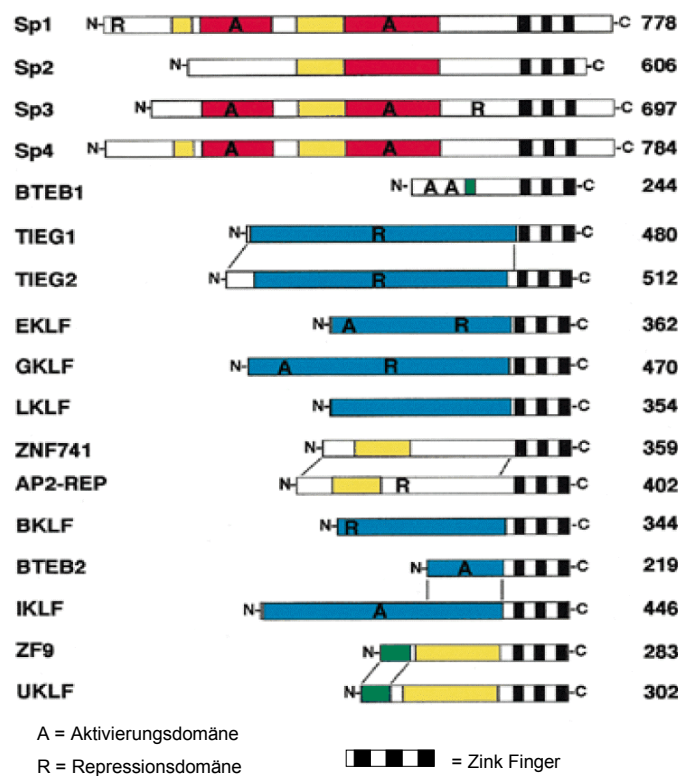
<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>	<b>KLF-Name</b>	<b>Alternative Bezeichnungen</b>
EKLF	erythroid krüppel-like factor	KLF1	
LKLF	lung krüppel-like factor	KLF2	
BKLF	basic krüppel-like factor	KLF3	TEF-2
GKLF	gut krüppel-like factor	KLF4	EZF
IKLF	intestinal krüppel-like factor	KLF5	BTEB2
CPBP		KLF6	ZF9
UKLF	ubiquitous krüppel-like factor	KLF7	
BKLF3	basic krüppel-like factor 3	KLF8	ZNF741
BTEB1	basic transcription elementbinding protein1	KLF9	
TIEG1	TG $\beta$ -inducible early gene1	KLF10	EGR $\alpha$
TIEG2	TGF $\beta$ -inducible early gene2	KLF11	FKLF
AP-2rep		KLF12	
BTEB3	basic transcription element binding protein 3	KLF13	RFLAT1, FKLF2
Sp6	specifity protein 6	KLF14	
KKLF	kidney krüppel-like factor	KLF15	
BTEB4	basic transcription element binding protein 4	KLF16	MDRRF
BTEB5	basic transcription element binding protein 5	-	

(Black et al., 2001; Kaczynski et al., 2003; Philipsen und Suske, 1999)

### 2.3.2. Struktur

Gemeinsames Kennzeichen der Mitglieder dieser Familie sind drei 81 AS umfassende Zinkfinger nahe dem C-Terminus, welche die DNA-Bindungsdomäne darstellen und große Sequenzhomolgien innerhalb von Familienmitgliedern aufweisen. Die auffallende Ähnlichkeit mit dem Drosophila melanogaster-Protein *Krüppel* führte zur Bezeichnung als "*Krüppel-like factors*" (Black et al., 2001; Kaczynski et al., 2003; Philipsen und Suske, 1999). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die Struktur und funktionellen Domänen der SP/KLFartigen Proteine.

Ogleich GC-reiche Bindungsstellen potentiell von allen Mitgliedern dieser Familie erkannt werden, können diese aber von einzelnen Mitgliedern mit unterschiedlicher Affinität gebunden werden. Im Allgemeinen binden die Sp-Faktoren bevorzugt an GC-Boxen, während Mitglieder der KLFs häufig eine erhöhte Affinität für GT-Boxen aufweisen. Da einige Mitglieder der Sp/KLF-Familie mit vergleichbarer Affinität identische Core-Sequenzen erkennen, können Kompetitionen um die DNA-Bindung vorkommen - ein Aspekt, der womöglich von großer funktioneller Relevanz ist (Übersicht in Kaczynski et al., 2003).



**Abb.1: Übersicht über die Familie der KLF/Sp1-artigen Transkriptionsfaktoren und ihre funktionellen Domänen**

(Philipsen, Suske 1999)

Im Gegensatz zum DNA-bindenden C-Terminus weist das N-terminale Ende große Sequenzunterschiede auf. Der N-Terminus beinhaltet die transkriptionsregulierende Domäne, die einzelne oder auch mehrere Repressions- oder Aktivierungsmotive beherbergen kann, über die Korepressoren oder Koaktivatoren gebunden werden.

Bindungsstellen für Mitglieder der Sp/KLF-Familie finden sich in zahlreichen Genen, die eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation und Apoptose spielen, wie z.B. VEGF, TGF- $\beta$  und seine Rezeptoren oder TNF- $\alpha$ . Die Sp/KLF-Familie ist in zahlreiche Signalwege involviert, die Einfluss auf Apoptose, Proliferation oder Angiogenese nehmen.

### **1.3.3. Vorkommen und Gewebsspezifität**

Viele Mitglieder der Sp/KLF-Familie kommen ubiquitär vor und spielen eine wichtige Rolle in Differenzierung und Wachstum verschiedener Gewebe. Trotz prinzipiell ubiquitärer Präsenz ist für viele Mitglieder dieser Familie eine Zell- und Organspezifität zu erkennen. EKLF wird beispielsweise ausschließlich in Erythrozyten exprimiert und spielt eine Rolle in der Erythropoese. Sp4 findet sich vor allem in Nerven- und Hodengeweben und ist wichtig für die männliche Reproduktion, während GKLF v.a. im Verdauungstrakt exprimiert wird. Einige KLFs kommen zwar ubiquitär vor, sind aber in bestimmten Geweben deutlich stärker exprimiert wie z.B. TIEG2, das eine bevorzugte Expression im Pankreas zeigt.

Das Vorkommen der verschiedenen Sp/KLF-Mitglieder schwankt neben dem Zelltyp auch stark in Zellzyklusphasen und Differenzierungsstadium der Zelle: GKLF wird in ruhenden Zellen kaum exprimiert und findet sich vielfach stärker in proliferierenden Zellen; in undifferenzierten Keratinozyten findet sich sehr viel mehr Sp3 als in differenzierten Zellen, in denen wiederum Sp1 quantitativ überwiegt. Die Expression einiger Familienmitglieder scheint konstitutiv zu sein, während die Expression anderer Mitglieder durch Signalkaskaden reguliert wird. So wird die TIEG1-Expression beispielsweise durch TGF $\beta$  oder Östrogene induziert (Subramaniam et al., 1998; Tau et al., 1998).

### **1.1.4. Aktivatoren und Repressoren**

Die meisten Mitglieder der Sp/KLF-Familie sind als Aktivatoren beschrieben. SP1 als typischer Vertreter dieser Gruppe aktiviert eine Vielzahl verschiedener Gene und

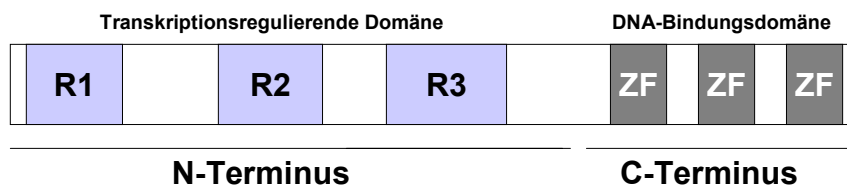
spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und Differenzierung von Geweben. Einige Mitglieder dieser Familie wirken jedoch als Repressoren und hemmen die Expression ihrer Targetgene. Hierzu zählt Sp3, das durch Bindung an identischen GC-Sequenzen Sp1 aus der DNA-Bindung verdrängt und dadurch eine weitere Aktivierung des Gens verhindert. Es ist denkbar, dass die Expression vieler Zielgene durch Konkurrenz von Aktivatoren und Repressoren um die gemeinsame Bindungsstelle bestimmt wird. Erstaunlicherweise gibt es unter den Mitgliedern der SP/KLF-Gruppe nur wenige Proteine, die ausschließlich als Aktivatoren oder Repressoren wirken, die meisten können vielmehr kontextabhängig beide Effekte ausüben. Einen Einfluss scheint dabei die Anordnung und Anzahl der Erkennungssequenzen im Promoter des Zielgens zu haben, z.B. aktiviert BTEB1 Zielpromotoren bei Vorliegen mehrerer Bindungsstellen, wohingegen BTEB1 bei Vorliegen einer einzelnen Bindungsstelle zur Repression nachgeschalteter Gene führt. Von Bedeutung sind weiterhin Koproteine, die Einfluss auf die transkriptionellen Eigenschaften von Sp/KLF-artigen Proteinen ausüben. Diese haben zwar selbst keine DNA-Bindungsaffinität, können aber über Bindung der Sp-Proteine deren transkriptionellen Eigenschaften modulieren. Durch zusätzliche Interaktion mit Histonen nehmen sie Einfluss auf die Chromatinstruktur und regulieren dadurch die Transkriptionsaktivität. Typische Partnerproteine für Aktivatoren wie KLF1 oder KLF4 sind z.B. p300 und Creb-binding protein CBP, welche die Chromatin-Struktur durch eigenständige Acetyltransferase-Aktivität modifizieren und dadurch eine verstärkte Bindung der Transkriptionsfaktoren an der DNA ermöglichen. Außerdem bilden sie ein Adapterprotein zur basalen Transkriptionsmaschinerie (Janknecht et al., 1998). Über Wirkungsmechanismen von Sp/KLF-artigen Repressoren ist weniger bekannt. Entsprechend ihrer Korepressoren werden sie gegenwärtig in zwei Gruppen unterteilt:

1. Proteine, die über Interaktion mit CtBP (C-terminale Binding Protein) Repression ausüben. Hierzu gehören KLF3 und KLF8.
2. Proteine, die über Interaktion mit Sin3A zur Repression nachgeschalteter Gene führen. Hierzu zählen KLF11 (TIEG2) und KLF13. Neben Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren weist Sin3A auch Bindungsstellen für die Histondeacetylase HDAC1 auf und kann darüber die DNA durch Verpackung für weitere Transkriptionsfaktoren unzugänglich machen.

### 1.1.5. TIEG2 als Sin3A-bindender Repressor

Das „TGF $\beta$ -inducible early response gene“ TIEG2 wurde vor einigen Jahren als weiteres Mitglied der Sp/KLF-Familie charakterisiert (Cook et al., 1999) und findet sich am stärksten in Zellkernen von Pankreas und Skelettmuskulatur exprimiert. Abbildung 2 veranschaulicht die funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors.

Es erkennt die klassische GC-Box (GGG GCG GGG). TIEG2/KLF11 ist sowohl als Aktivator in Erythrozyten als auch als transkriptioneller Repressor beschrieben, wobei der Schwerpunkt der Untersuchungen auf seiner Funktion als Repressor liegt. Die Repression findet über drei voneinander unabhängigen, am N-terminalen Ende lokalisierten Repressionsdomänen R1, R2 und R3 statt und ist unverzichtbar für die wachstumshemmende Wirkung von TIEG2 (Cook et al.1999).



**Abb.2: Funktionelle Domänen des Transkriptionsfaktors TIEG2**

R = Repressionsdomäne

ZF = Zinkfinger

Es ist gezeigt worden, dass diese Wirkung hauptsächlich über die erste Repressionsdomäne R1 abläuft (Zhang et al., 2001) und durch Rekrutierung des Korepressors Sin3A erreicht wird, weshalb das Kernmotiv von R1 auch als „Sin3A-interacting domain“ (SID) bezeichnet wird. In den Verbindungssequenzen der Repressionsdomänen finden sich zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen für proliferative Kinasen.

Unter Verwendung von Deletions- und Mutationskonstrukten wurde gezeigt, dass die Transkriptionsaktivität von TIEG2 durch die proliferative EGF-ras-raf-MEK-ERK-Signalkaskade reguliert und antagonisiert wird. EGF-Aktivierung führt zu Phosphorylierung von TIEG2 an vier Phosphorylierungsstellen im N-Terminus neben der SID, wobei die Phosphorylierungsstellen dabei annähernd gleich wichtig sind. Als Folge dieser Phosphorylierung kann TIEG2 den Korepressor Sin3A nicht mehr binden und verliert so die Fähigkeit zur transkriptionellen Repression und Wachstumshemmung (Ellenrieder et al., 2002b).

DNA-Bindungsstellen für TIEG2 finden sich sowohl in den Promotoren kritischer Kontrollgene der Zellzyklusprogression wie CyclinD1, cdc25 und CDK6 als auch in Genen, die indirekt durch Stimulation proliferativer Signalwege wie HGF, ras, VEGF den Zellzyklus beeinflussen. Unter den potentiellen TIEG2-Targetgenen finden sich auch Zielgene von „Transforming growth factor beta“ (TGF $\beta$ ) (siehe unten), die von besonderem Interesse sind, da TIEG2 selbst durch TGF $\beta$  reguliert wird und somit ein Feedback-Loop vorliegen könnte.

#### **1.1.6. TIEG2 als Tumorsuppressor**

Bislang ist über die biologische Funktion der TIEG-Proteine noch sehr wenig bekannt, sie scheinen aber eine Funktion in der Wachstumshemmung und Tumorsuppression zu spielen. In epithelialen Tumoren, wie z.B. des Pankreas, der Mamma und der Niere fanden sich stadienabhängig erniedrigte Expressionslevel von TIEG1. Überexpression von TIEG2 oder TIEG1 hingegen mündet in der Einleitung eines Zellzyklusarrests und Apoptoseinduktion epithelialer Zellen.

In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte *in vivo* gezeigt werden, dass TIEG2 die Chemosensitivität des Gewebes durch Herunterregulation von oxidativen Stressgenen wie Superoxiddismutase erhöht und darüber hinaus direkte tumorsuppressive Eigenschaften besitzt. In transgenen Mäusen wurde deutlich, dass TIEG2 ein negativer Regulator des Zellwachstums ist und die neoplastische Transformation hemmt (Fernandez-Zapico et al., 2003). Erstmals tritt damit ein Mitglied der KLF-Familie als Tumorsuppressor in den Vordergrund.

#### **1.1.7. TIEG2 als early-response-Gen von TGF $\beta$**

TGF $\beta$  ist ein pluripotenter Wachstumsfaktor, der durch transkriptionelle Regulation wichtiger Zielgene eine essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung, der Differenzierung von Geweben, in der Wundheilung und in der Karzinogenese spielt (Massague, 1998; Piek et al., 1999).

Dabei reguliert TGF $\beta$  die Transkription seiner Zielgene durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege, in deren Mittelpunkt die Smad-Signalkaskade steht. Nach Rezeptor-vermittelter Aktivierung der Smad2- und Smad3-Proteine interagieren diese mit Smad4, translozieren in den Zellkern und regulieren nach DNA-Bindung die Transkription TGF $\beta$ -



kontrollierter Gene. Hierzu gehören „early response“-Gene wie Zellzyklusregulatoren oder andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Jun, Fos und TIEG2.

Von großem Interesse sind Untersuchungen zur Bedeutung dieser TGF $\beta$ -induzierbaren Transkriptionsfaktoren für die TGF $\beta$ -Signaltransduktion und Transkription. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten beispielsweise zeigen, daß die Smad-vermittelte Signalübertragung und Transkription einem Feedback-Mechanismus über TIEG2 unterliegt, und dass TIEG2 nach TGF $\beta$ -Induktion einen stimulierenden Effekt auf die Smad-Signaltransduktion ausübt. Dabei verstärkt TIEG2 TGF $\beta$ -Smad vermittelte Effekte durch Terminierung des negativen Feedback-Mechanismus über Smad7. Smad7 bindet am TGF $\beta$ -Typ I Rezeptor und verhindert eine weitere Aktivierung der Smad-Proteine. TIEG2 scheint hier auf transkriptioneller Ebene anzusetzen und die Expression des inhibierenden Smad7 zu terminieren. Die genauen biochemischen und molekularen Mechanismen dieser wichtigen Funktion von TIEG2 sind allerdings bislang nicht bekannt und sollen daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

#### **2.4. Smad7**

Smad7 ist ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein, dessen Expression durch TGF $\beta$  stimuliert wird und das eine entscheidende Rolle in der Terminierung der TGF $\beta$ -Antwort spielt (Nakao et al., 1997).

Es wirkt als negativer feedback Mechanismus der TGF $\beta$ -Signalkaskade: Nach Bindung an den TGF $\beta$ -Rezeptor II wird der TGF $\beta$  Rezeptor I durch Phosphorylierung aktiviert. Die weitere Signalübertragung wird über zytoplasmatisch lokalisierte Smad-Proteine vermittelt. Die Rezeptor-Smads (R-Smads) Smad2 und Smad3 werden durch den aktivierten Rezeptor phosphoryliert und aktiviert. Anschließend binden sie das Koprotein Smad4 und translozieren als Komplex in den Zellkern, um die Promotoren ihrer Zielgene zu binden (Wotton und Massague, 2001). Eines dieser Zielgene ist dabei Smad7.

Nach TGF- $\beta$ -Stimulation transloziert Smad7 in das Zytoplasma (Itoh et al., 1998), wo es dann ähnlich wie die R-Smads an den TGF $\beta$ RI bindet. Diese Bindung ist im Gegensatz zu den R-Smads jedoch stabil und verhindert eine weitere Bindung und Phosphorylierung der R-Smads, so dass die TGF $\beta$ -Antwort unterbrochen wird. Neben der Rezeptorblockade induziert Smad7 auch einen verstärkten Abbau des Rezeptors durch die Bindung der Ubiquitin-Ligasen Smurf1 Smurf2 (Ebisawa et al., 2001; Suzuki

et al., 2002). Durch diesen Abbruch der TGF $\beta$ -Signalkaskade stellt Smad7 eine negative Rückkopplung der TGF $\beta$ -Signalübertragung dar.

Smad7 ist nicht konstitutiv aktiv, sondern unterliegt einer ständigen Regulation durch transkriptionelle Einflüsse und einer Vielzahl proliferativer Signalkaskaden. Eine der wichtigsten ist dabei die Aktivierung durch den epidermal growth factor EGF und der abwärts gelegenen Signalkaskade Ras-Raf-MEK-ERK. Weitere Beispiele sind die Aktivierung durch NF $\kappa$ B über den Tumor Necrose Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

In normalem epithelialen Gewebe findet sich nur eine sehr geringe Expression von Smad7. Dagegen ist Smad7 in zahlreichen Tumoren wie Pankreas, Kolon oder Hauttumoren überexprimiert und induziert in diesen Tumoren eine Resistenz gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von TGF $\beta$  (Boulay et al., 2003; He et al., 2001; Kleeff et al., 1999).

## **2.5. Alterationen der TGF $\beta$ -Signalkaskade im Tumor**

Aufgrund seiner starken wachstumshemmenden und apoptotischen Funktionen gilt TGF $\beta$  als potenter Tumorsuppressor in frühen Tumorstadien. In jüngeren Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass TGF $\beta$  in fortgeschrittenen Tumorstadien als Promotor der Tumorprogression wirken kann und Tumorzellen auf einen TGF $\beta$ -Stimulus häufig mit erhöhter Invasivität und Zunahme des Metastasierungspotentials reagieren.

Der Verlust der TGF $\beta$ -induzierten Tumorsuppression kann auf genetischen oder funktionellen Störungen der TGF $\beta$ -Signalkaskade beruhen. Inaktivierende Mutationen des TGF $\beta$  Typ-II Rezeptors oder von Smad4 finden sich in ca. 40% der Pankreaskarzinome und gehen mit einem Verlust aller TGF $\beta$ -Wirkungen einher. Noch interessanter sind jedoch epigenetische Störungen der Smad-Signalkaskade, die mit einem selektiven Verlust der TGF $\beta$ -induzierten Wachstumshemmung einhergehen, obgleich andere TGF $\beta$ -induzierte Effekte erhalten bleiben. Epigenetische Alterationen scheinen von großer Bedeutung für das phänotypische Verhalten insbesondere fortgeschrittener Tumoren zu sein und sind mit einer Stimulation der Tumorzellaussaat assoziiert. Ursächlich werden hier v.a. Crosstalks mit onkogenen Signalwegen diskutiert, die sowohl Einfluss auf Intensität und Dauer der Smad-Signaltransduktion nehmen können, als auch die Auswahl und Aktivität Smad-interagierender Partnerproteine bestimmen. Folge der veränderten Konstellation interagierender Partnerproteine sind einschneidende Änderungen der Substratspezifität und damit der

Targetgenselektion. Mit anderen Worten verlieren diese Tumorzellen nur partiell ihre Responsivität auf TGF $\beta$ , während andere Funktionen entsprechend der modifizierten Genselektion abgeschwächt oder verstärkt werden oder gänzlich neue Funktionen hinzukommen. Diese Tumorzellen mit intakter Smad-Signalkaskade sind in der Tumorforschung von besonderem Interesse, da sie maßgeblich zur Erlangung und Aufrechterhaltung eines aggressiven Phänotyps beitragen. Ein typisches Merkmal dieser Tumorzellen ist die Überexpression des Smad-Inhibitors Smad7, der Einfluss auf die Dauer und Intensität der TGF $\beta$ -induzierten Smad-Signaltransduktion ausübt und dessen Überexpression in epithelialen Zellen mit einem selektiven Verlust der TGF $\beta$ -vermittelten Tumorsuppression einhergeht.

## **2.6. Ziel dieser Arbeit**

Die vorliegende Arbeit galt der Untersuchung von TIEG2 in der transkriptionellen Kontrolle des Smad7 Onkogens. Dabei standen zwei Ziele im Vordergrund:

1. Charakterisierung der transkriptionellen Mechanismen, über welche TIEG2 in epithelialen Zellen die Transkription des Smad7-Onkogens reprimiert.
2. Untersuchungen zur Funktionalität der TIEG2-vermittelten Smad7-Hemmung in Pankreaskarzinomzellen mit erhöhter Expression von Smad7 .

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. E. coli-Stämme

DH5 $\alpha$  (Fa. Invitrogen Life Technologies)

BL21 (Fa. Amersham Biosciences)

##### 3.1.1. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Expressionsplasmide in *E. coli* wurden die „Max Efficiency DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Competent Cells“ (Fa. Invitrogen Life Technologies) verwendet. Für die Expression von GST-fusionierten Proteinen wurden die GST-Konstrukte in chemisch kompetente BL21 (Fa. Amersham Biosciences) transformiert. Die chemische Transformation erfolgte nach Instruktionen der Hersteller.

##### 3.1.2. Medium für *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli* wurde LB-Medium verwendet. LB-Medium wurde hergestellt aus Fertig-Kapseln der Fa. BIO 101 Systems (25 Kapseln/l), die sich durch Autoklavieren in Wasser auflösen. Für LB-Festmedium wurde 2% (w/v) Agar (Fa. Duchefa Biochemie) zugegeben.

#### 3.2. Zelllinien

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Abkürzung	Name	Herkunft	Medium	Transfektion
CHO	Chinese hamster ovary	ECACC (European Collection of American Cellculture)	F-12 Nutrient Mixtures (Ham)	Fugene6
Hek293	Human embryonic kidney	DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen	DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)	CaPO <sub>4</sub> ; JetPeJ

Colo357	Humane Pankreaskarzinom- Zelllinie	DSMZ	DMEM	Fugene6
Panc1	Humane Pankreaskarzinom- Zelllinie	DSMZ	DMEM	TransFast
MiaPaca2	Humane Pankreaskarzinom- Zelllinie	DSMZ	DMEM	TransFast
293 Tet-on	Hek293; stabil transfiziert mit pTet-On, welches die Induktion der Expression von Tet-on-Systemen ermöglicht.	Fa. BD Biosciences	DMEM	CaPO <sub>4</sub>

### 3.2.1. Medien für Zelllinien

F-12 Nutrient Mixtures (Ham) und DMEM wurden von der Fa. Invitrogen Life Technologies bezogen. Die Medien wurden mit 10% FCS (v/v) (fötales Kälberserum) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) (Fa. Invitrogen Life Technologies) versetzt.

### 3.2.2. Transfektion von Zell-Linien

#### 3.2.2.1. CaPO<sub>4</sub>-Transfektion

(für 100 mm-Zellkulturschale)

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion ausgesät, so dass sie 60-80% konfluent waren. Am nächsten Tag wurde das Medium mehrere Stunden vor der Transfektion gewechselt. Die Lösung (Lsg.) A und B wurden in Polystyrol-Röhrchen angesetzt. Anschließend wurde die Lsg. A unter Vortexen tröpfchenweise zur Lsg. B zugegeben. Die DNA-Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet.

#### Lsg. A:

50 µl            2,5 M CaCl<sub>2</sub>  
 10 µg            DNA pro Expressionskonstrukt  
 add. 500 µl    H<sub>2</sub>O

Lsg. B:

500 µl      2 × HBS

2 × HBS

270 mM      NaCl

10 mM      KCl

1,5 mM      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

10 mM      Glucose

42 mM      HEPES

⇒ pH 7,05 mit NaOH

## 3.2.2.2. andere Transfektionsmethoden

Die Transfektion mit TrasFast (Fa. Promega Corporation), JetPeJ (Fa. Qbiogene) und Fugene6 (Fa. Roche Diagnostics) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

**3.3.      Antikörper****3.3.1.      primäre Antikörper**

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Flag-Antikörper M2	Fa. Sigma-Aldrich-Corporation
Flag-Antikörper M2 freezer safe	Fa. Sigma-Aldrich-Corporation
GST-Antikörper	Fa. Amersham Biosciences
Sin3A-Antikörper (AK-11)	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Smad7-Antikörper H-79	Fa. Santa Cruz Biotechnology
βActin-Antikörper	Fa. Sigma-Aldrich Corporation

**3.3.2.      sekundäre Antikörper (HRP-gekoppelt)**

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-mouse-Antikörper IgG	Fa. Sigma-Aldrich Corporation
Anti-rabbit-Antikörper IgG	Fa. Amersham Biosciences

### 3.4. Konstrukte

#### 3.4.1. Luciferase-Konstrukte

Promotorabschnitte wurden in einen Vektor kloniert, der für die Luciferase aus *Photinus pyralis* codiert. Der Promotorabschnitt kontrolliert die Transkription des Luciferasegens. Somit entspricht die Luciferase-Aktivität der Induktion dieses Promotorabschnittes.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Luciferase-Konstrukte

Name	Promotor-Abschnitt	Herkunft / Referenz
mSmad7-pGL725 wt	muriner Smad7-Promotor -613 bis +112	Dr. Heuchel; Uppsala, Schweden
RSV (Rous-Sarkom-Virus- (RSV) Promotor)	codiert für die Luciferase aus <i>Renilla reniformis</i> unter der Kontrolle des Rous-Sarkom-Virus- (RSV) Promotors; dient der Normalisierung der Transfektionseffizienz bei Reporter-Assays	Dr. Urrutia; Rochester, USA

#### 3.4.2. Expressionskonstrukte

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Expressionskonstrukte

Name	Insert	TAG	Vektor	Herkunft/Referenz
Flag-TIEG2 wt	humanes TIEG2	Flag	pCMV TAG 2C (Fa. Stratagene)	Dr. Urrutia; Rochester, USA
Flag-TIEG2-pBI-EGFP	humanes TIEG2	Flag	pBI-EGFP (Fa. BD Biosciences)	Dr. Volker Ellenrieder
GST-TIEG2-ZF	humanes TIEG2	GST	pGEX-5X-1 (Fa. Amersham Biosciences)	Dr. Urrutia; Rochester, USA
TIEG2 $\Delta$ R2/R3	humanes TIEG2; Deletion der R2-und R3-Domäne	Flag	pCMV TAG 2C (Fa. Stratagene)	Dr. Urrutia; Rochester, USA

TIEG2 $\Delta$ SID	humanes TIEG2; Deletion der R1-Domäne	Flag	pCMV TAG 2C (Fa. Stratagene)	Dr. Urrutia; Rochester, USA
--------------------	--	------	---------------------------------	--------------------------------

### 3.5. Wachstumsfaktoren und Inhibitoren

Der MEK-Inhibitor PD 98059 wurde von der Firma Sigma-Aldrich Corporation bezogen und 50 $\mu$ M eingesetzt. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion behandelt und nach weiteren 24 h lysiert.

### 3.6. Primer

Primer und sonstige Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech bezogen.

### 3.7. Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen VWR International, Sigma-Aldrich Corporation und Carl Roth GmbH bezogen.

### 3.8. radioaktiv markierte Nukleotide

Radioaktiv markierte Nukleotide wurden von der Fa. Amersham Biosciences bezogen.

### 3.9. Methoden im Umgang mit DNA

#### 3.9.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Proteine aus einer DNA- bzw. RNA-Lösung zu entfernen, kann eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt werden. Dazu wird die Probe mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gemischt. Nach Zentrifugation bei 10000  $\times$  g für 2 min wird die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wird ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, gemischt und wieder zentrifugiert. Die obere Phase, die die DNA bzw. RNA enthält wird abgenommen und einer Ethanol-Fällung unterzogen.

#### 3.9.2. Fällung von DNA/RNA

Der DNA- bzw. RNA-Lösung wird ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 bzw. 3 Volumen 100% (v/v) Ethanol zugeben. Als Fällungshilfe kann



Muschelglycogen zugegeben werden. Die Lösung wird gemischt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wird die Probe für 30 min bei 10000 × g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wird getrocknet und im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O oder 10 mM Tris/HCl pH 7,5 aufgenommen.

### **3.9.3. Plasmidpräparation**

Plasmidpräparationen aus *E. coli* im Miniformat wurden mit dem „NucleoSpin Plasmid Kit“ (Fa. Macherey-Nagel), Plasmidpräparationen im Maxiformat mit dem „Plasmid Maxi Kit“ (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.9.4. Sequenzierung**

Zur Verifizierung der verwendeten Konstrukte wurden diese durch die Fa. MWG-Biotech sequenziert.

## **3.10. Methoden im Umgang mit RNA**

### **3.10.1. Isolierung von RNA aus Geweben und Zell-Linien**

#### **3.10.1.1. Isolierung von RNA aus Humangeweben**

Die Gewebe stammten von den chirurgischen Abteilungen der Universitäten Ulm und Homburg/Saar sowie von der ungarischen Wissenschaftlichen Akademie (Budapest, Ungarn). Für alle Gewebeentnahmen lag die Zustimmung der lokalen Ethikkommission vor. Als Kontrollen dienten zwei Pankreasgewebe von Organspendern sowie vier tumorfreie Resektatränder von Pankreaskarzinompatienten. Zusätzlich wurden 16 Gewebe aus duktalem Adenokarzinomen verwendet. Die schockgefrorenen chirurgischen Präparate wurden schockgefroren und auf Trockeneis mit Mörser und Stößel zerkleinert und in RLT-Puffer (Fa. Qiagen) resuspendiert. Die weitere Verarbeitung der RNA erfolgte wie unter 3.10.1.2 beschrieben

#### **3.10.1.2. Isolierung von RNA aus Zell-Linien**

Die RNA aus Zell-Linien wurde mit Hilfe des „RNeasy Midi Kits“ (Fa. Qiagen) nach Instruktionen des Herstellers isoliert.

### 3.10.2. cDNA-Herstellung

#### 3.10.2.1. DNase-Verdau der Gesamt-RNA

10 µg Gesamt-RNA wurden zuerst mit DNase I (Fa. Roche Diagnostics) behandelt, um genomische DNA zu entfernen, die in der quantitativen PCR amplifiziert werden könnte.

#### Ansatz des DNase I-Verdaus:

5 µl PCR-Puffer (Fa. Applied Biosystems)

10 µg Gesamt-RNA

2 µl RNasin (Fa. Promega)

1 µl DNase I (Fa. Roche Diagnostics)

add 50 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei)

Der Ansatz wurde für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Proteine durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt (siehe 3.9.1). Die RNA wurde mit Ethanol gefällt (siehe 3.9.2).

#### 3.10.2.2. c-DNA-Synthese

Die gefällte DNA wurde in 11 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 0,5 µg „random“-Hexamer-Oligonukleotide für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt.

Die „First-Strand“-Synthese der cDNA erfolgte durch die Reverse-Transkriptase für 1 h bei 42°C.

#### Ansatz für die Reverse Transkription:

11 µl RNA (10 µg)

1 µl random-Hexamer (0,5 µg/µl) (Fa. MWG Biotech)

4 µl First Strand Buffer (Fa. Invitrogen Life Technologies)

2 µl DTT (0,1 M) (Fa. Invitrogen Life Technologies)

1 µl dNTPs (10 mM) (Fa. PEQLAB Biotechnologie)

1 µl Reverse Transkriptase Superscript II (Fa. Invitrogen Life Technologies)

Nach der Reversen Transkription wurde das Enzym bei 72°C für 10 min inaktiviert.

### 3.10.3. Quantitative PCR

Um die mRNA eines spezifischen Gens quantifizieren zu können, kann eine „Real-time“-PCR („polymerase chain reaction“) durchgeführt werden.

#### 3.10.3.1. Primer-Auswahl

Die Auswahl der Primer für die quantitative PCR erfolgte mit Hilfe des PrimerExpress 1.0 Programms von der Fa. Applied Biosystems. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sie eine Schmelztemperatur von 60°C +/-1 besitzen. Das „Amplicon“ wird so bestimmt, dass es zwischen 50 und 150 bp groß ist, wodurch eine optimale Amplifikation der cDNA erreicht werden soll. Die Spezifität der Primer wurde durch einen Vergleich mit der Datenbank des „national center for biotechnology information“ (NCBI) („BlastN“) überprüft.

Um die Expression des Zielgens quantifizieren zu können, wurde die Expression eines Haushaltsgens zur Normalisierung benutzt. In diesem Fall wurde das „human ribosomal protein, large, P0“ (BC001127) (XS13) verwendet.

#### XS13-Primer:

for: AGATCCGC ATGTCCCTTCG

rev: CCTTGCGCATCATGGTGTT

#### Smad7-Primer:

for: TGCTCCCATCCTGTGTGTTAAG

rev: TCAGCCTAGGATGGTACCTTGG

#### TIEG2-Primer:

for: ACGGTCTTGGCGGCCTAG

rev: ACTTTCATCAAAACCAGCCTCC

#### 3.10.3.2. Quantitative PCR

Die quantitative PCR erfolgte mit dem „SYBR Green PCR Master Mix“ von der Fa. Applied Biosystems. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in der kleinen Furche („minor groove binder“) doppelsträngiger DNA einlagert. Dadurch kann die Amplifikation der cDNA verfolgt werden.

Ansatz:

25 µl	SYBR Green PCR Master Mix (Fa. Applied Biosystems)
5 µl	Primer Mix
0,25 µl	cDNA (siehe 3.10.2)
19,75 µl	H <sub>2</sub> O

Primer Mix:

6 µl	Vorwärts-Primer (20 pmol/µl)
6 µl	Rückwärts-Primer (20 pmol/µl)
28 µl	H <sub>2</sub> O

Die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte im „ABI Prism 7700“ von der Fa. Applied Biosystems nach folgendem Programm:

2 min	50°C	
10 min	95°C	
15 s	95°C	} 40 ×
1 min	60°C	

### 3.10.3.3. Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Fa. Applied Biosystems) ausgewertet. Der  $C_T$ -Wert steht für die Zyklenzahl, die benötigt wurde, bis der exponentielle Anstieg der amplifizierten DNA erfolgte. Je kleiner der  $C_T$ -Wert, desto mehr cDNA des Gens ist in der Probe enthalten. Durch die Differenzbildung zwischen dem  $C_T$ -Wert des Zielgens und des Haushaltsgens, wird die cDNA-Menge der Proben normalisiert ( $\Delta C_T$ -Wert). Um die Expression von verschiedenen Bedingungen bzw. Ansätzen auf einen Ansatz (z. B. nicht behandelter Kontrollansatz) zu beziehen, kann der  $\Delta C_T$ -Wert des Bezugspunkts von den  $\Delta C_T$ -Werten der Ansätze abgezogen werden ( $\Delta\Delta C_T$ -Wert). Dieser  $\Delta\Delta C_T$ -Wert wird in Potenz zu der Basis 2 gestellt, um die relative Expression der Ansätze in Bezug zum Kontrollansatz zu erhalten ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ).

Die Expression des Zielgens wurde 3fach bestimmt und die Expression des Haushaltsgens doppelt.

### 3.11. Methoden im Umgang mit Proteinen

#### 3.11.1. Isolierung von Proteinen aus Zell-Linen

##### 3.11.1.1. Gesamt-Protein

Die Zellen wurden mit eiskaltem 1 × PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm für 5 min bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen 1 × RIPA (200 µl für eine 100 mm-Zellkulturschale) lysiert. Anschließend wurden die Zellen 10mal durch eine Kanüle gezogen und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 10000 × g wurden die Zelltrümmer entfernt.

##### 1 × PBS:

140 mM	NaCl
3 mM	KCl
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

⇒ pH 7,4 mit HCl

##### 1 × RIPA:

50 mM	Tris/HCl pH 7,5
150 mM	NaCl
20 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5%	Nonidet P-40 (NP-40) (v/v)

#### 3.11.2. Western Blot

##### 3.11.2.1. denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit 5 × Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden sie in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Trenngel (5 ml):

7-15%	Acrylamid (Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid; 29:1)
1,3 ml	Trenngelpuffer
50 µl	10% SDS (w/v)
25 µl	10% APS (w/v)
2,5 µl	TEMED
add 5 ml	H <sub>2</sub> O

Sammelgel (1,25 ml):

140 µl	Acrylamid (Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid; 29:1)
325 µl	Sammelgelpuffer
12,5 µl	10% SDS (w/v)
6,25 µl	10% APS (w/v)
1,25 µl	TEMED

Trenngelpuffer:

1,5 M	Tris/HCl pH 8,8
-------	-----------------

Sammelgelpuffer:

0,5 M	Tris/HCl pH 6,8
-------	-----------------

5 × Lämmli-Puffer

225 mM	Tris/HCl pH 6,8
50%	Glycerin (v/v)
5%	SDS (w/v)
0,02%	Bromphenolblau (w/v)
100 mM	DTT

1 × SDS-Laufpuffer:

0,1%	SDS (w/v)
25 mM	Tris
200 mM	Glycin

### 3.11.2.2. Protein-Transfer auf eine Membran

Die Proteine wurden mittels Nass-Transfer mit dem Tank-Blotter „Criterion“ (Fa. Bio-Rad Laboratories) von dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Fa. Schleicher & Schuell) transferiert. Dabei wurde das Polyacrylamid-Gel und die Membran in „Towbins“-Puffer für 30 min äquilibriert, der anschließend auch für den Nass-Transfer benutzt wurde. Das Gel und die Membran wurden zwischen Whatman-Papiere geschichtet, so dass durch die Stromrichtung die negativ geladenen Proteine auf die Membran transferiert wurden. Der Transfer erfolgte bei 400 mA und 4°C über Nacht.

#### Towbins-Puffer (1 l):

200 ml	5 × Salt
200 ml	Methanol
500 µl	20% SDS (w/v)
add. 1 l	H <sub>2</sub> O

#### 5 × Salt:

250 mM	Tris
2 M	Glycin

### 3.11.2.3. Antikörper-Nachweis

Die Membranen wurden für 1 h in Blockingpuffer bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT mit dem Antikörper, verdünnt in Blockingpuffer (1:500 bis 1:1000) oder über Nacht bei 4°C. Die Membranen wurden 3mal für 5 min mit 1 × TBST-Puffer gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert (1:10000 in Blockingpuffer). Die sekundären Antikörper sind mit der Peroxidase aus dem Meerrettich (HRP)-gekoppelt, die durch eine Chemilumineszenz-Reaktion den spezifischen Proteinnachweis ermöglicht. Die Membranen wurden anschließend wieder 3mal mit 1 × TBST-Puffer für 5 min gewaschen und für 5 min in der Chemilumineszenz-Substrat-Lösung („Lumi-Light Western Blotting Substrate“ von der Fa. Roche Diagnostics) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Chemilumineszenz-Reaktion durch die Röntgenfilme „Cronex“ der Fa. AGFA.

Blockingpuffer:

5% Milchpulver (w/v)

1 × TBST-Puffer

1 × TBST-Puffer:

1 × TBS-Puffer

0,1% Tween<sup>®</sup> 20 (v/v) (Fa. Serva Electrophoresis GmbH)10 × TBS-Puffer:

1,4 M NaCl

25 mM KCL

250 mM Tris

⇒ pH 7,4 mit HCl

**3.11.3. Immunpräzipitation**

Die Zellen wurden in 200 µl 1 × RIPA lysiert (siehe 3.11.1.1), ein Teil des Zell-Lysats wurde gegebenenfalls abgenommen, zu dem restlichen Zell-Lysat wurde 1 ml 1 × RIPA zugegeben und mit dem Antikörper 2 h bei 4°C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert (Flag-Antikörper M2 freezer safe 50 µl; Fa. Sigma-Aldrich Corporation). Der Agarosegekoppelte Antikörper wurde durch Zentrifugation bei 1500 rpm sedimentiert und 5-6mal mit 1 ml 1 × RIPA gewaschen. Anschließend wurde die Agarose in 50 µl 2 × Lämmli (Fa. Bio-Rad Laboratories) gelöst und für 5 min bei 95°C inkubiert, um die Antikörpergebundenen Proteine von der Agarose zu entfernen. Anschließend folgte eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.11.2.1) mit nachfolgendem Nass-Transfer (siehe 3.11.2.2). Durch spezifische Antikörper wurden die immunpräzipitierten bzw. coimmunpräzipitierten Proteine nachgewiesen (siehe 3.11.2.3).

**3.11.4. Phosphorylierungsstudien**

Die Zellen wurden nach Transfektion für 24 Stunden in phosphatfreiem Medium ausgehungert und anschließend für 4 Stunden mit radioaktiv markierten <sup>32</sup>P-Orthophosphat inkubiert. Im Anschluß wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt (siehe 3.11.3) und das radioaktiv markierte TIEG2-Protein mittels Autoradiographie durch die Röntgenfilme „Cronex“ der Fa. AGFA detektiert.



### 3.11.5. Reporter-Assay

Für Promotor-Studien wurden 24-well-Platten mit der entsprechenden Zell-Linie ausgesät, die am nächsten Tag transfiziert wurde. Dabei wurde als Reporter gen für die Promotor-Konstrukte das Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis* („Firefly“) verwendet. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde ein Reporterkonstrukt zusätzlich transfiziert, das das Gen für die Luciferase aus *Renilla reniformis* („Renilla“) unter der Kontrolle des Rous-Sarkom-Virus-(RSV) Promotors enthält. 36-48 h nach Transfektion wurden die Zellen 1mal mit 1 × PBS gewaschen und in 100 µl 1 × „Passive Lysis Buffer“ (Fa. Promega Corporation) lysiert. 20 µl des Lysats wurden für die Messung mit dem „Dual-Luciferase<sup>®</sup>-Reporter Assay“ (Fa. Promega Corporation) eingesetzt. Dabei wurden die unterschiedlichen Substrate der zwei Luciferase-Enzyme nacheinander zugegeben und die Luciferase-Aktivität im Luminometer „Luminat LB 9501“ (Fa. Berthold Laboratories) gemessen. Die „Firefly“-Aktivität entspricht der Induktion des Promotorkonstrukts. Durch die Quotientenbildung mit dem „Renilla“-Wert wird die Transfektionseffizienz normalisiert. Die Ansätze wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

1 × PBS:

siehe 3.11.1

### 3.11.6. Aufreinigung von GST-Proteinen

Die Expressionskonstrukte pGEX-1 (Fa. Amersham Biosciences) und GST-TIEG2-ZF wurden in den *E. coli*-Stamm BL21 (Fa. Amersham Biosciences) transformiert. Ein Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml LB-Medium wurde mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Kolben mit 500 ml LB-Medium mit 10 ml Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis sie eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4 - 0,6 erreicht hatte. Durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG wurde die Expression der GST-Proteine induziert. Die Kultur wurde 2 h bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 4°C sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml TE-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym für 15 min bei 37°C wurden die Bakterien lysiert. Anschließend wurde die Lösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder bei 37°C aufgetaut. Nachdem das Lysat 4mal 15s sonifiziert

wurde (Branson Sonicator 250, Stufe 6), wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 15000 rpm für 1 h bei 4°C pelletiert. Zu dem Überstand wurden 500 µl „Glutathione Sepharose™ 4B“ (Fa. Amersham Biosciences) zugegeben und für 2 h bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Agarose wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm sedimentiert und 3mal mit 10 ml eiskaltem 1 × PBS gewaschen. Die GST-Proteine wurden mit dem Glutathion-Elutionspuffer von der Agarose durch Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur eluiert und überführt. Durch Zugabe von 50% Glycerol (v/v) wurden die GST-Proteine stabilisiert.

#### LB-Medium:

siehe 3.1.2

#### TE-Puffer:

10 mM Tris pH 7,5

1 mM EDTA pH 8

#### 1 × PBS:

siehe 3.11.1.1

#### Glutathion-Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8

150 mM NaCl

10 mM Glutathion

### **3.12. Protein-DNA-Interaktion**

#### **3.12.1. EMSA**

Um Protein-DNA-Interaktionen zu untersuchen, kann ein „Electromobility Shift Assay“ (EMSA) durchgeführt werden. Dabei werden GST-Proteine mit einem doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid (>25 bp) inkubiert, die bestimmten Promotor-Sequenzen entsprechen. Bindet ein Protein an die radioaktiv markierte DNA, wird der Gellauf des Oligonukleotids verlangsamt. Dies wird als „Shift“ bezeichnet. Durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers kann die Bindung eines Proteins an die DNA nachgewiesen

werden („Supershift“). Die Inkubation mit mutierten Oligonukleotiden beweist die spezifischen Bindung an eine DNA-Sequenz.

#### 3.12.1.1. Verwendete Oligonukleotide

##### mSmad7-Box AB:

for: 5'-CGGGTGGGGGGCGGGAAGGAGGCGGCGGCGGCTGGGGGCGGGGAGGGAGGG-3'

rev: 5'-CCCTCCCTCCCCGCCCCCAGCCGCGCGCCTCCTTCCCGCCCCCCCCACCCG-3'

##### mSmad7-Box CD:

for: 5'-AGGGAAGGGGGCGGAGGCGGGAGGCCTTGC-3'

rev: 5'-GCAAGGCCTCCCGCCTCCGCCCCCTTCCCT-3'

#### 3.12.1.2. Annealing der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden 100 pmol/µl in 10 mM Tris/HCl pH 8 gelöst.

##### Ansatz:

1 pmol	Vorwärts-Primer
1 pmol	Rückwärts-Primer
10 mM	Tris/HCl pH 8
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA

Der Ansatz wurde nacheinander für 5 min bei 95°C, 10 min bei 80°C und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

#### 3.12.1.3. Radioaktive Markierung der doppelsträngigen DNA

Das doppelsträngige Oligonukleotid wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase (Fa. Promega Corporation) mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP radioaktiv markiert.

#### 3.12.1.4. Protein-DNA-Interaktion

Die GST-Proteine (0,5 - 3 µg) wurden in ZnCl<sub>2</sub>-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Bei der Zugabe eines Antikörpers wurden die Proben 1 h auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurde das radioaktiv markierte Oligonukleotid zu den Ansätzen hinzugegeben und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Ladepuffer wurden die Proteine durch ein natives 5%iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das Gel getrocknet. Die

Autoradiographie erfolgte über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  durch die Röntgenfilme „Cronex“ der Fa. AGFA.

Ansatz:

x $\mu\text{g}$	Protein
1 x	ZnCl <sub>2</sub> -Puffer
0,05 pmol	radioaktiv markiertes Oligonukleotid

5 x ZnCl<sub>2</sub>-Puffer:

100 mM	HEPES pH 7,5
250 mM	KCl
25 mM	MgCl <sub>2</sub>
50 $\mu\text{M}$	ZnCl <sub>2</sub>
30%	Glycerol (v/v)
1 mg/ml	BSA
250 $\mu\text{g/ml}$	Poly(dI-dC) (Fa. Sigma-Aldrich Corporation)

Ladepuffer:

250 mM	Tris/HCl pH 7,5
40%	Glycerol (v/v)
0,2%	Bromphenolblau (w/v)

5%iges Polyacrylamid-Gel (75 ml):

7,5 ml	5 x TGE
1,88 ml	Gel B (2% Bisacrylamid)
12,5 ml	Gel A (30% Acrylamid)
563 $\mu\text{l}$	10% APS (w/v)
37,5 $\mu\text{l}$	TEMED
add. 75 ml	H <sub>2</sub> O

5 × TGE:

0,25 M     Tris  
1,9 M     Glycin  
10 mM     EDTA

Laufpuffer:

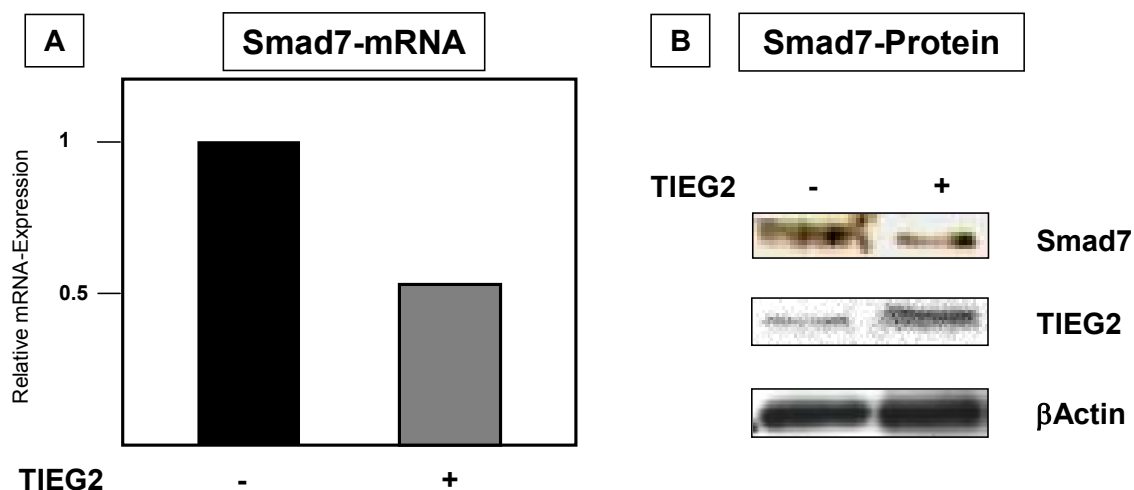
0,5 × TGE

## 4. Ergebnisse

### 4.1. TIEG2 hemmt die Smad7-Expression

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TIEG2 die TGF $\beta$ -Signaltransduktion verstärkt. Da TIEG2 als transkriptioneller Repressor bekannt ist, lag die Vermutung nahe, dass TIEG2 die Expression eines Gens hemmt, welches einen negativen Einfluss auf den TGF $\beta$ -Signalweg ausübt. Als potentielles Zielgen bot sich dabei das inhibitorische Smad7 an, das als negativer feedback die TGF $\beta$ -Signalkaskade terminiert.

Wir untersuchten daher den Effekt von TIEG2 auf Smad7 mit Hilfe eines Doxycyclin-induzierbaren Expressionskonstruktes. Die Induktion der TIEG2-Expression führte zu einer verminderten Smad7-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (siehe Abb.3).



### Abb.3: Hemmung der Smad7-Expression durch TIEG2

Ein Doxycyclin-induzierbares Expressionskonstrukt von TIEG2 (Flag-TIEG2-pBI-EGFP) wurde in 293 Tet-on-Zellen transfiziert. Die Doxycyclin-Induktion erfolgte für 24 h vor der Zellyse.

#### (A): TIEG2 hemmt die mRNA-Expression von Smad7

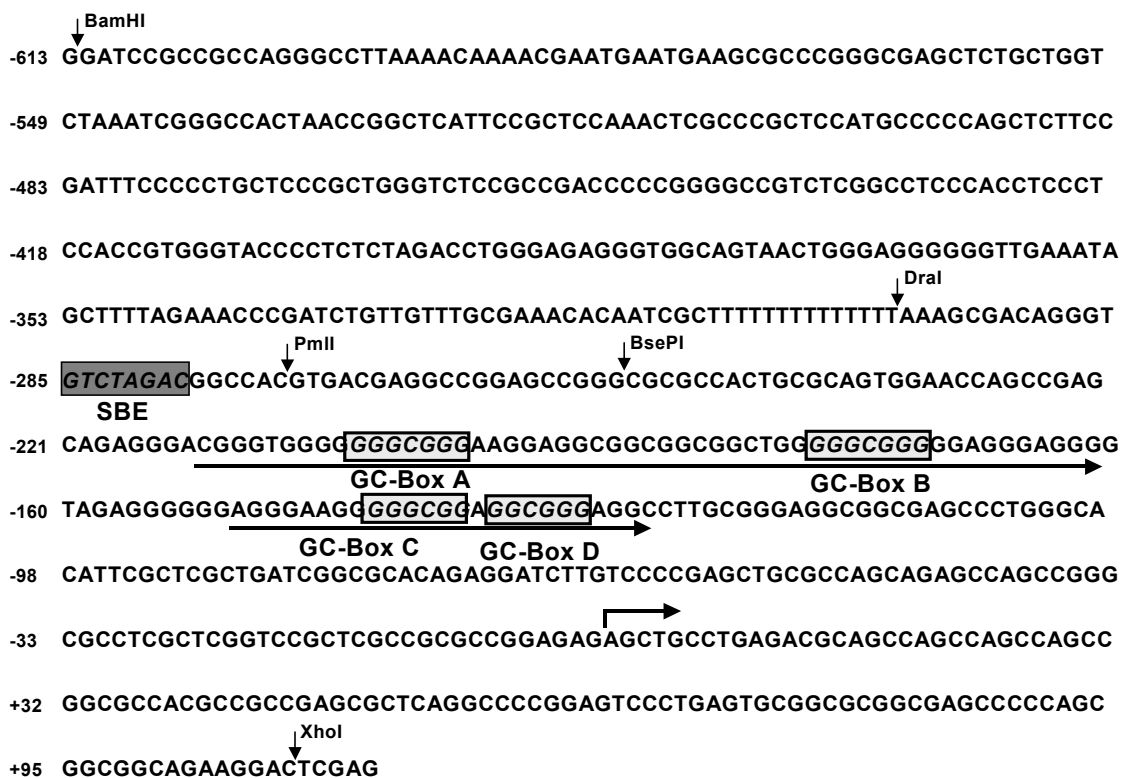
mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer PCR zeigen, dass die induzierte Expression von TIEG2 zu einer verminderten endogenen Smad7-mRNA-Expression führt. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf die Smad7-mRNA-Expression in unbehandelten Zellen.

#### (B): TIEG2 hemmt die Smad7-Expression

Mittels Western Blot-Analysen wurde die Smad7-Expression auf Protein-Ebene untersucht. Die Induktion der TIEG2-Expression ist mittels eines Flag-Antikörpers dargestellt. Als Ladungskontrolle ist die  $\beta$ Actin-Expression dargestellt.

#### 4.2. Der Smad7-Promoter verfügt über vier potentielle TIEG2-Bindungsstellen

In Abb.4 ist ein Teil des murinen Smad7 (mSmad7)-Promotors dargestellt, der für weiterführende funktionelle Untersuchungen zur Verfügung stand. Das Reporterkonstrukt Smad7-pGL725 enthält die Sequenz -613 bis +112 des murinen Smad7-Gens. Eine Analyse des Promotors zeigt, dass sich stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts eine Smad-Bindungsstelle (SBE) und 4 GC-reiche Bindungsstellen (GC-Box A-D) befinden, die von Guanin- und Adeninreichen Sequenzen flankiert werden und potentielle TIEG2-Bindungsstellen darstellen.



#### Abb. 4: Der murine Smad7-Promotor

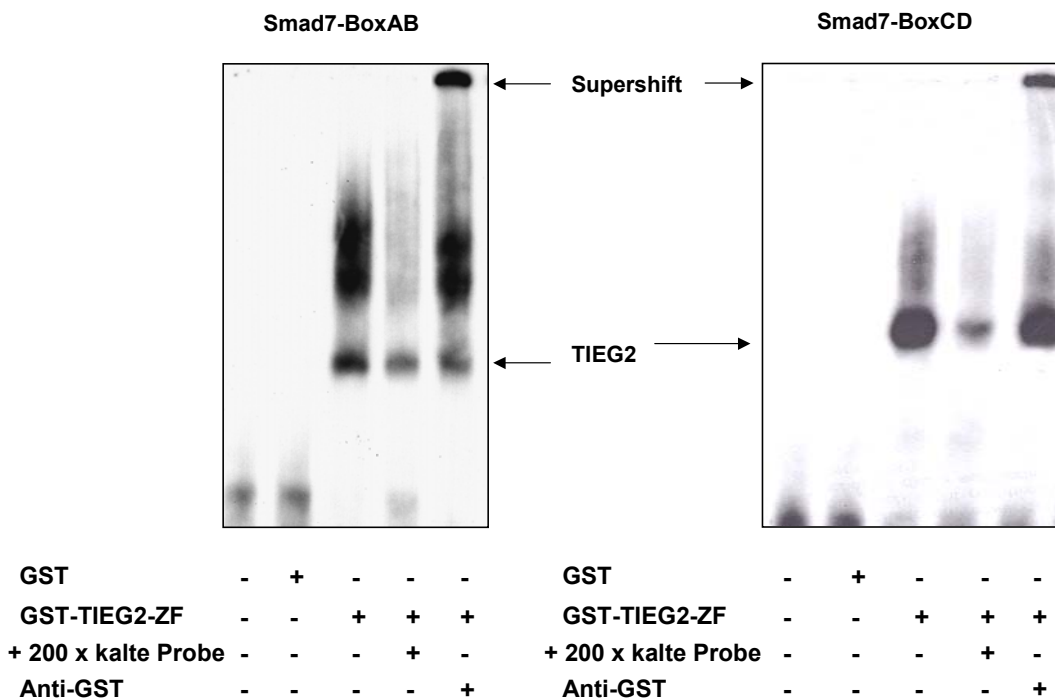
Der Promotor weist vier GC-reiche Boxen auf, die potentielle Bindungsstellen für TIEG2 darstellen. Die Pfeile stellen die verwendeten Oligonukleotide für die „electromobility shift assays“ (EMSA's) dar.

SBE = Smad-Bindungselement

GC = GC-reiche Bindungsstelle

### 4.3. TIEG2 bindet den mSmad7-Promotor

Unsere Hypothese war nun, dass TIEG2 an die GC-reichen Bindungsstellen des Smad7-Promotors bindet und konsekutiv die Transkription des Smad7-Gens verhindert. Wir führten zunächst DNA-Bindungsstudien an den 4 GC-reichen Bindungsstellen (GC-Box AB und GC-Box CD) durch (Abb.5). Die Ergebnisse von EMSA's zeigen, dass die Glutathion-S-Transferase (GST)-fusionierte Zinkfinger-Domäne von TIEG2, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist, Oligonukleotide für die Smad7-Box-AB und die Box-CD bindet. Für einen spezifischen Nachweis der TIEG2-Bindung wurde eine Kompetition der Bindung mit kalter Probe durchgeführt. Der Nachweis von TIEG2 erfolgte durch einen GST-Antikörper, der zu einem „Supershift“ des  $^{32}$ P-markierten Oligonukleotids führte.



#### Abb.5: TIEG2 bindet den Smad7-Promotor

Es wurden mit der GST-fusionierten TIEG2-Zinkfinger-Domäne Electromobility-Shift-Assays (EMSAs) an Smad7-Oligonukleotiden durchgeführt, die je zwei GC-reiche Bindungsstellen für TIEG2 enthalten. Kompetition mit unmarkiertem Oligonukleotid führt zu Abschwächung der Bindung, durch GST-Antikörper lässt sich die Spezifität der Bindung nachweisen.

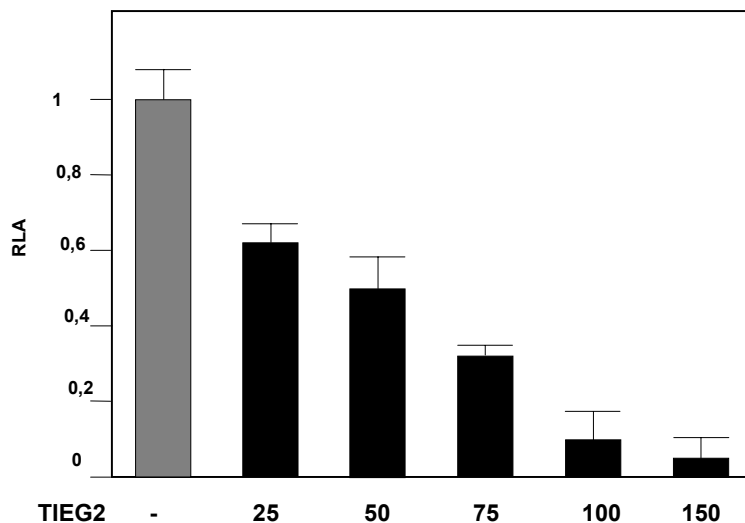
In weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass die erste Box am stärksten gebunden wird und die vierte durch TIEG2 kaum erkannt wurde. Weiterhin wurde gezeigt, dass alle vier Boxen von funktioneller Bedeutung für die TIEG2-



vermittelte Repression sind, da einzelne Mutationen der Boxen zu einer verminderten Smad7-Repression im Reporter-Assay führten (Buck A., 2004).

#### 4.4. TIEG2 hemmt den mSmad7-Promotor

Nachdem wir die Bindung von TIEG2 an den Smad7-Promotor nachgewiesen hatten, untersuchten wir den funktionellen Effekt dieser Bindung im Reporter-Assay. Es ergab sich eine deutliche dosisabhängige Repression des Promotors durch TIEG2, die die Smad7-Promotoraktivität nahezu vollständig aufhob.



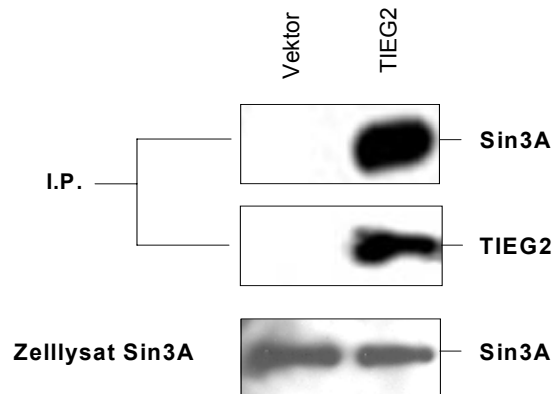
#### Abb. 6: TIEG2 reprimiert den Smad7-Promotor

100 ng Smad7-pGL725 wurden zusammen mit einer ansteigenden Menge Flag-TIEG2 transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Werte sind dargestellt als Relative Luciferaseaktivität (RLA).

#### 4.5. Die TIEG2-vermittelte Repression ist abhängig von der Interaktion mit dem Korepressor Sin3A

Ein häufiger Repressionsmechanismus von Transkriptionsfaktoren ist die Bindung von weiteren Koproteinen, im Falle Sp1-artiger Repressoren häufig Sin3A. Dieser Korepressor rekrutiert den Histondeacetylasekomplex und führt konsekutiv zu einer „Verpackung“ der DNA, die durch die Transkriptionsmaschinerie dann nicht mehr abgelesen werden kann. Um zu prüfen, ob auch TIEG2 seine Repressionsaktivität durch Bindung von Sin3A ausübt, wurden epitheliale CHO-Zellen mit Flag-TIEG2 transfiziert und über den Flag-Antikörper TIEG2 immunpräzipitiert (Abb.7). Mittels

Western Blot ließ sich im Präzipitat Sin3A nachweisen. TIEG2 scheint somit im Komplex mit Sin3A vorzuliegen und könnte seine Repression über diesen Korepressor ausüben.



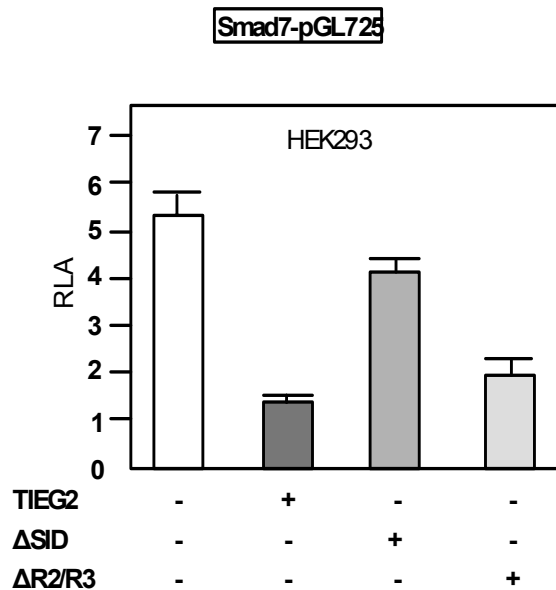
### Abb.7: TIEG2 bindet den Korepressor Sin3A

Epitheliale CHO-Zellen wurden transient mit Flag-TIEG2 transfiziert, 48 h nach der Transfektion wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt und im Präzipitat TIEG2 und Sin3A nachgewiesen.

In dem für die Immunpräzipitation benutzten Zelllysat befand sich die gleiche Menge an Sin3A.

Um die funktionelle Bedeutung dieser Bindung zu prüfen, wurden Promotorstudien mit verschiedenen TIEG2-Deletionskonstrukten und dem Smad7-pGL725-Promotor durchgeführt. Abbildung 8 zeigt die verwendeten TIEG2-Konstrukte, bei denen entweder die SID (TIEG2  $\Delta$ SID), die für die Interaktion mit Sin3A verantwortlich ist, oder die Repressionsdomänen R2 und R3 (TIEG2  $\Delta$ R2/R3) deletiert wurden. Transfektion des TIEG2-Wildtyps führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Smad7-Repression, die Promoteraktivität sank auf unter ein Drittel der Grundaktivität. Deletion der SID hob die Repression durch TIEG2 nahezu vollständig auf, während Deletion der anderen beiden Repressionsdomänen R2 und R3 die TIEG2-vermittelte Hemmung kaum einschränkte und weiterhin zu einer deutlichen Repression von Smad7 führte.

Somit scheint die Interaktion mit dem Korepressor Sin3A für die Funktion von TIEG2 als transkriptioneller Repressor unabdingbar zu sein.



**Abb.8: Die Smad7-Repression ist abhängig von der Sin3A-interagierenden Domäne (SID) von TIEG2**

100 ng Smad7-pGL725 wurden zusammen mit 100 ng Flag-TIEG2 wt, TIEG2  $\Delta$ SID oder TIEG $\Delta$ R2/R3 transfiziert. In den nach 48 h lysierten Zellen wurde die Luciferase-Aktivität gemessen und als relative Luciferase-Aktivität (RLA) der basalen Reporteraktivität dargestellt.

SID = Sin3A-interagierende Domäne

NLS = nukleäres Lokalisationssignal

NTD = N-terminale Domäne

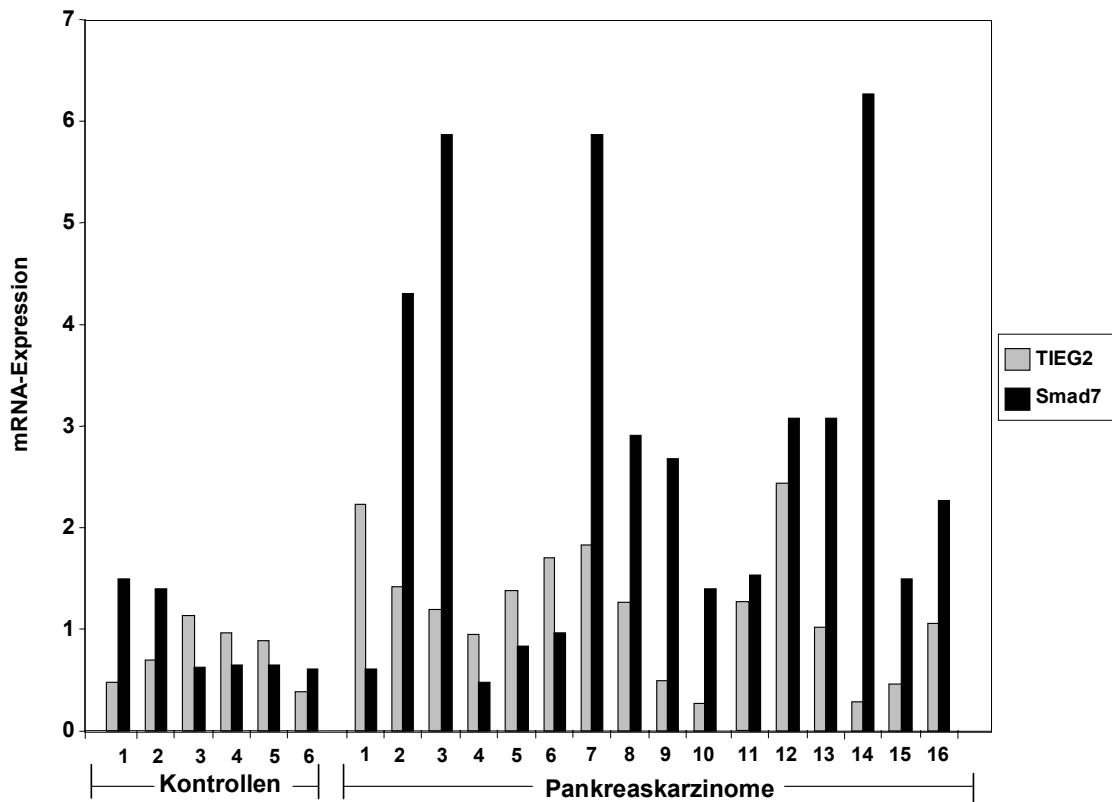
CTD = C-terminale Domäne

ZF = Zinkfinger

#### 4.6. Smad7 ist im Pankreaskarzinom überexprimiert

In zahlreichen Tumoren liegen Defekte in der TGF $\beta$ -Signalkaskade vor. Neben Smad2- und Smad4-Mutationen ist auch eine Smad7-Überexpression im Pankreaskarzinom gezeigt worden. Wir untersuchten die Smad7-mRNA-Expression in sechs gesunden Pankreasgeweben und in 16 duktaalen Adenokarzinomen (Abb.9).

In der Mehrzahl (12 von 16 Geweben) fand sich eine deutlich erhöhte mRNA-Expression von Smad7, in einzelnen Fällen lag sogar eine sechsfach höhere Expression verglichen mit den gesunden Pankreata vor. 9 von 16 Tumorproben hatten eine mindestens doppelt so hohe Expression wie die gemittelten normalen Gewebe. Um zu untersuchen, ob diese Überexpression durch den Verlust der Hemmung durch TIEG2 bedingt ist, untersuchten wir in den Tumoren auch die Expression von TIEG2. Es fand sich jedoch keine klare Korrelation zwischen TIEG2- und Smad7-Expression. Dies spricht mehr für einen qualitativen als für einen quantitativen Verlust von TIEG2 in den Tumorzellen.

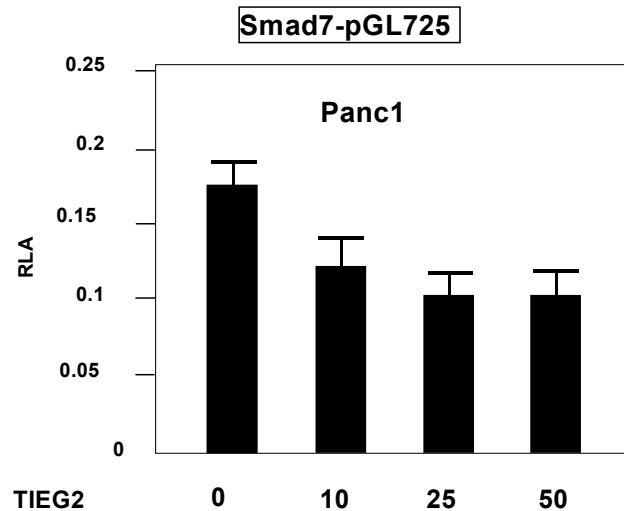


### Abb.9: Im Pankreaskarzinom findet sich eine Überexpression von Smad7

Aus 16 humanen Pankreastumoren wurden Gewebe entnommen und darin mittels quantitativer PCR die mRNA-Expression von TIEG2 und Smad7 bestimmt. Als Kontrollen dienten die Werte aus sechs gesunden Pankreasgeweben, deren mRNA-Expression gleich eins gesetzt wurde.

#### 4.7. In Tumorzellen geht die TIEG2-vermittelte Repression verloren

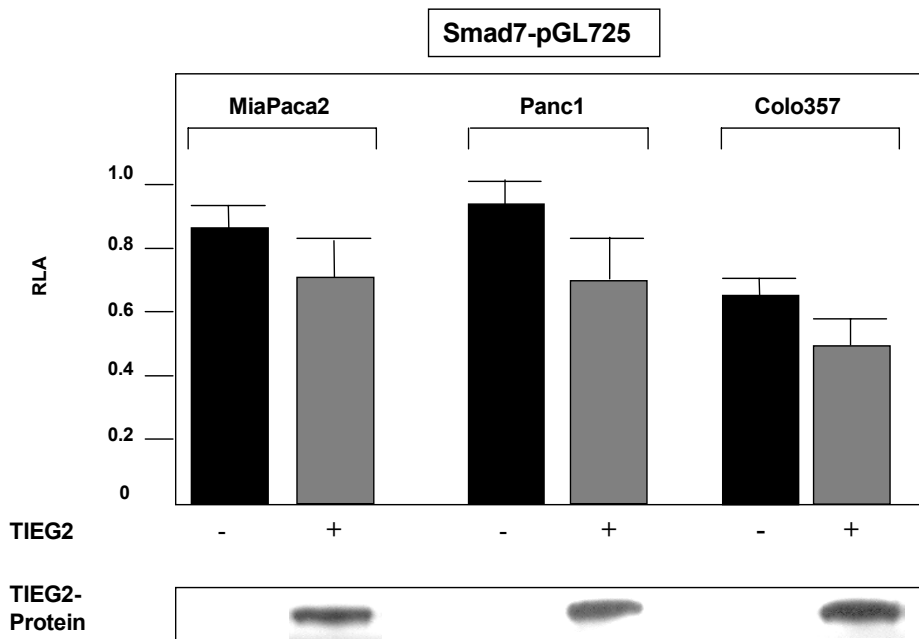
Als nächstes überprüften wir, ob die beobachtete aufgehobene Hemmung nicht ein dosisabhängiger Effekt sein könnte und sich durch Erhöhung der TIEG2-Konzentration die Hemmung von Smad7 wieder herstellen lässt (Abb.10). In Panc1-Zellen wurden ansteigende Konzentrationen von Flag-TIEG2 titriert und im Reporter-Assay die Smad7-Promoteraktivität untersucht. Die Smad7-Hemmung blieb jedoch weiterhin aufgehoben, auch eine größere Menge von TIEG2 konnte den Promoter nicht reprimieren. Also beruht die Hemmung auf einer funktionellen Ausschaltung der Repressionsaktivität und ist nicht z.B. darauf zurückzuführen, dass in Karzinomzellen eine geringere Menge von TIEG2 vorliegt oder ein weiterer Transkriptionsfaktor um die Bindung des Smad7-Promoters konkurriert.



**Abb.10 : Die verminderte Smad7-Hemmung durch TIEG2 ist nicht dosisabhängig**

Panc1-Zellen wurden mit 100 ng Smad7-pGL725 sowie mit zunehmenden Konzentrationen von Flag-TIEG2 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die relative Luciferaseaktivität (RLA) dargestellt.

Um zu prüfen, ob zwischen der Überexpression von Smad7 und TIEG2 ein funktioneller Zusammenhang besteht, wurde in verschiedenen Pankreaskarzinomzellen (MiaPaca2, Panc1, Colo357) die Smad7-Promoteraktivität bei Überexpression von TIEG2 untersucht. Die Pankreaskarzinomzellen wurden mit einem Smad7-Luciferasekonstrukt sowie mit 100 µg TIEG2-Konstrukt transfiziert und in dem Proteinextrakt die Luciferaseaktivität des Smad7-Promoters bestimmt (Abb.11). Smad7 ließ sich in den Pankreaskarzinomzellen nicht mehr durch TIEG2 hemmen, die Repression betrug allenfalls 30 Prozent, während TIEG2 in epithelialen Zellen (CHO) zu einer nahezu 100%igen Hemmung des Smad7-Promoters geführt hatte.



**Abb.11 Pankreaskarzinomzelllinien mit einer aktivierenden Ras-Mutation sind refraktär auf die TIEG2-vermittelte Smad7-Hemmung**

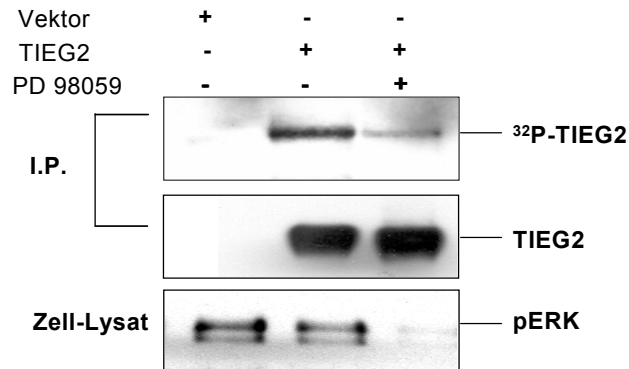
Verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien wurden mit 100 ng Smad7-pGL725 und mit 100 ng TIEG2 transfiziert. Nach 48 h wurde die Luciferase-Aktivität (RLA) bestimmt und auf die basale Promotoraktivität bezogen.

#### **4.8. Phosphorylierung von TIEG2 durch hyperaktives ERK verhindert in Panc1-Zellen die Bindung von Sin3A**

Die untersuchten Zelllinien weisen, ebenso wie nahezu 90% der Pankreaskarzinome, eine hyperaktive Ki-ras-Mutation auf. Die abwärts gelegene Signalkaskade läuft über ras-raf-MEK bis zu der Kinase ERK, für die TIEG2 vier Phosphorylierungsstellen aufweist. Da der ERK-MAPKinase Signalweg bereits als negativer Regulator für TIEG2 identifiziert wurde, lag der Gedanke nahe, dass in Tumorzellen hyperaktives ERK zu einer Phosphorylierung von TIEG2 und dadurch zu seiner funktionellen Inaktivierung führt.

Um diese These zu überprüfen, führten wir Phosphorylierungsstudien an unbehandelten Panc1-Zellen sowie an mit PD98059 behandelten Zellen durch. Dabei handelt es sich um einen selektiven Inhibitor von MEK, der die Phosphorylierung der MAPKinase ERK verhindert. Abbildung 12 zeigt die deutliche Phosphorylierung von TIEG2 und die eindeutige Anschwächung durch MEK-Inhibitor-Behandlung (1.Zeile). Die erfolgreiche Behandlung mit dem Inhibitor ist an der erniedrigten Menge an phosphoryliertem ERK

abzulesen (3.Zeile). Die Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Gesamtmenge an TIEG2 (2.Zeile)

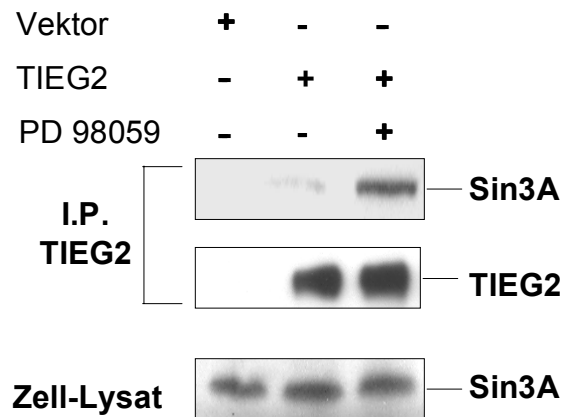


**Abb.12: TIEG2 wird in Panc1-Zellen durch ERK phosphoryliert. Pharmakologische MEK-Hemmung verringert die TIEG2-Phosphorylierung.**

Panc1-Zellen wurden mit Flag-TIEG2 transfiziert, 24 h in phosphatfreiem Medium gehalten und anschließend für 4 h mit radioaktivem Orthophosphat inkubiert. Mit den Zellen wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt und phosphoryliertes TIEG2 durch Autoradiographie detektiert. TIEG2 und phosphoERK wurden im Western blot nachgewiesen. Die MEK-Inhibitorbehandlung (50 µM PD98059) erfolgte 24 h vor der Lyse.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass die Sin3A-Bindung für die Repressionsaktivität von TIEG2 essentiell ist und in den Pankreaskarzinomzelllinien diese Repressionsaktivität verloren geht, lag der Gedanke nahe, dass durch die gezeigte Ras-vermittelte Phosphorylierung die TIEG2-Sin3A-Interaktion und damit die hemmende TIEG2-Funktion verloren geht. Flag-TIEG2 wurde in Panc1-Zellen transfiziert und ein Teil der Zellen mit PD98059 behandelt. Flag-TIEG2 wurde mittels Flag-Antikörper immunpräzipitiert und das Präzipitat gegen Sin3A gefärbt (siehe Abb.13). In den unbehandelten Zellen, in denen TIEG2 phosphoryliert vorliegt, ließ sich kein Sin3A nachweisen. Pharmakologische MEK-Hemmung und daraus resultierende verminderte TIEG2-Phosphorylierung konnten die Bindung von Sin3A wieder ermöglichen.

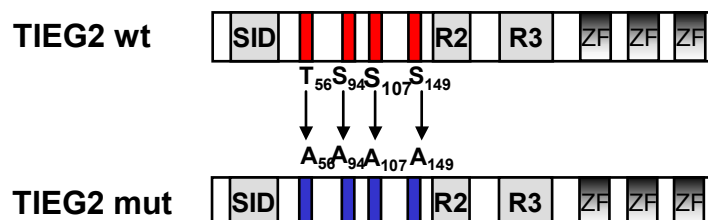
Diese Daten zeigten, dass die aktivierende ras-Mutation in den Pankreaskarzinomzellen zu einer Unterbrechung der TIEG2-Sin3A-Repressor-Korepressor-Interaktion führte, indem TIEG2 durch hyperaktives ERK phosphoryliert wird.



**Abb.13: Pharmakologische ERK-Hemmung stellt in Panc1-Zellen die Sin3A-Bindung durch TIEG2 wieder her**

Panc1-Zellen wurden mit 100 ng Flag-TIEG2 transfiziert, Flag immunpräzipitiert und ein Western Blot gegen Sin3A durchgeführt. Im Zellysat befand sich die gleiche Menge an Sin3A.

Um die Relevanz der ERK-Phosphorylierung in der ras-induzierten Hemmung von TIEG2 zu überprüfen, wurde eine TIEG2-Mutante hergestellt, bei welcher die vier ERK-Konsensus-Stellen in der Linker-Region zwischen SID und R2-Domäne mutiert sind (Abb.14).



**Abb.14: Im verwendeten TIEG2-Mutationskonstrukt wurden die vier ERK-Bindungsstellen mutiert.**

An Position 56, 94, 107 und 149 wurde Serin(S) bzw. Threonin (T) durch Alanin (A) ersetzt

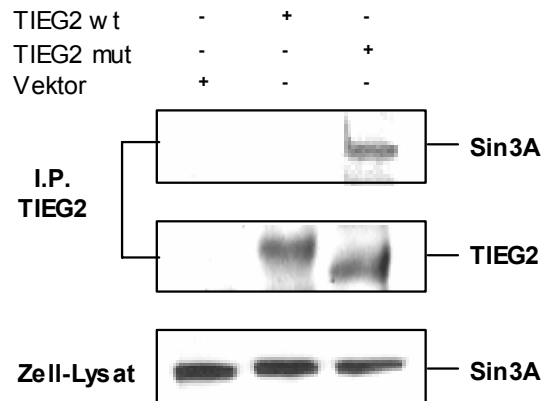
SID = Sin3A-interagierende Domäne

ZF = Zinkfinger

R = Repressionsdomäne

Panc1-Zellen wurden mit Vektor sowie den beiden TIEG2-Flag- Konstrukten transfiziert und dann Flag immunpräzipitiert (siehe Abb.15). Die unterschiedliche Höhe, auf der die TIEG2-Banden laufen (2.Zeile), ist darauf zurückzuführen, dass der TIEG2-Wildtyp phosphoryliert vorliegt. Abbildung 16 zeigt, dass Mutation der ERK-Phosphorylierungsstellen in der Tat die Bindung von Sin3A wieder herstellt und die Repressor-Korepressor-Interaktion ermöglicht.

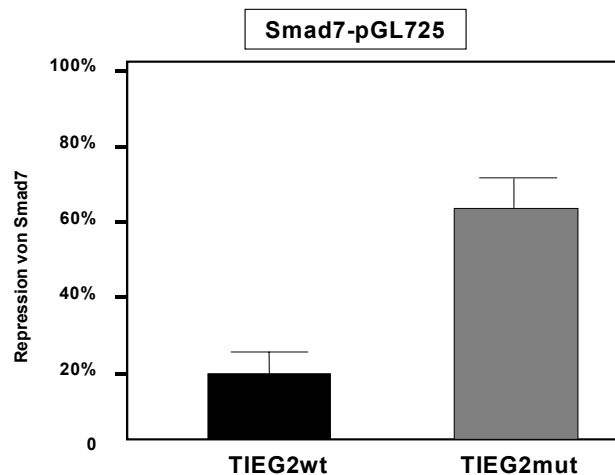




### Abb.15: Nach Mutation der Phosphorylierungsstellen kann Sin3A wieder an TIEG2 binden

Panc1-Zellen wurden mit Flag-TIEG2-Wildtyp (wt) sowie mit dem Mutationskonstrukt (TIEG2-mut) transfiziert. Flag wurde immunpräzipitiert und ein Western Blot gegen Sin3A durchgeführt. Im Zell-Lysat befanden sich gleiche Mengen an Sin3A.

Um zu prüfen, ob die wiederhergestellte TIEG2-Sin3A-Interaktion auch zu einer funktionellen Restitution von TIEG2 führt, wurde im Reporter-Assay der Effekt der TIEG2-Konstrukte auf den Smad7-pGL725-Promotor untersucht (siehe Abb.16).

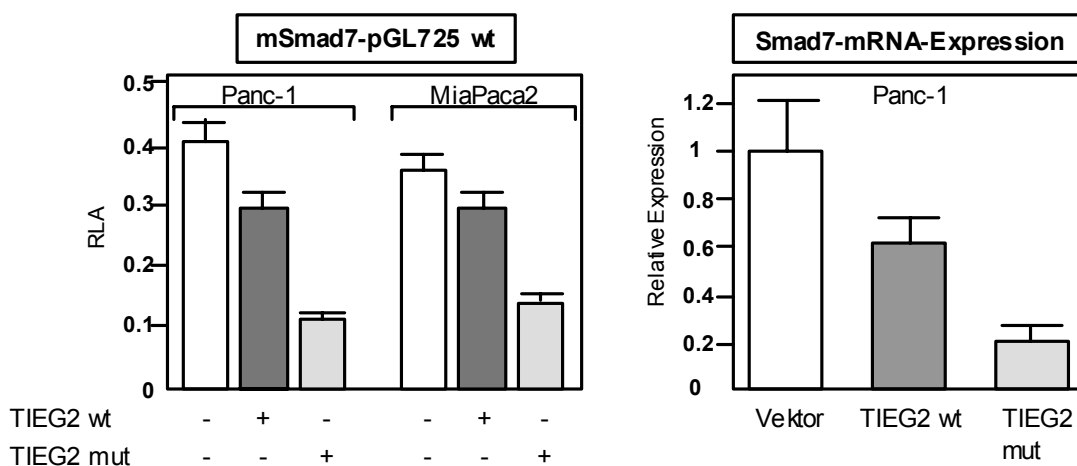


### Abb.16: Mutation der ERK-Phosphorylierungsstellen stellt die Repressionsaktivität von TIEG2 wieder her

Panc1-Zellen wurden mit 100 ng Smad7-pGL725 sowie mit 100 ng Flag-TIEG2-wildtyp bzw. TIEG2-Mutante kotransfiziert. Die Zellen wurden lysiert und Luciferaseaktivität bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Repression des Smad7-Promotors durch die jeweiligen TIEG2-Konstrukte.

Dargestellt ist die prozentuale Repression des Smad7-Promoters durch die beiden TIEG2-Konstrukte. Tatsächlich war in dem ERK-insensitiven Mutationskonstrukt die Repressionsaktivität wieder hergestellt, während der phosphorylierte TIEG2-Wildtyp den Smad7-Promotor kaum reprimieren konnte.

Wir prüften die Smad7-Repression auch in einer weiteren Pankreastumorzelllinie, MiaPaca2. Auch bei dieser Zelllinie hat TIEG2wt seinen hemmenden Effekt auf Smad7 verloren. Mutation der Phosphorylierungsstellen bewirkte ebenfalls hier eine deutliche Wiederherstellung der Smad7-Repression auf etwa 30% (Abb.17A).



**Abb.17: Wiederherstellung der Smad7-Hemmung durch das ERK-insensitive TIEG2-Konstrukt**

**A) Repression des Smad7-pGL725-Promotors durch TIEG-Wildtyp und das Mutationskonstrukt**

Panc1-und Mia-Paca2-Zellen wurden mit 100 ng Smad7-pGL725 und 100 ng Flag-TIEG2-Konstrukten transfiziert. In den nach 48 h lysierten Zellen wurde die Luciferase-Aktivität gemessen und als relative Luciferase-Aktivität (RLA) der basalen Reporteraktivität dargestellt.

**B) Hemmung der mRNA-Expression von Smad7 durch TIEG2-wt und die TIEG2-Mutante**

mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer PCR zeigen, dass die ERK-insensitive TIEG2-Konstrukt die mRNA-Expression deutlich vermindert. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf die Smad7-mRNA-Expression in unbehandelten Zellen.

Schliesslich wurde überprüft, ob sich die im Luciferase-assay gefundenen Ergebnisse in der mRNA-Expression widerspiegeln (Abb.17B). Es fanden sich in den mit TIEG2-Wildtyp transfizierten Panc1-Zellen eine etwa 40% geringere Expression, bei Transfektion mit der TIEG2-Mutante sank die Expression deutlich niedriger auf nur noch etwa 20%. Die beobachtete Wiederherstellung der Repression des Smad7-Promotors durch TIEG2mut resultierte in einer geringeren Expression.

Wir haben somit in der vorliegenden Arbeit den funktionellen Mechanismus charakterisiert, über den TIEG2 den Smad7-Promotor reprimiert und die Zellen durch

Terminierung des negativen Smad7-Feedbacks wieder sensitiv gegenüber einen TGF $\beta$ -Stimulus werden lässt. Dies geschieht über Bindung an vier GC-reiche Boxen des Smad7-Promotors und konsekutiver Interaktion mit dem Korepressor Sin3A, der wiederum über Rekrutierung der Histondeacetylase zu einer aktivem Repression des Smad7-Promotors führt.

In Pankreaskarzinomzellen mit einer aktivierenden ras-Mutation ist dieser funktionelle Mechanismus durch Phosphorylierung von TIEG2 unterbrochen und resultiert in einem Verlust der Smad7-Hemmung. Die verstärkte Smad7-Aktivierung führt über Verstärkung des negativen feedbacks der TGF $\beta$ -Signalkaskade zu einem Verlust der Zellresponsivität auf TGF $\beta$ .

## 5. Diskussion

Über Regulation der Genexpression nimmt der pluripotente Wachstumsfaktor TGF $\beta$  Einfluss auf zahlreiche vitale Funktionen, wie z.B. der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums, der Wundheilung und der Kontrolle des zellulären Immunsystems (Massague, 1998; Piek et al., 1999). Dabei kontrolliert TGF $\beta$  die Transkription seiner Zielgene durch Induktion der intrazellulären Smad-Proteine, die nach Rezeptor-vermittelter Aktivierung an spezifischen Promotorsequenzen binden und die Expression nachgeschalteter Gene induzieren. Eines dieser Zielgene ist Smad7, das als negativer Terminator der TGF $\beta$ -Smad-Signalkaskade wirkt und über Rezeptor-Inaktivierung die TGF $\beta$ -induzierte Transkription beendet.

Wenngleich der Smad-Signalkaskade zweifelsfrei eine zentrale Stellung in der TGF $\beta$ -induzierten Signaltransduktion zukommt, so zeigen jüngste Arbeiten, dass auch Smad-unabhängige Signalwege durch TGF $\beta$ -Rezeptor-Bindung initiiert werden können und – vielleicht noch wichtiger – eine heterogene Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die nicht zur Familie der Smad-Proteine gehören, an der transkriptionellen Regulation TGF $\beta$ -kontrollierter Gene teilnehmen. Zu diesen TGF $\beta$ -induzierbaren „Non-Smad“-Transkriptionsfaktoren gehören einzelne Mitglieder der AP1- und Runx-Familien sowie der Transkriptionsfaktor TIEG2, der zur Familie der Sp/KLF-artigen Zinkfingerproteine gehört. TIEG2 ist ein transkriptioneller Repressor, der seine reprimierenden Eigenschaften durch Bindung an GC-reiche Promotorabschnitte und anschließende Rekrutierung des Sin3A-Corepressor-Komplexes ausübt. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Funktion von TIEG2 in der TGF $\beta$ -vermittelten Expressionskontrolle konnten wir bereits zeigen, daß TIEG2 eine „Enhancer“-Funktion auf die TGF $\beta$ -Signaltransduktion ausübt und somit die TGF $\beta$ -induzierte Transkription seiner Zielgene verstärkt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen analysiert und ein neuer, bislang unbekannter Regelkreis der TGF $\beta$ -Signaltransduktion und Transkription identifiziert und charakterisiert. Wir konnten zeigen, dass TIEG2 über Terminierung des negativen Smad7-Feedback-Loops epitheliale Zellen für einen TGF $\beta$ -Impuls resensibilisiert und damit einen positiven Einfluss auf die Smad-vermittelte Transkription ausübt. Dabei bindet TIEG2 an vier GC-reiche Boxen des proximalen Smad7-Promotors und reprimiert dessen Expression durch Rekrutierung seines Korepressors Sin3A. Entsprechend unseren Ergebnissen resultiert diese Repressor-Korepressor-Interaktion in einer dosisabhängigen Hemmung

der Smad7-Expression. Unter Verwendung einer Vielzahl von Deletions- und Mutationskonstrukten gelang der Arbeitsgruppe von R. Urrutia der Nachweis von 3 funktionell unabhängigen Repressionsdomänen, die entsprechend als R1, R2 und R3-Domänen benannt werden (Cook et al., 1999). Dabei scheint die R1-Domäne von besonderer Relevanz in der Repression von Smad7 zu sein, da unseren Ergebnissen zufolge die Deletion dieser Sin3A-Interaktionsdomäne (SID) in einem Verlust der TIEG2-induzierten Expressionshemmung von Smad7 mündet. Im Gegensatz hierzu blieb die Deletion der Repressionsdomänen R2 und R3 ohne Einfluss auf die TIEG2-Sin3A vermittelte Repression des Smad7-Promotors. Die Funktion der Repressionsdomänen R2 und R3 bleibt daher unbekannt, in der TIEG2-vermittelten Hemmung von Smad7 sind sie jedoch ohne Bedeutung.

Die Bindung von TIEG2 an seine DNA-Bindungssequenz GGCGGG findet über drei C-terminale Zinkfinger motive statt, deren Aminosäuresequenz innerhalb der Sp/KLF-Familie stark konserviert ist. Denkbar erscheint daher, dass neben TIEG2 auch andere Familienmitglieder an diese Promotorabschnitte binden und an der Expressionskontrolle von Smad7 beteiligt sind. Tatsächlich konnte eine Konkurrenz Sp/KLF-artiger Transkriptionsfaktoren in der Regulation verschiedener Zielgene bereits nachgewiesen werden: BKLF konkurriert mit EKLF (Turner und Crossley, 1999); BTEB1 und AP2-rep konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle am AP2-Promoter (Imhof et al., 1999). Von besonderem Interesse ist dabei eine potentielle Interaktion zwischen Aktivatoren und Repressoren, deren Bindung am Zielpromotor die transkriptionelle Antwort definieren. So regulieren KLF4 und BTEB2 die Differenzierung glatter Muskelzellen gegensinnig (Adam et al., 2000; Watanabe et al., 1999) und auch für die transkriptionellen Repressoren GKLF, BTEB3 und BTEB4 ist eine Konkurrenz mit dem Aktivator Sp1 um die Bindung an den CYP1A1-Promotor gezeigt worden (Imhof et al., 1999; Kaczynski et al., 2002; Zhang et al., 1998). In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe bereits eine Bindung von Sp1 am proximalen Smad7-Promotor nachweisen und zeigen, dass Sp1 an der TGF $\beta$ -induzierten Transkription von Smad7 beteiligt ist. Dabei spielt Sp1 eine essentielle Rolle, da Hemmung der Sp1-Aktivität zu einem Verlust der TGF $\beta$ -induzierten Smad7-Expression führt. Weiterführende Untersuchungen konnten ferner zeigen, dass Sp1 mit aktivierten Smad-Proteinen einen transkriptionell aktiven Komplex eingeht und gemeinsam und in Kooperation mit den Smad Proteinen die Aktivität des Smad7-Promotors reguliert (K. Jungert, unveröffentlichte Befunde). Damit belegen unsere

Arbeiten einen neuen Mechanismus Sp1-artiger Transkriptionsfaktoren in der TGF $\beta$ -regulierten Genexpression.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und in Zusammenschau mit jüngsten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe postulieren wir ein Modell, demzufolge der transkriptionelle Aktivator Sp1 an der Induktion des negativen Smad7-Loops beteiligt ist, während der Sp1-artige Repressor TIEG2 für die koordinierte transkriptionelle Terminierung der Smad7-Expression zuständig ist. Dabei verdrängt TIEG2 seinen Kompetitor Sp1 aus dessen DNA-Bindung und beendet somit die Sp1-Smad3 vermittelte Transkription von Smad7. In einem zweiten Schritt rekrutiert TIEG2 den Korepressor-Komplex Sin3A, der über Histondeacetylierung zur aktiven Hemmung der Smad7 Expression führt. Sin3A ist zentraler Teil eines Korepressor-Komplexes, der eine wichtige Rolle in Prozessen der Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielt. Strukturelle Untersuchungen von Sin3A ergaben den Nachweis von vier PAH (Paired Amphipatic Helix) Domänen, die für die spezifische Interaktion mit transkriptionellen Repressoren und Proteinen zur Histonmodifikation verantwortlich sind (Cowley et al., 2004, Burke und Baniahmad, 2000). Dabei bindet Sin3A den Repressor TIEG2 ausschließlich über seine PAH2-Domäne (Zhang et al., 2001), wenngleich zur Entfaltung der maximalen Repressionsaktivität auch die Domänen PAH3 und PAH4-Domänen notwendig sind, über die Histon-Deacetylasen gebunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass TIEG2 über seine SID-Domäne an Sin3A bindet und dass diese Interaktion eine Voraussetzung für die TIEG2-vermittelte Repression von Smad7 darstellt. Neben TIEG2 sind weitere Repressoren beschrieben, deren Repressionseigenschaften vorrangig über Rekrutierung von Sin3A vermittelt werden. Interessanterweise zeigen einige dieser Proteine konservierte Bindungsmotive, deren Sequenz eine große Homologie zur SID-Domäne von TIEG2 aufweisen. Hierzu zählen Mitglieder der Mad-Tumorsuppressor-Familie (Schreiber-Agus und DePinho, 1998), der Sp/KLF-Familie (Zhang et al., 2001) sowie Pf1 (Yochum und Ayer, 2001) und Ume6 (Washburn und Esposito, 2001). Bindung von Sin3A resultiert in der Formation eines Multiproteinkomplexes, der weitere Ko-Repressoren wie z.B. N-Cor (nuclear repressor Corepressor) beinhaltet und eine Interaktion mit HDACs (Histondeacetylasen) ermöglicht (Aranda und Pascual, 2001; Jones und Shi, 2003). Die Formation dieses Multiproteinkomplexes ist von weitreichender Bedeutung, da Sin3A alleine nicht zur Bindung von HDACs befähigt ist. Bindung dieses Proteinkomplexes mündet in einer zeitlich und räumlich begrenzten Deacetylierung von Histonen, wodurch die

Chromatinstruktur kondensiert und die Bindung der basalen Transkriptionsmaschinerie aufgehoben wird. Folge dieser DNA-„Verpackung“ ist eine Hemmung der Transkription (Eberharter und Becker, 2002; Struhl, 1998).

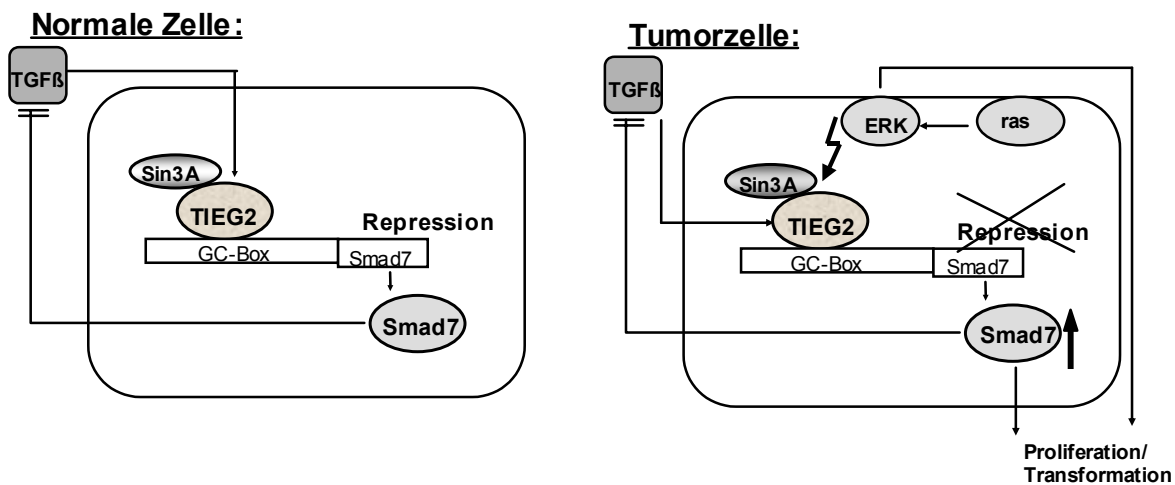
Zusammenfassend konnten wir im Rahmen dieser Untersuchungen eine neue und wichtige Funktion von TIEG2 in der TGF $\beta$ -induzierten Transkription nachweisen. Entsprechend unseren Ergebnissen bildet die TGF $\beta$ -induzierte Expression von TIEG2 einen wichtigen Regelkreis der TGF $\beta$ -Signalkaskade, deren Funktion die Terminierung des negativen Feedback-Mechanismus über Smad7 ist. Folge dieses Regelmechanismus ist eine Resensibilisierung epithelialer Zellen für TGF $\beta$  und folgerichtig eine gesteigerte Smad-vermittelte Signaltransduktion und Transkription. Somit greift TIEG2 potentiell in die Expressionskontrolle einer Vielzahl TGF $\beta$ -regulierter Gene ein. Erste Northern Blot Untersuchungen belegen dies und zeigen z.B. eine gesteigerte TGF $\beta$ -induzierte Collagen-I mRNA-Expression als Folge einer stabilen Expression von TIEG2 in epithelialen Zellen. Die wichtige Rolle von TIEG2 in der TGF $\beta$ -regulierten Genexpression wird durch weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigt, die zur Identifikation von TIEG2 als Partnerprotein der Smad-vermittelten Repression des Onkogens c-Myc führten. Dabei stimuliert TGF $\beta$  die nukleäre Translokation von Smad3 und die anschließende physikalische Interaktion mit TIEG2. Smad3 und TIEG2 binden als Komplex an spezifischen Sequenzen des c-Myc-Promtors und reprimieren dessen Transkription. Die Smad3/TIEG2 vermittelte Hemmung von c-Myc ist als Schlüsselereignis der TGF $\beta$ -induzierten Wachstumshemmung und Tumorsuppression zu verstehen, da ein Verlust der c-Myc Repression ein Versagen aller TGF $\beta$ -vermittelten tumorsupprimierenden Eigenschaften nach sich zieht (Buck A., 2004). Ein Verlust der TGF $\beta$ -vermittelten c-Myc Repression geht häufig mit Störungen der TGF $\beta$ -Signaltransduktion und -Transkription einher und wird v.a. während der Progression epithelialer Tumore beobachtet. Der Verlust der antiproliferativen Wirkung von TGF $\beta$  kann dabei Folge genetischer Alterationen der Rezeptor-Smad-Signalkaskade oder epigenetischer Störungen der TGF $\beta$ -Signaltransduktion sein (Akhurst und Derynck, 2001). Inaktivierende Mutationen der TGF $\beta$ -Rezeptoren und einzelner Mitglieder der Smad-Signalkaskade treten in epithelialen Tumoren des Gastrointestinaltraktes mit unterschiedlicher Häufigkeit auf, werden aber besonders zahlreich in Tumoren des Dickdarms und des Pankreas beschrieben und sind nach heutigem Kenntnisstand mit einem vollständigen und irreversiblen Verlust der TGF $\beta$ -Responsivität einer Tumorzelle vergesellschaftet (Goggins et al., 1998; Hahn et al.,

1996; Miyaki und Kuroki, 2003; Schutte et al., 1996). Interessanter als Tumorzellen mit genetischen Alterationen der Smad-Signalkaskade sind jedoch Karzinomzellen, die einen selektiven Verlust der TGF $\beta$ -Wachstumshemmung aufweisen, während andere TGF $\beta$ -vermittelte Funktionen erhalten bleiben. Diese Tumorzellen besitzen in der Regel eine genetisch intakte Smad-Signalkaskade, weisen aber Alterationen interagierender Signalwege auf, die Einfluss auf die TGF $\beta$ -induzierte Transkription ausüben können und durch hohe Expressionstiter von Smad7 charakterisiert sind (Roberts und Wakefield, 2003). Tatsächlich konnte eine Überexpression von Smad7 in zahlreichen Tumoren, wie z.B. des Pankreas und Colons und in Assoziation mit einem Verlust der TGF $\beta$ -Wachstumshemmung beschrieben werden (Kleeff et al., 1999). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir in einer Serie von 16 Tumoren eine deutliche Überexpression der Smad7-mRNA messen. Unter der Vorstellung, dass in diesen Tumoren mit gesteigerter Smad7-Expression ein funktioneller oder quantitativer Ausfall von TIEG2 vorliegt, führten wir sowohl Expressions- als auch Funktionsuntersuchungen zu TIEG2 im Pankreaskarzinom durch. Interessanterweise ließ sich hierbei jedoch keine signifikante und inverse Korrelation zwischen der Höhe der Smad7-Expression und der TIEG2-Expression nachweisen, obgleich niedrige TIEG2-mRNA-Level bereits in verschiedenen epithelialen Tumoren und als Folge einer Methylierung des TIEG2-Promoters beschrieben wurden (Fernandez-Zapico et al., 2003). Wichtiger als reduzierte Expressionsspiegel scheinen jedoch funktionelle Störungen von TIEG2 im Pankreaskarzinom zu sein. Unsere Untersuchungen an humanen Pankreaskarzinomzellen belegen in der Tat einen Funktionsverlust von TIEG2. Dabei konnten wir zeigen, dass die Transkriptionsaktivität von TIEG2 der strengen Kontrolle durch intrazelluläre Signalkaskaden unterliegt. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die onkogene Ras-Signalkaskade, die über Aktivierung der ERK-MAP-Kinase zur Hemmung der Repressionsaktivität von TIEG2 in Pankreaskarzinomzellen führt. Dabei resultiert die Aktivierung der ERK-MAP-Kinase in einer Phosphorylierung von TIEG2 an vier Serin/Threoninresten (T-56, S-97, S-107 und S-149) innerhalb des Linker L1 zwischen den Repressionsdomänen SID (R1) und R2. Die ERK-induzierte Phosphorylierung von TIEG2 mündet wiederum in einem Verlust der Sin3A-Korepressorbindung und konsekutiv in einem Verlust der Repressoraktivität von TIEG2. Folge dieser post-translationellen Modifikation von TIEG2 ist eine gesteigerte Expression von Smad7, die mit einem Verlust der TGF $\beta$ -erzielten Wachstumshemmung und vermutlich einer gesteigerten Tumorprogression assoziiert ist. Pharmakologische



Hemmung der Erk-MAP-Kinase oder Mutation der ERK-Phosphorylierungsstellen stellt die Bindung von Sin3A wieder her und resultiert in einer Restitution der Repressionsaktivität von TIEG2.

Der aufgezeigte Zusammenhang zwischen einer aktivierenden Ras-Mutation und einem Verlust der TIEG2-vermittelten Smad7-Hemmung bietet einen Erklärungsansatz für die Beobachtung, dass Ras-Überexpression das onkogene Potential von Smad7 verstärkt: In Keratinozyten führte Smad7 zu einer Hyperplasie, verursachte aber alleine noch keine maligne Transformation. Bei Koexpression mit dem Onkogen v-ras jedoch resultierte eine kontinuierlichen Proliferation mit Weiterentwicklung zum Karzinom (Liu et al., 2003).



**Abb.18: Modell zum Verlust der Repressionsaktivität von TIEG2 in Pankreaskarzinomzellen mit einer aktivierenden Ras-Mutation. Hyperaktives ERK führt zu einer funktionellen Inaktivierung von TIEG2. Es resultiert eine gesteigerte Smad7-Expression, die die Zellen unresponsiv auf TGFβ-induzierte Wachstumshemmung werden lässt.**

Zusammenfassend konnten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle des Non-Smad Transkriptionsfaktors TIEG2 in der TGFβ-regulierten Transkription und Wachstumshemmung aufzeigen. Dabei gelang es uns nicht nur, den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus der TIEG2 vermittelten „Enhancer“-Funktion zu charakterisieren, sondern auch seine Inaktivierung in Pankreaskarzinomzellen mit onkogener Ras-Mutation als wichtiges epigenetisches Ereignis zu definieren, welches mit einem Verlust der TGFβ-Responsivität von Tumorzellen einhergeht. Die funktionelle Störung von TIEG2 findet dabei in einer

gesteigerten Expression des antagonistischen Smad7 Ausdruck und resultiert in einer gehemmten TGF $\beta$ -Signaltransduktion und Transkription.

### **Ausblick**

Die vorliegenden Untersuchungen belegen erstmalig und am Beispiel von TIEG2 eine wichtige funktionelle Rolle der Non-Smad Transkriptionsfaktoren in der TGF $\beta$ -regulierten Transkription. Entsprechend unserer Ergebnisse moduliert TIEG2 auf verschiedenen Ebenen die TGF $\beta$ -induzierte Genexpression und übt hierüber Effekte auf die intrazelluläre Signaltransduktion und Wachstumshemmung epithelialer Zellen aus. Die Hemmung der Repressionsaktivität von TIEG2 ist von Bedeutung für den Verlust der TGF $\beta$ -Wachstumshemmung und Tumorsuppression und erfolgt durch Aktivierung onkogener Signalwege. Die Identifikation der zugrundeliegenden Mechanismen, die zum Verlust der Repressionaktivität von TIEG2 führen, erweitern unser Verständnis der dualen Rolle von TGF $\beta$  in Tumorzellen mit intakter Smad-Signalkaskade, in denen TGF $\beta$  seine tumorsupprimierenden Eigenschaften verliert und im weiteren Verlauf die Tumorprogression stimuliert. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und in Zusammenschau mit weiteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe postulieren wir ein Modell, demzufolge Non-Smad Proteine eine zentrale Rolle beim Wechsel TGF $\beta$ s vom Tumorsuppressor zum Tumorpromotor spielen. Die Expression und Aktivierung dieser TGF $\beta$ -induzierbaren Transkriptionsfaktoren könnte maßgeblich an der Auswahl TGF $\beta$  regulierter Zielgene beteiligt sein und damit die funktionelle Antwort einer Tumorzelle auf TGF $\beta$  definieren. In weiterführenden Untersuchungen sollen die Rolle und die transkriptionellen Mechanismen anderer Non-Smad Proteine in der transkriptionelle Regulation TGF $\beta$  kontrollierter Zielgene analysiert und ihre Funktion in der dualen Rolle TGF $\beta$ s im Pankreaskarzinom beleuchtet werden.

## 6. Zusammenfassung

TGF $\beta$  (Transforming growth factor beta) ist ein pluripotenter Wachstumsfaktor, der über Regulation der Genexpression wichtige antiproliferative Eigenschaften ausübt. Im Mittelpunkt der TGF $\beta$ -regulierten Genexpression stehen zwei Gruppen von Transkriptionsfaktoren – die Smad-Proteine und die neue Gruppe der Non-Smads – die für die Induktion und Repression TGF $\beta$ -regulierter Zielgene verantwortlich sind. Während die Bedeutung der Smad-Proteine als zentrale Mediatoren der TGF $\beta$ -induzierten Transkription gut untersucht ist, bleibt die Funktion der TGF $\beta$ -induzierbaren Non-Smad Transkriptionsfaktoren in der TGF $\beta$ -regulierten Genexpression und Wachstumshemmung weitgehend unklar. Zur Gruppe der Non-Smad Proteine gehört TIEG2 (TGF $\beta$ -inducible early response gene), dessen Expression durch TGF $\beta$ -stimuliert wird und in einer signifikanten Wachstumshemmung epithelialer Zellen mündet. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnten wir bereits wichtige Funktionen von TIEG2 charakterisieren und TIEG2 als einen wichtigen Regulator der intrazellulären TGF $\beta$ -Signaltransduktion und Transkription identifizieren. Dabei wirkt TIEG2 als „Enhancer“ der intrazellulären Signaltransduktion und verstärkt die TGF $\beta$ -induzierte Genexpression in epithelialen Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen charakterisiert und das inhibitorische Smad7 als neues Target von TIEG2 identifiziert. Smad7 ist ein Antagonist der TGF $\beta$ -Signalkaskade, der nach Induktion am TGF $\beta$ -Typ I-Rezeptor bindet und dessen Aktivierung beendet. Somit unterliegt die TGF $\beta$ -Signalübertragung der negativen Kontrolle über Smad7, die für eine koordinierte und zeitlich limitierte Transkription unerlässlich ist. Erst die Terminierung von Smad7 gestattet einer Zelle eine erneute Stimulierbarkeit durch TGF $\beta$ . Im Rahmen dieser Arbeit gelang es uns, TIEG2 als wichtiges Effektorprotein von TGF $\beta$  zu identifizieren und seine Bedeutung in der Terminierung des negativen Smad7-Loops zu bestätigen. Wir konnten zeigen, dass TIEG2 an vier GC-reiche Boxen des proximalen Smad7-Promotors bindet und dessen Transkription durch Rekrutierung des Corepressors Sin3A reprimiert. Folge dieser Repressor-Corepressor-Interaktion ist eine dosisabhängige Hemmung der Smad7-Expression und konsekutiv eine gesteigerte Transkription TGF $\beta$ -regulierter Zielgene.

Zahlreiche solide Tumoren einschliesslich des Pankreas und des Kolons weisen inaktivierende Mutationen des TGF $\beta$ -Smad-Signalweges auf. Folge dieser inaktivierenden Mutationen ist ein genereller Verlust der TGF $\beta$ -Responsivität, wodurch diese Tumorzellen refraktär für TGF $\beta$  werden und TGF $\beta$  seine transkriptionsregulierenden und antiproliferativen Eigenschaften verliert. Ein Verlust der TGF $\beta$ -regulierten Transkription und Wachstumshemmung wird allerdings auch häufig in Tumorzellen mit intakter Smad-Signalkaskade beobachtet, in denen zwar keine genetischen Alteration der Smad-Proteine, wohl aber erhöhte Expressionslevel von Smad7, vorliegen. Unseren Untersuchungen zufolge kann eine Überexpression von Smad7 Ausdruck einer funktionellen Inaktivierung von TIEG2 in Pankreaskarzinomzellen mit Vorliegen onkogener Ras-Mutationen sein. Dabei führt die gesteigerte Aktivierung von Ras zu einer Erk-MAP-Kinasen-vermittelten Phosphorylierung von TIEG2, die in einer Unterbrechung der TIEG2-Sin3A-Corepressor-Interaktion mündet und konsekutiv in einem Verlust der Repressionsaktivität von TIEG2 resultiert. Folge dieser funktionellen Inaktivierung von TIEG2 ist ein Verlust der kontrollierten Terminierung des negativen Smad7-Loops, wodurch Tumorzellen zumindest partiell refraktär für TGF $\beta$  werden. Hemmung der Erk-MAP-Kinasenaktivität oder Einführen Erk-insensitiver TIEG2-Mutanten mündet in einer Wiederherstellung der TIEG2-Aktivität und resultiert in einer suffizienten Hemmung der Smad7 Expression in Pankreaskarzinomzellen.

Zusammenfassend konnten wir einen neuen Regelkreis definieren, in welchem TIEG2 durch TGF $\beta$  induziert wird und eine entscheidende Rolle als Terminator des negativen Smad7-feedbacks aufweist. Dadurch wird die Smad-vermittelte Transkription von TGF $\beta$ -Zielgenen verstärkt, und die Zellen werden wieder responsiv auf einen TGF $\beta$ -Stimulus. Dieser Regelkreis wird im Pankreaskarzinom durch funktionelle Inaktivierung von TIEG2 unterbrochen und bietet damit einen Erklärungsansatz für den Verlust der TGF $\beta$ -induzierten Wachstumshemmung im Pankreaskarzinom.

## 7. Literaturverzeichnis

Adam, P. J., Regan, C. P., Hautmann, M. B., and Owens, G. K.: Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. *J Biol Chem* 275, 37798-37806 (2000)

Akhurst, R. J., and Derynck, R.: TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11, 44-51 (2001)

Aranda, A., and Pascual, A.: Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-1304 (2001)

Black, A. R., Black, J. D., and Azizkhan-Clifford, J.: Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188, 143-160 (2001)

Boulay, J. L., Mild, G., Lowy, A., Reuter, J., Lagrange, M., Terracciano, L., Laffer, U., Herrmann, R., and Rochlitz, C.: SMAD7 is a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 104, 446-449 (2003)

Buck, A.: Untersuchungen zur Bedeutung des Repressors TIEG2 in der TGF $\beta$ -vermittelten Wachstumshemmung; humanbiolog.Dissertationsschrift, Universität Ulm (2004)

Burke, L. J., and Baniahmad, A.: Co-repressors 2000. *Faseb J* 14, 1876-1888 (2000)

Cook, T., Gebelein, B., Belal, M., Mesa, K., and Urrutia, R.: Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins. *J Biol Chem* 274, 29500-29504 (1999)

Cowley, S. M., Kang, R. S., Frangioni, J. V., Yada, J. J., DeGrand, A. M., Radhakrishnan, I., and Eisenman, R. N.: Functional analysis of the Mad1-mSin3A repressor-corepressor interaction reveals determinants of specificity, affinity, and transcriptional response. *Mol Cell Biol* 24, 2698-2709 (2004)

Eberharter, A., and Becker, P. B.: Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3, 224-229 (2002)

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K.: Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276, 12477-12480 (2001)

Ellenrieder, V., Buck, A., and Gress, T. M.: TGFbeta-regulated transcriptional mechanisms in cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 31, 61-69 (2002a)

Ellenrieder, V., Zhang, J. S., Kaczynski, J., and Urrutia, R.: Signaling disrupts mSin3A binding to the Mad1-like Sin3-interacting domain of TIEG2, an Sp1-like repressor. *Embo J* 21, 2451-2460 (2002b)

Fernandez-Zapico, M. E., Mladek, A., Ellenrieder, V., Folch-Puy, E., Miller, L., and Urrutia, R.: An mSin3A interaction domain links the transcriptional activity of KLF11 with its role in growth regulation. *Embo J* 22, 4748-4758 (2003)

Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C. J., Hruban, R. H., and Kern, S. E.: Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 58, 5329-5332 (1998)

Hahn, S. A., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Schutte, M., Rozenblum, E., Seymour, A. B., Weinstein, C. L., Yeo, C. J., Hruban, R. H., and Kern, S. E.: Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. *Cancer Res* 56, 490-494 (1996)

He, W., Cao, T., Smith, D. A., Myers, T. E., and Wang, X. J.: Smads mediate signaling of the TGFbeta superfamily in normal keratinocytes but are lost during skin chemical carcinogenesis. *Oncogene* 20, 471-483 (2001)

Imhof, A., Schuierer, M., Werner, O., Moser, M., Roth, C., Bauer, R., and Buettner, R.: Transcriptional regulation of the AP-2alpha promoter by BTEB-1 and AP-2rep, a novel wt-1/egr-related zinc finger repressor. *Mol Cell Biol* 19, 194-204 (1999)

Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C. H., Heldin, N. E., and ten Dijke, P.: Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* 273, 29195-29201 (1998)

Janknecht, R., Wells, N. J., and Hunter, T.: TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev* 12, 2114-2119 (1998)

Jones, P. L., and Shi, Y. B.: N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 274, 237-268 (2003)

Kaczynski, J., Cook, T., and Urrutia, R.: Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* 4, 206 (2003)

Kaczynski, J. A., Conley, A. A., Fernandez Zapico, M., Delgado, S. M., Zhang, J. S., and Urrutia, R.: Functional analysis of basic transcription element (BTE)-binding protein (BTEB) 3 and BTEB4, a novel Sp1-like protein, reveals a subfamily of transcriptional repressors for the BTE site of the cytochrome P4501A1 gene promoter. *Biochem J* 366, 873-882 (2002)

Kleeff, J., Ishiwata, T., Maruyama, H., Friess, H., Truong, P., Buchler, M. W., Falb, D., and Korc, M.: The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* 18, 5363-5372 (1999)

Liu, X., Lee, J., Cooley, M., Bhogte, E., Hartley, S., and Glick, A.: Smad7 but not Smad6 cooperates with oncogenic ras to cause malignant conversion in a mouse model for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63, 7760-7768 (2003)

Massague, J.: TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791 (1998)

Miyaki, M., and Kuroki, T.: Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 799-804 (2003)

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.: Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389, 631-635 (1997)

Philipsen, S., and Suske, G.: A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 27, 2991-3000 (1999)

Piek, E., Heldin, C. H., and Ten Dijke, P.: Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 13, 2105-2124 (1999)

Roberts, A. B., and Wakefield, L. M.: The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8621-8623 (2003)

Schneider, G., and Schmid, R. M.: Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2, 15 (2003)

Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A.: Repression by the Mad(Mxi1)-Sin3 complex. *Bioessays* 20, 808-818 (1998)

Schutte, M., Hruban, R. H., Hedrick, L., Cho, K. R., Nadasdy, G. M., Weinstein, C. L., Bova, G. S., Isaacs, W. B., Cairns, P., Nawroz, H., Sidransky, D., Casero, R.A. Jr, Meltzer, P.S., Hahn, S.A., Kern, S.E.: DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 56, 2527-2530 (1996)

Sherr, C. J.: Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677 (1996)



Struhl, K.: Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12, 599-606 (1998)

Subramaniam, M., Hefferan, T. E., Tau, K., Peus, D., Pittelkow, M., Jalal, S., Riggs, B. L., Roche, P., and Spelsberg, T. C.: Tissue, cell type, and breast cancer stage-specific expression of a TGF-beta inducible early transcription factor gene. *J Cell Biochem* 68, 226-236 (1998)

Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., and Miyazono, K.: Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 277, 39919-39925 (2002)

Tau, K. R., Hefferan, T. E., Waters, K. M., Robinson, J. A., Subramaniam, M., Riggs, B. L., and Spelsberg, T. C.: Estrogen regulation of a transforming growth factor-beta inducible early gene that inhibits deoxyribonucleic acid synthesis in human osteoblasts. *Endocrinology* 139, 1346-1353 (1998)

Turner, J., and Crossley, M.: Basic Kruppel-like factor functions within a network of interacting haematopoietic transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1169-1174 (1999)

Washburn, B. K., and Esposito, R. E.: Identification of the Sin3-binding site in Ume6 defines a two-step process for conversion of Ume6 from a transcriptional repressor to an activator in yeast. *Mol Cell Biol* 21, 2057-2069 (2001)

Watanabe, N., Kurabayashi, M., Shimomura, Y., Kawai-Kowase, K., Hoshino, Y., Manabe, I., Watanabe, M., Aikawa, M., Kuro-o, M., Suzuki, T., Yazaki, Y., Nagai, R.: BTEB2, a Kruppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res* 85, 182-191 (1999)

Weinberg, R. A.: Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138-1146 (1991)

Wotton, D., and Massague, J.: Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 254, 145-164 (2001)

Yochum, G. S., and Ayer, D. E.: Pf1, a novel PHD zinc finger protein that links the TLE corepressor to the mSin3A-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol* 21, 4110-4118 (2001)

Zhang, J. S., Moncrieffe, M. C., Kaczynski, J., Ellenrieder, V., Prendergast, F. G., and Urrutia, R.: A conserved alpha-helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A. *Mol Cell Biol* 21, 5041-5049 (2001)

Zhang, W., Shields, J. M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., and Yang, V. W.: The gut-enriched Kruppel-like factor suppresses the activity of the CYP1A1 promoter in an Sp1-dependent fashion. *J Biol Chem* 273, 17917-17925 (1998)

