

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik

Regulation der TGF β Signaltransduktion durch Phosphorylierung des Transkriptions-Cofaktors Smif

Sebastian Kuhn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Haller

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Küster
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 12.12.2012 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.04.2013
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Vorwort	1
1.2 Der <i>Transforming Growth Factor β</i> Signalweg	1
1.2.1 Liganden-vermittelte Rezeptoraktivierung und Initiierung der TGF β -Signalkaskade	2
1.2.2 Smad-Proteine – Shuttle Proteine zwischen Rezeptorvermittelter Aktivierung und Transkriptionsregulation	3
1.2.3 Runterregulation der TGF β -Signalkaskade – Inhibitorische Smad-Proteine und Dephosphorylierung von R-Smad-Proteinen	4
1.2.4 Weitere TGF β -Signalwege – Nicht-kanonische Signalkaskaden	5
1.3 TGF β -vermittelte Vielfältigkeit der Signalantwort und zelluläre Spezifität	6
1.3.1 Regulative Mechanismen auf der Liganden-Rezeptor-Komplex Ebene	6
1.3.2 Smad-Proteine assoziieren mit zahlreichen anderen Faktoren bei der TGF β -vermittelten Genexpression	7
1.3.3 Assoziation von Smad-Proteinen mit Transkriptionsfaktoren	8
1.3.4 Einfluss von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren	10
1.4 Der Transkriptions-Cofaktor Smif	11
1.5 „ <i>Signaling Cross-Talk</i> “ – Wechselspiel mit anderen Signalwegen	12
1.5.1 Bedeutung der Linker Phosphorylierung von BMP aktivierten Smad-Proteinen am Beispiel der neuralen Differenzierung	14
1.5.2 Phosphorylierung von TGF β aktiviertem Smad2/3 kann vielfältige funktionelle Auswirkungen haben	14
1.5.3 Regulation von Smad4 durch andere Signalkaskaden	15
1.5.4 Einfluss anderer Signalwege auf Smad Transkriptionskomplexe durch Modulation Smad-assoziierter Cofaktoren	15
1.6 Aufgabenstellung	16
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen.....	19
2.1.2 Medium und Supplemente für die Zellkultur	20
2.1.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren	20

2.1.4	Kinase- & Phosphataseinhibitoren	20
2.1.5	Enzyme	21
2.1.6	Radioaktive Substanzen.....	21
2.1.7	Membranen.....	21
2.1.8	Molekulargewichtsmarker für Proteine.....	21
2.1.9	Antikörper	21
2.1.10	Material und Molekularbiologische Kitsysteme.....	22
2.1.11	Geräte	22
2.1.12	Oligonukleotide	23
2.1.13	Reporterplasmide.....	23
2.1.14	Expressionsvektoren.....	23
2.1.15	Zelllinien (tabellarisch)	24
2.1.16	Bakterienstämme	24
2.1.17	Lösungen und Puffer	25
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Mikrobiologische Arbeiten.....	27
2.2.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	28
2.2.3	Molekularbiologische Arbeiten.....	31
2.2.4	Biologische Untersuchungen.....	32
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	34
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Überblick über den Phosphorylierungsstatus von Smif	45
3.2	EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif.....	46
3.2.1	Differenzielles Verhalten von phosphoryliertem Smif in der SDS-PAGE	46
3.2.2	EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif an Serin 315, 319 und Threonin 321	47
3.3	Phosphorylierung von Smif durch andere proliferative Stimuli.....	50
3.4	TGF β selbst führt zu keiner Phosphorylierung von Smif am Serin 315 und 319 und Threonin 321	51
3.5	Zellulärer Stress induziert eine Phosphorylierung von Smif.....	52
3.6	Identifizierung von Kinasen, die Smif phosphorylieren.....	53
3.6.1	ERK vermittelte Phosphorylierung von Smif an Serin 315 und 319 und Threonin 321	53
3.6.2	Die MAP-Kinasen JNK und p38 vermitteln die Phosphorylierung von Smif nach zellulärem Stress	57
3.7	Phosphorylierung von Smif während der Mitose.....	58

3.8	Die Phosphorylierung von Smif reguliert dessen Aktivität als Transkriptions-Cofaktor.....	63
3.8.1	Einfluss von Punktmutationen an Serin 315, Serin 319 und Threonin 321 auf die TGF β -vermittelte Transkriptionsregulation.....	63
3.8.2	Negative Regulierung der TGF β -vermittelten Aktivierung des SBE ₄ -luc Reporters durch FGF2.....	65
3.8.3	Desensibilisierung gegenüber inhibitorischen Effekten von FGF2 durch Inaktivierung von Smif Phosphorylierungsstellen.....	66
3.8.4	Antagonistische und kooperative Effekte von TGF β mit FGF2 oder EGF in Abhängigkeit von Promotorsequenzen.....	69
3.8.5	Blockierung der Smif Phosphorylierung unterdrückt die TGF β -EGF induzierte Transkriptionsaktivierung.....	71
3.8.6	Einfluss von Smif bei der TGF β -FGF2 induzierten Expression spezifischer TGF β -Zielgene.....	73
3.9	Einfluss der Phosphorylierung von Smif auf Interaktionen mit TGF β Komponenten und Smad Promotorelementen.....	75
3.9.1	Phosphorylierungs-unabhängige Interaktion von Smif mit Smad4	75
3.9.2	Indirekte Bindung von Smif über Smad4 an TGF β Promotoren.....	78
3.9.3	Chromatin-Immunpräzipitation bestätigt eine DNA Assoziation von Smif <i>in vivo</i>	81
3.9.4	Bindung von Smif an DNA-Oligonukleotiden – <i>DNA-Pulldown</i>	83
3.10	Oligomerisierung von Smif und deren Einfluss auf die Rolle von Smif als Transkriptions-Co-Aktivator.....	86
3.10.1	Phosphorylierungs-unabhängige Oligomerisierung von Smif	86
3.10.2	Smad4 assoziiert mit oligomeren Smif Komplexen.....	88
3.10.3	Oligomeres Smif reguliert die TGF β -vermittelte Genexpression.....	89
3.11	Einfluss der Phosphorylierung von Smif im mRNA <i>Decapping</i>	90
3.11.1	Phosphorylierungs-unabhängige Assoziation von Smif und Dcp2.....	91
3.11.2	Einfluss der Phosphorylierung auf die Lokalisation von Smif in <i>P-Bodies</i>	92
3.12	Einfluss weitere Phosphorylierungsstellen auf die Funktion von Smif – N-terminale Phosphorylierung reguliert die Interaktion mit Smad4.....	96
4	Diskussion.....	99
4.1	Phosphorylierungs-bedingte Veränderung der Migration von Smif in der SDS-PAGE – Möglichkeiten und Grenzen dieser Analysemethode	99
4.2	Der Phosphorylierungsstatus von Smif unter verschiedenen Bedingungen.....	100
4.2.1	Phosphorylierung von Smif in proliferierenden Zellen durch Mitogen	

aktivierte Signalkaskaden.....	100
4.2.2 MAP-Kinase vermittelte Phosphorylierung von Smif nach zellulärem Stress..	102
4.2.3 Veränderungen des Phosphorylierungszustandes von Smif während des Zellzyklus	103
4.2.4 TGF β -vermittelte Phosphorylierung von Smif.....	106
4.3 Phosphorylierungs-regulative Elemente beeinflussen die Funktion von Smif als Transkriptions-Cofaktor	106
4.3.1 Smif ist ein positiver Regulator der TGF β -Antwort – Charakterisierung von zwei Smif abhängigen TGF β -Zielgenen: PAI-1 und JunB	106
4.3.2 Uneingeschränkte Funktionalität von S315,S319,T321 Phosphorylierungs-defizienten Smif für die TGF β -Signalkaskade.....	107
4.3.3 Etablierung von Modellsystemen zur Bestimmung des Einflusses mitogener Signalwege auf den TGF β -Signalweg und deren Beeinflussung durch Smif ..	107
4.3.4 Regulierung der Aktivität von Smif über dessen Phosphorylierung	109
4.3.5 Negative Regulation von Smif durch N-terminale Phosphorylierung.....	112
4.4 Smif Oligomere und Smif-Smad4 DNA-Komplexe – Mechanistisches Model für eine Smif vermittelte Transkriptionsregulation.....	113
4.5 Könnte die Funktion von Smif im Decapping Ursache für Veränderungen in der TGF β -Signaltransduktion sein?	117
5 Zusammenfassung.....	119
6 Abstract	120
7 Literaturverzeichnis	121
8 Abkürzungsverzeichnis	137
9 Danksagung	139

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Experimente zur Isolierung von Faktoren, welche Zellen transformieren, führten Anfang der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts zur Identifizierung einer neuen Klasse von sogenannten *Transforming Growth Factors Type β* (TGF β)¹⁻³.

Heute, knapp 30 Jahre später, kennt man 30 Vertreter dieser Cytokin-Familie in Menschen. Mitglieder der TGF β -Familie regulieren viele zelluläre Prozesse wie Proliferation, Festlegung und Steuerung von Zelldifferenzierungswegen, Zellmobilität, Adhäsion und Apoptose. Dadurch spielen sie eine wesentliche Rolle für die Entwicklung, Homöostase und Reparatur in Organismen⁴⁻⁷. Veränderungen dieses Signalweges sind mit Erkrankungen wie Fibrose, Atherosklerose, vererbare Hämorrhagische Teleangiektasie bis hin zu Krebs assoziiert⁸⁻¹⁰.

Diese funktionelle Vielfaltigkeit der TGF β Familie spiegelt sich gleichfalls in der umfangreichen Literatur zu diesem Thema wieder. Die Literaturdatenbank „PubMed“ listet derzeit etwa 55.000 Publikationen auf diesem Feld (Stand 2012). Es ist daher praktisch nicht möglich alle Aspekte dieses Forschungsfeldes angemessen zu berücksichtigen, weshalb im Verlauf dieser Einleitung vertiefend auf einige Punkte eingegangen werden soll. Zunächst werden wesentliche Komponenten der TGF β -Signalkaskade vorgestellt. Anschließend soll auf Mechanismen der TGF β -induzierten Genregulation näher eingegangen werden. In diesem Zusammenhang spielen zwei Faktoren eine große Rolle. Zum einen wird die TGF β -vermittelte Genexpression durch Integration zahlreicher weiterer Transkriptionsfaktoren als auch vielfältigster Cofaktoren reguliert. Deren Einfluss soll daher im Allgemeinen als auch speziell am Beispiel von Smif dargestellt werden. Der Transkriptions-Cofaktor Smif ist Thema dieser Arbeit. Zum anderen wird mit der Einbindung des TGF β -Signalweges in ein Netzwerk konkurrierender und kooperierender Signalkaskaden dieser stets moduliert. Im letzten Teil der Einleitung soll daher der aktuelle Stand der Literatur hinsichtlich der Beeinflussung des TGF β -Signalweges durch interagierende Signalkaskaden dargelegt werden.

1.2 Der *Transforming Growth Factor β* Signalweg

Der kanonische TGF β -Signalweg ist durch eine sehr geradlinige Abfolge gekennzeichnet und als solches von Invertebraten wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* bis hin zu höheren Vertebraten wie Säugern konserviert. TGF β -Liganden bilden einen Komplex mit den TGF β -Rezeptoren Typ I und Typ II. Transphosphorylierung des Typ I Rezeptors durch den Typ II Rezeptor aktiviert die Kinaseaktivität des TGF β Typ I Rezeptors, welcher intrazelluläre Rezeptor assoziierte Smad-Proteine (R-Smads) C-terminal phosphoryliert. Phosphorylierte

R-Smad-Proteine bilden mit Smad4 (Co-Smad) Oligomere. Die so aktivierten Smad-Komplexe translozieren in den Zellkern und führen direkt zu einer transkriptionellen und damit zu einer biologischen Antwort (siehe Abbildung 1.1)⁴⁻⁷.

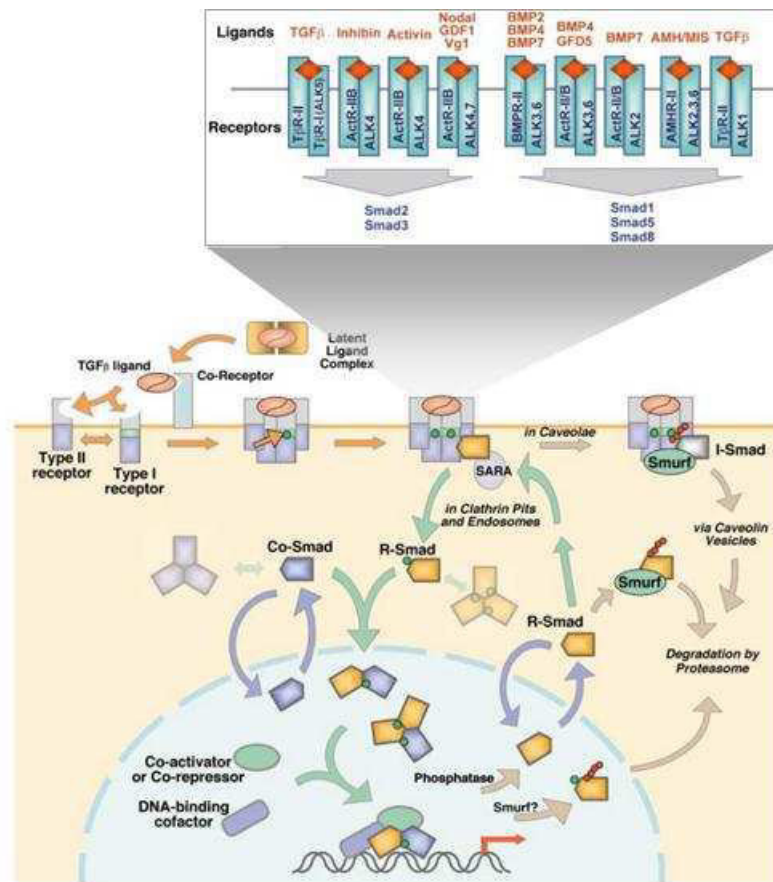


Abbildung 1.1 Übersicht über die kanonische (Smad-vermittelte) TGF β -Signalkaskade: Bildung und Aktivierung von TGF β -Liganden-Rezeptor-Komplexen (orangefarbene Pfeile/Ausschnitt oben) führen zur Phosphorylierung von R-Smad Transkriptionsfaktoren, welche im Komplex mit Smad4 nach Translokation in den Kern TGF β -Zielgene regulieren (grüne Pfeile). Dephosphorylierung und proteasomaler Abbau von Rezeptor-Komplexen und Smad-Proteinen regulieren diesen Prozess herunter (graue Pfeile). In unstimulierten Zellen translozieren Smad-Proteine kontinuierlich zwischen Zellkern und Cytoplasma (blaue Pfeile). Abbildung modifiziert nach Shi & Massagué, 2003⁶.

1.2.1 Liganden-vermittelte Rezeptoraktivierung und Initiierung der TGF β -Signalkaskade

Aktive TGF β -Liganden bestehen aus Homo- oder Heterodimeren, deren Untereinheiten mit ihren drei Cystein-Disulfidbrücken ein für diese Cytokin-Familie charakteristisches Faltungsmotiv aufweisen⁶. Hinsichtlich ihrer intrazellulär aktivierenden Signalkaskaden können sie in die zwei Gruppen TGF β /Activin/Nodal und Bone-Morphogenic-Proteins/Growth-and-Differentiation-Factors/Muellerian-Inhibiting-Substance (BMP/GDF/MIS) unterteilt werden⁶.

Derzeit sind fünf TGF β Rezeptoren Typ I, die auch *Activin-Receptor-Like Kinase* (ALK) genannt werden, und sieben Rezeptoren Typ II bekannt. Beide Typen von Membranproteinen weisen extrazelluläre Liganden-Bindungsdomänen auf, durchspannen die Zellmembran mit einer α -Helix und enthalten im cytoplasmatischen Teil eine Kinasedomäne. TGF β Typ I Rezeptoren besitzen in der juxtamembranären Region zusätzlich noch eine GS-Domäne, ein Glycin und Serin reiches Motiv. Im Gegensatz zu Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind sowohl Typ I als auch Typ II TGF β Rezeptoren Serin/Threonin-Kinasen⁷. Wie in Abbildung 1.1 dargestellt ist, stabilisieren Liganden-Dimere einen heterotetrameren Komplex aus jeweils TGF β Rezeptor Typ I/II Dimeren¹¹. TGF β oder Activin Liganden binden dabei sequenziell erst den Rezeptor Typ II, wodurch eine Konformationsänderung im Liganden eine Assoziation mit dem Typ I Rezeptor ermöglicht. BMP Liganden bilden kooperativ einen hochaffinen Ligand-Rezeptor Komplex aus⁵. Die durch den Liganden induzierte sterische Nähe von Typ I und Typ II Rezeptoren ermöglicht eine Phosphorylierung der GS-Domäne im Typ I Rezeptor durch die Kinasedomäne des Typ II Rezeptors. Infolge dessen wird die Kinasedomäne des Typ I Rezeptors und damit der gesamte Rezeptorkomplex aktiviert¹²⁻¹⁴. Die intrazelluläre Signalkaskade wird damit initiiert.

Entsprechend der Zahl von etwa 30 Liganden, fünf bzw. sieben TGF β Rezeptoren ergeben sich zahlreiche kombinatorische Möglichkeiten. Wie der obere Ausschnitt in Abbildung 1.1 zeigt, binden im Allgemeinen Liganden der TGF β /Activin/Nodal Familie an die Typ I Rezeptoren ALK4/5/7 und aktivieren Smad2/3. Im Gegensatz dazu werden Smad1/5/8 durch ALK1/2/3/6 phosphoryliert, welche BMP, GDF oder MIS als Liganden binden. Eine Loop-Region im Typ I Rezeptor (L45) und eine im C-terminalen Bereich der Smad-Proteine (L3) entscheiden dabei, welche Rezeptor-Smad-Interaktionen ausgebildet werden und damit über eine Phosphorylierung und somit Aktivierung von R-Smads¹⁵⁻¹⁷.

1.2.2 Smad-Proteine – Shuttle Proteine zwischen Rezeptorvermittelter Aktivierung und Transkriptionsregulation

Der Name Smad setzt sich aus den homologen Proteinen in *Caenorhabditis elegans* Sma^{18,19} und *Drosophila melanogaster* Mad²⁰⁻²² zusammen und verdeutlicht die evolutionäre Konservierung dieses Signalweges. Acht Vertreter (Smad1-8) sind in Säugern beschrieben. Sie werden in die drei Gruppen „Rezeptor assoziierte Smad-Proteine“ (R-Smad, Smad1/2/3/5/8), „Smad4“ auch bekannt als Co-(*Common*) Smad und „inhibitorische Smad-Proteine“ (I-Smad, Smad6/7) unterteilt. Strukturell bestehen sie aus einer konservierten N-terminalen MH1 und einer C-terminalen MH2 Domäne, die über eine variable Linker-Region verknüpft sind²³.

In unstimulierten Zellen pendeln R-Smad-Proteine und Smad4 zwischen Nukleus und Cytoplasma²⁴⁻²⁶. Aktivierung des TGF β Rezeptors führt zu einer C-terminalen Phosphorylierung von R-Smads an ihrem SXS-Motiv (siehe Abschnitt 1.2.1). Assoziierte Proteine wie „*Smad Anchor for Receptor Activation*“ (SARA) unterstützen diesen Prozess²⁷.

Über ihre MH2 Domänen mit dem phosphorylierten C-Terminus bilden R-Smads und Smad4 oligomere Komplexe, welche in den Kern translozieren und über ihre Bindung an Promotoren

von TGF β -Zielgenen die Transkription regulieren²⁸⁻³². Der laufende Prozess der Phosphorylierung von R-Smads bis hin zur nukleären Lokalisation wird durch eine Folge von Interaktionen mit regulatorischen Proteinen bestimmt, deren Bindungsstellen überlappen. So führt die Verdrängung durch in der Kaskade nachfolgende Interaktionspartner zu einer sequenziellen Abfolge³³. Beispielsweise erfolgt die Trimerisierung über den gleichen L3 Loop mit dem R-Smads an den TGF β -Rezeptor binden³⁴. Das bei der Phosphorylierung involvierte Helferprotein SARA wiederum wird von den Kernporenproteinen Nup214 und Nup153 verdrängt, die ihrerseits von nukleären Transkriptionsfaktoren, welche an Smad-Komplexe binden, abgelöst werden^{24,35,36}. Stabil an die DNA assoziierte Smad-Komplexe entziehen sich den nukleären Exportmechanismen, wodurch eine Anreicherung im Kern nach TGF β -Aktivierung erfolgt³⁷.

Über ihre MH1 Domäne assoziieren R-Smads und Smad4 mit der DNA. Promotor Analysen typischer TGF β -Zielgene wie PAI-1, JunB oder c-myc führten zur Identifizierung mehrerer Konsensussequenzen. Smad3/4 Komplexe binden beispielweise an GTCT oder CAGA im humanen PAI-1³⁸⁻⁴⁰, eine CAGACA Sequenz im murinen JunB⁴¹ oder ein GGCGGG Motiv im humanen c-myc Promotor⁴². BMP-aktivierte Smad1/5-Smad4-Komplexe binden ebenfalls an GC reiche Sequenzen des Smad6 Promotors⁴³. Hochdurchsatzverfahren mit Proteinarrays und zahlreichen DNA-Sonden konnten ebenfalls GC reiche Bindungsmotive für Smad-Proteine identifizieren⁴⁴. Eine Ausnahme bildet hierbei Smad2. Die DNA Bindung wird in allen Smad-Proteinen über einen *hairpin* in der MH1 Domäne vermittelt. Dieser ist durch ein zusätzliches Exon im Smad2 Gen inaktiviert. Smad2 kann daher nur indirekt über Smad4 mit der DNA assoziieren^{39,45}. Die Bindung von Smad-Proteinen an die DNA ist durch eine niedrige Affinität gekennzeichnet. Wie in Abschnitt 1.3.2ff noch ausführlich dargestellt wird, entsteht erst durch Interaktion mit assoziierten Transkriptionsfaktoren ein stabiler Komplex, der eine Transkriptionsregulation ermöglicht^{46,47}.

Verschiedene Smad-Proteine können gleichzeitig durch einen Liganden-Rezeptor-Komplex aktiviert werden. Unterschiede in *knock-out* Mausmodellen zeigen aber, dass *in vivo* diese Effektoren nicht austauschbar sind und offensichtlich unterschiedliche Gene regulieren. Während Smad2-/- *knock-out* Mäuse aufgrund einer defekten Gastrulation embryonal letal sind, können Smad3-/- *knock-out* Mäuse vital geboren werden, entwickeln im Verlauf aber eine starke Autoimmunerkrankung, welche dessen Lebenserwartung stark reduziert⁴⁸. Auch Expressionsstudien von Smad2 oder Smad3 defizienten Fibroblasten zeigten, dass Gene wie c-Fos Smad3 abhängig waren, während andere wie MMP2 durch Smad2 induziert wurden. Eine dritte Gruppe wurde sowohl von Smad2 als auch Smad3 reguliert⁴⁹. Dazu zählen Gene wie PAI-1 oder p15.

1.2.3 Runterregulation der TGF β -Signalkaskade – Inhibitorische Smad-Proteine und Dephosphorylierung von R-Smad-Proteinen

TGF β -Liganden aktivierte R-Smad-Smad4 Transkriptionsfaktorkomplexe induzieren die Expression von inhibitorischen Smad-Proteinen (I-Smads; Smad6/7) und damit die

Deaktivierung der TGF β -Signalkaskade^{50,51}. I-Smads entfalten ihrer Aktivität auf mehreren Ebenen. Durch Bindung an TGF β Rezeptoren blockieren sie die Bindung und Phosphorylierung von R-Smads^{50,52,53} und rekrutieren mit der GADD34-PP1c Phosphatase⁵⁴ und der E3-Ligase Smurf⁵⁵⁻⁵⁷ Komponenten, die den Rezeptor dephosphorylieren und einer anschließenden proteasomalen Degradation zuführen.

Des Weiteren inaktivieren I-Smads die R-Smad-Smad4-Oligomere durch Interaktion mit deren Untereinheiten. Beispielsweise konkurrieren Smad4 und Smad6 um die Bindungsstelle in Smad1, wodurch sich in einem Fall transkriptionell aktive Smad1-Smad4-Komplexe im anderen aber inaktive Smad1-Smad6-Komplexe ausbilden⁵⁸. Neben der Aktivität von Smurf gegenüber den TGF β -Rezeptorkomplex, sind Smad-Proteine gleichfalls Zielproteine dieser E3-Ubiquitinligase und werden dadurch negativ reguliert^{57,59-61}.

Ein weiterer Mechanismus der negativen Regulation der TGF β -Signalkaskade stellt die Inaktivierung von trimeren Smad-Komplexen durch Dephosphorylierung des C-Terminus dar. Neben PPM1A⁶², welches Smad2/3 dephosphoryliert, können die Phosphatasen SCP⁶³ oder PDP⁶⁴ BMP-assoziierte Smads dephosphorylieren. Im Gegensatz zur proteasomalen Degradation ermöglicht dieser Mechanismus der konstitutiven Dephosphorylierung, des nukleären Exports und der Reaktivierung durch den TGF β -Rezeptor eine permanente Rückkopplung von Smad-Proteinen an den Liganden-Rezeptor-Komplex⁷.

1.2.4 Weitere TGF β -Signalwege – Nicht-kanonische Signalkaskaden

Neben der bisher beschriebenen TGF β -Smad-vermittelten Transkriptionsregulation induziert der TGF β -Rezeptor-Komplex noch weitere intrazelluläre Signalkaskaden. Dieser auch als *non-Smad* oder nicht-kanonisch bezeichnete Signalweg ist durch die TGF β -vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen, GTPase und des PI3K-Akt Signalweges gekennzeichnet⁶⁵. So wurde beispielsweise die Aktivierung von p38 oder JNK durch die MAP3K TAK (*TGF β Activated Kinase*) nach Stimulation mit TGF β oder BMP beobachtet⁶⁶⁻⁶⁸. In Kooperation mit der Smad Signalkaskade können sie die TGF β -vermittelte Apoptose regulieren⁶⁹. Daneben wurden auch TGF β -vermittelte Regulationsmechanismen auf translationaler Ebene beschrieben. Die TGF β -Akt-vermittelte Phosphorylierung von hnRNP E1 inhibiert dessen Assoziation mit regulativen Elementen von den mRNAs Dab2 und ILEI, wodurch diese translatiert werden können. Die TGF β -induzierte Translation beider Gene spielt bei der Epithelial-Mesenchymalen-Transition eine Rolle^{70,71}. Das Beispiel hier zeigt, dass TGF β auch über post-transkriptionelle Prozesse Einfluss auf die Expression nehmen kann.

Kürzlich wurde ein weiterer TGF β -vermittelter Mechanismus beschrieben. TGF β bzw. BMP aktivierte R-Smads (Smad1 oder Smad3) binden Smad4-unabhängig an RNA-Sequenzen von primary-microRNAs (pri-miRNAs) und rekrutieren den *Drosha-Microprocessing Complex*. Diese Rolle von R-Smads bei der Prozessierung von microRNAs war bisher als solches nicht bekannt. Interessant hierbei ist, dass die Bindung von R-Smads an spezifische pri-miRNA Sequenzen erfolgt. Die RNA-Sequenzmotive CAGAC und CAGGG ähneln dabei den DNA-

Motiven an die die R-Smads in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor binden^{72,73}. R-Smad-Proteine weisen offensichtlich weitere Funktionen neben der als Transkriptionsfaktor auf.

1.3 TGF β -vermittelte Vielfältigkeit der Signalantwort und zelluläre Spezifität

Wie kann der gleiche Ligand TGF β 1: a.) auf Endothelzellen Smad1/5/8 vermittelt Id1 aktivieren und damit Migration und Angiogenese stimulieren, während TGF β 1 auf vielen anderen Zellen Smad2/3 Signalwege aktiviert b.) in T-Helferzellen die Differenzierung in Th2 Zellen stimulieren oder c.) die myogene Differenzierung von Myoblasten blockieren? Durch eine Endothel-spezifische Expression des akzessorischen Rezeptors Endoglin kann TGF β 1 anstatt des gängigen TGF β -Rezeptor Typ I ALK5 den TGF β -Rezeptor Typ I ALK1 in den Liganden-Rezeptor-Komplex rekrutieren (siehe Abbildung 1.1). ALK1 phosphoryliert im Gegensatz zu ALK5 Smad1/5/8, wodurch Id1 induziert wird⁷⁴⁻⁷⁷. Im zweiten Fall assoziieren in T-Zellen TGF β 1 aktiviertes Smad3 und der T-zellspezifische Transkriptionsfaktor GATA-3, um die Expression von den Th2 Differenzierungsgenen IL-5 und IL-10 zu induzieren⁷⁸. Was den Differenzierungsblock von Myoblasten betrifft, so deuten Daten in der Literatur auf ein synergistisches Zusammenwirken von TGF β und Notch Signaleffektoren bei der Expression von Hes-1, welcher die Myogenese inhibiert⁷⁹.

Ein und derselbe Ligand reguliert in Abhängigkeit vom zellulären Kontext und der Beeinflussung durch andere Signalwege unterschiedliche Gene und kann damit unterschiedlichste biologische Antworten hervorrufen. Modulationen treten dabei auf allen Ebenen der TGF β -Signalkaskade auf.

1.3.1 Regulative Mechanismen auf der Liganden-Rezeptor-Komplex Ebene

Sezernierte TGF β -Liganden assoziieren in einer inaktiven Form an die extrazelluläre Matrix. Die Freisetzung des TGF β -Liganden stellt somit die erste Regulationsstufe im TGF β -Signalweg dar. Dieser Prozess wird durch Proteasen (Plasmin/Matrix-Metalloproteinasen) oder auch Integrine reguliert⁸⁰. So bindet beispielsweise Integrin $\alpha_v\beta_6$ spezifisch TGF β 1/3 nicht aber TGF β 2. Eine Hochregulierung von Integrin $\alpha_v\beta_6$ bei Verwundungen oder Entzündungen aktiviert somit TGF β und dessen anti-inflammatorische Eigenschaften und Wundheilungsfunktion⁸¹.

Einen weiteren entscheidenden Faktor bildet die Konzentration des TGF β -Liganden. So zeigten Studien, dass TGF β -Liganden wie Activin und BMP Gradienten in Embryonen bilden. Activin induziert in Blastomeren von *X. laevis* die Differenzierung unterschiedlichster Stufen des Mesoderms von posteriolateralen Mesoderm bis zum Spemann-Organisator. Bei niedrigen Konzentrationen wird der mesodermale Marker Xbra im posteriolateralen Mesoderm exprimiert. Hohe Konzentrationen an Activin führen zur Expression von *Xenopus* gooseoid

(Xgsc) im Spemann-Organisator^{82,83}. Die absolute Zahl der gebundenen Moleküle pro Zelle entscheidet dabei über die genspezifische Aktivierung⁸⁴.

Die Konzentration an aktiven Liganden wird zusätzlich durch Antagonisten reguliert. So binden die Faktoren Noggin und Chordin, welche vom Spemann-Organisator sezerniert werden, BMP4 und unterdrücken dessen Eigenschaften als Aktivator des ventralen Mesoderms und der Epidermis, wodurch die neurale Differenzierung während der Gastrulation eingeleitet werden kann⁸⁵⁻⁸⁷.

Wie eingangs schon erwähnt, können akzessorische Rezeptoren wie Endoglin bestimmte TGF β -Liganden binden und alternative Signalwege induzieren. Akzessorische Rezeptoren spielen bei der Differenzierung von Liganden für die Zelle eine Rolle bzw. ermöglichen erst eine Ausbildung des Liganden-Rezeptor-Komplexes. So reicht die Affinität von TGF β 2 allein nicht aus, um den T β RII Rezeptor zu binden. Betaglycan wird für seine Aktivität benötigt^{88,89}. Die Expression von Betaglycan, die man z.B. auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, Myoblasten oder Endothelzellen beobachtet, bestimmt daher über die Zellspezifität des Liganden⁵.

Schließlich regulieren intrazelluläre Faktoren Dauer und Intensität der Rezeptoraktivität und damit die Signalantwort. Clathrin vermittelte Endozytose in Endosomen, wo der Rezeptor mit Smad-SARA Komplexen assoziiert ist, führen zu einer Aufrechterhaltung des Signals. Dem entgegen wirkt die Smad7-Smurf-Caveolin-vermittelte Endozytose degradierend (siehe Abbildung 1.1)⁹⁰.

1.3.2 Smad-Proteine assoziieren mit zahlreichen anderen Faktoren bei der TGF β -vermittelten Genexpression

Mit einem CAGA DNA Erkennungsmotiv könnten Smad Transkriptionsfaktoren das gesamte Chromosom weit über das Maß ihrer beobachteten Genspezifität hinaus markieren. Allein ihre niedrige Affinität verhindert dies. Smad-Komplexe könne erst dann an der DNA stabilisiert werden, wenn ihre DNA Erkennungsmotive mehrfach hintereinander geschaltet auftreten, oder wenn interagierende DNA bindende Proteine diese Komplexe stabilisieren^{46,47}.

Ersteres tritt in Fällen wie z.B. der transkriptionellen Induktion von Smad7 auf⁹¹. In den meisten Fällen kooperieren Smad-Proteine mit anderen DNA bindenden Transkriptionsfaktoren und ermöglichen dadurch eine stabile Bindung an die DNA. Zusätzlich assoziieren Smads mit Co-Aktivatoren oder Repressoren, die die Transkription positiv oder negativ regulieren (siehe Abbildung 1.2). Die Vielzahl an interagierenden Transkriptionsfaktoren zusammen mit der Tatsache, dass diese Transkriptionsfaktoren zelltypspezifisch exprimiert werden und selbst funktionell-regulativen Mechanismen unterliegen, erklärt die Vielseitigkeit und Gewebsspezifität in der TGF β -vermittelten Signalantwort mit^{46,47}.

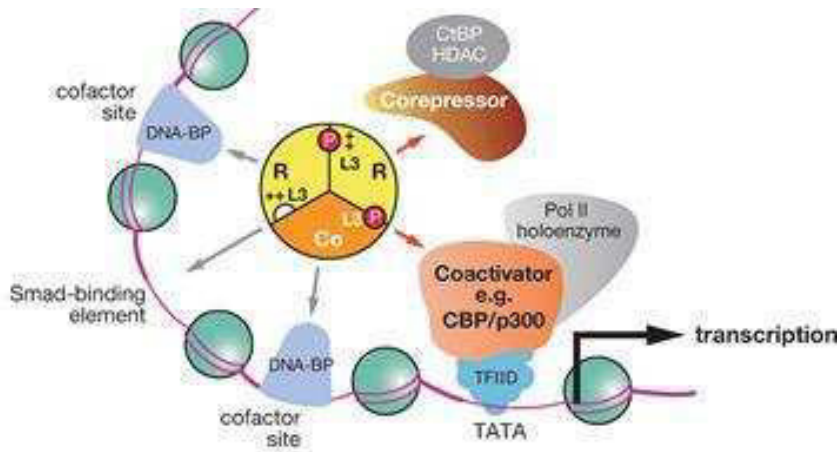


Abbildung 1.2 **Modell der Smad vermittelten Transkriptionsregulation:** R-Smad und Co-Smad-(Smad4)-Komplexe binden über Smad-Bindungs-elemente an die DNA. Interaktion mit anderen DNA assoziierten Transkriptionsfaktoren stabilisiert Smad-DNA-Komplexe. Rekrutierung von positiv und negativ agierenden Cofaktoren entscheidet über Signalstärke und Signaldauer. Abbildung modifiziert nach Feng & Derynck, 2005⁴⁷.

1.3.3 Assoziation von Smad-Proteinen mit Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren unterschiedlichster Familien können an die MH1- oder die MH2-Domäne von Smad-Proteinen direkt binden⁴⁷. So bindet der Transkriptionsfaktor FAST1 an die MH2-Domäne von Smad2 und kann nach Aktivierung durch den TGF β -Liganden Activin zusammen mit Smad2/4 Entwicklungsgene wie Mix.2 induzieren⁹². Die Kopplung der Expression von FAST1, nicht aber die von Smad2, an frühe Entwicklungsstufen im Embryo stellt einen Mechanismus dar, wie die TGF β -Signaltransduktion zeitlich und gewebsspezifisch die Expression von Mix.2 reguliert und begrenzt. Ein vergleichbares Beispiel wurde mit GATA3 einleitend angeführt (siehe Abschnitt 1.3).

Eine weitere Stufe an Komplexität zeigt die Regulation des Zellzyklusinhibitors p21^{CIP}, welcher in epithelialen Zellen durch TGF β -induziert wird. Hier binden distal FoxO-Smad-Komplexe⁹³ und proximal Sp1-Smad-Komplexe⁹⁴ den Promotor. Unterschiedliche Transkriptionsfaktoren scheinen hierbei in der TGF β -vermittelten Regulation eines Genes involviert zu sein.

Interaktionen von Smad2/3 mit Mitgliedern der AP-1 Familie von Transkriptionsfaktoren wurden mehrfach in der Literatur beschrieben⁹⁵⁻⁹⁸. Im Einklang dazu wurden TGF β -regulierte Gene wie PAI-1, COL1A2 oder MMP-1 ursprünglich als AP-1-abhängige Gene identifiziert. Analysen der Promotoren wie PAI-1^{97,99} oder c-Jun⁹⁶ zeigen sowohl AP-1- als auch Smad-DNA-Bindungs-elemente. Kooperationen bei der Induktion dieser Gene wurden beschrieben^{96,97}. Molekular wurde dabei ein Modell der Bindung von Smad-AP1-Komplexen an ein DNA-Element beschrieben⁹⁸. Alternative Modelle gehen von unabhängigen Bindungen von Smad und AP-1 Transkriptionsfaktoren an unterschiedliche DNA-Elemente aus. Durch Rekrutierung unterschiedlicher Cofaktoren ergänzen sich beide Transkriptionsfaktoren dabei^{96,97}. Aber auch inhibitorische Wechselwirkungen zwischen beiden Transkriptionsfaktorfamilien sind in der Literatur aufgeführt. In Experimenten mit Reporterkonstrukten, welche ausschließlich Smad-

DNA-Bindungselemente aufwies, trat eine negative Beeinflussung durch Überexpression von AP-1 Transkriptionsfaktoren c-Jun und JunB auf. Als Ursache dafür wurde die Konkurrenz von AP-1 und Smad Transkriptionsfaktoren um den limitierenden Transkriptions-Cofaktor CBP/p300 als auch eine Blockierung der Smad-DNA Interaktion durch Komplexbildung mit AP-1 Transkriptionsfaktoren diskutiert⁹⁷.

Smad-Transkriptionsfaktor-Komplexe können ebenso bei der transkriptionellen Repression von Genen kooperieren. Smad3/4-Komplexe zusammen mit dem Transkriptionsfaktor E2F4 und dem Co-Repressor p107 binden an ein „*TGFβ inhibitory element*“ der DNA und reprimieren den c-myc Promotor^{100,101}.

TGFβ-aktiviertes Smad3 kann Runx2 binden, wodurch Runx2 Zielgene wie Osteocalcin inhibiert werden und so die Differenzierung von mesenchymalen Zellen in Osteoblasten blockiert wird^{102,103}. Im Gegensatz dazu assoziieren die beiden verwandten Transkriptionsfaktoren Runx1 und Runx3 mit Smad3/4 Komplexen und aktivieren den *germ line IgC-alpha* Promotor beim Antikörper-Isotyp-Wechsel zu IgA¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Während im ersten Fall Smad3 DNA-unabhängig an Runx2 bindet und möglicherweise über Rekrutierung von Histon-Deacetylasen inhibitorisch wirkt, weist der *germ line IgC-alpha* Promotor im zweiten Fall Smad- und Runx-DNA-Bindungsmotive für die Transkriptionsaktivierung auf.

Interessanterweise wird die Expression von Runx3 durch TGFβ in B-Zellen selbst induziert, um anschließend einen Isotypwechsel einzuleiten¹⁰⁷. Ein solcher vorwärts gerichteter Mechanismus (*feed-forward* oder *self-enabling response*) bei dem durch den TGFβ-Liganden erst Transkriptionsfaktoren induziert werden, die dann in einer zweiten Welle mit Smad-Proteinen weitere Gene regulieren, ist für den TGFβ-Signalweg nicht ungewöhnlich^{7,46}. So induziert TGFβ in epithelialen Zellen den Transkriptionsfaktor ATF3, welcher zusammen mit Smad3 die Expression von Id1 durch Bindung an dessen Promotor inhibiert¹⁰⁸. Die Konsequenzen daraus lassen sich in der zeitlich unterschiedlichen Aktivierung von TGFβ-regulierten Genen ablesen^{109,110}.

Mit Hilfe modernster Sequenziermethoden wurde vor kurzem die Bindung von Smad3 an die DNA auf genomischer Ebene charakterisiert. Dabei zeigte sich eine starke Überlappung der Smad3 Bindungsstellen mit sogenannten „*Master Transcription Factors*“ Bindungsstellen. „*Master Transcription Factors*“ sind zelltypspezifische, stark exprimierte Transkriptionsfaktoren, welche die Identität einer Zelle bestimmen. Die Autoren dieser Publikation postulieren eine zelltypspezifische TGFβ-Smad Genregulation, welche überwiegend durch Wechselwirkungen mit diesen „*Master Transcription Factors*“ bestimmt wird. Ein solches Modell steht im Widerspruch zur klassischen Ansicht, welche die zelltypspezifische Genregulation in der Interaktion mit zahlreichen in der Zelle exprimierten normalen Transkriptionsfaktoren sieht¹¹¹.

Die Regulierung von Smad-assoziierten Transkriptionsfaktoren durch andere Signalwege soll an dieser Stelle nur angerissen werden. Wie eingangs schon erwähnt, regulieren TGFβ1-aktiviertes Smad3 und Notch aktivierter *Notch intracellular domain* Transkriptionsfaktor die Expression von Hes-1 in der Myogenese⁷⁹. Exemplarisch soll hier die Aktivierung von AP-1 Transkriptionsfaktoren durch Cytokine, Wachstumsfaktoren, zellulären Stress oder als Reaktion auf bakterielle oder virale Infektionen erwähnt sein¹¹².

1.3.4 Einfluss von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren

Als Transkriptions-Cofaktoren bezeichnet man Moleküle oder Komplexe, welche Dauer und Amplitude der Transkription positiv oder negativ beeinflussen können. Im Gegensatz zu Transkriptionsfaktoren binden diese dabei nicht direkt an die DNA. Aktivierung der DNA-abhängigen RNA Polymerase II, „Chromatin remodelling“ sowie Modifizierungen von Histonen stellen Möglichkeiten dar, wie Cofaktoren die Transkription regulieren^{113,114}. Smad-Proteinen interagieren mit zahlreichen Cofaktoren. Zusätzlich können Transkriptionsfaktoren, welche mit Smad-Proteinen wechselwirken weitere Cofaktoren einbringen, wodurch die TGF β -Signalantwort moduliert wird⁴⁷.

TGF β , Activin oder Nodal induzierte Smad2/3-Smad4-Komplexe assoziieren mit ARC105 einer Untereinheit des ARC/Mediator Komplexes. Dieser ARC/Mediator Komplex ermöglicht eine direkte Aktivierung der RNA Polymerase II und damit eine Transkription von TGF β -Zielgenen¹¹⁵.

Modifizierungen von Histon-Proteinen verändern die Zugänglichkeit der DNA für assoziierende Proteine wie RNA-Polymerasen. Neutralisierung von Lysin-Seitenketten durch deren Acetylierung und die damit verbundene Auflockerung der DNA-Struktur unterstützt die Bindung des Transkriptionskomplexes. Smad-Proteine können direkt und indirekt über weitere Cofaktoren zahlreiche Histon-Acetyltransferasen wie CBP/p300, GCN5 oder PCAF rekrutieren⁴⁷. Die Bindung von CBP/p300 erfolgt dabei über eine „Smad activation domain (SAD)“, welche in der Linker-Region von Smad3 und Smad4 identifiziert wurden^{116,117}. Weitere Cofaktoren wie MSG1 verstärken die Bindung von Smad4 mit CBP/p300 durch ihre Interaktion mit beiden Proteinen¹¹⁸. ZEB1, welches ebenfalls die Bindung von Smad-Proteinen an Histon-Acetyltransferasen CBP/p300 und PCAF unterstützt, weist zusätzlich noch eine Genspezifität bestimmter TGF β -Zielgene über deren DNA-Bindungsdomäne auf¹¹⁹. Offensichtlich überschneiden sich hier klassische Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors mit denen eines Cofaktors.

Interessanterweise ist ZEB2, das homologe Protein zu ZEB1, ein Repressor für Smad-Transkriptionsfaktorkomplexe. Es bringt mit CtBP eine Histondeacetylase in Smad-Komplexe ein^{119,120}. Transkriptions-Cofaktoren wie c-Ski und SnoN assoziieren mit BMP und TGF β aktivierten Smad-Komplexen und blockieren unter anderem die antiproliferativen Effekte von TGF β oder regulieren BMP vermittelte Entwicklungsprozesse^{121,122}. Auf molekularer Ebene erfolgt diese durch Corekrutierung von Repressoren wie N-CoR und mSin3 und assoziierten Histon-Deacetylasen durch c-Ski oder SnoN¹²³. Des Weiteren zerstört c-Ski R-Smad-Smad4-Komplexe durch Bindung an Smad4-R-Smad Interaktionsdomänen¹²⁴. SnoN, welches in Zellen basal exprimiert ist, wird nach TGF β Stimulation degradiert und etwa 2 Stunden später reexprimiert. Dieser Mechanismus einer negativen Rückkopplung begrenzt die TGF β -Signaltransduktion und stellt gleichzeitig eine weitere Kontrollebene im basalen Zustand dar¹²⁵. Beide Co-Repressoren c-Ski und SnoN sind proto-onkogene und werden in ihrer Funktion als Repressoren für Smad-Komplexe im Zusammenhang mit malignen Veränderungen diskutiert¹²⁶.

Faktoren, wie TRIM33 können bestimmte Histonmodifikationen erkennen und durch Interaktion mit Smad-Proteinen Transkriptionsfaktoren an die DNA rekrutieren. So spielen Nodal aktivierte TRIM33-Smad2/3 Komplexe, welche über TRIM33 acetyliertes und methyliertes Histon H3 (K9me3-K18Ac) in den Promotoren von Gsc und Mixl1 erkennen, bei der Mesendoderm-Differenzierung in der Embryogenese eine wesentliche Rolle¹²⁷.

Neben der Bindung von Histon modifizierenden Enzymen durch Smad-Komplexe wurden Assoziationen von Smad2/3 mit BRG1, einer Untereinheit des Chromatin-Remodelling-Komplex SWI/SNF, in der Literatur beschrieben¹²⁸. Nukleosom-Strukturen, welche durch SWI/SNF verschoben werden, erleichtern die Zugänglichkeit der für die Transkription nötigen Faktoren.

Zusammenfassend deuten die umfangreichen Erkenntnisse auf ein komplexes nukleäres Netzwerk von Smad Interaktionspartnern hin, welche im Fall von Transkriptionsfaktoren die DNA-Bindungsspezifität mitbestimmen. Cofaktoren regulieren über ihren Einfluss auf die Chromatinstruktur und den RNA-Polymerase II Komplex die Signalstärke und Dauer. Bisher noch weniger genau verstanden sind die Mechanismen, welche die Zelltypspezifität determinieren. Hier spielen Faktoren wie Intensität und Art der TGF β -Signalkaskade, die Verfügbarkeit von interagierenden Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren sowie die Beeinflussung der TGF β -Signalkaskade durch andere Signalwege eine wesentliche Rolle (siehe Abschnitt 1.5).

1.4 Der Transkriptions-Cofaktor Smif

Smad4-Interaktionsstudien mittels eines Yeast Two-Hybrid-Systems führten zur Identifizierung eines neuen Smad4 Interacting Factor (Smif)¹²⁹.

Smif ist ein evolutionär konserviertes Protein, welches von höheren Eukaryoten (Säugetiere, Pflanzen) bis hin zu niederen Eukaryoten (Hefe) exprimiert wird. Die Expression von Smif konnte in verschiedensten Organen als auch über die gesamte Entwicklung vom Embryo bis zur adulten Maus nachgewiesen werden^{129,130}.

Die TGF β -vermittelte Assoziation von Smif mit Smad4 führt zu einer Smad4-vermittelten nukleären Translokation von Smif. Experimente mit TGF β -, BMP- oder Activin-aktivierten Reporterkonstrukten deuten auf eine generelle positive Transkriptionsregulation durch Smif hin. Smif assoziiert über seinen N-Terminus mit Smad4. Die regulativen Funktionen für die Transkription erstrecken sich zentral über die Aminosäuren 124 bis 390. Die Punktmutation W302L von Smad4 blockiert die Bindung mit Smif und deuten auf eine Assoziation von Smif mit der Linker-Region von Smad4¹²⁹.

Mäuse mit inaktivierten Smif Locus sind vital, zeigen aber einen ausgeprägten Autoimmunphänotyp, welcher durch lymphozytäre Infiltrate in unterschiedlichsten Organen sowie einer Glomerulonephritis gekennzeichnet ist. Sowohl Autoantikörper als auch das Auftreten von aktivierten Effektor-T-Zellen unterstützen diesen Phänotyp. *In vitro* zeigten CD4+ T-Lymphozyten eine stärkere Proliferation nach T-Zell-Rezeptorstimulation sowie eine verminderter Sensitivität gegenüber dem anti-proliferativen TGF β -Stimulus. In Gegensatz zu

Smad4 *knock-out* Mäusen, welche embryonal letal sind, deutet der vergleichsweise milde Phänotyp der Smif *knock-out* Maus auf eine Fehlregulierung einiger weniger TGF β -Zielgene¹³⁰.

Andere Studien zeigten Interaktionen von Smif mit Komponenten anderer Signaltransduktionswege als auch andere zelluläre Prozesse und deuten auf eine multifunktionale Rolle von Smif.

So wurde kürzlich Smif als negativer Transkriptionsregulator bei der IL1 α -vermittelten Aktivierung der NF κ B Signalkaskade beschrieben. Durch Bindung an den Transkriptionsfaktor p65 inhibiert Smif die Aktivierung von IL1 α Zielgenen wie IL-8¹³¹.

Daneben bildet Smif einen zentralen Bestandteil des mRNA Decapping Komplexes und damit bei der Degradation von mRNAs. In diesem Zusammenhang wird Smif auch als Dcp1a (Decapping Protein 1a) beschrieben¹³². Smif bindet die katalytische Untereinheit des Decapping-Komplexes Dcp2 und agiert als akzessorisches Protein bei der enzymatischen Hydrolyse der Cap-Struktur. Die so ungeschützte mRNA kann vom 5' Ende durch Exonucleasen weiter degradiert werden¹³³. Daneben wird durch die Bindung von Smif an PCRN2, welches seinerseits über Upf1 die Maschinerie zur Erkennung von mRNAs mit vorzeitigem Stop-Codon (*non-sense* mRNAs) bindet, der Decapping-Komplex für die Degradation von *non-sense* mRNAs rekrutiert¹³⁴. Neueste Studien zeigten, dass die Funktion von Smif im Decapping von der Ausbildung trimerer Smif-Komplexe über α -Helices im C-Terminus abhängig ist¹³⁵.

Beide katabolen Prozesse des mRNA Abbaus, an welchen Smif beteiligt ist, finden in speziellen cytosolischen Strukturen, welche als *Processing Bodies* (P-Bodies) bezeichnet werden statt. Diese hochmolekularen Strukturen agieren als Speicher für untranslatierte mRNA-Protein-Komplexen (mRNPs) und organisieren gleichzeitig Komponenten des mRNA Abbaus wie Deadenylasen, Decapping-Komplexe oder Nukleasen¹³⁶⁻¹³⁸. Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Smif machen diese granulären Strukturen im Cytoplasma sichtbar¹³⁹. Neben der Funktion von nukleären Smif als Transkriptions-Cofaktor wurde Smif als Bestandteil des Decapping-Komplexes bei der Degradation nukleärer mRNAs beschrieben. Noch während der Synthese der mRNA durch den RNA-Polymerase II Komplex kann die naszierende mRNA und der RNA-Polymerase II Komplex durch Decapping und nachfolgender Exonucleasen wieder degradiert werden¹⁴⁰.

1.5 „*Signaling Cross-Talk*“ – Wechselspiel mit anderen Signalwegen

Schon mit der ersten Isolierung von TGF β als Faktor für die Transformation normaler Fibroblasten wurde ein synergistisches Zusammenspiel von TGF β mit TGF α oder EGF aufgezeigt^{1,2}. Später nachdem die TGF β -Signalkaskade detailliert charakterisiert war, konnte mit der EGF-vermittelten Phosphorylierung der Smad1-Linker-Region erstmals auf molekularer Ebene ein Zusammenhang zwischen TGF β und anderen Signalwegen näher beschrieben werden¹⁴¹. Mittlerweile weiß man, dass zahlreiche andere Signalwege auf allen Ebenen der TGF β -Signalkaskade eingreifen können und diese sowohl positiv als auch negative

beeinflussen. Die TGF β -Signalkaskade agiert nicht als isolierte kausale Kette, sondern ist vielmehr in ein Netzwerk von Signalwegen eingebettet, so dass neben den zuvor besprochenen zellspezifischen TGF β -Komponenten auch Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen („*signaling cross-talk*“) Einfluss auf die Reaktion einer Zelle auf einen TGF β -Liganden nehmen^{46,47,142–145}.

Beispiele solcher Interaktionen wurden schon mit der Regulierung von Smad-assoziierten Transkriptionsfaktoren durch andere Signalkaskaden beschrieben (Abschnitt 1.3.3). In diesem Kapitel soll verstärkt auf die direkte Beeinflussung von Smad-Proteinen und deren assoziierten Cofaktoren eingegangen werden. Wie in Abbildung 1.3 zu erkennen ist, stellt die Phosphorylierung dabei ein wesentliches regulatives Element dar. Phosphorylierungen in Smad-Proteinen finden dabei abseits der C-terminalen aktivierenden Phosphorylierung vornehmlich in der Linker-Region statt und regulieren Lokalisation, Stabilität oder Aktivität.

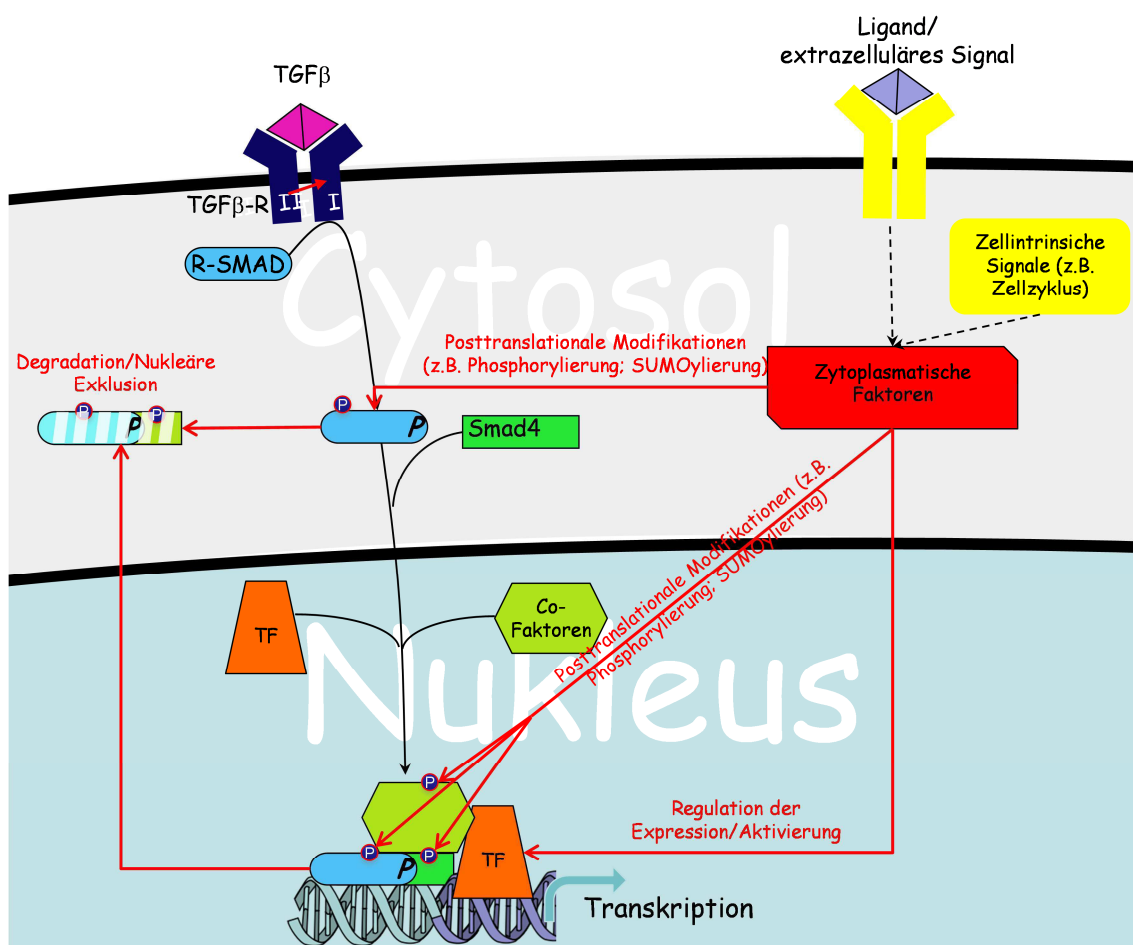


Abbildung 1.3 **Modell der Beeinflussung des kanonischen TGF β -Signalweges:** Extrazelluläre Signale wie auch intrinsische Signale aktivieren intrazelluläre Faktoren, welche Einfluss auf die Stabilität, Lokalisation und Aktivität von Faktoren der TGF β -Signalkaskade nehmen. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen von Smad-Proteinen oder Smad-assoziierten Cofaktoren dienen als Mediator anderer Signalwege. Integration von Transkriptionsfaktoren, welche durch intrinsische/extrinsische Signale reguliert werden, bestimmen als Bestandteil von Smad-Transkriptionsfaktorkomplexen über die Genregulation mit.

1.5.1 Bedeutung der Linker Phosphorylierung von BMP aktivierten Smad-Proteinen am Beispiel der neuronalen Differenzierung

Eingehend wurden Wechselwirkungen von TGF β -Liganden mit Wachstumsfaktoren wie FGF oder IGF in der Entwicklungsbiologie studiert. Dabei wurden unter anderem kooperative Effekte von FGF mit Activin während der Mesodermbildung in *Xenopus laevis* Embryonen aufgezeigt^{146,147}. Detailliert studiert wurde das Zusammenspiel von BMP Liganden mit der FGF Signalkaskade. BMP blockiert die neuronale Differenzierung und muss für die neuronale Induktion inaktiviert werden. Dies erfolgt durch eine FGF8 und IGF2 bedingte Phosphorylierung der Linker-Region von BMP aktiviertem Smad1¹⁴⁸. *In vitro* Studien zeigten eine ERK vermittelte Phosphorylierung, welche als Initiator für weitere GSK3- β Phosphorylierungen in der Linker Region dienen. So phosphoryliertes Smad1 führt zu einer verminderten Assoziation mit Komponenten des Kernporenkomplexes und resultiert in einer nukleären Exklusion. Zusätzlich wird Smad1, welches in der Linker-Region phosphoryliert ist, über die Ubiquitin-Ligase Smurf1 einem proteasomalen Abbau zugeführt^{149,150}. Diese Ergebnisse liefern eine molekulare Erklärung für die in *Xenopus laevis* Embryonen beobachteten Effekte bei der neuronalen Differenzierung¹⁵⁰. Umgekehrt stellt die Inhibition von GSK3- β durch den Wnt Signalweg und der daraus resultierenden verminderten Phosphorylierung der Smad1-Linker-Region ein Beispiel für das positive Zusammenspiel von BMP- und Wnt-Signaltransduktion bei der epidermalen Differenzierung dar¹⁴⁹.

1.5.2 Phosphorylierung von TGF β aktiviertem Smad2/3 kann vielfältige funktionelle Auswirkungen haben

Während Rezeptor-Tyrosin-Kinase aktivierte MAP-Kinasen über die Phosphorylierung der Linker-Region von Smad1 eher antagonistisch auf die BMP-Signaltransduktion wirken, ist die Situation für TGF β aktivierte Smad2/3 Proteine sehr vielseitig. Wie im Fall für Smad1 konnte eine verminderte nukleäre Lokalisation von Smad2/3 nach TGF β -Stimulation beobachtet werden, wenn die Zellen onkogenes Ras exprimieren oder mit EGF stimuliert wurden. Molekular konnte dies ebenfalls mit einer ERK-vermittelten Phosphorylierung in der Linker-Region von Smad2/3 erklärt werden¹⁵¹. Demgegenüber stehen Publikationen, welche entgegengesetzte Auswirkungen der Phosphorylierung der Linker-Region für die TGF β -Signaltransduktion beschreiben. Die Aktivierung von JNK durch TGF β selbst¹⁵² aber auch durch Scherstress in Endothelzellen¹⁵³, HGF in Epithelzellen^{154,155} oder PDGF in Kupffer-Sternzellen¹⁵⁶ kann zu einer Phosphorylierung der Linker-Region von Smad2/3 und einer verstärkten nukleären Translokation bzw. transkriptionellen Aktivität nach TGF β -Stimulation führen. Inwiefern die beobachteten funktionellen Unterschiede mit differenziellen Phosphorylierungszuständen in der Linker-Region korrelieren lässt sich anhand der Daten in der Literatur nicht ableiten. Das Beispiel der Phosphorylierung von Serin 203/207 in der Smad3-Linker-Region, welche vermittelt durch ERK¹⁵⁷ negativ aber vermittelt durch ROCK oder p38¹⁵⁸ positiv auf die TGF β -Smad3-Transkriptionsaktivierung wirkt, deutet jedoch auf eine Zelltyp-spezifische Komplexität über das Level der Phosphorylierungsstellen hinaus. Zusätzlich deuten Studien in unterschiedlichen Tumoren auf eine selektive Beeinflussung der TGF β -Signalkaskade durch onkogene MAP-Kinasen hin. Während TGF β -assoziierte, tumorinhibierende Funktionen wie Apoptose oder Zellzyklusarrest durch onkogene Signalwege

blockiert werden, werden tumorfördernde TGF β -Funktionen wie Migration, Invasion oder Epithelial-Mesenchymale Transition nicht beeinflusst oder gar gefördert¹⁴⁵.

Eine negative Beeinflussung von Smad2/3 durch Phosphorylierung mittels der Zellzyklus-regulierten Kinasen CDK2/4 ist ebenfalls bekannt. CDK4 bzw. CDK2 Aktivierung in der mittleren bis späten G1-Phase korreliert dabei mit einer Phosphorylierung von Smad3 *in vivo*¹⁵⁹.

1.5.3 Regulation von Smad4 durch andere Signalkaskaden

Smad4 wird, wie auch die R-Smads, durch andere Signalwege in seiner Aktivität beeinflusst. *In vivo* Markierungsexperimente zeigten eine Phosphorylierung von Smad4, was auf mögliche phosphorylierungsabhängige Regulationsmechanismen deutet¹⁶⁰. Mit Nemo-like Kinase (NLK)¹⁶¹, der *AMP-activated protein kinase* AMPK38¹⁶² und ERK¹⁶³ wurden Kinasen identifiziert, welche Smad4 in unterschiedlichen Domäne phosphorylieren können. Funktionelle Daten in *D. melanogaster* deuten auf eine inhibitorische Wirkung von NLK auf die Funktion des Smad4 homologen Proteins Mad während der Entwicklung der Flügel¹⁶⁴. Bisher fehlen diesbezüglich funktionelle Daten in höheren Eukaryoten. AMPK38 kann neben TGF β durch zellulären und oxidativen Stress als auch durch Cytokine wie TNF α aktiviert werden und durch Phosphorylierung von R-Smad-Proteinen und Smad4 die TGF β -vermittelte Transkription positiv beeinflussen¹⁶². Eine ERK vermittelte Smad4 Phosphorylierung am Threonin 276 in der Linker-Region, welche dessen nukleäre Lokalisation und transkriptionelle Aktivität verstärkt, wurde gleichfalls beschrieben¹⁶³.

Im Zusammenhang mit der Zellpolarität wurde kürzlich ein Smad4-abhängiger Regulationsmechanismus beschrieben. TGF β kann epitheliale Zellen in mesenchymale Zellen transdifferenzieren (Epithelial-Mesenchymale Transition) und spielt damit bei Prozessen wie Wundheilung aber auch Tumorinvasion und Metastasierung eine große Rolle. *Liver Kinase B1* (LKB1) hält als ein Gegenspieler die Polarität von Epithelzellen aufrecht. Mit der Identifizierung einer LKB1 vermittelten Phosphorylierung von Smad4 am Threonin 77 in der MH1-Domäne, welche die DNA Assoziation von Smad4 blockiert, wurde ein Wechselspiel zwischen beiden Faktoren für die Epithelial-Mesenchymale Transition molekular beschrieben¹⁶⁵.

Wie auch für R-Smad-Proteine wurde der Einfluss onkogener Signalwege auf Smad4, welches als Tumorsuppressor in Karzinomen beschrieben wurde, untersucht. Smad4 wird durch onkogenes Ras in seiner Expression unterdrückt¹⁶⁶. *In vitro* Studien deuten dabei auf eine p38/JNK vermittelte Phosphorylierung von Tumor-assoziierten mutiertem Smad4 R100T, welche Smad4 einem proteasomalen Abbau zuführt¹⁶⁷.

1.5.4 Einfluss anderer Signalwege auf Smad Transkriptionskomplexe durch Modulation Smad-assoziierter Cofaktoren

Smad assoziierte Cofaktoren können auch durch Phosphorylierungen reguliert werden. So konnte eine MAP-Kinase vermittelte Phosphorylierung von TGIF identifiziert werden, welche den Co-Repressor TGIF stabilisiert und Smad Transkriptionsfaktoren inhibiert^{168,169}. Solche Daten stehen im Einklang mit anderen antagonistischen Effekten von EGF oder onkogenem Ras auf die TGF β -Smad2/3 Signaltransduktion (siehe Abschnitt 1.5.2). Im Gegensatz dazu werden

Cofaktoren wie Ski durch Insulin/IGF oder HGF aktiviertes Akt phosphoryliert und destabilisiert¹⁷⁰. Auch hier zeigt sich ähnlich wie bei Smad-Proteinen eine Zelltyp und Kontext Abhängigkeit, da Phosphorylierung am Threonin 458 Ski degradiert, während Serin 515 phosphoryliertes Ski keine funktionellen Auswirkungen zeigt^{170,171}. Beeinflussungen des Transkriptions-Cofaktors Smif durch andere Signalwege im Zusammenhang mit der TGF β -Signaltransduktion sind bisher noch nicht beschrieben und sind Gegenstand dieser Arbeit (siehe Aufgabenstellung Abschnitt 1.6). Gleichwohl wurden Phosphorylierungen durch andere Signalwege beschrieben (siehe Abschnitt 3.1). Die Regulation der Funktion von Smif im Decapping über dessen Phosphorylierung wurde kürzlich in der Literatur dargestellt¹³¹.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zahlreiche andere Signalwege Einfluss auf die TGF β -Signaltransduktion nehmen. Die Phosphorylierung von intrazellulären Komponenten der Signalkaskade stellt dabei einen geläufigen Mechanismus dar, welcher Lokalisation, Aktivität und Stabilität mitbestimmt. Widersprüchliche Beobachtungen in der Literatur deuten dabei auf eine Komplexität, welche zum einem vom Gesamtstatus der zahlreichen Phosphorylierungsstellen mitbestimmt wird. Darüber hinaus spielen zellintrinsische Faktoren wie interagierende Transkriptionsfaktoren oder Cofaktoren und deren Aktivierungszustand eine wesentliche Rolle.

1.6 Aufgabenstellung

Signaltransduktionswege existieren nicht als autonom agierende Prozesse in einer Zelle. Vielmehr sind sie über ein weit verzweigtes Netzwerk miteinander verbunden mit daraus resultierenden positiven und negativen Konsequenzen für jeden individuellen Signalweg. In Anbetracht dessen, das in jede Zelle eines Organismus zu jeder Zeit viele Signale gleichzeitig verarbeitet werden müssen, trägt eine Charakterisierung dieser Wechselwirkungen wesentlich zum Verständnis der komplexen Reaktion einer Zelle auf seine Umgebung bei. Wie in der Einleitung näher erläutert ist, sind Wechselwirkungen des TGF β -Signalweges mit zahlreichen anderen Signalwegen in unterschiedlichen zellulären Zusammenhängen beschrieben worden. Auch konnte der Einfluss anderer Signalwege auf molekularer Ebene detailliert dargestellt werden. In diesem Zusammenhang spielt die Phosphorylierung von Smad-Proteinen, den intrazellulären Effektoren des kanonischen TGF β -Signalweges eine zentrale Rolle.

Smif, ein Cofaktor des TGF β -Signalweges, bindet Smad4 und reguliert dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor positiv mit. Interessanterweise zeigten Hochdurchsatzverfahren zur Analyse des Phosphoproteoms, dass Smif ein Phosphoprotein ist. Olsen et al. konnten darüber hinaus eine EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif in einem solchen massenspektrometrischen Verfahren nachweisen¹⁷². Dieser erste Nachweis einer Interaktion von Smif mit anderen Signalwegen sollte Ausgangspunkt dieser Dissertation sein. Die Fragestellung war, wie und warum Smif phosphoryliert wird. Zur Beantwortung wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Signalwege hinsichtlich ihres Einflusses auf die Phosphorylierung von Smif charakterisiert. Die Studien umfassten dabei Kinetik und Art der Phosphorylierung und verantwortliche Kinasen. Von zentraler Bedeutung war die Einordnung der Phosphorylierung von Smif in den TGF β -Signalweg. Mit Hilfe unterschiedlicher funktionaler Assays sollte dabei die Rolle von Smif bei der TGF β -vermittelten Transkriptionsregulation mit Hinblick auf dessen

Phosphorylierung untersucht werden. Biochemische Untersuchungen zum Einfluss der Phosphorylierung von Smif auf Transkriptionsfaktor-DNA-Komplexe dienten der Identifizierung mechanistischer Zusammenhänge hinter den beobachteten funktionellen Auswirkungen einer Phosphorylierung von Smif.

Das Verständnis über Art und Weise der Phosphorylierung von Smif und deren funktionellen Konsequenzen stellt daher einen weiteren Verknüpfungspunkt für die TGF β -Signaltransduktion im Netzwerk mit anderen Signalwegen dar.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Fluka, Taufkirchen
Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Benzylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Penzberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
BSA, Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Fluka, Taufkirchen
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen
Complete— Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliant Blau	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Tiedel-de Haen, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie, Taufkirchen
Formaldehyd, 37 %-ig	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glutathion	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glutathion-Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerol	Fluka Chemie, Taufkirchen
Glycerol-2-phosphat	Aldrich Chemical Company, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kaliumacetat	Fluka, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Naphtolblauschwarz 6B	Fluka, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka Chemie, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat	Fluka, Taufkirchen
Nocodazol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Paclitaxel (Taxol)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Phosphate buffered saline (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Protein A Sepharose-Lösung	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein G Sepharose-Lösung	Pharmacia Biotech, Freiburg
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
SlowFade® Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Streptavidin-Agarose beads	Pierce, Rockford, USA
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka Chemie, Taufkirchen
Thymidin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton®X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Trockenmilchpulver	Fluka Chemie, Taufkirchen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka Chemie, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.1.2 Medium und Supplemente für die Zellkultur

BES-buffered saline	Calbiochem, Merck AG, Darmstadt
DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
Hygromycin B, 50 mg/ml in PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine™ Reagent, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Opti-MEM® I, Serum-reduziertes Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phosphate buffered saline (PBS), 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Plus™ Reagent, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Polybren	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
RPMI-1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Trypanblau, 0,4 % Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren

rekombinantes, humanes EGF	Millipore, Schwalbach
rekombinantes, humanes TGFβ1	R&D Systems, Wiesbaden
rekombinantes, murines FGF basic (FGF2)	R&D Systems, Wiesbaden
rekombinantes, murines Interleukin-3 (IL-3)	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.4 Kinase- & Phosphataseinhibitoren

Okadainsäure	Calbiochem, Merck AG, Darmstadt
Pervanadat	Fluka, Taufkirchen
SB203580	Enzo Life Sciences, Lörrach
SP600125	Enzo Life Sciences, Lörrach
UO126	Promega, Madison, USA

2.1.5 Enzyme

DpnI	Fermentas, St. Leon-Rot
FastAP (Alkalische Phosphatase)	Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
rekombinantes, humanes ERK1	Biaffin, Kassel
rekombinantes, humanes Cdk1/Cyclin B1	NEB, Frankfurt/Main

2.1.6 Radioaktive Substanzen

³² P-γ-ATP	Amersham Biosciences, Freiburg
-----------------------	--------------------------------

2.1.7 Membranen

PVDF Membran (Immobilon P/FL)	Millipore, Schwalbach
-------------------------------	-----------------------

2.1.8 Molekulargewichtsmarker für Proteine

PAGERuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
--------------------------------------	-------------------------

2.1.9 Antikörper

α-β-Aktin [1:10000]	M	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
α-β-Tubulin [1:1000]	K	Santa Cruz, Heidelberg
α-ERK1/2 [1:1000]	K	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α-Flag (M2) [1:5000]	M	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
α-Flag (M2) Agarose Beads	M	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
α-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert [1:10000]	E	Amersham Biosciences, Freiburg
α-Kaninchen IRDye 800CW [1:10000]	Z	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
α-Lamin A/C (346) [1:1000]	M	Santa Cruz, Heidelberg
α-Maus IgG, HRP-konjugiert [1:10000]	E	Amersham Biosciences, Freiburg
α-Maus IgG, IRDye 800CW konjugiert [1:10000]	Z	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
α-Maus IgG, TexasRed konjugiert	Z	Chemicon, Schwalbach
α-Myc-tag [1:1000]	K	Upstate, Schwalbach
α-phospho-ERK1/2 (T202/Y204) [1:2000]	K	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α-phospho-Histon H3 (S10) [1:2000]	K	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α-phospho-p38 (T180/Y182) (1:2000)	K	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α-phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) [1:2000]	K	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α-phospho-Smad2/3 (S456/467) [1:5000]	K	Chemicon, Schwalbach
α-Smad2/3 [1:2000]	M	Transduction Laboratories, Lexington, USA
α-Smad4 (B-8) [1:1000]	M	Santa Cruz, Heidelberg
α-Smif (3G4) [1:5000]	M	Abnova, Heidelberg

[Konzentration in Milch oder BSA]

E-Esel

K-Kaninchen

M-Maus

Z-Ziege

2.1.10 Material und Molekularbiologische Kitsysteme

Bio-Rad Proteinassay	Bio-Rad, München
ChIP-IT™ Express Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit & Sonication Shearing Kit	Active Motif, Carlsbad, USA
Dual-Luciferase® Reporter-Assay System	Promega, Madison, USA
Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Spin Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Trizol®Reagent	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.1.11 Geräte

ABI PRISM®7700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
BRANSON SONIFIER 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Dispergierwerkzeug	IKA®-Werke, Staufen
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
ELISA Reader sunrise	Tecan, Crailsheim
Entwickler Optimax	Protec, Oberstenfeld
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co., Hamburg
Geltrockner SG200	Savant
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-14	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Lumat LB9507	Bertold, Bad Wildbad
Magnetrührgerät IKAMG RH	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
Odyssey Infrared Imager 9120	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
PCR-Thermocycler Primus 96	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	Beckman, Fullerton, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, HeraSafe	Thermo Scientific, Karlsruhe
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transfer Electrophoresis Unit	Hoefer, San Francisco, USA
Ultrazentrifuge, Rotor VTI 80	Beckman, Fullerton, USA
UV Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortex Genie2	Scientific Industries, New York, USA

2.1.12 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg synthetisiert.

2.1.12.1 Oligonukleotide für *DNA-Pulldown*

<i>wild-typ</i> (wt)	Biotin-tcgagcagacagctcagacagtc	tcgagactgtctgtctgtctgc
mutated (mut)	Biotin-tcgagcagacagctcacagagtc	cggtctcagctgtctcagagct

2.1.12.2 Oligonukleotide für EMSA

Smad4 Sonde	IRDye700-tcgagcagacagctcagacagtc	IRDye700-tcgagactgtctgtctgtctgc
-------------	----------------------------------	---------------------------------

2.1.12.3 Oligonukleotide für *Realtime* PCR

mJunB (mRNA/cDNA Sequenz)	gccgcttggtactcagcct	tctccacagtactatgcagaggg
mPAI-1 (mRNA/cDNA Sequenz)	tgcacgcctgccattg	ggacctgagataggacagctgct
mGAPDH (mRNA/cDNA Sequenz)	ggtcatcccagagctgaacgg	cctgctcaccacctcttgcacccc
mTBP (mRNA/cDNA Sequenz)	ccaccagcagttcagtagctatga	tgctctaactttagcacctgtaataacaac
mJunB (Promotor -2,8 kB)	gcctgtcttaagtgtctccca	gagacacccagagagacagatg
mPAI-1 (Promotor -0.3 kB)	gaattccaacaccaggcctt	actctggtccctgactgg
mPAI-1 (Promotor -0,6 kB)	cccaccagtacacctcaa	ctgctgtgaagcatgtctga
Luciferase (firefly)	caactgcataaggctatgaagaga	atttgattcagcccatatcgctt

2.1.12.4 Oligonukleotide für Mutagenese PCR

hSmif S142A,S144A	gggacaacacagctcccggccaatggctgc	gcagccattggcctggggaggagcctgtttgtccc
hSmif S315A,S319A,T321A	caatcccgttggccctgttctcgtcccgtctgccagctg	cagctggcagagcgggagcgagaacagggccaacgggattg
hSmif S353A	cctagacagaggctccactcctgaacc	ggttcaggagtgaggccctctgtctagg
hSmif S315D	ctacacaatcccgttggaccctgttctcagctcc	ggactgagaacagggtccaacgggattgtgtag
hSmif S315D,S319D,T321E	caatcccgttggaccctgttctcgtcccgaactgccagctg	cagctggcagctcgggatcgagaacagggtccaacgggattg
hSmif S523A,S525S	aggaaagccagcggccctgtcctcctaactatt	aatagttagaggagcaggggctgcttctct
mSmif S82A	ccgaaggtcagctgcgcttaccatgg	ccatggaaggcgcagctgacctcgg
mSmif S335A,S339A,T341A	cactcccactggccctgtcctcggccctgctcggcagctg	cagctggcagagcggggcggaggacagggccagtgagg
mSmif S335D,S339D,T341E	cactcccactggaccctgtcctcggccctgagctgcccagctg	cagctggcagctcggggcggaggacaggggtccagtgagg
mSmif S543A,S345A	ggaaagccagcggccctgtcctcctcactg	cagtgaggggagcggggcggctgcttctc
hSmif ΔTM (hSmif 1-538)/ mSmif ΔTM (mSmif 1-558)	gtcagagaaagccttaaccattattctcagc	gctgagaataatggattaaggcttctctcagc

2.1.12.5 siRNA gegen murines Smif

siRNA Smif	ccaugauacaagcaguaaa[dT][dT]	uuuacugcuugaucaugg[dT][dG]
siRNA Kontrolle	cguaagcggauuacucga[dT][dT]	ucgaaguauuccgcuacg[dT][dG]

2.1.13 Reporterplasmide

(SBE)₄luc
3TP-lux
pRL-null Vector

W. Kruijer
J. Massague
Promega, Madison, USA

2.1.14 Expressionsvektoren

hDcp2 in pGEX-4T2
ERK1 miRNA in pLMP
ERK2 miRNA in pLMP
HA-Smad4 in pCMV5
hEGFR in MSCV MiyR1
flag-hSmif *wild-typ* in pcDNA3.1
flag-hSmif S62A in pcDNA3.1

W. K. Leibig
M. Zech
M. Zech
R. Bai
R. K. Kancha
R. Bai
C. Weber

flag-hSmif Y64A in pcDNA3.1	C. Weber
flag-hSmif S142A,S144A in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-hSmif S315A,S319A,T321A in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-hSmif S353A in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-hSmif S523A,S525A in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-hSmif S315A,S319A,T321A,S523A,S525A in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-hSmif S315D in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-hSmif S315D,S319D,T321E in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-hSmif ΔTM in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-mSmif <i>wild-typ</i> in MSCV MigR1	W. K. Leibig
flag-mSmif S82A in MSCV MigR1	diese Arbeit
flag-mSmif S335A,S339A,T341A in MSCV MigR1	diese Arbeit
flag-mSmif S543A,S545A in MSCV MigR1	diese Arbeit
flag-mSmif S335A,S339A,T341A,S543A,S545A in MSCV MigR1	diese Arbeit
flag-mSmif S335D,S339D,T341E in MSCV MigR1	diese Arbeit
flag-mSmif ΔTM in MSCV MigR1	diese Arbeit
GST-hSmif <i>wild-typ</i> in pGEX-4T2	R. Bai
GST-hSmif S142A,S144A in pGEX-4T2	diese Arbeit
GST-hSmif S315A,S319A,T321A in pGEX-4T2	diese Arbeit
GST-hSmif S523A,S525A in pGEX-4T2	diese Arbeit
GST-hSmif S315A,S319A,T321A,S523A,S525A in pGEX-4T2	diese Arbeit
GST-NIPA 352-399 in pGEX-4T2	F. Bassermann
myc-Dcp2 in pCMV	W. K. Leibig
hSmad4 in pGEX-4T2	R. Bai
hSmad4 W302L in pGEX-4T2	R. Bai

2.1.15 Zelllinien (tabellarisch)

adhärent:

Zelllinie	Beschreibung	Transfektionsmethode
HCT116	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie, DSMZ	
Hela	human Zervixkarzinom-Zelllinie, DSMZ	a.
U2OS	humane Osteosarkom Zelllinie, DSMZ	
NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie, DSMZ	a. & b.
ΦNX-Eco (Phoenix-E)	retrovirale ecotrope Verpackungs-Zelllinie (Helfervirus-frei): 293T stabil transfiziert mit Moloney <i>GagPol-IHRES-Lyt2</i> Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promotors und Moloney <i>ecotropic envelope</i> Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors von G.P. Nolan, Stanford, USA	c. & d.
Cos-1	Nierenepithel-Zelllinie der grünen Meerkatze, SV-40 transformiert	a.
Mef-Smif -/-	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie generiert aus Smif <i>knock-out</i> Embryonen nach dem 3T3 Protokoll, W. K. Leibig	a. & b.
Mef-Smif +/-	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie generiert aus Smif <i>wild-typ</i> Kontroll-Embryonen nach dem 3T3 Protokoll, W. K. Leibig	a. & b.

- a. Lipofectamin™ & Plus™ Reagenz (transiente Expression)
b. Virale Infektion (stabile Expression)
c. Lipofectamin™2000 (transiente Expression; Generierung von Viruspartikeln);
d. Calciumphosphat (transiente Expression)

suspension:

Ba/F3	IL-3 abhängige murine pro-B-Zelllinie, DSMZ	
-------	---	--

2.1.16 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5α™ Invitrogen, Karlsruhe
F– Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1
endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ–
thi-1 gyrA96 relA1

OneShot® BL21 Star™ (DE3) Invitrogen, Karlsruhe
Chemically Competent E. coli
F– *ompT hsdSB*(rB–, mB–) *gal dcm* (DE3)

2.1.17 Lösungen und Puffer

Amidoschwarz-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Naphtol Blau Schwarz 25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure in A.d.
Cdk1-Kinase-Puffer (10x):	500 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM MgCl ₂ 20 mM DTT 1 mM EDTA 0,1 % Brij35 in A.d Zugabe von frischem 200 µM ATP in 1x Puffer
Coomassie-Färbelösung:	0,25 % (w/v) Coomassie-Blau 45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung:	45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
ERK1-Kinase-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 50 µM ATP in A.d
GST-Elutionspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 40 mM Glutathion 120 mM NaCl
LB-Medium (fest):	1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
LB-Medium (flüssig):	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl in A.d. mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton®X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
Lysis-Puffer P50:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 mM Kaliumacetat 1,5 mM Magnesiumacetat

	2 mM DTT 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
NETN-Puffer:	0,5 % (v/v) NP40 20 mM Tris/HCl (pH 8) 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM PMSF 1 mM Benzamidin 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
PIB-A Puffer	20 mM HEPES KOH, pH 7,5 250 mM KCl 10 % (v/v) Glycerol 1 mM PMSF 1 mM NaF 40 mM Glycerol-2-phosphat Protease Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
Phosphate buffered saline (PBS)	138 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ in A.d.
PI-Färbelösung	200 µg/ml RNase A 10 µg/ml Propidiumiodid in PBS
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4 % (w/v) SDS in A.d.
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (4-fach):	2 M Tris/HCl (pH 6,8) 400 mM DTT 8 % (w/v) SDS 0,4 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerol in A.d.
Stripping Buffer	0,2 M Natronlauge in A.d.
TBE-Puffer (10-fach):	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 0,02 M EDTA
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS in A.d. 20 % (v/v) Methanol in A.d.

Trenngelpuffer für
SDS-Gele (4-fach): 1,5 M Tris (pH 8,8)
0,4 % (w/v) SDS in A.d.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Arbeiten

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: 1 % Bacto-Trypton; 1 % NaCl; 0,5 % Bacto-Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert
LB-Agarplatten: 1,5 % Bactoagar in LB-medium; autoklaviert
Ampicillin/Kanamycin: 50 mg/ml / 10 mg/ml (beide 1000x Stock)

Bakterienkulturen wurden bei 37 °C unter schütteln (250 rpm) in LB-Medium oder ausplattiert auf LB-Agarplatten über Nacht angezogen. Entsprechend der Plasmid-kodierten Resistenzgene wurden die Antibiotika Ampicillin oder Kanamycin dem Medium beigefügt.

2.2.1.2 Lagerung von E. coli Stämmen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienklonen wurde ein Teil der Übernachtskultur mit sterilem Glycerol auf eine Endkonzentration von 30 % (v/v) Glycerol eingestellt und langsam auf -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.1.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

LB-Agarplatten: 1,5 % Bactoagar in LB-medium; autoklaviert
Ampicillin/Kanamycin: 50 mg/ml / 10 mg/ml (beide 1000x Stock)

Hitzeschock chemisch kompetenter Bakterien, bei denen durch den sprunghaften Anstieg der Temperatur DNA über dabei gebildete Poren in der Bakterienwand aufgenommen werden, stellt eine gängige Methode dar, mit der DNA in Bakterien eingeschleust werden kann. Die auf dem Plasmid codierenden Selektionsmarker wie Antibiotika-Resistenzen ermöglichen eine Selektion gegenüber nicht transformierten Bakterien. 0,1-1 µg Plasmid-DNA bzw. 5-10 µl der nach der Mutagenese-PCR aufgereinigten DNA wurden mit 50 µl einer auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für DH5α bei 37°C für 42 s bzw. im Fall von BL21 (DE3) bei 37°C für 30 s. Nach anschließender zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert.

2.2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und reiner relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem Brutschrank kultiviert.

2.2.2.2 Passagieren von adhärenenten Zelllinien

DMEM-Kulturmedium: DMEM; 10 % FCS
Einfach Trypsin-EDTA-Lösung
PBS

Die in Abschnitt 2.1.15 aufgelisteten adhärenenten Zelllinien wurden liegend in Zellkulturflaschen mit DMEM-Kulturmedium kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 90 % wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS einmal gewaschen und mit einem adäquaten Volumen an Einfach Trypsin-EDTA-Lösung versetzt, so dass der Boden vollständig bedeckt war. Durch die Trypsin vermittelte enzymatische Proteolyse von Zelloberflächenproteinen bzw. die Komplexierung von Calcium durch EDTA wurden die bestehenden Zell-Zell bzw. Zell-Matrix-Interaktionen zerstört, so dass sich nach einer Inkubationszeit von 1-5 min bei 37°C die Zellen sichtbar ablösten. Die Zellen wurden in DMEM-Kulturmedium resuspendiert, und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem DMEM-Kulturmedium aufgenommen und ein Teil davon auf eine neue Zellkulturflasche überführt. In Abhängigkeit von der Zelllinie und ihren Wachstumseigenschaften wurden diese aller 3-4 Tage jeweils 1:10 passagiert. Einzige Ausnahme bildeten hierbei die Phoenix-E Zellen, welche täglich 1:2 passagiert wurden.

2.2.2.3 Kultivierung und Passagieren von Suspension-Zelllinien

RPMI-Kulturmedium: RPMI; 10 % FCS
10 µg/ml IL3 (5000x Stock)

Ba/F3 Suspensionszellen wurden in RPMI-Kulturmedium mit IL-3 kultiviert und bei einer Zelldichte von etwa $1-2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml 1:10 passagiert. Dazu wurde ein entsprechendes Aliquot der gut resuspendierten Zellkultur entnommen und in Medium mit frischem RPMI-Kulturmedium überführt.

2.2.2.4 Kryokonservierung – Auftauen von kryokonservierten Zellen

Einfriermedium: 10 % DMSO; 90 % FCS

Zellen können zur dauerhaften Lagerung tiefgefroren und gegebenenfalls wieder aufgetaut und in Kultur genommen werden. Zum Kryokonservieren wurde das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen und dicht verschlossen in Kryotubes für mindestens 24 h bei -80°C langsam abgekühlt. Bei -80°C konnten die Zellen für mehrere Monate gelagert werden. Um Zellen noch langfristiger aufbewahren zu können, wurden die bei -80°C herunter gekühlten Zellen in einen Stickstofftank überführt und dort aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Kyrotubes im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und die aufgetauten Zellen direkt in eine Kulturflasche mit reichlich Medium überführt.

2.2.2.5 Transfektion von Zelllinien

Zum Einschleusen fremder Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen gibt es verschiedenste Methoden. Neben chemischen Verfahren, wie die Calciumphosphatmethode oder die liposomale Transfektion, physikalischen Verfahren wie die Mikroinjektion oder Elektroporation können biologische Verfahren, wie die retrovirale Transduktion zum Einsatz kommen. Eigenschaften der Empfängerzelle, Art der einzuschleusenden Nukleinsäure (DNA oder RNA) als auch Ziel des Experimentes (transiente oder stabile Expression) entscheiden dabei über die verwendete Methode.

In Abschnitt 2.1.15 ist tabellarisch dargestellt, welche Methoden für welche Zelllinien bzw. Fragestellungen verwendet wurden. Die Lipofektion mit LipofectaminTM2000 sowie LipofectaminTM & PlusTM Reagenz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die auszuplattierende Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei erfolgte eine Vitalfärbung mit einer 0,5 %-igen Trypanblaulösung. Beide Methoden kamen bei der transienten Expression von Plasmid-DNA als auch bei transienten *knock-down* Experimenten mit siRNA zum Einsatz.

Für Expressionsexperimente in Phoenix-E Zellen wurde die Calciumphosphatmethode verwendet. $3 \cdot 10^6$ Zellen wurden dazu in 8 ml Medium auf ein 10 cm Schale plattiert. Am nächsten Tag wurden 20 µl einer 20 mM Chloroquine Lösung ins Medium gegeben. 12 µg Plasmid-DNA wurden in 450 µl Wasser verdünnt, 50 µl 2,5 M CaCl₂ hinzugefügt und mit 500 µl 2-fach BES Puffer gemischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen pipettiert und mit dem Medium gemischt. Das Medium wurde nach 5 h Inkubation gewechselt. Die Kultivierung wurde nach weiteren 36 h bis 48 h abgebrochen. Zellen und Zelllysate wurden analysiert.

2.2.2.6 Retrovirale Infektion – Stabile Integration von DNA ins Genom

4 mg/ml Polybren Stock; 2 mg/ml Puromycin (beide 1000x Stock)

Bei der retroviralen Transduktion wird das einzelsträngige RNA-Genom nach Infektion der Wirtszelle in ein doppelsträngiges DNA-Molekül umgeschrieben, welches ins Genom der Wirtszelle integrieren kann. Aufgrund ihrer guten Effizienz und stabilen Integration ins Wirtsgenom eignet sich ein solches System zur stabilen Expression. Als Virusverpackungszelllinie wurden hierbei Phoenix-E Zellen verwendet, welche die Gene für ein retrovirales Provirus stabil exprimieren. Bei gleichzeitiger Transfektion mit einem retroviralen Vektor, welcher über ein Verpackungssignal verfügt, kommt es zu Sezernierung infektiöser Viruspartikel, welche mit ihren ecotropen Oberflächenprotein murine Zellen infizieren können.

Phoenix-E Zellen wurden dazu entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit den retroviralen Vektoren MigRI, MiyRI oder pLMP und LipofectaminTM2000 transfiziert. Nach 24 h wurde das

Medium gewechselt und virushaltiger Überstand nach 36, 48 und 72 h geerntet, filtriert (0,45 µm) und bei 4°C gelagert. Zur Transduktion wurden $2,5 \cdot 10^4$ Zellen NIH3T3 oder Mef-Smif/- Zellen pro 6-well ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 2 ml Virus haltigen Zellkulturüberstand ausgetauscht und mit 4 µg/ml Polybren versetzt. Nach 12 und 24 h wurde jeweils gegen frischen Virus ausgetauscht. Die Infektionseffizienz wurde mittels FACS (2.2.4.1) kontrolliert. MigRI und pLMP exprimieren zusätzlich eine GFP Kassetten, MiyRI eine für YFP. Das in die Vektoren klonierte Konstrukt wurde dabei zusammen mit dem Fluoreszenzprotein als eine mRNA exprimiert und somit direkt aneinander gekoppelt. *Internal Ribosomal Entry Sites* (IRES) sorgten dabei für eine Expression von GFP bzw. YFP, während die klonierten Konstrukte über die 5' Cap Struktur der ribosomalen Translation zugeführt wurden. Zusätzlich wurden pLMP infizierte Zelle positive über ihre Puromycin-Resistenzkassetten selektioniert (2µg/ml).

2.2.2.7 Stimulierung von Zellen mit proliferativen, antiproliferativen Stimuli oder zellulären Stressestimuli und dessen Beeinflussung mittels Inhibitoren

125 ng/µl EGF Stock; 4 ng/µl TGFβ Stock; 20 ng/µl FGF2 Stock; 10 ng/µl IL-3 Stock
5 M NaCl Stock
5 mM UO126 Stock; 10 mM SP600125 Stock; 10 mM SB203580 Stock
200 µM Okadainsäure Stock; 10 mM Pervanadat Stock
PBS: 138 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Alle Cytokine, Wachstumsfaktoren und Inhibitoren wurden entsprechend den Angaben des Herstellers aufgelöst und gelagert.

Vor der Stimulation mit EGF, TGFβ₁, FGF2 oder IL-3 wurden die Zellen, wenn im Text nicht anders ausgewiesen, für 12-15 h in Medium ohne FCS gehungert. Inkubationszeiten bzw. Konzentrationen sind entsprechend den Experimenten ausgewiesen bzw. betragen 150 ng/ml EGF, 4 ng/ml TGFβ, 5 ng/ml FGF2 oder 2 ng/ml IL-3, wenn keine Angaben gemacht wurden.

Zur Induktion zellulären Stresses wurden die Zellen für 12-18 h in Medium ohne FCS gehungert und anschließend auf eine Konzentration von 500 mM NaCl eingestellt und für weiter 60 min inkubiert. Bei dem UV induzierten zellulären Stress wurden die Zellen nach einer 12-15 h Hungerphase in Medium ohne FCS bestrahlt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit einer Dosis von 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt, frisches Medium ohne FCS hinzugegeben und anschließend für weiter 60 min inkubiert.

Die MAP-Kinase Inhibitoren UO126, SP600125 und SB203580 wurden 1 h vor Stimulation der Zellen ins Medium hinzugefügt. Die Endkonzentration betrug in allen drei Fällen 10 µM.

Die Phosphataseinhibitoren Pervanadat und Okadainsäure wurden zu Zellen in Kulturmedium mit FCS gegeben. Im Fall der Okadainsäure wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 µM für 2 h inkubiert. Bei der Behandlung von Zellen mit Natriumpervanadat wurden 30 µl einer 10 mM Stocklösung mit 10 µl Wasserstoffperoxid für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 110 µl PBS verdünnt. Diese Lösung wurde 1:200 dem Kulturmedium beigemischt. Die Inkubationszeit betrug 10 min.

2.2.2.8 Synchronisierung von Zellen

100 mM Thymidin (Stock); 500 mg/ml Nocodazol (Stock); 58 mM Taxol (Stock)

Zellzykluszustände können durch Zugabe von Inhibitoren stabilisiert werden, so dass sich Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzykluses anreichern. Substanzen wie Nocodazol oder Taxol blockieren die Polymerisierung bzw. Depolymerisierung des Spindelapparates und halten Zellen in der Prometaphase an. Thymidin blockiert die Ribonukleotidreduktase infolge dessen Desoxycytidin Level in der Zelle abfallen und es zu einem Stop der Replikation mit Arrest in der S-Phase kommt.

Synchronisierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 mM Thymidin ins Kulturmedium und einer Inkubation für 12-16 Stunden. Nocodazol (500 ng/ml) als auch Taxol (100 nM) wurden ebenfalls direkt dem Kulturmedium zugefügt. Nach 12-16 Stunden konnte ein Abrunden der Zellen, welche schwach adhärent mit der Kulturflasche assoziierten, beobachtet werden. Eine solche Morphologie wurde als Indikator eines mitotischen Arrestes herangezogen. Die Zellen wurden daraufhin geerntet. Bei Präinkubation in Thymidin und anschließender Überführung in einen mitotischen Arrest wurde das Thymidin haltige Medium entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und in frischem Kulturmedium mit Nocodazol aufgenommen. Aufgrund der Anreicherung der Zellen in der S-Phase durch Behandlung mit Thymidin, waren die Zellen nach etwa 8 Stunden in der mitotischen Zellzyklusphase.

2.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.3.1 Isolierung von Plasmid DNA (Maxi Präparation)

Zur Isolierung der Plasmid DNA aus DH5 α wurde eine Einzelkolonie auf der LB-Agarplatte in 200 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht kultiviert. Die Präparation der Plasmid DNA erfolgte mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit entsprechend dem Angaben des Herstellers. Die Plasmid Isolation folgt dem Prinzip einer alkalischen Lyse der Bakterien und anschließender Aufreinigung der DNA über einen Anionenaustauscher und Fällung der DNA mittels Isopropanol. Die präzipitierte DNA wurde in 10 mM Tris pH 8,0 aufgenommen und bei -20°C gelagert. Quantifizierung der DNA erfolgte mit dem NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000.

2.2.3.2 Generierung von gerichteten Punktmutationen mittels PCR

Zur spezifischen Generierungen von Punktmutationen bzw. Insertionen im Bereich von 1 bis 6 Nukleotiden wurde der PCR basierte “QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit” verwendet. Primer wurden entsprechend der Nukleotidsequenzen abgeleitet. Substitutionen bzw. Insertionen wurden dabei von 10-15 Basen langen Nukleotiden flankiert (siehe 2.1.12.4). Die PCR selbst als auch Verdau der maternalen DNA erfolgen entsprechend den Angaben des Hersteller. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde vor der Transformation des DpnI verdauten PCR-Ansatzes das PCR Produkt mit dem QIAquick® Spin Purification Kit

aufgereinigt. Einzelkolonien wurden nach erfolgreicher Transformation als Minikultur über Nacht gezogen. Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit isoliert. Die erfolgreiche Insertion der Mutation wurde mittels Sequenzierung (Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg) verifiziert.

2.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen und Reverse Transkription in cDNA

RNA wurde mit dem Trizol® Reagent Kit entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde in Wasser gelöst und bei -20°C für kurze Zeit und bei -80°C über einen längeren Zeitraum gelagert. Die Konzentration der RNA wurde mit dem NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 bestimmt. 1 bis 2 µg RNA wurden für die cDNA Synthese verwendet. Die Reverse Transkription wurde mit dem RevertAid™ Minus First Strand cDNA Synthesis Kit entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Oligo-dT Nukleotide dienten als Primer für die Reverse Transkriptase. Die synthetisierte cDNA wurde 1:100 bis 1:200 in Wasser verdünnt und für quantitative Analysen mittels *Realtime* PCR verwendet (siehe Abschnitt 2.2.3.4).

2.2.3.4 *Realtime* PCR – quantitative PCR

Realtime PCR Verfahren, bei der über eine PCR Reaktion auf die ursprüngliche Menge einer bestimmten DNA in einer Probe geschlussfolgert werden kann, stellen eine sensitive und schnelle Methode dar. Die Quantifizierung der bei der PCR synthetisierten DNA erfolgt dabei über fluoreszenzmarkierte Sonden oder über unspezifische DNA interkalierende Reagenzien wie SYBR®Green.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA Mengen in Proben mittels *Realtime* PCR mit dem Kitsystem Platinum® SYBR®Green qPCR SuperMix-UDG bestimmt, welches auf der Quantifizierung mittels SYBR®Green basiert. Die *Realtime* PCR wurde auf einem ABI PRISM®7700 durchgeführt. Die Quantifizierung und Statistische Auswertung erfolgte entsprechend den Angaben in der Literatur¹⁷³. Als Referenzgene wurden GAPDH und TBP verwendet.

2.2.4 Biologische Untersuchungen

2.2.4.1 Durchflusszytometrie (FACS)

PI-Färbelösung: 200 µg/ml RNase A; 10 µg/ml Propidiumiodid in PBS

Die Durchflusszytometrie dient der phänotypischen Charakterisierung von Zellen. Fluorochrom-markierte Antikörper können Epitope auf Zelloberflächen als auch intrazellulär binden und anschließend qualitativ und quantitativ im FACS nachgewiesen werden. Daneben können Zellzykluszustände über Färbungen der DNA mit dem Fluorophor Propidiumiodid

charakterisiert werden. Die Expression von Fluoreszenzmolekülen wie *green fluorescence protein* (GFP) oder *yellow fluorescence protein* (YFP) ermöglicht eine Kontrolle der Transfektion-/Infektionseffizienz.

Zur Zellzyklusanalyse wurden die adhärennten Zellen mit einem Schaber geerntet und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3-5 ml 70 %-igem Ethanol, welches auf -20°C vorgekühlt war, resuspendiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zentrifugiert (300 g für 3 min) und in 300-500 µl PI-Färbelösung aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde über ein 100 µm Zellsieb filtriert und im FACS analysiert.

Zur Messung der GFP/YFP Fluoreszenz nach retroviraler Infektion (Abschnitt 2.2.2.6) wurden die Zellen in Einzelsuspensionen (Abschnitt 2.2.2.2) direkt im FACS gemessen. Bei Doppelinfektionen mit GFP und YFP haltigen retroviralen Vektoren wurden zwecks der Kompensation der Signale einzeln infizierte Zelllinien gemessen.

Die Auswertung erfolgte mittels der FlowJo Software.

2.2.4.2 Reporter-Assay

Dual-Luciferase® Reporter-Assay System

SDS-Probenpuffer (4-fach): 2 M Tris/HCl (pH 6,8); 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin in A.d.

Da der Nachweis der Expression eines bestimmten Genes mitunter experimentell recht aufwendig sein kann und nur Aussagen über die Aktivität des gesamten Promotors gibt, ermöglichen *Reporter-Assays* die Aktivität eines Promotors oder eines Teiles davon in einer bestimmten Zelle unter definierten Bedingungen zu bestimmen. Die Kopplung des Promotors an ein Reporter Gen, welches leicht und über einen großen Messbereich linear nachweisbar ist, lässt quantitative Rückschlüsse auf die Aktivität der vorgeschalteten Promotorregion zu. Enzyme wie die β -Galaktosidase, Chloramphenicol-Acetyltransferase oder die Luciferase erfüllen solch ideale Eigenschaften als Reporter.

Zur Messung der transkriptionellen Aktivität nach TGF β Stimulation kamen unterschiedliche Reporter-Konstrukte zum Einsatz (siehe Abschnitt 2.1.12.5). Als Reporter gen funktionierte die *firefly* Luciferase. Als Kontrollvektor wurde der pRL-Null Vektor, welcher frei von regulatorischen Elementen konstitutiv das *renilla* Luciferase Gen exprimiert, verwendet. NIH3T3 oder Mef Zelllinien wurden zu $3-5 \cdot 10^4$ Zellen pro *24-well* ausplattiert und entsprechend in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben transfiziert. Pro *24-well* wurden dabei jeweils 0,1 µg (NIH3T3) oder 0,5 µg (Mef) pRL-Null Vektor und 1 µg TGF β -Reporter Vektor transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in Kulturmedium ohne FCS für 12 h gehungert, bevor sie mit TGF β allein oder in Kombination mit FGF2 oder EGF stimuliert wurden. Die Stimulationszeiten betragen zwischen 15-18 Stunden. Jede Messung erfolgte in Triplikaten. Für die Messung der *firefly/renilla* Luciferase-Aktivität wurde der Dual-Luciferase® Reporter-Assay Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser ermöglichte die sequenzielle Messung beider Enzyme in einem Ansatz. Die relative Luciferase-Aktivität (RLU %) wurde über die Formel $\text{Aktivität}_{\text{firefly}}/\text{Aktivität}_{\text{renilla}} \cdot 100$ berechnet. Die

Fehlerbalken geben die Standardabweichung zum Mittelwert der Dreifachbestimmungen an. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Nach erfolgter Messung wurde 20 µl 4x SDS-Probenpuffer zu jedem *24-well* gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Triplikate wurden vereint, die DNA durch Ultraschallbehandlung (5 Pulse) gesichert und die Proben für SDS-PAGE bzw. *Western Blot* Analysen aufgeköcht und gelagert (siehe Abschnitt 2.2.5.12 ff.).

2.2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Bestimmung der Lokalisation von Proteinen in intakten Zellen erfolgte mittels Antikörper-spezifischer Immunfluoreszenz. Dazu wurden die adhärenenten Zellen auf einem Objektträger ausplattiert und bei entsprechender Zelldichte mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden durch Waschen mit PBS vom Paraformaldehyd befreit und anschließend durch zweiminütige Inkubation in Methanol permeabilisiert. Die so präparierten Zellen wurden mit PBS erneut gewaschen. Eine anschließende Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in Ziegen Serum, was 1:10 in PBS verdünnt wurde, diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Primärantikörper (2.1.9), die gegen das zu untersuchende Protein gerichtet sind, wurden in verdünntem Ziegen Serum 2 Stunden zu den Zellen gegeben. Überschüssiger Primärantikörper wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Der Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper, welche ebenfalls in Ziegen Serum verdünnt wurde, inkubierte nun folgend eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln mit den Zellen. Überschüssige Antikörper wurden mit PBS heruntergewaschen. Die Zellen wurden mit dem Anti-Fading-Mittel, welches das DNA interkalierende Agens 4',6 Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthält, überschichtet und eingedeckelt. Bedienung des Fluoreszenzmikroskops und die Auswertung erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

PBS: 138 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Lysispuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton®X-100; 20 mM Natriumphosphat pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat pH 7,0; 50 mM NaF; 1 mM Natriumorthovanadat; 1 mM Glycerol-2-phosphat; 1 mM PMSF; Protease Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.

SDS-Probenpuffer (4-fach): 2 M Tris/HCl (pH 6,8); 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin in A.d.

Mit Hilfe des in Lysispuffer enthaltenen nicht-ionischen Detergenz Triton®X-100 werden Membranlipide gelöst, was zur Auflösung der Membranstrukturen und Freisetzung der zellulären Bestandteile führt. Durch Zusatz der Phosphataseinhibitoren Natriumpyrophosphat, Natriumfluorid, Natriumorthovanadat als auch Glycerol-2-phosphat wird eine artifizielle Dephosphorylierung der Proteine *in vitro* blockiert, was für die Analyse der Phosphorylierungszustände in der Zelle wichtig ist. Proteaseinhibitoren PMSF sowie Protease

Inhibitor Cocktail Tablette verhindern eine Degradation durch während der Lyse freigesetzte Protease, welche unter anderem aus lysosomalen Vesikeln freigesetzt werden.

Die zu lysierenden Zellen wurden dazu im Fall von adhären wachsenden Zellen nach mehrmaligem Waschen im kalten PBS abgeschabt und bei 300 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in kalten Lysispuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nicht lösliche Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C für 20 min abgetrennt. Der Überstand wurde überführt und konnte anschließend für GST-Pulldown Experimente (2.2.5.4), Immunpräzipitationen (2.2.5.5) verwendet werden oder direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen und analysiert werden (2.2.5.12 ff.).

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten

Die Proteinkonzentration wurde mit einer modifizierten Methode nach Lowry mit dem DCTTM Protein Assay von Bio-Rad entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Als Referenz diente BSA.

2.2.5.3 Expression und Isolation rekombinanter GST-Proteine aus Bakterien

NETN-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 % Nonidet P40; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.

Die bakterielle Expression von Proteinen bietet den Vorteil große Mengen eines Proteins leicht zu produzieren und zu reinigen. Zu den wesentlichen Nachteilen gehören unter anderem fehlende oder veränderte posttranslationale Modifikationen gegenüber dem ursprünglichen Expressionssystem. Durch Fusion mit *Protein-Tags* können die Proteine zusätzlich mit Hilfe der Affinitätschromatographie spezifisch isoliert werden. Der Glutathion-S-Transferase-Tag (GST) ermöglicht die Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Sepharose gekoppeltem Glutathion aus Proteinlysaten (siehe 2.2.5.4). Das verwendete pGEX-Vektor System basiert auf einem IPTG induzierbaren System. Der über das BL21 (DE3) Genom exprimierte Lac-Repressor bindet an die lac-Promotorregion im pGEX-Vektor und inhibiert dessen Transkription. Durch Zugabe von IPTG zum Medium wird dieser gebunden und inaktiviert. Das über den lac-Promotor regulierte GST-Fusionsprotein kann exprimiert werden.

Dazu wurde eine 3 ml Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert und kultiviert. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,4 bis 0,6 wurde eine IPTG Konzentration von 1 mM im LB-Medium eingestellt und für 2 Stunden weiter kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend mittels Zentrifugation geerntet.

Zur Isolierung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien wurde das Bakterienpellet einer 200 ml Kultur in etwa 8 bis 10 ml kaltem NETN-Puffer resuspendiert und im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die wieder aufgetauten Suspensionen wurden durch lysozymatischen Verdau und anschließender Ultraschallbehandlung lysiert. Dazu wurde die Suspension mit Lysozym auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml eingestellt und 15 min auf Eis inkubiert. Mittels

anschließender Ultraschallbehandlung (zweimal 10 Pulse à *duty cycle* 50 %, *outputcontrol* 5) wurden unvollständig aufgeschlossene Bakterien fragmentiert sowie die freigesetzte bakterielle DNA geschert, wodurch die infolge der Lysozymbehandlung stark gestiegene Viskosität wieder abnahm. Unlösliche Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation bei 20.000 g 4°C für 15 min abgetrennt. Der Überstand wurde mit etwa 200 µl Glutathion-Sepharose *beads* pro 1,5 ml NETN-Puffer resuspendierter Bakterien versetzt und bei 4°C für 30 min auf dem Rollrad inkubiert. Die an die Glutathion-Sepharose *beads* gekoppelten GST-Fusionsproteine wurden durch kurzes Zentrifugieren (*short spin* 10 s) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Restliche Spuren an Lysat wurden durch fünfmaliges Waschen mit kaltem NETN-Puffer entfernt. Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden im NETN-Puffer bis zur weiteren Verwendung (siehe Abschnitt 2.2.5.4) gelagert. Qualität und Quantität wurde mittels SDS-PAGE/Coomassie Färbung überprüft (siehe Abschnitt 2.2.5.12 & 2.2.5.13).

2.2.5.4 Interaktionsstudien mittels *GST-Pulldown*

Lysispuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton®X-100; 20 mM Natriumphosphat pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat pH 7,0; 50 mM NaF; 1 mM Natriumorthovanadat; 1 mM Glycerol-2-phosphat; 1 mM PMSF; Protease Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
SDS-Probenpuffer (4-fach): 2 M Tris/HCl (pH 6,8); 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin in A.d.

Interaktionen zwischen zwei Proteinen können unter anderem mittels Immunpräzipitation, chemischen *cross-linking* oder dem hier beschriebenen *GST-Pulldown* nachgewiesen werden. Dabei wird einer der Interaktionspartner als GST Fusionsprotein rekombinant exprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Die bei der Inkubation mit Zelllysaten gebildeten Komplexe zwischen dem immobilisierten GST-Fusionsprotein und Proteinen im Lysat werden präzipitiert und anschließend analysiert.

Dazu wurden, wie im Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben, Zelllysate hergestellt und für 30 min mit Glutathion-Sepharose inkubiert, um unspezifisch assoziierende Proteine herauszuwaschen. Die Glutathion-Sepharose *beads* wurden durch kurzzeitiges Zentrifugieren pelletiert und der Überstand wurde für den *GST-Pulldown* abgenommen. Etwa 10-20 µg GST-Protein wurden in Lysispuffer prä-äquilibriert, jeweils zu den Lysaten gegeben und für 2 h auf dem Rollrad bei 4°C inkubiert. Die zwischen den Proteinen aus dem Lysat und dem immobilisierten GST-Fusionsprotein formierten Komplexe wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch fünfmaliges Waschen in Lysispuffer wurden ungebundene Kontaminationen entfernt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE bzw. *Western Blot* Analyse vorbereitet (siehe Abschnitt 2.2.5.12 ff.).

2.2.5.5 Immunpräzipitation

Lysispuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton®X-100; 20 mM Natriumphosphat pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat pH 7,0; 50 mM NaF; 1 mM Natriumorthovanadat; 1 mM Glycerol-2-phosphat; 1 mM PMSF; Protease Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
SDS-Probenpuffer (4-fach): 2 M Tris/HCl (pH 6,8); 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin in A.d.

Zur Bestimmung von Interaktionen zwischen Proteinen können einzelne Proteine spezifisch über Antikörper präzipitiert werden (Immunpräzipitation). Weitere interagierende Proteine werden indirekt über dessen Assoziation mit dem Protein, wogegen der Antikörper gerichtet ist, co-präzipitiert. Im Fall von bekannten Interaktionspartnern können diese co-präzipitierten Proteine spezifisch beispielsweise im *Western Blot* nachgewiesen werden. Methoden zur Identifizierung von Proteinen wie die Massenspektrometrie ermöglichen die Bestimmung von bisher unbekanntem Interaktionspartnern.

Für die Immunpräzipitation wurden Lysate wie in Abschnitt 2.2.5.1 hergestellt. Die Lysate wurden für 30 min mit 20 µl Protein-A/G-Sepharose *Beads* bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Durch kurzzeitiges Zentrifugieren wurde die Protein-A/G-Sepharose sedimentiert. Der von unspezifischen Bindungen an die Sepharose *Beads* bereinigte Überstand wurde abgenommen und mit 1-2 µg Antikörper versetzt. Durch Inkubation für 2 h bei 4°C auf dem Rollrad konnten sich Antikörper-Protein-Konjugate ausbilden. Anschließend wurde die Probe mit 20 µl Protein A/G-Sepharose *Beads* versetzt. Die Protein-Antikörper-Konjugate wurden so über den F_c-Bereich des Antikörpers an das Protein A/G der makroskopischen Sepharose *Beads* gekoppelt. Diese Konjugate wurden von ungebundenen Bestandteilen des Lysates abzentrifugiert und fünfmal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Reste des Waschpuffers wurden mit einer Spritze vollständig abgenommen. Das verbliebene Sediment wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min aufgekocht und mittels *Western Blot* analysiert (Abschnitt 2.2.5.12 ff.)

2.2.5.6 Phosphatase Assay

Phosphatasepuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM KCl; 1 % Triton®X-100; Protease Inhibitor Cocktail (ohne EDTA)
0,5 M EDTA Stock; 100 mM Natriumorthovanadat Stock; 100 mM Glycerol-2-phosphat Stock
SDS-Probenpuffer (4-fach): 2 M Tris/HCl, pH 6,8; 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin in A.d.

Zur *in vitro* Dephosphorylierung von Proteinen wurden adhärenen Zellen mit einem Schaber von der Zellkulturplatte gelöst, geerntet und zentrifugiert (300 g für 3 min). Das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Phosphatasepuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden Zelltrümmer und andere nicht lysierte Bestandteile bei 20.000 g für 20 min zentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde für die Phosphatasereaktion eingesetzt. Pro Reaktion wurden 10 U alkalische Phosphatase (FastAP™) zu jedem Ansatz gegeben. Zu den Kontrollansätzen kamen zusätzlich die Phosphataseinhibitoren 50 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat und 1 mM Glycerol-2-phosphat. Die Reaktion inkubierte 30 min bei 37°C bevor sie mit SDS-Probenpuffer gestoppt und anschließend bei 95°C gekocht wurde. Die Proben wurden anschließend mittels *Western Blot* Verfahren analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5.12 ff.). Wurden die Probe anschließend für GST-Pulldown Experimente (2.2.5.4) verwendet, so erfolgte der Phosphatase Inkubationsschritt bei Raumtemperatur für 45 min.

2.2.5.7 Kinase-Assay

1 μ Ci 32 P- γ -ATP

ERK1-Kinase-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 50 μ M ATP in A.d

Cdk1-Kinase-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 0,01 % Brij35; 200 μ M ATP in A.d

ERK1 Kinase 50 U/ μ l Stock

Cdk1-CyclinB1 Kinase 20 U/ μ l Stock

SDS-Probenpuffer (4-fach): 2 M Tris/HCl, pH 6,8; 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin in A.d.

Protein-Kinasen katalysieren den Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxyl-Seitengruppe von Serin, Threonin oder Tyrosinseitengruppen. Da in zellulären Systemen gleichzeitig viele Kinasen aktiviert sein können, ist die Identifizierung der Kinase, welche für eine bestimmte Phosphorylierung verantwortlich ist, schwierig. Die experimentelle Nachstellung einer Kinase Reaktion *in vitro* bei der gereinigte Substrate und Kinasen eingesetzt werden, kann daher als direkter Nachweis einer Substrat-Kinase Wechselwirkung dienen.

Als Substrat wurden GST-Smif-Fusionsproteine, wie in Abschnitt 2.2.5.3 beschrieben, hergestellt. 10-15 μ g an Glutathion-Sepharose immobilisiertes Protein wurde zweimalig in den entsprechenden Kinase-Puffer ohne DTT und ATP gewaschen. Folgende Reaktionsansätze wurden pipettiert:

10-15 μ g GST-Smif in 20 μ l ERK1/CDK1-Kinase-Puffer

1 μ Ci 32 P- γ -ATP

50 U ERK1/20 U CDK1

Die Reaktion wurde 60 min bei 30°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von heißem SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C aufgekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie angefärbt, um die gleichmäßige Ladung der GST-Proteine zu überprüfen (siehe Abschnitt 2.2.5.12ff). Anschließend wurde das Gel getrocknet. Der Phosphat-Transfer der radioaktiv markierten γ -Phosphatgruppe auf die GST-Proteine ermöglichte eine autoradiographische Detektion. Die Inkubation der Gele auf dem Film lag dabei zwischen 12 h bis zu 5 Tagen.

2.2.5.8 DNA-Pulldown

PBS: 138 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Anneling Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 M NaCl; 0,2 mM EDTA

PIB-A Puffer: 20 mM HEPES KOH, pH 7,5; 250 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM PMSF; 1 mM NaF; 40 mM Glycerol-2-phosphat;

Protease Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.

SDS-Probenpuffer (4-fach): 2 M Tris/HCl, pH 6,8; 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin in A.d.

Interaktionen zwischen Proteinen und Nucleinsäuren können durch unterschiedlichste Methoden studiert werden. Werden bei einer Chromatin-Immunpräzipitation (CHIP) Protein-DNA-Komplexe über spezifische Antikörper präzipitiert und anschließend co-präzipitierte Nucleinsäuren nachgewiesen, so wird bei dem *DNA-Pulldown* der umgekehrt Weg beschritten. Immobilisierte DNA präzipitiert interagierende Proteine aus einem Lysat, welche anschließend nachgewiesen werden können.

Zum Nachweis der interagierenden Proteine wurden Oligonucleotide aus etwa 20 Nucleotiden, die an ihrem 5' Ende biotinyliert waren, hybridisiert. Diese konnten an Streptavidin-Sepharose

gekoppelt werden. Experimentell wurde dabei entsprechend Dellaire et al verfahren¹⁷⁴. Die synthetisierten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 200 μM in Wasser gelöst. Jeweils 20 μl eines Oligonukleotidpaares (wt forward/reverse; mut forward/reverse) wurden mit 4 μl Annealing Puffer gemischt für 4 min bei 90°C inkubiert und anschließend langsam abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide konnten bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Für den *DNA-Pulldown* wurden Zellen im kalten PBS mit einem Schaber von der Zellkulturplatte gelöst, geerntet und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PIB-A Puffer resuspendiert. Durch Ultraschallbehandlung (10 Pulse á *duty cycle* 50 %, *output control* 5) wurden die Zellen lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 12.000 g für 20 min bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde 1 h mit Streptavidin-Sepharose bei 4°C auf dem Rollrad vorgereinigt. Die Streptavidin-Sepharose wurde abzentrifugiert und der Überstand mit 5 μl hybridisierten Oligonukleotiden für 1 h bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Ausgebildete DNA-Protein-Komplexe wurden anschließend durch Zugabe von Streptavidin-Sepharose für 30 min immobilisiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation vom restlichen Überstand getrennt und fünfmal in PIB-A Puffer gewaschen, bevor sie in SDS-Probenpuffer aufgekocht und analysiert wurde (siehe Abschnitt 2.2.5.12 ff.).

2.2.5.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Annealing Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 M NaCl; 0,2 mM EDTA

GST-Elutionspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 40 mM Glutathion; 120 mM NaCl

PIB-A Puffer: 20 mM HEPES KOH, pH 7,5; 250 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM PMSF; 1 mM NaF; 40 mM Glycerol-2-phosphat;

Protease Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.

EMSA-Probenpuffer (10-fach): 65 % Sucrose; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,3 % (w/v) Orange G

TBE-Puffer (0.5-fach): 45 mM Tris; 45 mM Borsäure; 1 mM EDTA

Vergleichbar dem *DNA-Pulldown* werden markierte DNA-Oligonukleotide mit Lysaten, aufgereinigten Proteinen etc. inkubiert. Anstelle der Präzipitation dieser Komplexe werden diese elektrophoretisch aufgetrennt und anhand der Markierung an der DNA nachgewiesen.

Hierzu wurden DNA-Oligonukleotide (Sequenzen siehe 2.1.12.2), welche am 5' Ende mit einem IRDye700 markiert waren hybridisiert (siehe Abschnitt 2.2.5.8). Aufgereinigte GST-Proteine (2.2.5.3) wurden in GST-Elutionspuffer für 30 min auf Eis eluiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels SDS-PAGE (2.2.5.12) und Coomassie-Färbung (2.2.5.13) bestimmt. Als Referenz diente BSA. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

Reaktionsansatz:

0,5 – 1 μg GST-Protein in 10-15 μl Elutionspuffer

1 μg poly(dI:dC)

1 μl Sonde (1:500 Verdünnt)

ad 40 μl PIB-A

Im Fall von *Supershift* Experimenten wurde 10 min nach Beginn der Inkubation 2 μg des Antikörpers hinzugefügt. Nach insgesamt 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz mit EMSA-Probenpuffer versetzt und auf ein 5 %-iges natives

Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Als Laufpuffer diente 0,5-facher TBE Puffer.

2.2.5.10 Chromatin-Immunpräzipitation (CHIP)

Lysispuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton®X-100; 20 mM Natriumphosphat pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat pH 7,0; 50 mM NaF; 1 mM Natriumorthovanadat; 1 mM Glycerol-2-phosphat; 1 mM PMSF; Protease Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.

Chromatin-Immunpräzipitation (CHIP) stellt eine Methode zur Charakterisierung von Protein-DNA-Interaktionen *in vivo* dar. Proteine, welche die DNA direkt oder indirekt binden, werden mittels antikörperspezifischer Immunpräzipitation isoliert. Co-präzipitierte DNA Fragmente können im Anschluss spezifisch mittels quantitativer PCR oder *de novo* mittels Sequenzierungsverfahren nachgewiesen werden.

Die Zellen wurden über Nacht in Medium ohne FCS gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ1 allein oder in Gegenwart von 150 ng/ml EGF für 1 h stimuliert. Das Chromatin wurde entsprechend dem Protokoll von „ChIP-IT® Express“ (Firma Active Motif) präpariert. Die Fixierung erfolgte dabei in DMEM Medium mit 1 % Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur. Fragmentiert wurde das Chromatin mittels Ultraschallbehandlung (7-mal 10 Pulse à *duty cycle* 50 %, output control 5). Die Größe der Fragmente lag dabei im Bereich von 250 bis 500 bp. Dies wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers kontrolliert. Abweichend von dem Protokoll wurde 25 µg Chromatin in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und mit Protein-G Magnet *Beads* vorgereinigt, um unspezifische Assoziationen herauszufiltern. Nachdem die Protein-G Magnet *Beads* mithilfe eines Magnetständers abgetrennt wurde, wurde das Chromatin mit 5 µg Antikörper und 20 µl Protein-G Magnet *Beads* Suspension für 2 h auf dem Rollrad bei 4 °C inkubiert. Protein-Chromatin-Komplexe, welche über den Antikörper an die Protein-G Magnet-*Beads* gekoppelt waren, wurden über einen Magnetständer isoliert und fünfmal mit Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurden sie zweimal mit dem vom Hersteller empfohlenen CHIP2 Puffer gewaschen. Elution, Auflösen der Fixierung und Proteinase K Verdau erfolgten entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Das isolierte Chromatin wurde mittels *Realtime* PCR analysiert (siehe 2.2.3.4).

2.2.5.11 Präparation und Analyse von *Processing Bodies* (P-Bodies)

P50-Lysispuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM Kaliumacetat; 1,5 mM Magnesiumacetat; 2 mM DTT; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette; ad 10 ml A.d.

Processing Bodies sind makromolekulare Strukturen aus Proteinen und Nucleinsäuren im Cytosol eukaryontischer Zellen. Biochemisch lassen sie sich aus einem Zellkern befreiten Lysat durch Ultrazentrifugation aufreinigen¹⁷⁵.

Dazu wurden etwa 10^7 Zellen in 1 ml P50-Lysispuffer resuspendiert und einem Typ B Dounce-Homogenisator (25 Stöße) mechanisch aufgebrochen. Die Zellkerne wurden mittels Zentrifugation bei 2.000 g und 4 °C für 10 min sedimentiert (= Fraktion P). Der postnukleäre Überstand (= Fraktion S) wurde abgenommen und bei 4°C und 50.000 g für eine Stunde

zentrifugiert. Der Überstand (= Fraktion SupP50) wurde abgenommen. Das in frischen P50-Lysispuffer resuspendierte Pellet (= Fraktion PelP50) enthielt die angereicherten P-Bodies. Alle Fraktionen wurden daraufhin immunchemisch untersucht (siehe Abschnitt 2.2.5.12 ff).

2.2.5.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel: 8-15 % Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS

Sammegel: 5 % Polyacrylamid-Lösung; 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 % SDS

SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin, 0,1 % SDS in A.d.

SDS-Probenpuffer (4-fach): 2 M Tris/HCl, pH 6,8; 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin in A.d.

Die SDS-PAGE stellt eine Möglichkeit dar, Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen. Proteinhaltige Lysate, Präzipitate etc. wurden dazu vorbereitend in einem Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die durch die Hitze denaturierten Proteine wurden dabei durch das zugesetzte Natriumdodecylsulfat (SDS) gebunden und in Lösung gehalten. Das gegebenenfalls zugesetzte DTT reduziert Cystein-Disulfidbrücken. Es bilden sich Protein-Dodecylsulfat-Komplexe welche eine stark negative Ladung aufgrund der Sulfatgruppen aufweisen. Aufgrund eines konstanten Masseverhältnisses von 1,4 g SDS pro 1 g Protein können Proteine entsprechend ihrer molaren Masse durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels aufgetrennt werden. Dabei wurde das diskontinuierliche TRIS/Glycin Gelsystem nach Laemmli verwendet. Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend Angaben in der Literatur hergestellt¹⁷⁶. Entsprechend dem Angaben des Herstellers wurden Mini-PROTEAN© Gelapparaturen aufgebaut, SDS-Polyacrylamidgele gegossen und die Elektrophorese durchgeführt. Im diskontinuierlichen System passieren die Proteine zunächst das grobporige Sammelgel, um eine scharfe Proteinbande zu erhalten. Das Prinzip der Bandenschärfung beruht hierbei auf der Anwesenheit des Folgeions Glycin und des Leitons Chlorid. Zwischen den getrennten Folge- und Leitonen erhöht sich die lokale Feldstärke, was dazu führt, dass die SDS-Proteinkomplexe beschleunigt werden und dicht hinter der Leitonenfront als scharfe, konzentrierte Bande laufen. Der alkalische pH Sprung im Trenngel führt zur negativen Aufladung des Glycins und Auflösung der Folgeionenfront. Die Proteine werden entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Für die Auftrennung hochmolekularer Proteine wurden 8-10 %ige Trenngele verwendet, während niedermolekulare Proteine auf hochprozentigen (bis zu 15 %) Gelen aufgetrennt wurden. Standard-Proteinmarker wurden als Molekulargewichtsabgleich zusätzlich mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde, nachdem die Bromphenolblau markierten Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, abgebrochen.

Anschließend wurden die Gele entweder mit Coomassie-Färbelösung angefärbt (siehe 2.2.5.13) oder für *Western Blot* Analysen (siehe 2.2.5.14 bis 2.2.5.17) weiterverwendet.

2.2.5.13 Färbung von SDS-Gelen mittels Coomassie

Coomassie-Färbelösung: 0,25 % Brilliant Blau; 45 % Methanol; 10 % Essigsäure in A.d.

Coomassie-Entfärbelösung: 45 % Methanol; 10 % Essigsäure in A.d.

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie bindet unspezifisch an basische Aminosäuren von Proteinen und kann zum Nachweis von in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteinen

verwendet werden. Die Gele wurden dazu für 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend in Coomassie-Entfärbelösung gewaschen, bis die blau angefärbten Proteinbanden sichtbar wurden.

2.2.5.14 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol in A.d.

Eine der gebräuchlichsten Methoden zum spezifischen Nachweis einzelner Proteine ist der *Western Blot*. In SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine werden dazu auf einer Membran immobilisiert und einzelne Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die Proteine wurden dabei elektrophoretisch auf die PVDF-Membran transferiert. Beim verwendeten „*Wet-Blot*“ Verfahren wurde eine in Methanol äquilibrierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das SDS-Polyacrylamidgel gelegt und zwischen zwei Schichten aus Cellulosefilterkarton (*Whatman-Paper*) in der Vorrichtung eingespannt. Diese wurde entsprechend der Polung der Apparatur (Membran zur Anode, Gel zur Kathode weisend) in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte unter ständiger Kühlung bei 1 A konstanter Stromstärke. Die Transferzeit richtete sich nach der Größe der zu transferierenden Proteine und Dichte des Polyacrylamidgels und lag dabei zwischen 1-2 h.

2.2.5.15 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine

PBS-Tween-Puffer: 0,1 % Tween® 20 in PBS

Blockierlösung: 5 % Trockenmilchpulver (entfettet) in PBS-Tween-Puffer; 5 % BSA in PBS-Tween-Puffer (nur Chemolumineszenz-System) oder *Odyssey Blocking Buffer* (nur Fluoreszenz basierten System)

PBS: 138 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte entweder mit einem Chemolumineszenz- oder einem Fluoreszenz-basierten System. In beiden Fällen wurde die Membran nach erfolgtem Transfer in Blockierlösung für 30 min bei RT inkubiert, um überschüssige Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die Membran wurde mit den Primäantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert (Antikörperkonzentration siehe 2.1.9). Überschüssige Reste von Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in PBS-Tween-Puffer entfernt, bevor die Membran mit dem Sekundäantikörper für 1 bis 2 h bei 4°C inkubierte. Im Fall des Chemolumineszenz-Systems war der gegen den Primäantikörper gerichtete Sekundäantikörper mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Wie schon bei der Behandlung mit Primäantikörpern wurde die Membran anschließend dreimal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen. Zusätzlich erfolgte ein Waschschriff mit PBS, bevor mit der frisch angesetzten Chemolumineszenz-Substrat-Lösung für 1 min inkubiert wurde. Die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert dabei die Lumineszenzreaktion. Das dabei emittierte Licht wurde durch auflegen der Membran auf einen Film dokumentiert.

Im Gegensatz zur Chemilumineszenz basierten Nachweismethode wurden bei der Nah-Infrarot-Fluoreszenz fluoreszenzmarkierte Sekundäantikörper (LI-COR IRDye®680 und LI-COR IRDye®800CW) verwendet. Inkubation und Waschschriffe waren dabei denen der

Chemilumineszenz basierten Nachweismethode gleich. Die Membran wurde danach mit dem Odyssey®-Imager gescannt, um die fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper zu detektieren.

2.2.5.16 Entfernung gebundener Antikörper von PVDF-Membranen – Wiederverwendung für erneute immunochemische Nachweisverfahren

Stripping Buffer: 0,2 M Natronlauge in A.d.

Nach erfolgreicher Detektion der Sekundärantikörper auf der Membran wurde diese für 10 min in *Stripping Buffer* inkubiert und anschließend kurz in Wasser gespült. Bevor eine erneute Inkubation im Primärantikörper erfolgte, wurde die Membran nochmals mit Blockierlösung für 30 min behandelt.

2.2.5.17 Amidoschwarz-Färbung der PVDF-Membran

Amidoschwarz-Färbelösung: 0,2 % Naphtolblauschwarz 6B; 25 % Isopropanol; 10 % Essigsäure in A.d.

Amidoschwarz-Entfärbelösung: 25 % Isopropanol; 10 % Essigsäure in A.d.

Nach abgeschlossenem immunochemischem Nachweisverfahren wurde die Membran kurz in einer Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und danach soweit entfärbt, bis die transferierten Proteinbanden auf der Membran erkennbar waren. Ähnlich dem Coomassie bindet der Naphtolblauschwarz 6B Diazofarbstoff Proteine unspezifisch und diente daher als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des ursprünglichen Gels.

3 Ergebnisse

3.1 Überblick über den Phosphorylierungsstatus von Smif

Die Massenspektrometrie verfügt seit einiger Zeit über Möglichkeiten und Kapazitäten qualitativ und quantitativ den Zustand einer Zelle auf Proteinebene (Proteom) zu beschreiben. So können neben Expression und Interaktion von Proteinen auch deren posttranslationale Zustände analysiert werden. Die Detektion von Phosphorylierungen des gesamten Proteoms wurde mehrfach an unterschiedlichen Systemen in der Literatur beschrieben.

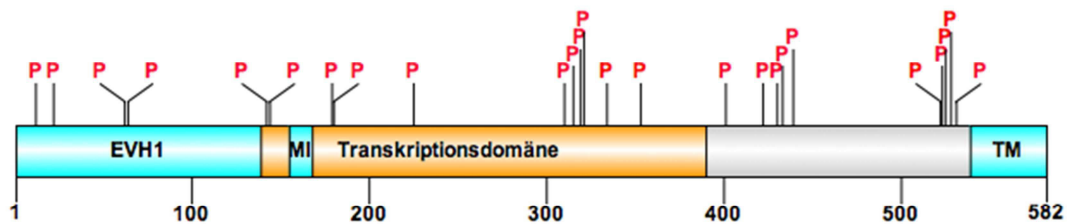


Abbildung 3.1 **Schematische Darstellung der Struktur von Smif einschließlich in der Literatur beschriebener Phosphorylierungsstellen:** Humanes Smif umfasst 582 Aminosäuren. Strukturelle Motive sind farbig unterlegt und umfassen: [i.] eine EVH1 homologe Domäne, welche Protein-Protein-Interaktionen u.a. mit Smad4 ermöglicht; [ii.] ein weitere Protein-Protein-Interaktionsdomäne „Motiv I“ (MI); [iii.] das Oligomerisierungsmotiv TM, welches für die Ausbildung von Smif-Trimeren verantwortlich ist. Phosphorylierungsstellen (P) sind über die gesamte Aminosäuresequenz identifiziert worden (Daten stammen aus den Datenbanken „PhosphoSitePlus®“ und „PHOSIDA-posttranslational modification database“).

Ausgehend von diesen Daten zeigt sich, dass Smif ein multi-phosphoryliertes Protein ist (Abbildung 3.1). Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, wurden Phosphorylierungen dabei über die gesamte Aminosäuresequenz identifiziert. Dabei wurden sowohl Serin-, Threonin- als auch Tyrosin-Phosphorylierungen für Smif in der Massenspektrometrie nachgewiesen. Zusammenfassend wurden dabei 16 Serin-, 6 Threonin- und 2 Tyrosin-Phosphorylierungsstellen identifiziert. Entsprechend der Aminosäuresequenz von humanen Smif (Q9NPI6 Swissprot) sind das 24 % aller Serin-, 14 % aller Threonin- und 20 % aller Tyrosin-Aminosäuren. Zahlreiche dieser Phosphorylierungsstellen sind in unabhängigen Versuchsstudien identifiziert worden. Analysen der Literatur zeigten dabei, dass unterschiedlichste zelluläre als auch biologische Systeme zum Einsatz kamen. Ein Aminosäuresequenzabgleich zwischen Mensch, Maus und Ratte zeigte weiterhin einen hohen Grad an Konservierung der bekannten Phosphorylierungsstellen. Während der Mehrzahl der Studien *steady-state* Messungen zugrunde liegen, wurden einige wenige dynamische Messungen beschrieben. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass Smif in Abhängigkeit der Phosphorylierungsstelle ein Grad an Flexibilität aufwies. So wurden Wachstumsfaktoren (EGF¹⁷² und Insulin¹⁷⁷)- oder Cytokin (IL1a¹³¹)-abhängige und auch Zellzyklus-regulierte Phosphorylierungen¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ beschrieben. Organspezifische Phosphorylierungen wurden ebenfalls identifiziert¹⁸¹.

3.2 EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif

3.2.1 Differenzielles Verhalten von phosphoryliertem Smif in der SDS-PAGE

Phosphorylierungen von Proteinen können aufgrund veränderter Konformationszustände oder Veränderungen in der Bindung von SDS zu einem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE führen^{182,183}. In Analogie dazu zeigten *Western Blot* Analysen mit einem monoklonalen Antikörper, welcher gegen die Aminosäuren 186 bis 286 von Smif gerichtet ist, zwei prominente Signale um die 75 kDa (Abbildung 3.2a). Diese distinkten Banden werden hier entsprechend ihrem unterschiedlichen Laufverhalten als Zustand 1 (niedrigeres Molekulargewicht) und Zustand 2 (höheres Molekulargewicht) bezeichnet.

Olsen et al.¹⁷² zeigte eine EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif in Hela Zellen. Wurden Hela Zellen unter vergleichbaren Bedingungen mit EGF stimuliert, zeigte sich schon nach 5 min eine Verschiebung der Signalintensitäten vom Zustand 1 hin zum Zustand 2. Innerhalb dieses Zeitraumes von 5 min konnte gleichzeitig eine Aktivierung von ERK (pERK), einem intrazellulären Effektor der EGF Signalkaskade, beobachtet werden.

Sowohl das Auftreten distinkter Banden im *Western Blot* als auch deren Veränderung in Gegenwart eines publizierten Aktivators der Smif Phosphorylierung deuten darauf, dass die beiden Signale im *Western Blot* Ausdruck unterschiedlicher Phosphorylierungen sind. Dennoch können alternativ unterschiedliche Isoformen (alternatives *Splicing*) als auch andere post-translationaler Modifikationen wie Ubiquitinierung oder Glykosylierung diese Beobachtungen erklären. Die Veränderungen im *Western Blot* von Smif nach Stimulation mit EGF, welche durch eine schnelle Kinetik im Bereich von wenigen Minuten gekennzeichnet sind, lässt die Vermutung einer differenziellen Expression unterschiedlichster Isoformen von Smif eher ausschließen. Dies konnte zusätzlich mit der rekombinanten Expression von Smif in Fibroblasten bestätigt werden. Die Klonierung der Smif cDNA, welcher Intronsequenzen fehlen, in einen Expressionsvektor verhindert die Expression unterschiedlicher mRNA-Transkripte durch alternatives *Splicing*. Die Zusätzliche Expression des EGF-Rezeptors (EGFR) diente der adäquaten Stimulierbarkeit von Fibroblasten mit EGF. Auch hier zeigte sich eine Veränderung im Laufverhalten in der SDS-PAGE nach Stimulation mit EGF. Wie in Abbildung 3.2b gezeigt, trat vergleichbar den Experimenten mit Hela Zellen bei einer Konzentration um 1 ng/ml dieser Effekt auf.

In Anbetracht der EGF-vermittelten Aktivierung zahlreicher Kinasen wurde untersucht, ob sich durch Inhibition von Phosphatasen, welche als Gegenspieler Phosphorylierungen hydrolytisch abspalten, Veränderungen im *Western Blot* für Smif auftraten. Vergleichbar zu den Experimenten mit EGF führte die Behandlung mit Okadainsäure zu einer Verschiebung des Laufverhaltens von Smif in der SDS-PAGE zu höheren Molekulargewicht im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Im Gegensatz zur Stimulation mit EGF trat aber ein Laufverhalten hin zu noch höherem Molekulargewicht (Zustand 3) auf. Stimulation mit Vanadat induzierte ebenfalls eine Veränderung im Laufverhalten in der SDS-PAGE, welche aber eher mit der von EGF als der von Okadainsäure vergleichbar war.

Um die Daten zu vervollständigen wurde eine mögliche Phosphorylierung von Smif mittels Phosphatase Assays *in vitro* studiert. Zelllysaten, in denen *wild-typ* Smif überexprimiert wurde, zeigten wie erwartet eine veränderte Migration in der SDS-PAGE hin zum Zustand 2 nach Stimulation mit EGF. Behandelte man diese Lysate *in vitro* mit einer Phosphatase und analysiert das Laufverhalten in der SDS-PAGE, so trat eine Verschiebung des Signals im *Western Blot* hin zu niedrigeren Molekulargewicht auf. Das Laufverhalten von Smif entsprach nach Behandlung mit Phosphatase exakt dem des Zustandes 1.

Insgesamt konnte hier eine EGF-abhängige Phosphorylierung von Smif in verschiedenen Zellbasierten Systemen gezeigt werden. Diese Phosphorylierung korrelierte dabei mit einem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE.

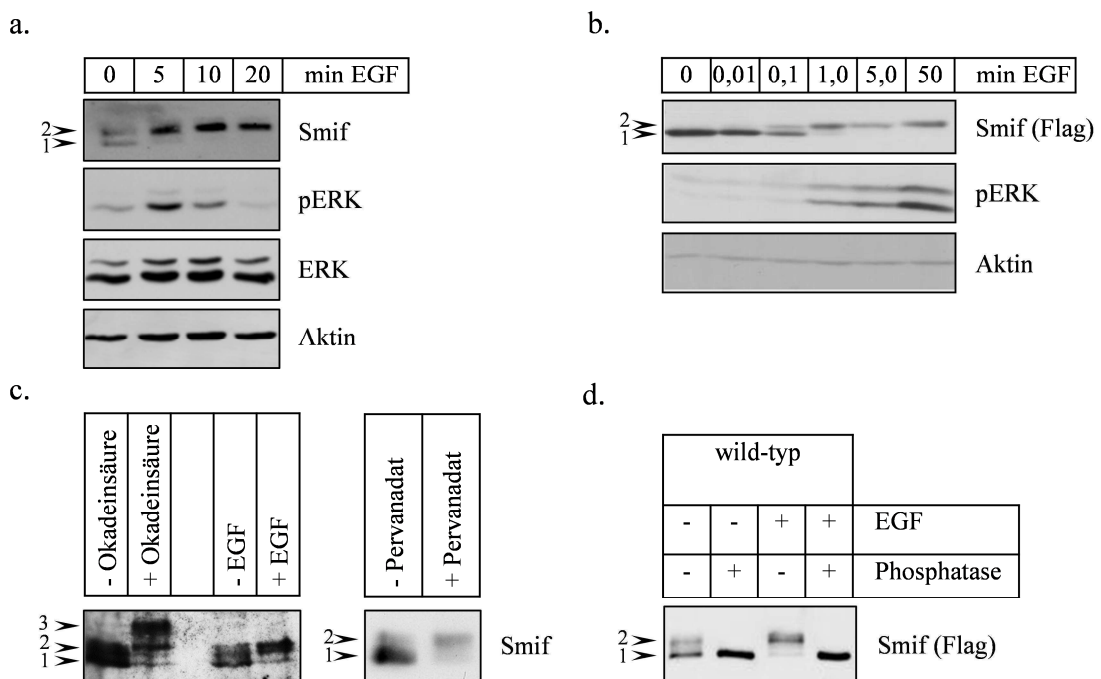


Abbildung 3.2 EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif: a. HeLa Zellen wurden in Medium ohne FCS für 18 h gehungert und mit 150 ng/ml EGF stimuliert. Zellen wurden entsprechend den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Lysate wurden mittels Western Blot analysiert. b. Maus Embryonale Fibroblasten (Mef) wurden retroviral stabil mit Smif und EGFR transduziert, in Medium ohne FCS für 18 h gehungert und entsprechend den angegebenen Konzentrationen an EGF für 20 min stimuliert. Lysate wurden mittels Western Blot analysiert. c. HeLa Zellen wurden 2 h mit 1 μ M Okadeinsäure oder 15 min mit 10 μ M Pervanadat behandelt. Zelllysate wurden präpariert und mittels Western Blot analysiert. d. Phoenix-E Zellen wurden mit wild-typ Smif transfiziert, 24 h gehungert und mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Zelllysate wurden präpariert und mit Phosphatase für 60 min inkubiert. Die Phosphorylierung von Smif wurde anschließend mittels Western Blot analysiert.

3.2.2 EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif an Serin 315, 319 und Threonin 321

In Anbetracht der Vielzahl an identifizierten Phosphorylierungsstellen in Smif (siehe Abschnitt 3.1) kommen mehrere Serin, Threonin aber auch Tyrosin Aminosäuren als mögliche Phosphatatazeptoren in Frage. Aus diesem Grund wurden die potentielle Phosphorylierungsstellen S142,S144; S315,S319,T321 und S353 durch Mutagenese-PCRs zu

Alanin substituiert und damit einer möglichen Phosphorylierung gegenüber inaktiviert. Alle drei Phosphorylierungsstellen wurden von Olsen et al.¹⁷² in Hela Zellen identifiziert.

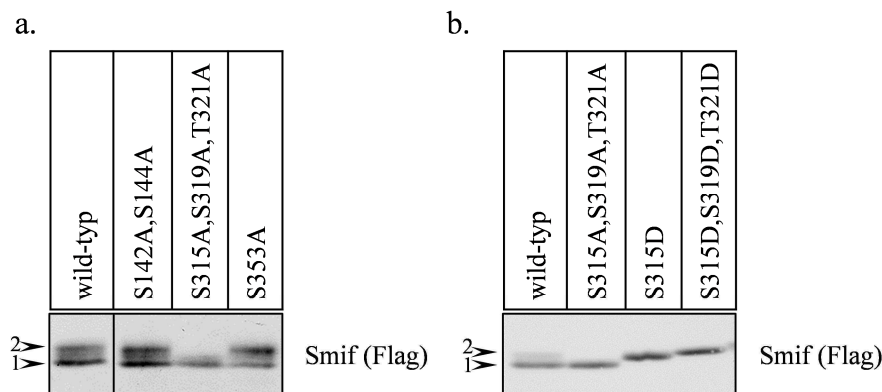


Abbildung 3.3 Phosphorylierung an Serin 315, 319 und Threonin 321 induziert eine veränderte Migration in der SDS-PAGE: Phoenix-E Zellen wurden transient mit den angegebenen Smif-Konstrukten, bei denen potentielle Phosphorylierungsstellen inaktiviert (a) oder nachgeahmt (b) wurden, transfiziert. Zelllysate wurden im Western Blot analysiert.

Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, zeigte die rekombinante Expression von Smif mit Alanin-Substitutionen an S315,S319,T321 deutliche Veränderungen im Laufverhalten in der SDS-PAGE gegenüber dem *wild-typ* Protein in Hela Zellen. Phosphoryliertes Smif (Zustand 2) ist bei Mutation von S315A,S319A,T321A nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu wirken sich Mutationen an S142A,S144A sowie an S353A nicht auf das Laufverhalten in der SDS-PAGE aus. Weiterhin verursacht die Einführung der Phosphorylierungs-Mimikry Aspartat oder Glutamat an S315D allein als auch an S315D/S319D/T321E ein Laufverhalten in der SDS-PAGE, welches phosphoryliertem Smif nach Stimulation mit EGF ähnelt.

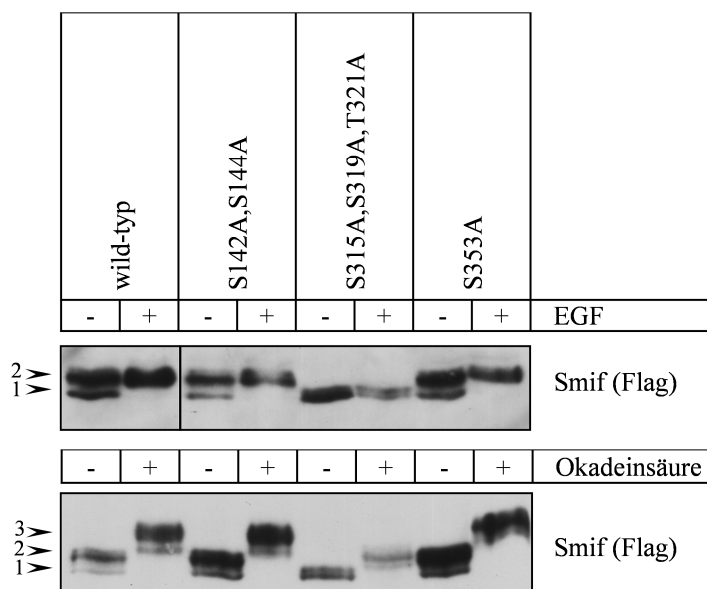


Abbildung 3.4 EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif an Serin 315, 319 und Threonin 321: HeLa Zellen wurden mit unterschiedlichen Smif-Konstrukten mit inaktivierten Phosphorylierungsstellen transfiziert und mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert (oben) oder für 2 h mit 1 μM Okadaicinsäure inkubiert (unten). Zellen wurden geerntet, lysiert und mittels Western Blot analysiert.

Die Analyse unterschiedlicher Smif Mutationen deutet auf einen Zusammenhang zwischen Phosphorylierung von Smif an den Aminosäuren S315, S319 und T321 und Veränderungen im Laufverhalten in der SDS-PAGE hin. Dies konnte weiter untermauert werden, da die EGF-vermittelte Modifizierung von Smif aus dem Zustand 1 in den Zustand 2 durch Inaktivierung der Serine bzw. des Threonin an den Positionen 315, 319 und 321 blockiert wurde. In Gegensatz dazu zeigten die Mutationen S142A, S144A sowie S353A eine EGF-vermittelte Veränderung der Bandenintensität hin zum Zustand 2 im *Western Blot*, welche der im *wild-typ* vergleichbar war (Abbildung 3.4 oben).

Der Phosphataseinhibitor Okadainsäure veränderte bei allen Konstrukten das Laufverhalten in der SDS-PAGE hin zu einem höheren Molekulargewicht. Einzig bei Inaktivierung von S315A, S319A, T321A ist dieser Effekt abgeschwächt (Abbildung 3.4 unten).

Bisher war nicht auszuschließen, dass die Phosphorylierung an S315, S319, T321 als Primer für zusätzliche Phosphorylierungen dient und diese ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE bewirken. Phosphorylierungs-Mimikry S315D, S319D, T321E, die sich in der SDS-PAGE wie phosphoryliertes Smif verhalten, zeigten keine Sensitivität gegenüber einer *in vitro* Behandlung mit Phosphatase und schließen diese Möglichkeit aber aus. Ebenso wiesen Kontrollen mit inaktivierten Phosphorylierungsstellen S315A, S319A, T321A sowohl nach Stimulation mit EGF als auch nach *in vitro* Behandlung mit Phosphatase keine Veränderungen in der SDS-PAGE auf. Ihr Laufverhalten entsprach in allen Bedingungen dem Zustand 1.

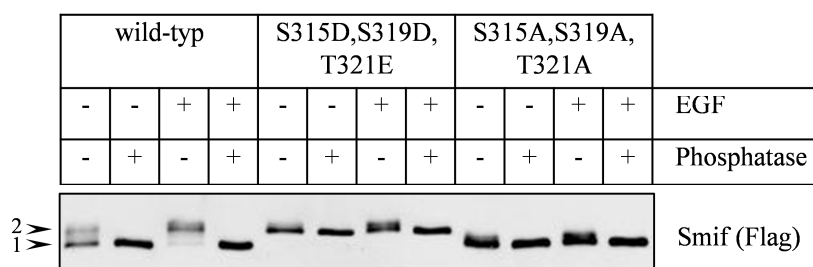


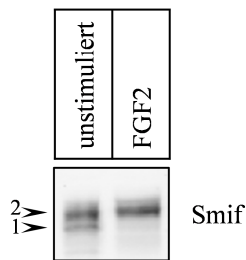
Abbildung 3.5 ***In vitro* Dephosphorylierung von Smif:** Phoenix-E Zellen wurden mit wild-typ Smif, Phosphorylierungs-Mimikry oder Phosphorylierungs-defizientem Smif transfiziert, 24 h gehungert und mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Zellysate wurden präpariert und mit Phosphatase für 60 min inkubiert. Die Phosphorylierung von Smif wurde anschließend mittels Western Blot analysiert.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass mit der Phosphorylierung von Smif an den Aminosäureresten S315, S319 und T321 ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE hin zu höheren Molekulargewicht auftritt. *In vitro* Phosphatase Assays mit Phosphorylierungs-Mimikry schließen eine mögliche über S315, S319, T321 induzierte Phosphorylierung an einer weiteren Stelle von Smif aus, welche zu einer veränderten Migration in der SDS-PAGE führen könnte. Das veränderte Laufverhalten in der SDS-PAGE kann daher als spezifischer Indikator einer Phosphorylierung von Serin 315 und 319 und Threonin 321 herangezogen werden. Mit EGF und Okadainsäure konnten erste Aktivatoren einer Phosphorylierung von Smif an dieser Stelle identifiziert werden. Die Induzierbarkeit der Phosphorylierung deutet auf eine flexible posttranslationale Modifikation an dieser Position.

3.3 Phosphorylierung von Smif durch andere proliferative Stimuli

In Anbetracht einer induzierten Phosphorylierung von Smif durch Aktivierung der proliferativen EGF Kaskade stellte sich die Frage, inwiefern andere mitogene Stimuli die Phosphorylierung von Smif regulieren können. FGF aktiviert im Vergleich zur EGF ähnliche Signalkaskaden wie die Ras/MAPK-, PI3K/AKT- oder PLC γ /PKC Signalwege¹⁸⁴ und ließe daher eine ähnliche Aktivität gegenüber Smif vermuten. Dies konnte auch bei Analysen des Phosphorylierungszustandes von Smif nach Stimulation mit FGF2 bestätigt werden. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, induziert FGF2 eine verminderte Migration von endogenen Smif in der SDS-PAGE hin zum Zustand 2, was eine FGF2 vermittelte Phosphorylierung von Smif in NIH3T3 Zellen belegt. Wie auch schon für EGF gezeigt wurde, führten Inaktivierungen potentieller Phosphorylierungsstellen an S315,S319,T321 zu keiner Verschiebung der Banden im *Western Blot* von Lysaten FGF2 behandelter Zellen. Phosphorylierungs-Mimikry zeigten konstitutiv ein Laufverhalten vergleichbar dem von *wild-typ* Smif nach Stimulation mit EGF oder FGF2, welches durch beide Stimuli nicht beeinflusst wurde.

a.



b.

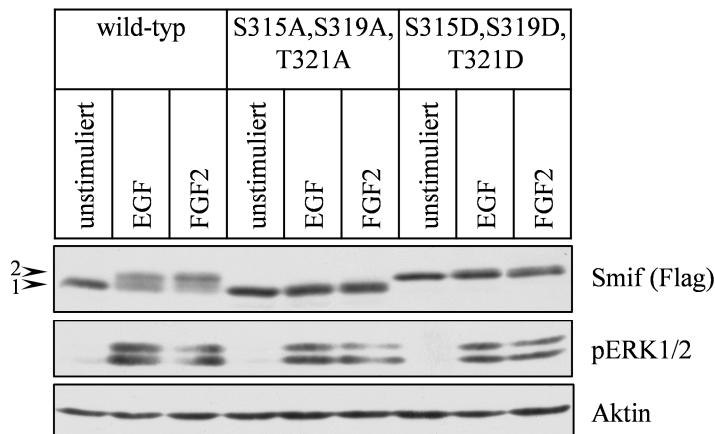


Abbildung 3.6 **Fibroblast Growth Factor (FGF) vermittelte Phosphorylierung von Smif:** *Western Blot* von Zelllysaten FGF2/EGF stimulierter NIH3T3 (a.) und Mef-Zellen, welche die angegebenen Smif-Konstrukte sowie EGFR stabil exprimieren (b.).

Die murine pro-B-Zelllinie Ba/F3 benötigt für ihre Proliferation neben FCS zusätzlich noch IL-3. Stimulation von Ba/F3 Zellen mit IL-3, welche zuvor durch IL-3 Entzug in ihrer Proliferation blockiert wurden, führt innerhalb weniger Minuten zu einem starken Anstieg des

ERK-MAP-Kinase Signalweges. Parallel dazu kam es zu einer Phosphorylierung von Smif, was sich in der vollständigen Verschiebung der Signale im *Western Blot* hin zum Zustand 2 zeigte (Abbildung 3.7).

Zusammenfassend deuten die Experimente mit FGF2 als auch IL-3 darauf, dass nicht nur EGF sondern generell pro-mitogene Stimuli intrazellulär zu einer Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321 führen.

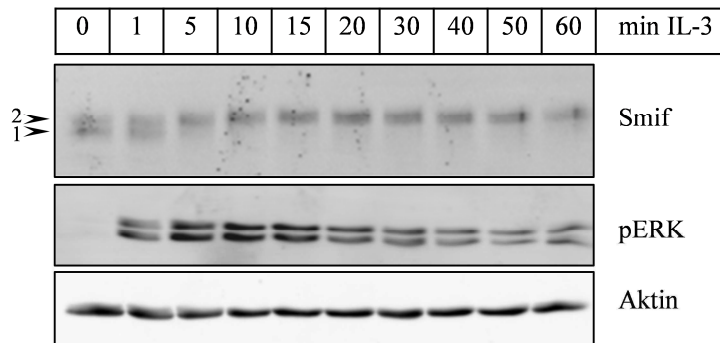


Abbildung 3.7 **Interleukin-3 vermittelte Phosphorylierung von Smif**: Die pre-B-Zelllinie Ba/F3 wurde mit 2 ng/ml IL-3 für die angegebenen Zeiten stimuliert. Lysate wurden im *Western Blot* analysiert.

3.4 TGF β selbst führt zu keiner Phosphorylierung von Smif am Serin 315 und 319 und Threonin 321

Wie in der Einleitung dargestellt ist, aktiviert der TGF β -Rezeptor Komplex intrazellulär unterschiedliche Kinasen (Abschnitt 1.2.4). Darüber hinaus sind sowohl TGF β Rezeptoren Typ I und Typ II Serin/Threonin Kinasen und könnten Smif potentiell phosphorylieren (Abschnitt 1.2.1).

Präinkubation von Hela Zellen mit TGF β 60 min vor Stimulation mit EGF zeigten eine Aktivierung der TGF β -Signalkaskade, welche sich durch die Phosphorylierung von Smad2/3 nachweisen ließ. Veränderungen in der Intensität beider Signale von Smif waren im *Western Blot* aber nicht zu beobachten und schließen eine TGF β -vermittelte Phosphorylierung aus. Erst Stimulation mit EGF konnte eine Phosphorylierung von Smif induzieren. Titration der EGF Konzentration zeigte keine quantitativen Unterschiede in der Phosphorylierung von Smif zwischen TGF β präinkubierten und nicht inkubierten Zellen. In beiden Fällen war ab einer Konzentration von 1 ng/ml eine vollständige Phosphorylierung von Smif zu beobachten (Abbildung 3.8a).

In der Phoenix-E Zelllinie, einem Abkömmling human embryonaler Nierenzellen (HEK293), konnte ebenfalls eine EGF-vermittelte Veränderung in der Migration von Smif in der SDS-PAGE gezeigt werden. Auch hier beeinflusste TGF β diesen Effekt nicht (Abbildung 3.8b).

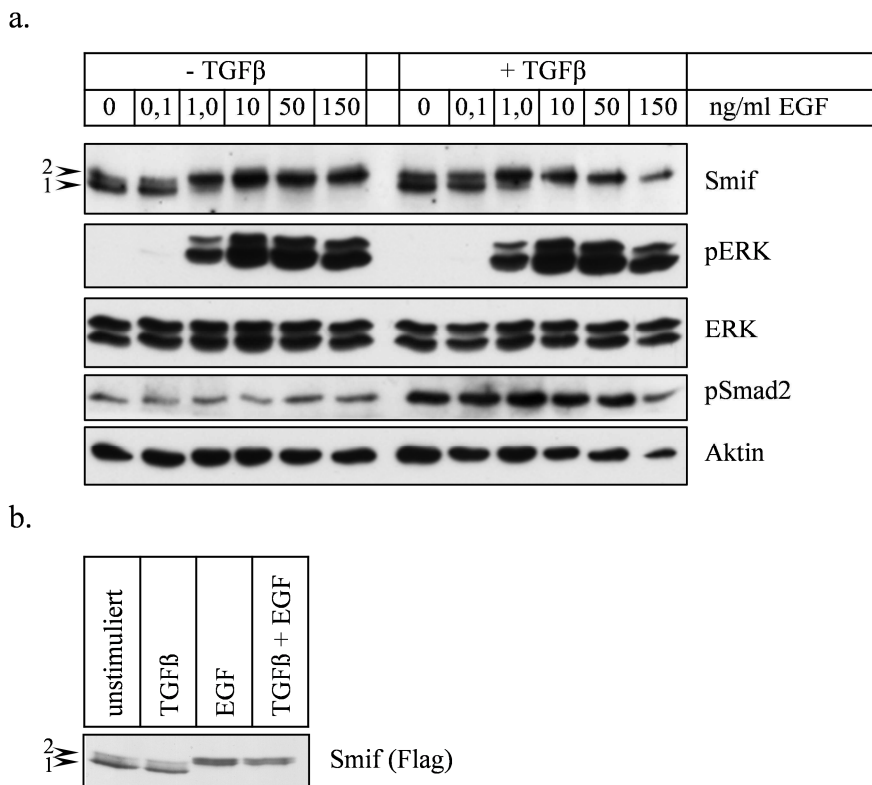


Abbildung 3.8 **TGFβ-unabhängige Phosphorylierung von Smif**: a. HeLa-Zellen wurden in Medium ohne FCS für 18 h gehungert und entsprechend den angegebenen Konzentrationen an EGF für 20 min in Gegenwart oder Abwesenheit von 4 ng/ml TGFβ stimuliert. b. Phoenix-E Zellen wurden mit wild-typ Smif transfiziert, gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ, 50 ng/ml EGF allein oder in Kombination für 20 min stimuliert.

3.5 Zellulärer Stress induziert eine Phosphorylierung von Smif

Wie aus der Literatur hervorgeht, zeigen die TGFβ Effektoren Smad eine Mitogen vermittelte Phosphorylierung. Unter vergleichbaren Bedingungen war dies im Rahmen dieser Arbeit für Smif beobachtbar. Daneben wurden Phosphorylierungen von Smad-Proteinen unter zellulären Stress nachgewiesen (siehe Abschnitt 1.5). Inwiefern ein solches Verhalten auch auf den Transkriptions-Cofaktor Smif zutrifft wurde daher untersucht. Dazu wurden die Zellen durch Zugaben von Natriumchlorid einem osmotischen Stress ausgesetzt oder durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UVC) stimuliert. In beiden Fällen kam es sowohl in Phoenix-E (Abbildung 3.9a) als auch in NIH3T3 Zellen (Abbildung 3.9b) zu einer Phosphorylierung von endogenen Smif, wie sich im *Western Blot* zeigte. Vergleichend traten dabei keine Unterschiede hinsichtlich des Laufverhaltens von Smif in der SDS-PAGE nach Stimulation mit UVC-Strahlung, Natriumchlorid und EGF auf. Punktmutationen an S315, S319, T321 zu Alanin und der daraus resultierenden Blockierung der UV-bedingten Verschiebung zum Phosphorylierungszustand 2 bestätigten eine UV-vermittelte Phosphorylierung von Smif an

diesen Positionen (Abbildung 3.9c). Phosphorylierungs-Mimikry zeigten eine konstitutive Migration in der SDS-PAGE hin zum Phosphorylierungszustand 2, welcher wie im Fall von EGF nicht durch UVC-Bestrahlung beeinflusst wurde.

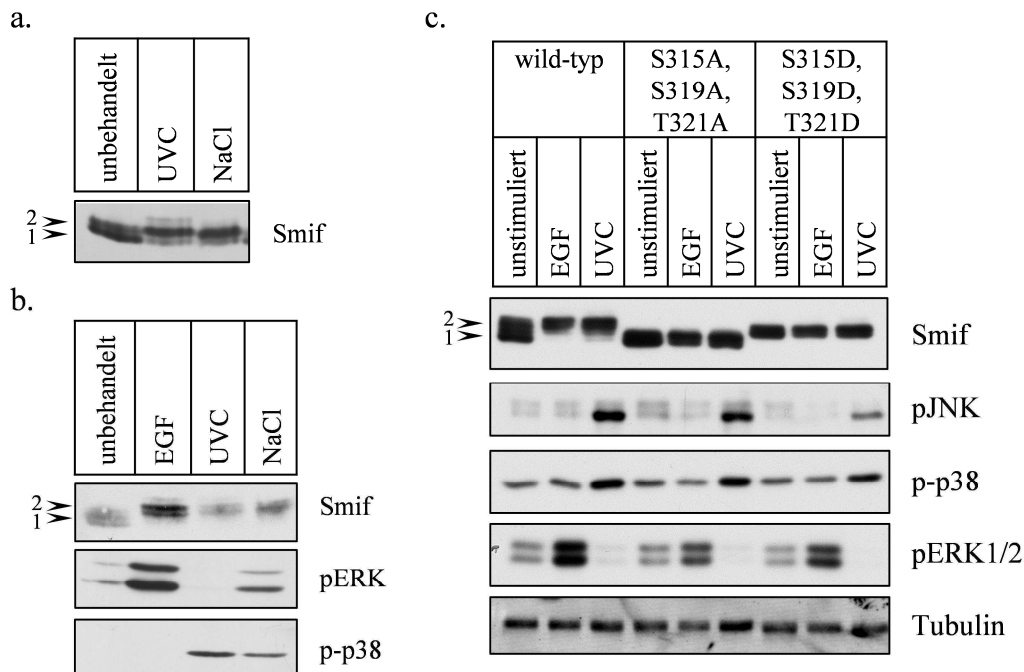


Abbildung 3.9 Stress-induzierte Phosphorylierung von Smif: a & b. Phoenix-E (a.) und NIH3T3-EGFR Zellen (b.) wurden mittels UVC-Strahlung bzw. Natriumchlorid zellulärem Stress ausgesetzt. Vergleichend wurden NIH3T3 Zellen mit EGF stimuliert. Zelllysate wurden im Western Blot analysiert. c. Phoenix-E Zellen wurden transient mit den angegebenen Smif-Konstrukten transfiziert und mit EGF bzw. UVC stimuliert. Zelllysate wurden auf die Phosphorylierung von Smif sowie Aktivierungsmarker für EGF Stimulation (pERK) bzw. UV Stimulation (p-p38/pJNK) im Western Blot analysiert.

3.6 Identifizierung von Kinasen, die Smif phosphorylieren

3.6.1 ERK vermittelte Phosphorylierung von Smif an Serin 315 und 319 und Threonin 321

Nähere Betrachtung der Aminosäuresequenz um die identifizierten Phosphorylierungsstellen S315, S319, T321 deuten auf eine potentielle Phosphorylierung durch *Prolin-Directed Kinases* zu denen auch MAP-Kinasen gehören. So weisen Serin 315 und 319 ein Prolin an Position +1 als Aminosäure auf. Analysen mittels verschiedener Kinase Vorhersageprogramme geben unter anderem MAP-Kinasen wie ERK1/2 oder p38 an (Abbildung 3.10c). In Anbetracht dessen, dass die oben untersuchten Signalwege solche MAP-Kinasen aktivieren, rückten diese MAP-Kinasen in den Focus dieser Arbeit.

EGF und FGF Signalwege aktivieren über Ras-Raf-MEK die MAP-Kinase ERK. Pharmakologisch lässt sich MEK, der direkte Aktivator von ERK, *in vivo* inhibieren. Prä-Inkubation von NIH3T3, die den humanen EGF-Rezeptor exprimieren, mit dem MEK Inhibitor UO126 zeigten keine Aktivierung von ERK nach Stimulation mit EGF, was auf eine

vollständige Inhibition von MEK hindeutet. Parallel dazu trat keine Verschiebung von Smif im *Western Blot* hin zu höheren Molekulargewicht auf, was auf eine gleichzeitige Blockierung der Phosphorylierung von Smif deutet (Abbildung 3.10a). Interessanterweise zeigten Hela Zellen, in welchen eine EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif auftrat, zwar eine Inhibition von ERK durch den MEK Inhibitor UO126 aber keine Blockierung der Phosphorylierung von Smif nach Stimulation mit EGF (Abbildung 3.10b).

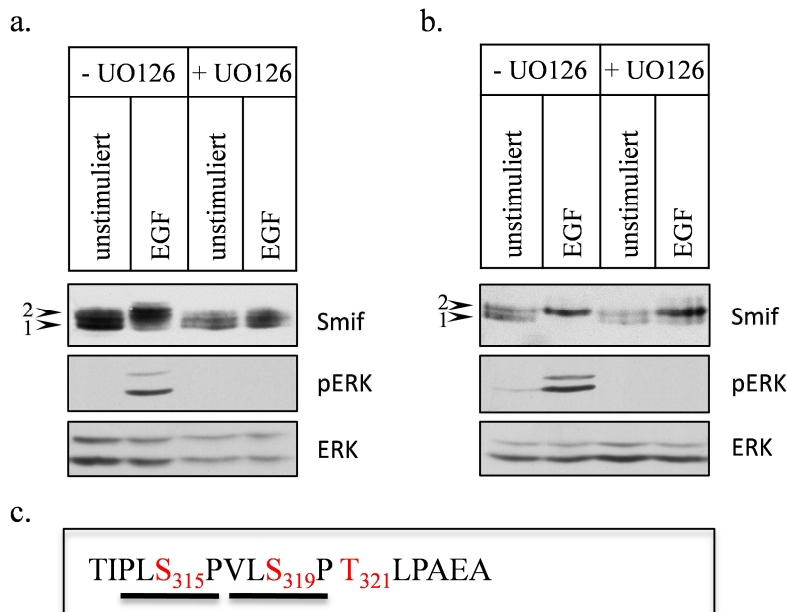


Abbildung 3.10 EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif ist über den MEK-ERK Signalweg vermittelt: a und b. NIH3T3-EGFR Zellen (a) und Hela Zellen (b) wurden mit dem MEK Inhibitor UO126 behandelt und anschließend mit EGF stimuliert. Zelllysate wurden präpariert und mittels *Western Blot* analysiert. c. Aminosäuresequenz von humanem Smif (Ausschnitt) mit in rot markierten Phosphorylierungsstellen und den ERK-Kinase Konsensussequenzen (unterstrichen).

Experimente mit dem Inhibitor UO126 schließen neben dem direkten Bindungspartner MEK auch alle durch MEK aktivierten Kinasen als potentielle Enzyme für die Phosphorylierung von Smif ein. Für eine genauere Charakterisierung wurden die beiden Isoenzyme ERK1/2 mittels eines RNA-Interferenz Ansatzes in ihrer Expression herunter reguliert. Dazu wurden sequenziell Vektoren, welche shRNA gegen ERK1 oder ERK2 codierten, stabil in NIH3T3-Zellen integriert (Abbildung 3.11). Kontroll-Vektor integrierte Zellen, sowie Zellen in denen ERK1 oder ERK2 alleine herunter reguliert wurden, zeigten sowohl nach Stimulation mit FGF2 oder ultraviolettem Licht eine vollständige Phosphorylierung von Smif, was sich in der Verschiebung der Signale von Smif im *Western Blot* zum Zustand 2 zeigte. Kontrollen der Expression von aktiviertem ERK zeigten, dass ERK1 in Zellen mit shRNA nicht mehr nachweisbar war. In Zellen mit shRNA gegen ERK2 konnte ERK2 noch in geringen Mengen im *Western Blot* detektiert werden. Parallel dazu trat eine starke Induktion der Aktivität von ERK1 auf. Die Aktivierung von p38 nach Stimulation mit ultraviolettem Licht war in Kontroll- als auch Zellen mit ERK1 oder ERK2 shRNA unbeeinflusst.

Wurde ERK1 und ERK2 gleichzeitig herunter reguliert, trat eine Verminderung in der Phosphorylierung von Smif nach Stimulation mit FGF2 auf. Die Verschiebung der Signale hin

zu höheren Molekulargewicht trat partiell auf und unterschied sich deutlich von der in Kontrollzellen als auch Zellen mit ERK1- oder ERK2-shRNA allein. Eine Analyse der Phosphorylierung von Smif durch Stimulation mit ultraviolettem Licht zeigte keine Abhängigkeit von ERK, was sich in der vollständigen Verschiebung von Smif hin zum phosphorylierten Zustand 2 nach UV Behandlung in beiden Zelllinien zeigte. Auch in Zellen mit shRNA gegen ERK1 und ERK2 zusammen war keine vollständige Blockierung der Expression beider Kinasen zu beobachten.

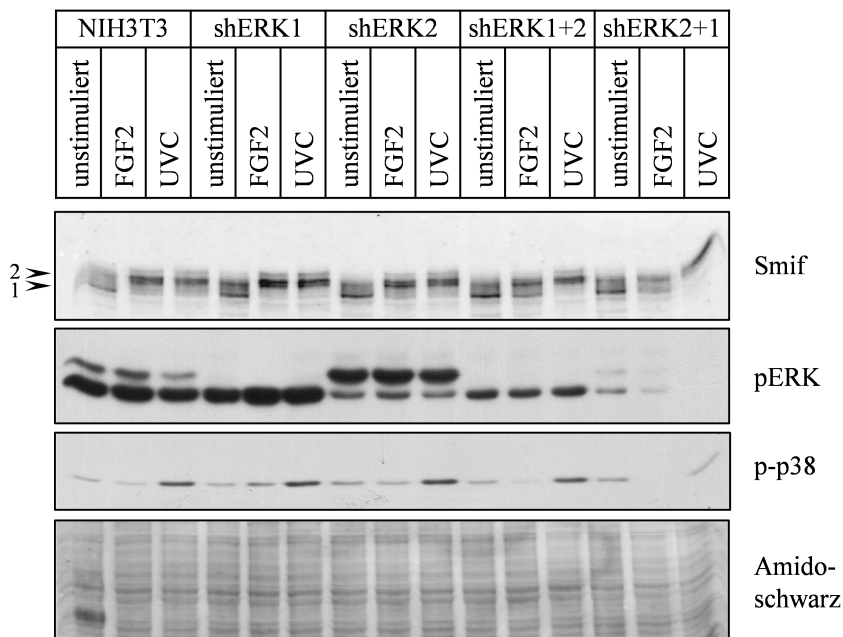


Abbildung 3.11 ERK vermittelte Phosphorylierung von Smif nach Stimulation mit FGF2 nicht aber nach UV Bestrahlung: NIH3T3 Zellen wurden mittels retroviraler Transduktion von Expressionsvektoren für shRNAs gegen ERK1 (*shERK1*), ERK2 (*shERK2*) oder ERK1 und ERK2 (*shERK1+2*, sequenzielle Infektion *shERK1* gefolgt von *shERK2* bzw. *shERK2+1*, sequenzielle Infektion *shERK2* gefolgt von *shERK1*) generiert.. Puromycin selektionierte Zellen wurden entweder mit 5 ng/ml FGF2 für 60 min stimuliert oder mit 200 J/m² UV bestrahlt und nach 60 min geerntet. Zellysate wurden im Western Blot analysiert.

Zusammenfassend deuten diese Experimente auf eine ERK vermittelte Phosphorylierung von Smif nach Stimulation mit pro-mitogenen Stimuli wie EGF oder FGF nicht aber nach Induktion zellulären Stresses. Zum Nachweis einer direkten Phosphorylierung von Smif durch ERK wurde daher *in vitro* bakteriell gereinigtes Smif und ERK1 in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert und die Phosphorylierung anschließend autoradiographisch bestimmt. GST-Smif zeigte dabei ein Signal im Autoradiogramm bei dem erwarteten Molekulargewicht um die 100 kDa, wie in Abbildung 3.12 dargestellt ist. Im Gegensatz dazu war kein Signal im Autoradiogramm mit GST-Protein nachweisbar. Wie in der Coomassie Färbung des Gels deutlich zu erkennen ist, trat eine starke Degradation von GST-Smif auf. Eine mögliche Phosphorylierung partiell degradiertem GST-Smif Proteins könnte daher das zweite Signal im Autoradiogramm um die 75 kDa erklären.

GST-Smif, welches eine Serin bzw. Threonin zu Alanin Substitution an den Positionen S315,S319,T321 aufweist, wurde deutlich schwächer durch ERK phosphoryliert, was sich an

der verminderten Signalintensität im Autoradiogramm erkennen lässt. Inaktivierung weitere Phosphorylierungsstellen allein als auch in Kombination mit S315A,S319A,T321A zeigten keine Veränderungen gegenüber *wild-typ* Smif bzw. Smif S315A,S319A,T321A.

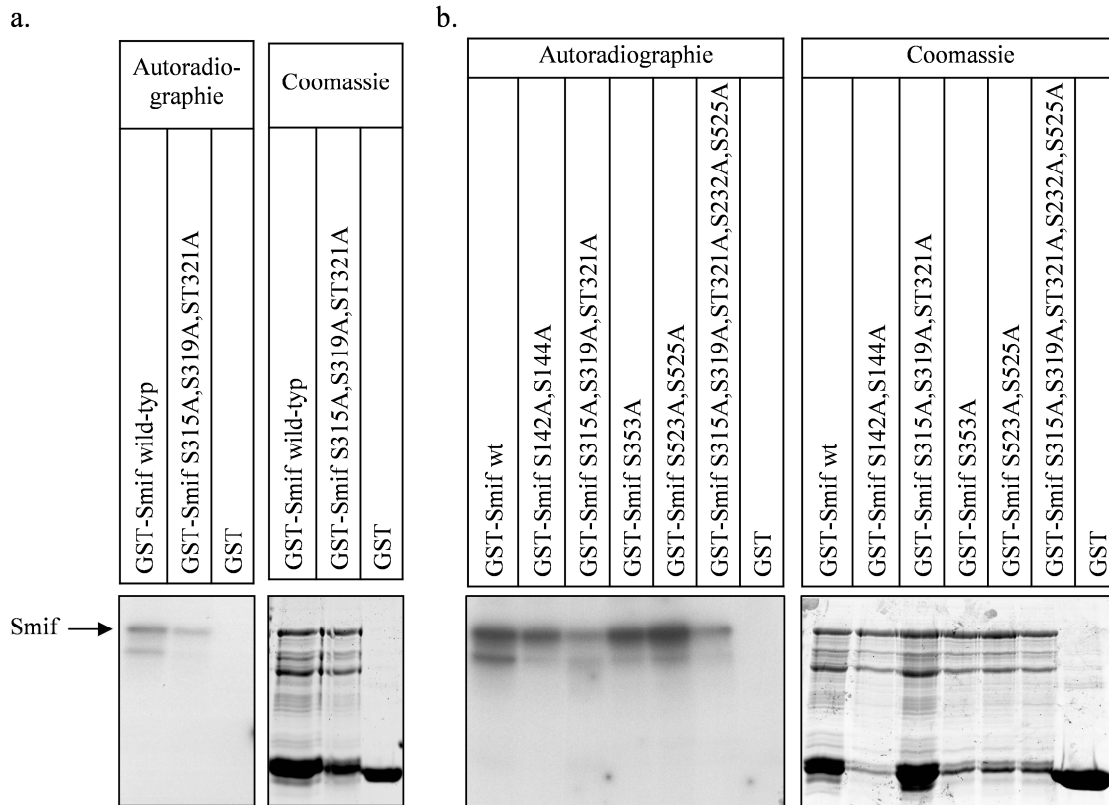


Abbildung 3.12 **Smif ist ein Substrat von ERK:** a. *In vitro* Kinase-Assay von aufgereinigten, rekombinanten GST-Smif mit rekombinanten ERK1 in Gegenwart von γ - 32 P-ATP. Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Phosphoryliertes Smif wurde mittels Autoradiographie detektiert. Korrespondierendes Signal für GST-Smif in der Autoradiographie wurde entsprechend der Coomassie-Färbung bestimmt und ist markiert. b. Test verschiedener Smif-Konstrukte, bei denen potentielle Phosphorylierungsstellen durch Alanin-Substitution inaktiviert wurden, im ERK1 *in vitro* Kinase-Assay.

Ausgehend von den *in vitro* Daten lässt sich schlussfolgern, dass Smif über ERK an S315,S319,T321 phosphoryliert werden kann. Diese Daten stehen in Einklang mit *in vivo* Daten in NIH3T3 Fibroblasten, bei denen mit dem MEK-Inhibitor UO126 gearbeitet wurde als auch RNA-Interferenz-Experimenten, in denen ERK1/2 herunterreguliert wurde. Stimulationsexperimente mit ultraviolettem Licht zeigten aber gleichzeitig, dass neben ERK weitere Kinasen Smif an S315,S319,T321 phosphorylieren. Hela Zellen scheinen ERK-unabhängig Smif nach mitogener Aktivierung zu phosphorylieren, was, wie später diskutiert wird, zellintrinsische Ursachen zu haben scheint und auf Zellkontext-abhängige Effekte deutet.

3.6.2 Die MAP-Kinasen JNK und p38 vermitteln die Phosphorylierung von Smif nach zellulärem Stress

Stimulation mit ultraviolettem Licht zeigte in verschiedenen Zelllinien keine Aktivierung von ERK im phospho-ERK *Western Blot* (siehe Abschnitt 3.5). Trotzdem trat eine Phosphorylierung von Smif auf. Entsprechend zeigte eine Prä-Inkubation mit dem MEK-Inhibitor UO126 keinen Einfluss auf die UV vermittelte Phosphorylierung von Smif in der Zelllinie Mef27-Smif-EGFR (Abbildung 3.13), eine Smif *knock-out* Zelllinie, in der neben Smif der EGF Rezeptor stabil exprimiert wird. Im Gegensatz dazu war die EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif, wie im Abschnitt 3.6.1 gezeigt, abhängig von der Aktivität der MEK-MAPK-Kaskade.

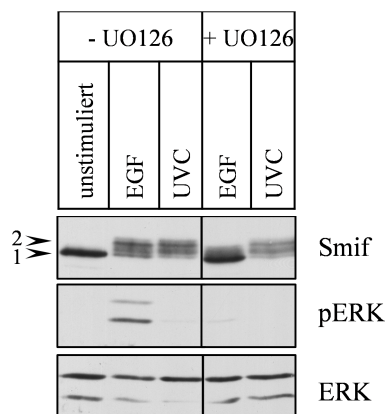


Abbildung 3.13 UV vermittelte Phosphorylierung von Smif erfolgt nicht über den MEK-ERK Signalweg: Smif defiziente Mef Zelllinien, welche exogen Smif und EGFR überexprimieren, wurden in Gegenwart des MEK Inhibitors UO126 entweder mit 50 ng/ml EGF für 20 min oder mit 200 J/m² UVC bestrahlt und 60 min später geerntet. Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert.

Ultraviolettes Licht aktiviert die MAP-Kinasen JNK und p38. Die Kinasen können mittels den Inhibitoren SP600126 für JNK1/2 und SB203580 für p38 in ihrer Aktivität blockiert werden. Wie in Abbildung 3.14a gezeigt, trat in NIH3T3 Zellen, in denen JNK1/2 und p38 gleichzeitig inhibiert wurden, keine UV vermittelte Phosphorylierung von Smif auf, was in der fehlenden Verschiebung des Signales im *Western Blot* hin zum Phosphorylierungszustand 2 erkennbar ist. Die Phosphorylierung von JNK1/2 und p38 nach UV Stimulation war in Gegenwart beider Inhibitoren nur schwach reduziert. Im Gegensatz zur Behandlung mit ultraviolettem Licht zeigte die EGF-vermittelte Verschiebung der Signalintensität von Smif im *Western Blot* hin zu höherem Molekulargewicht (Zustand 2) keine Veränderung, was auf eine Phosphorylierung von Smif durch EGF unabhängig von den Inhibitoren SP600126 und SB203580 bzw. JNK1/2 und p38 deutet.

Wie zuvor in Abbildung 3.10 gezeigt wurde, wiesen Hela Zellen eine EGF-vermittelte Phosphorylierung unabhängig von MEK auf. Behandlung von Hela Zellen mit SP600126 und SB203580 führten zu einer Blockierung der UV und EGF-vermittelten Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321, wie im *Western Blot* erkennbar war (Abbildung 3.14b). Eine verstärkte Aktivierung von p38 als auch JNK durch EGF konnte im *Western Blot* mit phospho-spezifischen Antikörpern aber nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321 durch UV aktivierte JNK1/2 und p38 MAP-Kinasen. Hela Zellen scheinen darüber hinaus abhängig von JNK1/2 und p38 bei der EGF-vermittelten Phosphorylierung von Smif zu sein.

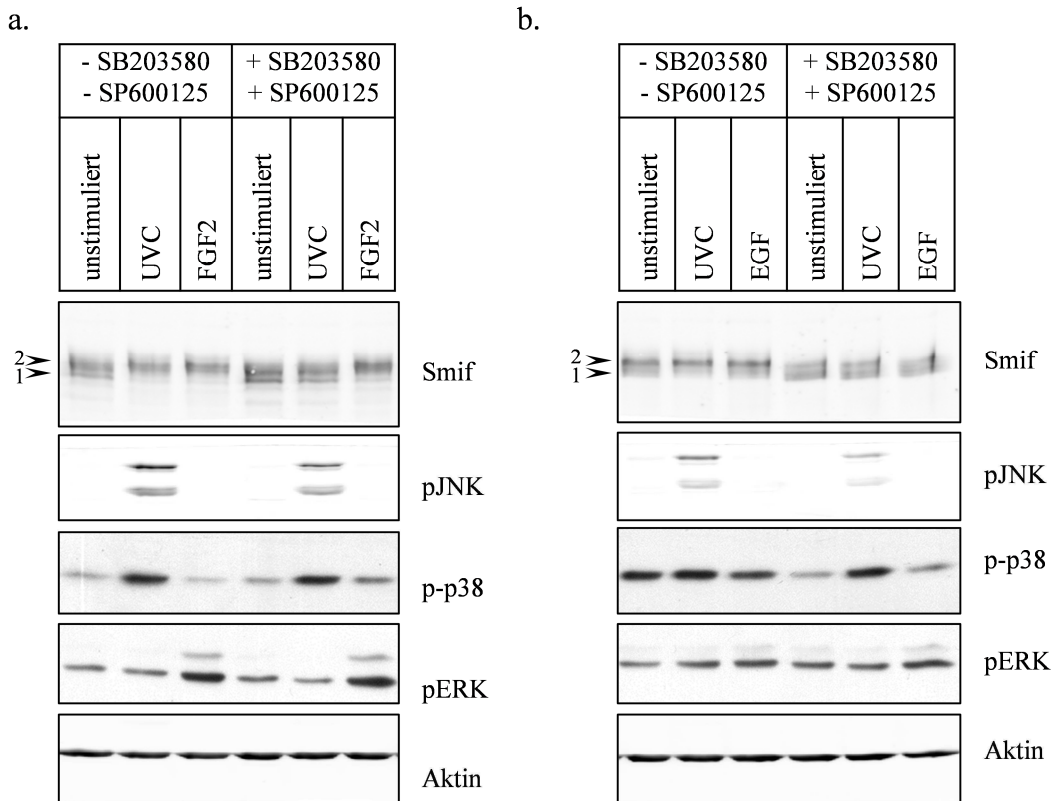


Abbildung 3.14 *p38/JNK* vermittelte Phosphorylierung von Smif nach Stimulation mit UV: NIH3T3-Zellen (a) bzw. HeLa Zellen (b) wurden mit 200 J/m^2 UVC stimuliert und 60 min später geerntet oder mit 5 ng/ml FGF2 für 60 min bzw. 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Durch Behandlung der Zellen mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ SB203580 und $10 \text{ }\mu\text{M}$ SP600125 30 min vor der Stimulation wurden die Kinasen p38 und JNK inhibiert.

3.7 Phosphorylierung von Smif während der Mitose

Proliferierende eukaryontische Zellen durchlaufen verschiedene Zellzyklus-Phasen, welche in G1-S-G2-M unterteilt werden. Während Zellen in G1 einen diploiden Chromosomensatz aus $2n$ Chromatiden aufweisen, wird jedes Chromatid während der Replikation (S-Phase) verdoppelt, so dass nach Abschluss der S-Phase und mit Beginn der G2-Phase zwei Schwester-Chromatiden ($4n$) vorliegen. Diese werden in der Mitose (M-Phase) gleichmäßig auf zwei Tochterzellen verteilt, dessen Abschluss den Beginn der G1-Phase und damit eines neuen Zyklus darstellt. Mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) lässt sich die DNA in Zellen anfärben und mittels FACS analysieren. Die Fluoreszenz-Intensität korreliert dabei direkt mit der Menge an DNA in der Zelle. G2/M-Zellen haben einen etwa doppelt so hohen DNA-Gehalt im Vergleich zu G1-Zellen. Der Wert liegt etwa um das 1,8-fache des G1-Signales aufgrund der azyklischen, ständig stattfindenden Replikation mitochondrialer DNA. S-Phase Zellen weisen eine diffuse Fluoreszenzintensität zwischen G1 und G2/M auf.

Wie in Abbildung 3.15 & Abbildung 3.16 dargestellt ist, traten in unsynchronisierten Zellen (U2OS bzw. Mef27-Smif) unter Sub-Konfluenz Zellen in unterschiedlichsten Zellzyklusphasen auf, was sich in der PI-Färbung zeigte. Entsprechend der im Zellzyklus zeitlich am längsten stattfindenden G1-Phase befindet sich die Mehrzahl aller Zellen im unsynchronisierten Zustand in dieser Phase. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität in der PI-Färbung liegt für Zellen in der G1-Phase bei etwa 200. Der Anteil an Zellen in G2/M mit einer mittleren Fluoreszenz-Intensität um 380, ist deutlich geringer, was sich in der niedrigeren Signalhöhe widerspiegelt. Dazwischen erstreckt sich ein Plateau, welches Zellen in unterschiedlichen Phasen der Replikation repräsentiert.

Analysiert man parallel dazu die Expression von Smif im *Western Blot* in den Fibroblastenzellen (Abbildung 3.15 & Abbildung 3.16), so ließen sich beide Phosphorylierungszustände von Smif nachweisen. Bei der Osteosarkom-Zelllinie U2OS (Abbildung 3.15a) lag der überwiegende Teil im Zustand der Dephosphorylierung an S315,S319,T321 vor.

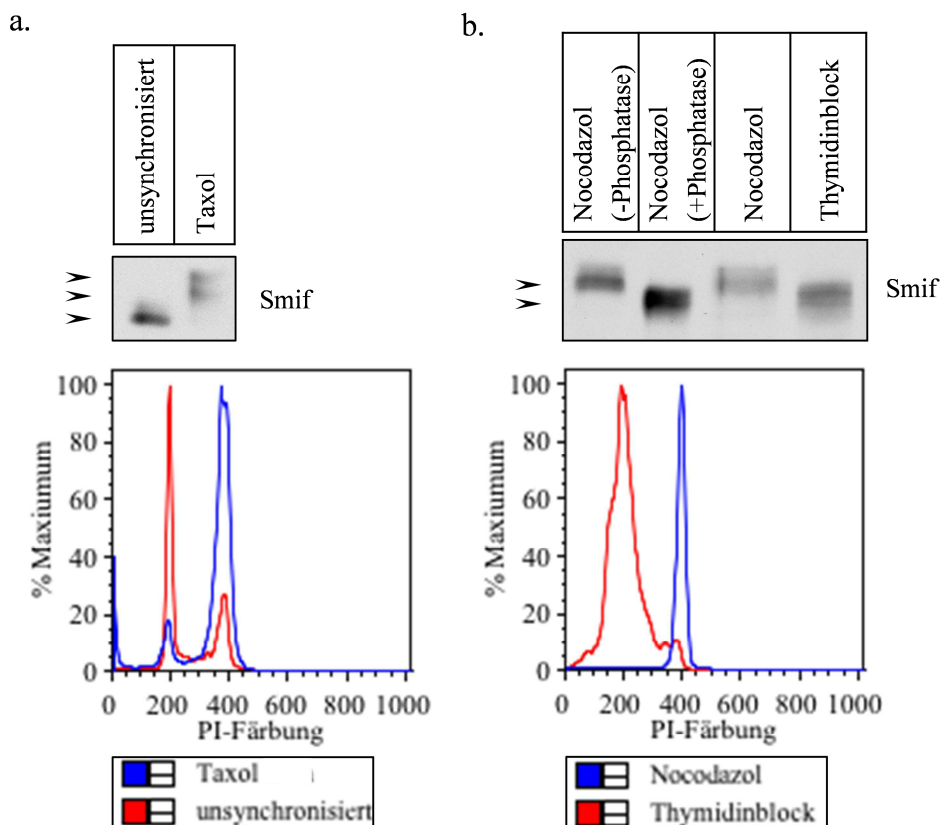


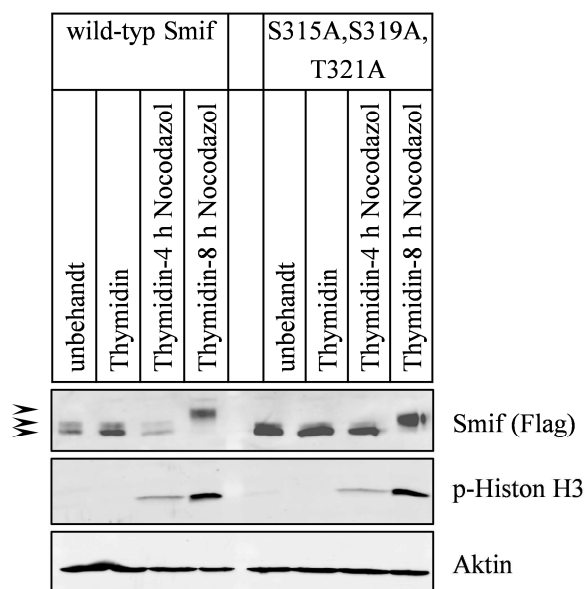
Abbildung 3.15 Zellzyklus abhängige Phosphorylierung von Smif: a. Mittels Taxol in Mitose arretierte U2OS Zellen wurden lysiert. Die Phosphorylierung von Smif wurde im Western Blot analysiert. Synchronisation der Zellen in der Mitose wurde mittels PI-Färbung kontrolliert. b. Mitotische NIH3T3 Zellen wurden durch Behandlung mit Nocodazol isoliert. Das Nocodazol wurde anschließend herausgewaschen, so dass die Zellen aus der Mitose für 4 h im Zellzyklus weiter laufen konnten. Gleichzeitig wurden durch Zugabe von Thymidin der Zellzyklus in G1/S blockiert. Mitotische und G1/S arretierte Zellen wurden vergleichend im Western Blot und PI-Färbung analysiert. Zelllysate wurden, wenn angegeben, vorher *in vitro* mit alkalischer Phosphatase behandelt

Zellen können *in vitro* durch Zugabe bestimmter Substanzen im Zellzyklus angehalten und dadurch synchronisiert werden. So führt die Zugabe von freiem Thymidin zu einer Blockierung in der Replikation und einem Zellzyklusarrest in der S-Phase. Inhibitoren der Polymerisierung des Mikrotubulin Spindel-Apparates wie Nocodazol als auch der De-Polymerisierung von Mikrotubulin wie Taxol führen dagegen zu einem Arrest von Zellen in der Mitose.

Zellen, die zusammen mit Thymidin kultiviert werden und in der S-Phase akkumulieren, zeigten im *Western Blot* keine Veränderungen der Signale für Smif. FACS Analysen mittels PI-Färbung bestätigten eine Block in der S-Phase. Nahezu alle Zellen befanden sich am Übergang von der G1 zur S-Phase bzw. in der S-Phase. Das Signal für Zellen in der G2 Phase war nahezu vollständig verschwunden.

Interessanterweise trat im *Western Blot* mit Antikörpern gegen Smif eine deutliche Verschiebung der Signale hin zu höheren Molekulargewicht auf, wenn die Zellen entweder mit Nocodazol oder mit Taxol in G2/M synchronisiert wurden (Abbildung 3.15a+b). Die Verschiebung ging dabei über das Maß, was bei Stimulationsexperimenten mit EGF/FGF oder UV beobachtet wurde, hinaus. Wie in Abbildung 3.15b dargestellt ist, kehrte sich bei einer Aufhebung des mitotischen Blocks durch Entfernung des Nocodazols aus dem Medium dieser Prozess um. Entsprechend den Ergebnissen der PI-Färbung vollendeten die Zellen nach Entfernung des Nocodazols den Zellzyklus und gingen zurück in die G1-Phase. Phosphatase-Experimente von Zelllysaten, die mit Nocodazol synchronisiert wurden, führten zu einem Laufverhalten von Smif in der SDS-PAGE, was vergleichbar mit Zellen, welche in G1/S arretiert wurden, war und deutet auf eine Nocodazol-vermittelte Phosphorylierung (Abbildung 3.15b).

a.



b.

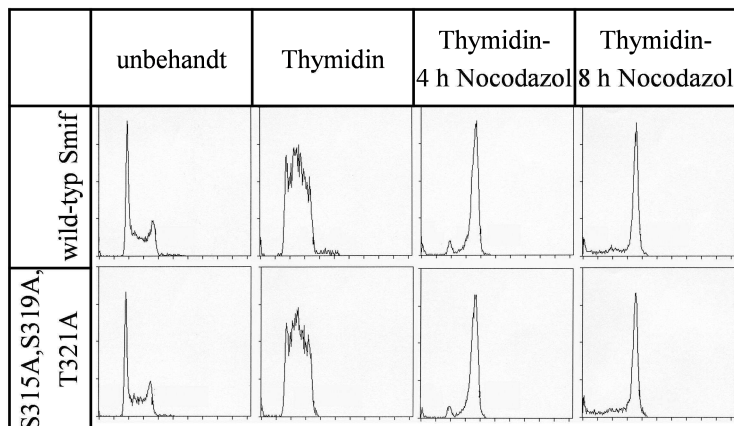


Abbildung 3.16 **Mitotische Phosphorylierung von Smif an Serin 315, 319 und Threonin 321 sowie weiteren Aminosäuren:** Mef-Zelllinien, welche wild-typ Smif bzw. Phosphorylierungs-defizientes Smif überexprimieren, wurden durch Zugabe von Thymidin für 16 h in G1/S synchronisiert. Das Medium wurde gegen Thymidin-freies Medium mit Nocodazol ersetzt, so dass die Zellen aus der G1/S Phase in die Mitose laufen konnten. 4 h bzw. 8 h nach Zugabe entfernen des Thymidins wurden die Zellen geerntet und im Western Blot (a) und FACS (b) analysiert.

Smif *wild-typ* und Smif-S315A,S319A,T321A zeigten beide eine durch Nocodazol induzierte Verschiebung im *Western Blot*, was auf eine Phosphorylierung deutet (Abbildung 3.16). Die Migration im *Western Blot* von *wild-typ* Smif war aber im Vergleich zu Smif-S315A,S319A,T321A zu höheren Molekulargewicht gerichtet. Parallel durchgeführte PI-Färbungen und FACS Untersuchungen zeigten eine vollständige Synchronisierung in G2/M. Signale im Sub-G1 Bereich, die auf Apoptose hindeuten, waren kaum nachweisbar und deuten auf geringe toxische Effekte durch die Inhibitoren.

Zur weiteren Charakterisierung der Phosphorylierung von Smif wurden G2/M synchronisierte Zellen einmal mit dem MEK-MAPKK Inhibitor UO126 und zum anderen mit einem *Cyclin-Dependent Kinases* (CDKs) Inhibitor Purvalanol A behandelt (Abbildung 3.17). Nocodazol-behandelte Zellen zeigten im Vergleich zu unsynchronisierten Zellen eine verminderte Aktivität von ERK (pERK), welche durch Behandlung mit UO126 noch weiter inhibiert wurde und im *Western Blot* nicht mehr nachweisbar war. Behandlung mit dem MEK-MAPK Inhibitor UO126 hatte aber keinen Einfluss auf die Nocodazol-vermittelte Phosphorylierung von Smif, wie im *Western Blot* zu sehen ist. Im Gegensatz dazu trat bei Behandlung mit dem CDK Inhibitor Purvalanol A eine Reduktion in der Nocodazol-induzierten Verschiebung im *Western Blot* auf, welche aber im Vergleich zu Zelllysaten unsynchronisierter Zellen immer noch eine langsamere Migration in der SDS-PAGE aufwies. Die Verschiebung hin zu höheren Molekulargewicht bei der Purvalanol A behandelten Probe war der einer EGF/FGF/UV-induzierten Verschiebung in der SDS-PAGE vergleichbar. Histon H3 wird durch den CDK1-Cyclin B Komplex während der Mitose phosphoryliert. Dementsprechend war in Nocodazol behandelten Zellen eine Phosphorylierung von Histon H3 nachweisbar. Behandlung mit dem CDK-Inhibitor Purvalanol A nicht aber mit UO126 blockierte die Phosphorylierung von Histon H3, so dass

diese nicht mehr nachweisbar war, was auf eine Inhibition des CDK1-Cyclin B Kinasekomplexes zurückzuführen ist.

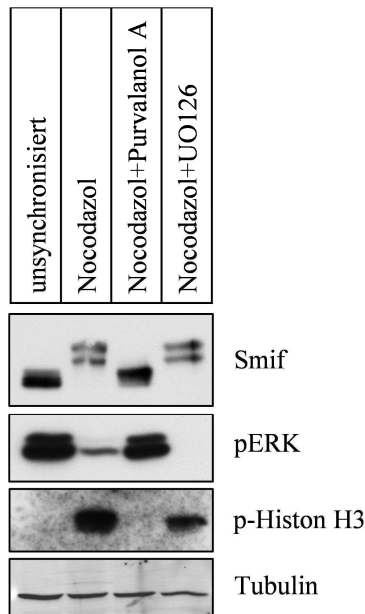


Abbildung 3.17 **CDK1-Cyclin B** vermittelte Phosphorylierung von Smif: U2OS Zellen wurden durch Nocodazol in Mitose arretiert. Mitotische Zellen wurden in Gegenwart von Nocodazol mit dem CDK-Inhibitor Purvalanol A (10 μ M) oder dem MEK-Inhibitor UO126 (10 μ M) für 2 Stunden weiter inkubiert und anschließend lysiert und im Western Blot analysiert.

Um eine direkte Phosphorylierung von Smif über CDK1 nachzuweisen, wurde zusätzlich ein *in vitro* Kinase-Assay durchgeführt (Abbildung 3.18). Dabei zeigte sich ein schwaches Signal im Autoradiogramm, welches mit dem Signal für GST-Smif in der Coomassie-Färbung kongruent ist. Auch hier waren in der Coomassie-Färbung neben GST-Smif Degradationsprodukte nachweisbar, welche ebenfalls Signale im Autoradiogramm erzeugten. Dies deutet auf eine CDK1-Cyclin B1 vermittelte Phosphorylierung von GST-Smif hin. Untersuchungen mit Punktmutationen einzelner phosphorylierbarer Aminosäuren zeigten einschließlich einer S315A,S319A,T321A Mutation aber keinen Unterschied zu *wild-typ* Smif im Autoradiogramm. Eine Identifizierung distinkter CDK1-Cyclin B1 vermittelter Phosphorylierungsstellen in Smif war daher im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine Phosphorylierung von Smif während der Mitose. Punktmutationen an den Aminosäuren S315,S319,T321 zeigten dabei eine Phosphorylierung an diesen Positionen. Inhibitoren gegen CDK1 deuten auf eine Funktion dieser in der Mitose aktiven Kinase bei der Phosphorylierung von Smif. Parallel durchgeführte *in vitro* Kinase Assays mit CDK1-Cyclin B1 zeigten eine Phosphorylierung von Smif an, welche aber an einer bisher nicht identifizierten Position abseits von S315,S319,T321 stattfindet.

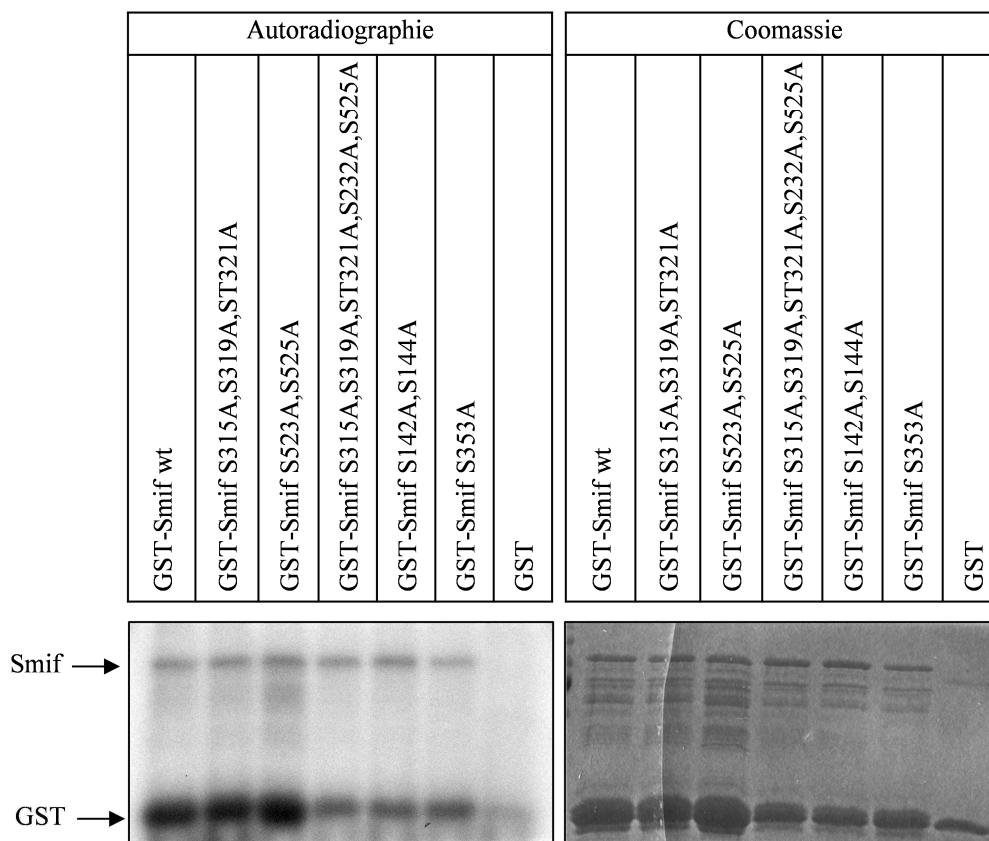


Abbildung 3.18 **CDK1-Cyclin B1** vermittelte Phosphorylierung von Smif: Aufgereinigtes, rekombinantes Smif wurde mit CDK1-Cyclin B1 Komplex in Gegenwart von γ - 32 P-ATP inkubiert. Der *in vitro* Kinase Ansatz wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Phosphoryliertes Smif wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen. Korrespondierendes Signal für GST-Smif in der Autoradiographie wurde entsprechend der Coomassie-Färbung bestimmt und ist markiert.

3.8 Die Phosphorylierung von Smif reguliert dessen Aktivität als Transkriptions-Cofaktor

3.8.1 Einfluss von Punktmutationen an Serin 315, Serin 319 und Threonin 321 auf die TGF β -vermittelte Transkriptionsregulation

TGF β -Liganden beeinflussen die Expression hunderter Gene. TGF β -Zielgene wurden zum einen mit Hilfe von Hochdurchsatzmethoden wie Expressions-Arrays, Sequenzierungen etc. als auch spezifisch mittels Methoden wie *Northern Blots* oder quantitativer *Realtime PCR* untersucht. Eine indirekte Methode stellt die Analyse der Promotoraktivität bekannter TGF β -Zielgene über Reporter dar. Einer dieser TGF β -regulierten Reporter-Konstrukte SBE₄-luc besteht aus vier hintereinander geschalteten Smad-Bindungs-elementen, welche zusammen mit der TATA-Box den Promotor bilden, woran sich das Luciferase-Reporter Gen anschließt. Daten in der Literatur zeigen, dass dieser Reporter durch unterschiedlichste TGF β -Liganden (TGF β , BMP, Activin) Smad4-abhängig induziert wird⁴¹.

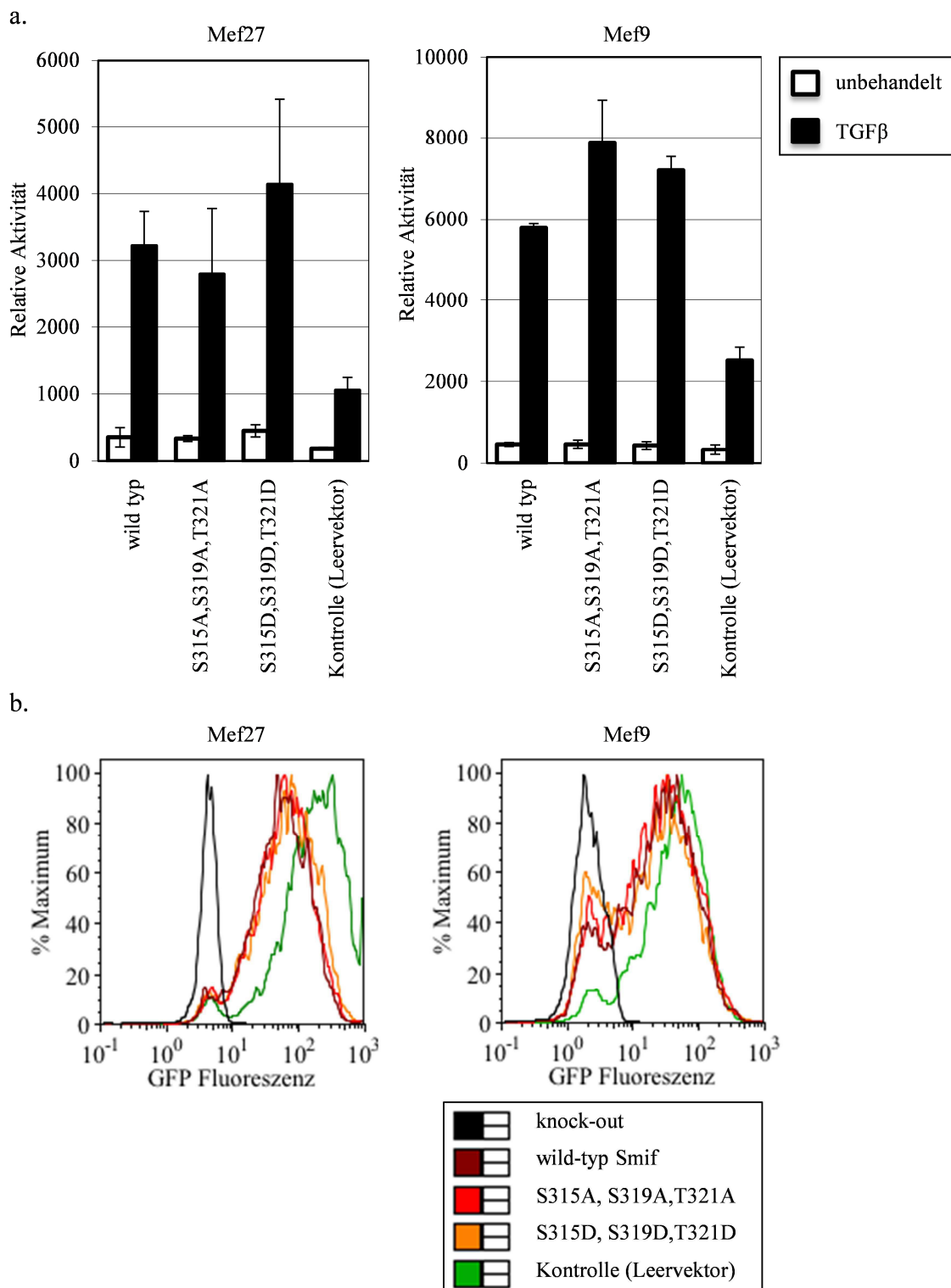


Abbildung 3.19 **Inaktivierung der EGF Phosphorylierungsstelle S315,S319,T321 beeinflusst die Aktivität von Smif als TGFβ Cofaktor nicht:** a. Smif defiziente Mef-Zelllinien Mef9 und Mef27 wurden mit wild-typ Smif, Phosphorylierungs-defizienten bzw. -mimikry Mutanten rekonstituiert. Zellen wurden mit dem SBE₃-luc Reporter transfiziert, nach 24 h für 12 h gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ für 18 h stimuliert. Die firefly Luciferase-Aktivität wurde relativ zur renilla Luciferase-Aktivität bestimmt. b. FACS Analyse der GFP Expression in den Mef-Zelllinien

Unter Verwendung des SBE₄-luc Reporters sollte zunächst geklärt werden, inwiefern Mutationen von Phosphorylierungsstellen in Smif sich auf deren Aktivität als Transkriptions-Cofaktor Aktivität im TGFβ-Signalweg auswirken (Abbildung 3.19a). Dazu wurden die zwei murinen embryonalen Fibroblasten-Linien Mef9/27, in welchen der Smif Genlocus inaktiviert wurde („*knock-out*“), mit verschiedenen Smif-Konstrukten stabil rekonstituiert. Zusätzlich wurde über eine IRES Sequenz die Expression von eGFP an die von Smif gekoppelt. Eine Smif abhängige Aktivierung des SBE₄-luc Reporters wurde schon beschrieben¹³⁰ und konnte hier bestätigt werden. Expression von *wild-typ* Smif führte zu einer TGFβ-vermittelten Expression der Luciferase. Im Vergleich dazu zeigten Zellen mit Kontroll-Vektor zwar eine TGFβ-vermittelte Aktivierung des Reporters. Diese fiel aber im Vergleich zu Zellen mit *wild-typ* Smif deutlich geringer aus.

Expression von Smif-Konstrukten, bei denen die Phosphorylierungsstellen S315,S319,T321 inaktiviert wurden oder Phospho-Mimikry eingeführt wurden, führten zu einer signifikanten Aktivierung des SBE₄-luc Reporters nach Stimulation mit TGFβ. Im Vergleich zu Zellen, die *wild-typ* Smif exprimierten, zeigten Punktmutationen an S315,S319,T321 keine Unterschiede hinsichtlich der Transkriptionsaktivität des Reporters nach Aktivierung mit TGFβ. Die Effizienz der viralen Infektion mit den Smif-Konstrukten wurde über deren gekoppelten eGFP (enhanced Green Fluorescence Protein) Expression bestimmt. Wie FACS Analysen, dargestellt in Abbildung 3.19b, zeigten, traten hinsichtlich des prozentualen Anteiles eGFP positiver Zellen (80 und 90 %) als auch der Intensität des Fluoreszenz-Signales keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Smif-Konstrukten auf. Einzig in Zellen, welche mit Kontroll-Vektor transduziert wurden, war eine höhere Intensität der eGFP Fluoreszenz zu erkennen. Die Expression von Smif selbst auf Proteinebene wurde in diesen Experimenten nicht parallel bestimmt. Wie aber in Abschnitt 3.3 gezeigt ist, traten in rekonstituierten Mef-Zelllinien keine Unterschiede in der Expression dieser Smif-Konstrukte im *Western Blot* auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mutationen in Smif an S315,S319,T321 keinen Einfluss auf die Transkriptionsdomäne und die Funktion bei der TGFβ-vermittelten Transkriptionsregulation nehmen.

3.8.2 Negative Regulierung der TGFβ-vermittelten Aktivierung des SBE₄-luc Reporters durch FGF2

Aufgrund gegensätzlicher Beobachtungen in der Literatur hinsichtlich des Einflusses von MAP-Kinase Signalwegen auf die TGFβ-vermittelte Signaltransduktion wurde zunächst der Einfluss von FGF2 auf die TGFβ-vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters in NIH3T3 Zellen untersucht. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der TGFβ-vermittelten Expression des Luciferase-Reporters. Wie in Abbildung 3.20 dargestellt ist, trat ab einer Konzentration von 1 ng/ml FGF2 eine deutliche Reduktion in der TGFβ-induzierten Luciferase-Aktivität auf. Bei einer Konzentration zwischen 3 bis 6 ng/ml FGF2 im Kulturmedium war der inhibitorische Effekt maximal. FGF2 allein zeigte, wie später dargestellt (Abschnitt 3.8.4), keine Aktivierung des SBE₄-luc Reporters.

Herunterregulierung der Expression von Smif mittels siRNA in NIH3T3 Zellen zeigte eine verminderte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters durch TGFβ und bestätigt die Ergebnisse in Smif defizienten Mef-Zelllinien (Abschnitt 3.8.1). Gleichzeitige Zugabe von TGFβ mit FGF2 ins Kulturmedium führte ebenfalls zu einer Reduktion der Aktivität des SBE₄-luc Promotors und einer reduzierten Expression von Luciferase im Vergleich zur TGFβ Stimulation ohne FGF2. Gleiche Bedingungen hinsichtlich der TGFβ-FGF2-Kostimulation führten immer zu einer reduzierteren Luciferase-Aktivität in NIH3T3 Zellen mit Smif siRNA in Vergleich zu Zellen mit Kontroll-siRNA und deuten auf einen Funktion von Smif bei der FGF2-vermittelten negativen Regulation gegenüber TGFβ.

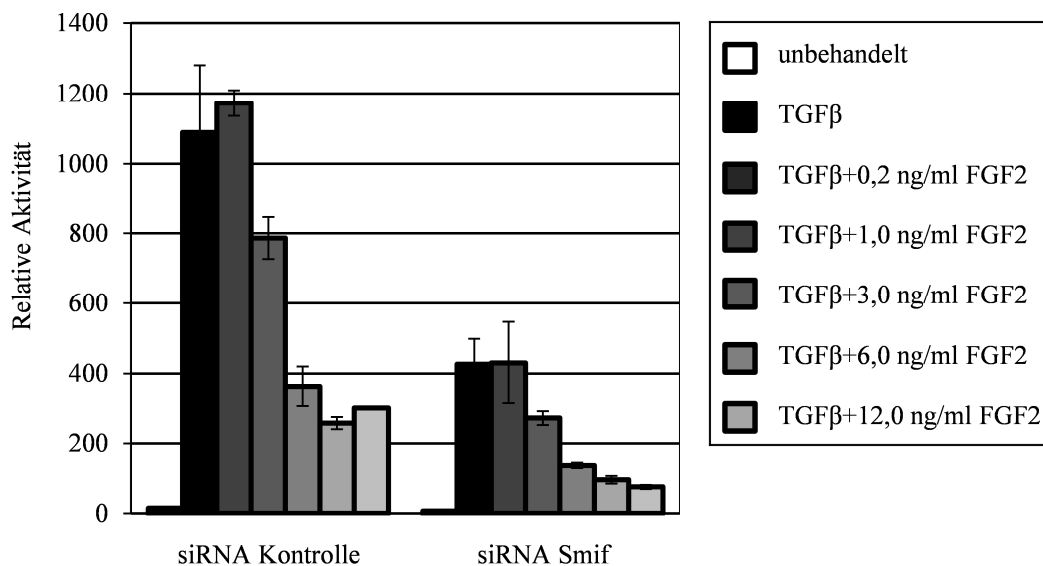


Abbildung 3.20 Negative Regulation der TGFβ-vermittelten Aktivierung des SBE₄-luc Reporters durch FGF2: NIH3T3 Zellen wurden mit dem SBE₄-luc Reporter sowie siRNA gegen Smif transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 12 h gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ und steigenden Konzentrationen an FGF2 für 18 h stimuliert. Die firefly Luciferase-Aktivität wurde relativ zur renilla Luciferase-Aktivität bestimmt.

3.8.3 Desensibilisierung gegenüber inhibitorischen Effekten von FGF2 durch Inaktivierung von Smif Phosphorylierungsstellen

Um Einblicke in die Funktion der Phosphorylierung von Smif für den TGFβ-FGF2 „cross-talk“ zu erlangen, wurden Smif *knock-out* Mef-Zelllinien mit Smif-Konstrukten, bei denen verschiedene Phosphorylierungsstellen inaktiviert wurden, rekonstituiert und der Einfluss von FGF2 auf die TGFβ-vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters gemessen (Abbildung 3.20). Übereinstimmend mit Experimenten in NIH3T3 Zellen (siehe 3.8.2) wirkte sich FGF2 negativ auf die TGFβ-vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters in Mef-Zellen, welche mit *wild-type* Smif rekonstituiert wurden, aus. Die Luciferase-Aktivität TGFβ und FGF2 kostimulierter Zellen betrug etwa 60 % in Vergleich zur Stimulation mit TGFβ ohne FGF2.

Die TGFβ-vermittelte Aktivierung in Smif *knock-out* Zellen war auch hier deutlich vermindert und unterstützt die Ergebnisse in NIH3T3 Zellen im Abschnitt zuvor als auch initiale Experimente in verschiedenen Mef-Zelllinien (Abschnitt 3.8.1). FGF2 inhibierte auch in Smif

knock-out Mef-Zellen partiell die TGF β -vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters, wenngleich dieser Effekt mit etwa 20 % Reduktion vermindert auftrat. Die Luciferase-Aktivität in Smif *knock-out* Mef-Zellen nach Stimulation mit TGF β allein oder in Kombination mit FGF2 war dabei immer signifikant reduzierter im Vergleich zu Mef-Zellen, welche mit Smif *wild-typ* rekonstituiert waren.

Expression von Smif-Konstrukten in Mef-Zelllinien, bei denen die S315,S319,T321 Phosphorylierungsstellen inaktiviert wurden, zeigten wie auch zuvor schon dargestellt (Abschnitt 3.8.1) eine TGF β -vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters. Wenngleich die Luciferase-Aktivität vergleichend mit *wild-typ* Smif exprimierenden Mef Zellen leicht reduziert war, so trat auch hier eine deutlich stärkere Aktivität gegenüber *knock-out* Zellen auf. In Anbetracht der FGF2 vermittelten Phosphorylierungen von Smif an S315,S319,T321 wäre eine Abschwächung des negativen Effektes von FGF2 auf die TGF β -vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters zu vermuten. Interessanterweise trat dieser Fall nicht ein. Mef-Zellen mit Smif S315A,S319A,T321A zeigten eine Verminderung der Luciferase Reporter Aktivität, wenn diese mit TGF β und FGF2 kostimuliert wurden. Quantitativ trat dabei eine Reduktion um etwa 40 % auf, welche der mit *wild-typ* Smif exprimierenden Mef-Zelllinie vergleichbar war. Ein mögliche Erklärung hierfür könnten weitere FGF2 vermittelte Phosphorylierungen von Smif sein, welche für die Inhibition der TGF β Aktivität mitverantwortlich sind. In diesem Zusammenhang wurde daher zusätzlich eine weitere Phosphorylierungsstelle S523,S525 untersucht, welche durch eine hohe Phosphorylierungshäufigkeit gekennzeichnet ist (siehe Abschnitt 3.1) und auch hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz um S523 auf eine MAP-Kinase vermittelte Phosphorylierung hindeutet. Kombinierte Inaktivierung der Phosphorylierungsstellen um S315,S319,T321 und S523,S525 zeigten keinen Einfluss auf die TGF β -vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters, wie vergleichbare Luciferase-Aktivitäten nach TGF β Stimulation mit *wild-typ* Smif zeigten. Demgegenüber steht aber eine deutlich verminderte Sensitivität gegenüber dem inhibitorischen Effekt von FGF2 auf die TGF β -vermittelte Aktivierung des Reporters. Sowohl die absolute Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit TGF β und FGF2 fiel signifikant höher aus, als auch die relative Aktivität war mit 80 % in Zellen mit Phosphorylierungs-defizientem Smif höher als die von *wild-typ* Smif.

Western Blot Analysen der für die Luciferase Messung herangezogenen Zelllysate zeigten eine vergleichbare Expressionen aller Konstrukte (Abbildung 3.21b). Im Einklang dazu waren GFP Intensitäten als auch Effizienz der Transduktion ähnlich, wie FACS Analysen bestätigten (Abbildung 3.21c).

Zusammenfassend deuten diese Daten auf einen negativen Regulationsmechanismus der Smif Cofaktor Aktivität über dessen Phosphorylierung. Untersuchungen weiterer Phosphorylierungsstellen neben S315,S319,T321 deuten auf regulative Mechanismen über diese Phosphorylierung hinaus.

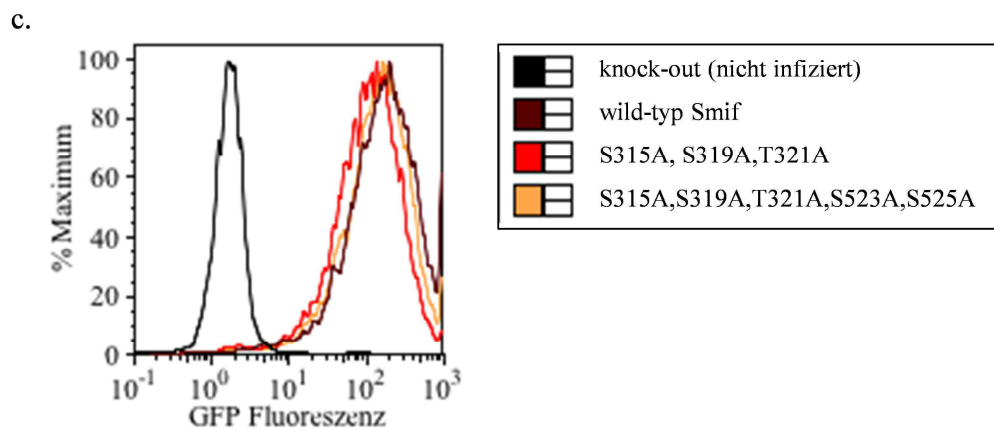
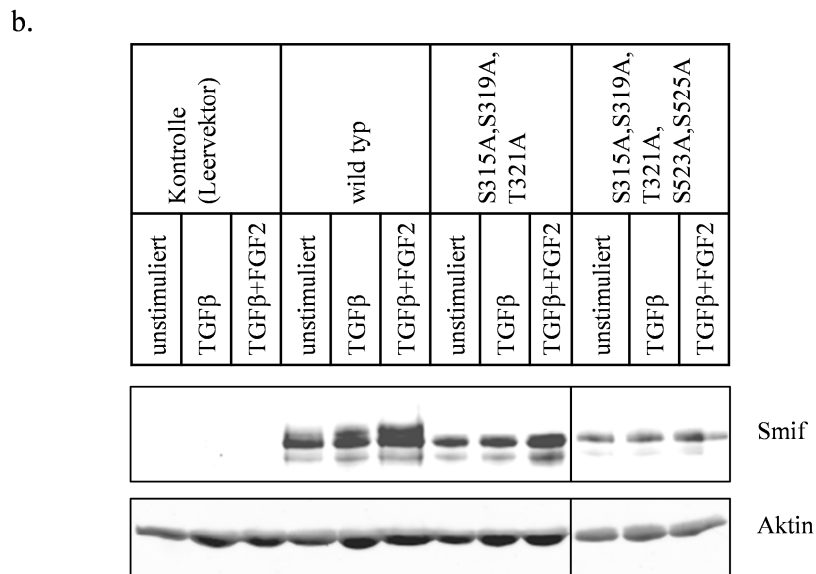
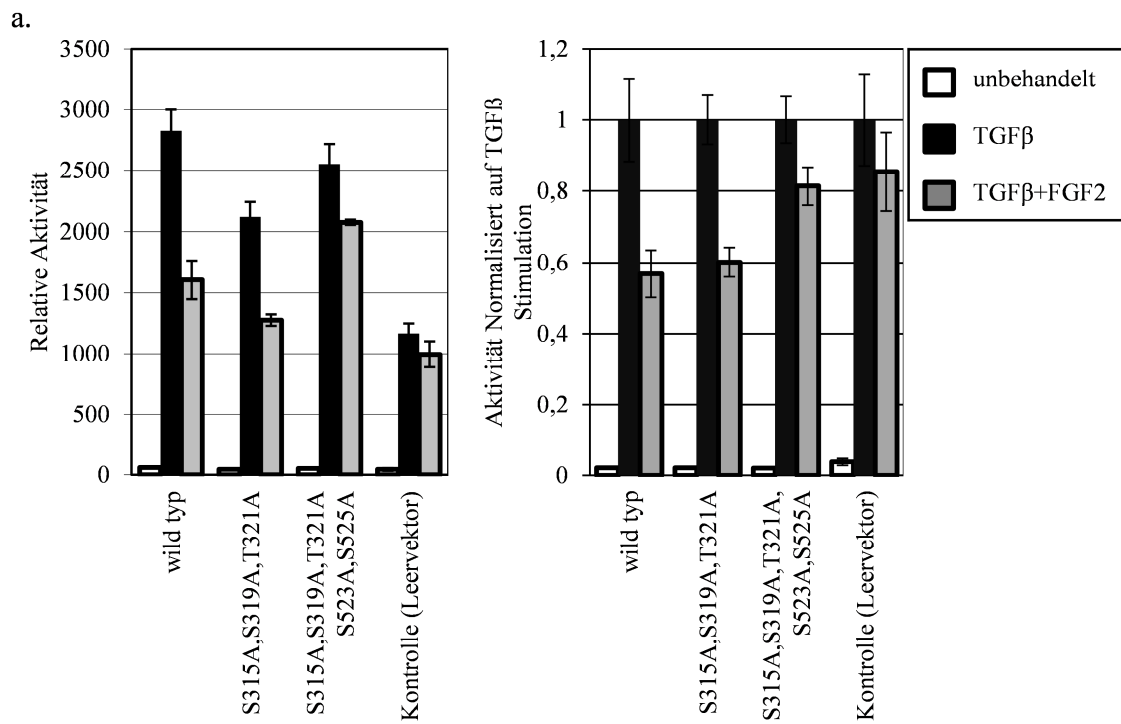


Abbildung 3.21 Blockierung der Phosphorylierung vom Smif hebt die inhibitorischen Effekte von FGF2 auf die TGF β -vermittelten Aktivierung des SBE₄-luc Reporters partiell auf: a. Mef Zelllinien wurden mit wild-typ Smif und verschiedenen Phosphorylierungs-defizienten Smif-Konstrukten rekonstituiert. Die Zellen wurden mit dem SBE₄-luc Reporter transfiziert, nach 24 h für 12 h gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGF β in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 5 ng/ml FGF2 für 18 h stimuliert. Die firefly Luciferase-Aktivität wurde relativ zur renilla Luciferase-Aktivität bestimmt (links) sowie auf die relative Aktivität des Reporters nach Stimulation mit TGF β allein normalisiert (rechts). b. Zellysate aus den Reporter-Assay wurden anschließend im Western Blot auf die Expression von Smif hin analysiert. c. FACS Analyse der GFP Expression in den Mef Zelllinien.

3.8.4 Antagonistische und kooperative Effekte von TGF β mit FGF2 oder EGF in Abhängigkeit von Promotorsequenzen

Mit der zunehmenden Identifizierung verschiedenster TGF β -Zielgene und den damit verbundenen Promotoranalysen stieg die Zahl an publizierten TGF β -Reporterkonstrukten. Ein Reporter von besonderem Interesse ist dabei ein TGF β -regulierter Reporter namens 3TP-lux, welcher gleichfalls eine Smad-abhängige Aktivierung in Gegenwart proliferativer Stimuli wie EGF oder HGF aufweist¹⁵⁴. Der 3TP-lux Reporter ist durch drei hintereinander geschalteten „12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-response elements“ (-42 bis -73 aus dem humanen Collagenase Promotor) und einer *downstream* folgenden etwa 100 bp umfassenden Sequenz aus dem humanen PAI-1 Promotor (-636 bis -740) gekennzeichnet¹⁸⁵.

Entsprechend den Angaben in der Literatur zeigte der 3TP-lux als auch der SBE₄-luc Reporter eine TGF β -abhängige Aktivität in der murinen Fibroblasten Zelllinie NIH3T3 (Abbildung 3.22a). Aufgrund einer schwachen Expression des EGF-Rezeptors und damit verbundenen geringen Induktion der EGF Signalkaskade in NIH3T3 als auch in Mef Zellen wurde der EGF-Rezeptor in diesen für folgende Experimente stabil überexprimiert. Kostimulation von TGF β mit EGF zeigten eine stärkere Aktivierung des 3TP-lux Reporters über das Maß einer Stimulation mit TGF β allein hinaus. FGF2 beeinflusste die TGF β -vermittelte Aktivierung des 3TP-lux Reporters nicht, was sich in einer vergleichbaren Luciferase-Aktivität zwischen TGF β allein sowie FGF2 und TGF β kostimulierten Zellen widerspiegelt. Im Einklang mit der Literatur¹⁵⁴ induzierte eine Stimulation mit EGF eine 2- bis 3-fache erhöhte Expression der Luciferase des 3TP-lux Reporters in Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Im Gegensatz dazu wurde der SBE₄-luc Reporter, wie im Abschnitt zuvor schon für FGF2 gezeigt, bei Kostimulation mit EGF in seiner TGF β -vermittelten Aktivierung inhibiert. Eine EGF-vermittelte Induktion der Luciferase-Aktivität des SBE₄-luc Reporters wurde nicht beobachtet. Stimulation mit FGF2 führte sowohl in Experimenten mit dem SBE₄-luc als auch dem 3TP-lux Reporter zu keiner Induktion der Luciferaseexpression.

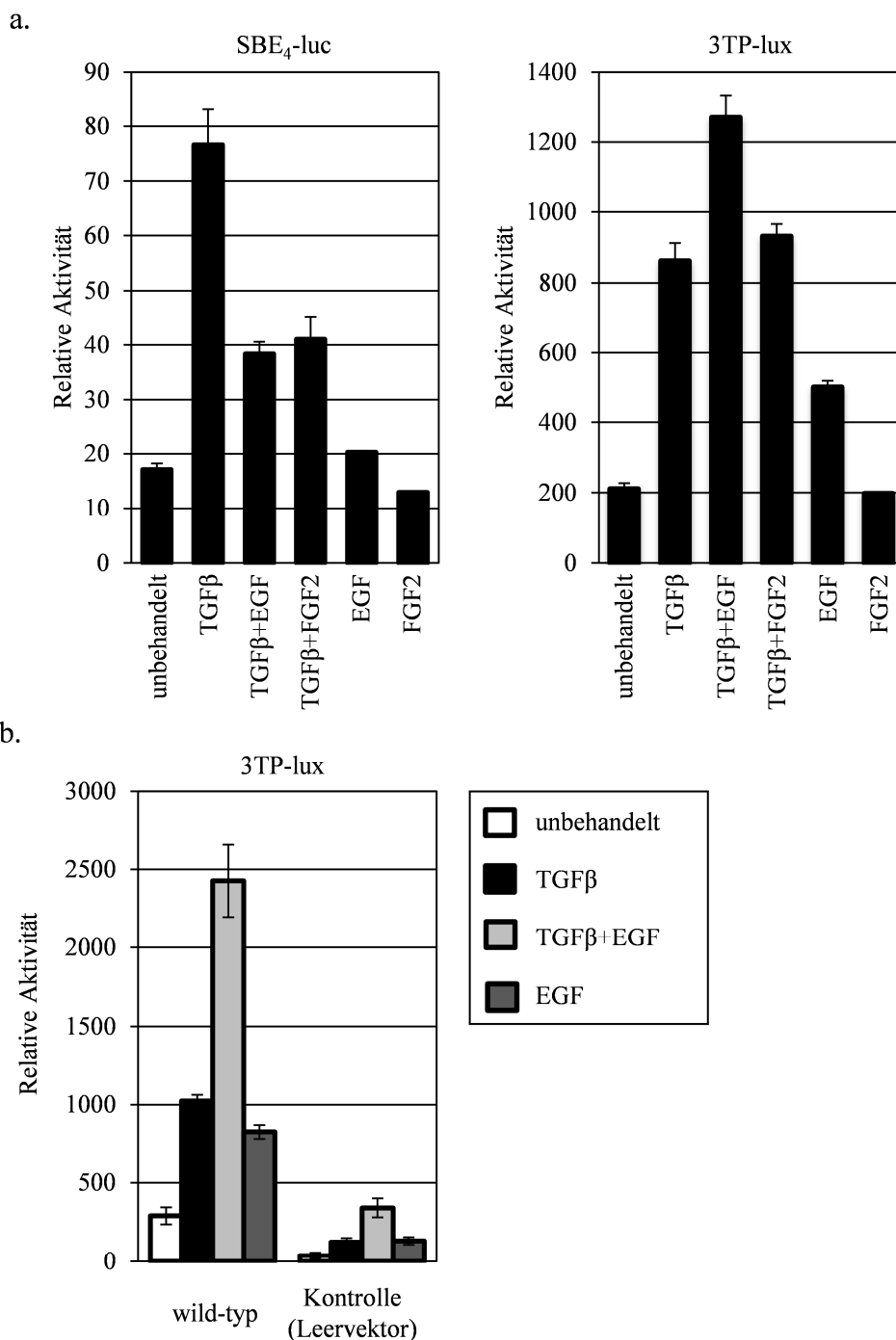


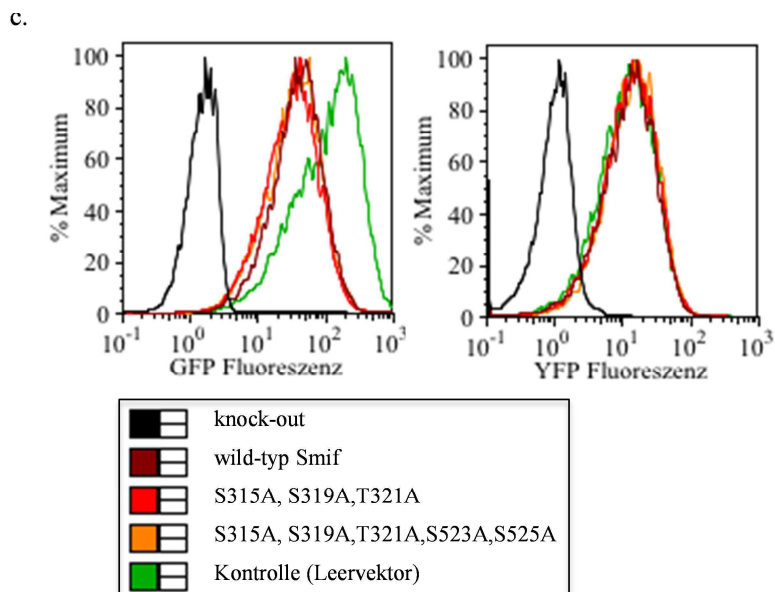
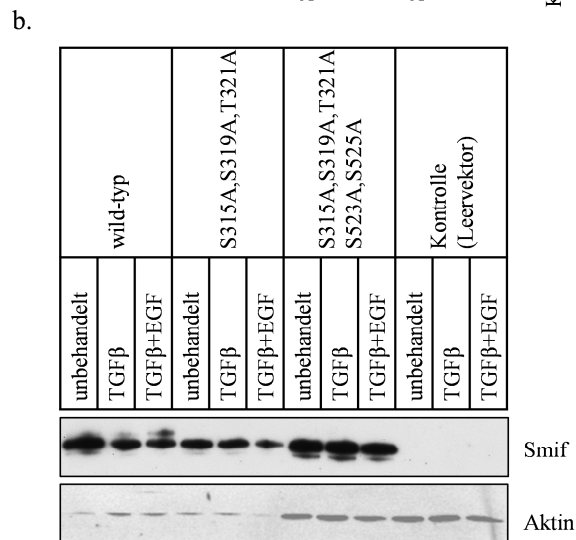
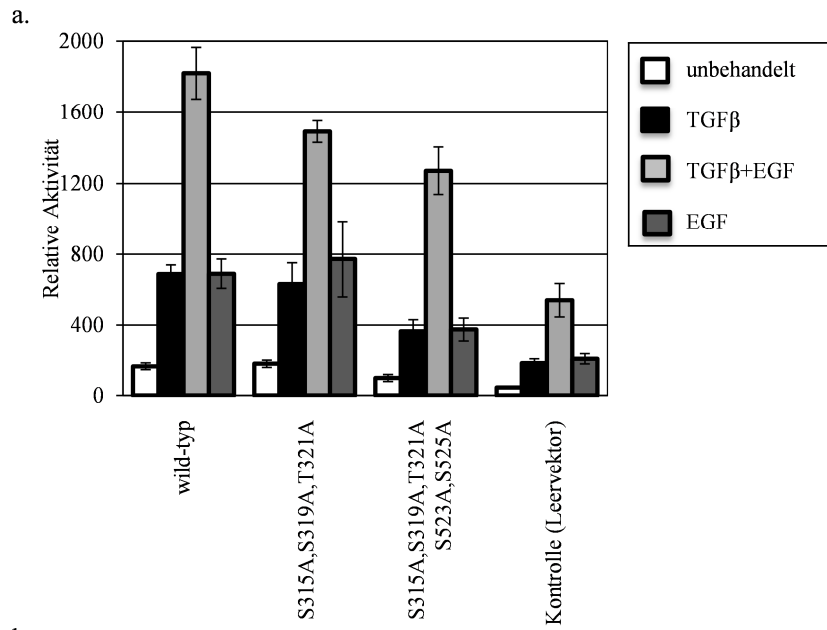
Abbildung 3.22 **TGFβ-Promotor-abhängige antagonistische bis synergistische Effekte von pro-mitogenen Faktoren:** a. NIH3T3 Zellen, welche EGFR überexprimieren, wurden mit den TGFβ-Reportern SBE₄-luc (links) und 3TP-lux (rechts) transfiziert, nach 24 h für 12 h gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ in Gegenwart von pro-mitogenen Faktoren EGF (150 ng/ml) oder FGF2 (5 ng/ml) stimuliert. Die firefly Luciferase-Aktivität wurde relativ zur renilla Luciferase-Aktivität bestimmt. b. Smif defiziente Mef Zellen, welche mit Expressionsvektoren für wild-typ Smif und EGFR retroviral transduziert wurden, wurden mit den 3TP-lux Reporter transfiziert, 24 h nach Transfektion für 12 h gehungert und mit 4 ng/ml TGFβ oder 150 ng/ml EGF allein oder in Kombination für 18 h stimuliert.

Der Einfluss der Expression von Smif auf die kooperativen Effekte von TGF β mit EGF als auch bei der EGF-vermittelten Aktivierung des 3TP-lux Reporters zeigte sich deutlich bei dem Vergleich von Smif *knock-out* und Smif rekonstituierten Mef-Zellen (Abbildung 3.22b). Wie schon bereits in unserem Labor beobachtet¹³⁰, zeigte sich in den oben beschriebenen Experimenten ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit der TGF β -vermittelten Expression des Reportergenes von der Expression von Smif. Die Expression der Luciferase war um den Faktor 5- bis 10-fach reduziert, wenn Smif nicht exprimiert wurde. Kostimulation von TGF β mit EGF zeigte ebenfalls eine deutlich verminderte Luciferase-Aktivität in Smif *knock-out* Mef-Zellen. Auch war die EGF-vermittelte Aktivierung des 3TP-lux Reporters in Abwesenheit von Smif stark reduziert.

Insgesamt deuten diese Daten auf eine Rolle von Smif bei der TGF β -EGF-vermittelten, kooperativen Transkriptionsregulation hin. Inwiefern eine EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif hierbei von Bedeutung ist, wurde nachfolgend mithilfe Phosphorylierungs-defizienter Konstrukte untersucht.

3.8.5 Blockierung der Smif Phosphorylierung unterdrückt die TGF β -EGF induzierte Transkriptionsaktivierung

Experimente mit dem 3TP-lux Reporterkonstrukt (Abbildung 3.22) zeigten eine starke Abhängigkeit der EGF und TGF β -vermittelten Koaktivierung des 3TP-lux Reporters von der Expression von *wild-typ* Smif. Wie in Abbildung 3.23a dargestellt, zeigte die Inaktivierung der EGF-regulierten Phosphorylierungsstelle S315,S319,T321 keinen Einfluss auf die TGF β -induzierte Expression des Luciferase-Reportergenes. Im Vergleich zu *wild-typ* Smif trat aber eine deutliche Reduktion in der Luciferase-Aktivität bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF β und EGF auf, was auf eine Rolle dieser Phosphorylierung bei der transkriptionellen Aktivierung deutet. Die EGF bedingte Aktivierung des 3TP-lux Reporters war aber nicht durch die Mutationen an S315,S319,T321 beeinflusst worden. Inaktivierungen der Phosphorylierungsstellen an S315,S319,T321 zusammen mit S523,S525 führten zu einer verringerten Aktivierung des 3TP-lux Reporters in Gegenwart von EGF alleine oder in Kombination mit TGF β . Die Luciferase-Aktivität lag dabei unter der von Mef Zellen, welche *wild-typ* oder Smif S315A,S319A,T321A exprimierten war aber immer noch deutlich über der von Smif *knock-out* Mef Zellen, die mit dem Kontrollvektor infiziert wurden. Auffällig war zudem eine verminderte Aktivierung des 3TP-lux Reporters durch TGF β alleine, wenn Phosphorylierungs-defizientes Smif S315A,S319A,S321A & S523A,S525A exprimiert wurde. Diese Beobachtung konnte nicht durch unterschiedliche Expressionslevel zwischen *wild-typ* und Phosphorylierungs-defizienten Konstrukten erklärt werden, wie *Western Blot* Analysen zeigten. Indirekte Messungen der IRES gekoppelten eGFP Expression für Smif bzw. YFP Expression für EGFR zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Mutanten (Abbildung 3.23b+c). Darüber hinaus wurde parallel die Transkriptionsaktivität des SBE₄-luc Reporters nach Stimulation mit TGF β in den gleichen Zellen getestet. Hier traten keine Unterschiede in der Aktivierung des Reporters auf (Abbildung 3.23d+e).



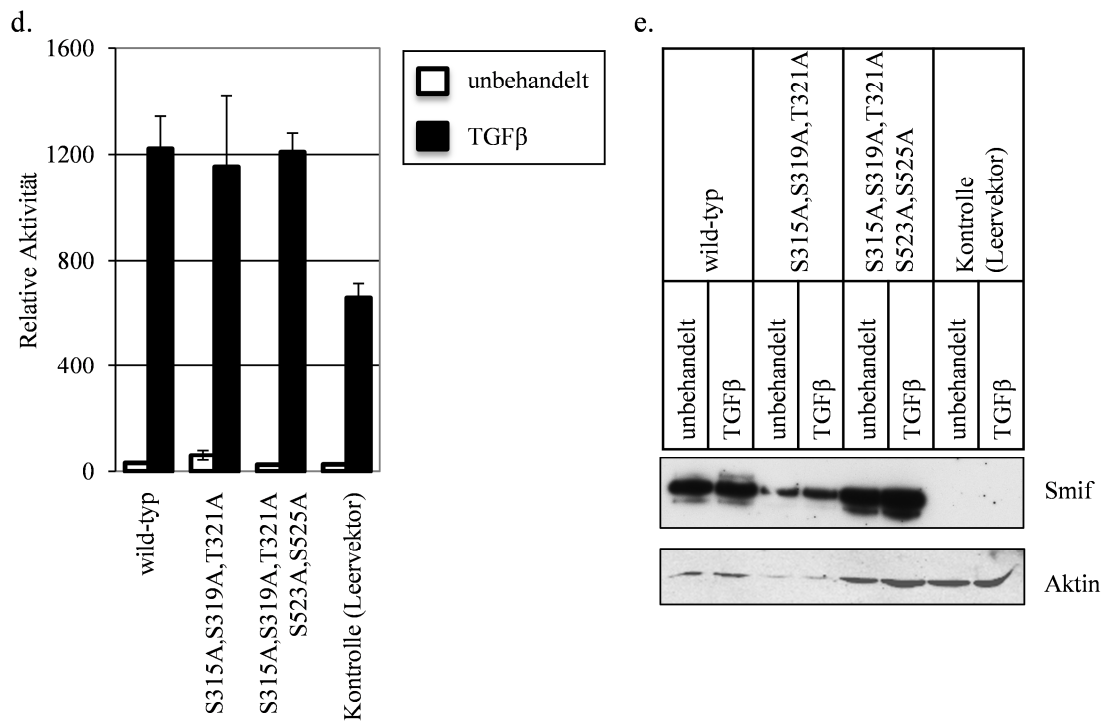


Abbildung 3.23 Die Phosphorylierung von Smif unterstützt die synergistischen Effekte von EGF und TGFβ bei der Aktivierung des 3TP-lux Reporters: a. Die Mef9 Zelllinie wurde mit wild-typ Smif und verschiedenen Phosphorylierungs-defizienten Smif-Konstrukten rekonstituiert. Zusätzlich wurde der humane EGF-Rezeptor (EGFR) durch retrovirale Transduktion in die Zellen eingebracht. Die Zellen wurden mit dem 3TP-lux Reporter transfiziert, nach 24 h für 12 h gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ oder 150 ng/ml EGF allein oder in Kombination für 18 h stimuliert. Die firefly Luciferase-Aktivität wurde relativ zur renilla Luciferase-Aktivität bestimmt. b. Zellysate aus den 3TP-lux Reporter-Assay wurden anschließend im Western Blot auf die Expression von Smif hin analysiert. c. FACS Analyse der GFP Expression des Smif Expressionsvektors und der YFP Expression des EGFR Expressionsvektors in den Mef Zelllinien. d. Die generierten Mef Zelllinien wurden parallel auf die TGFβ-vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters entsprechend den Bedingungen in a. getestet. e. Zellysate aus den SBE₄-luc Reporter-Assay wurden anschließend im Western Blot auf die Expression von Smif hin analysiert.

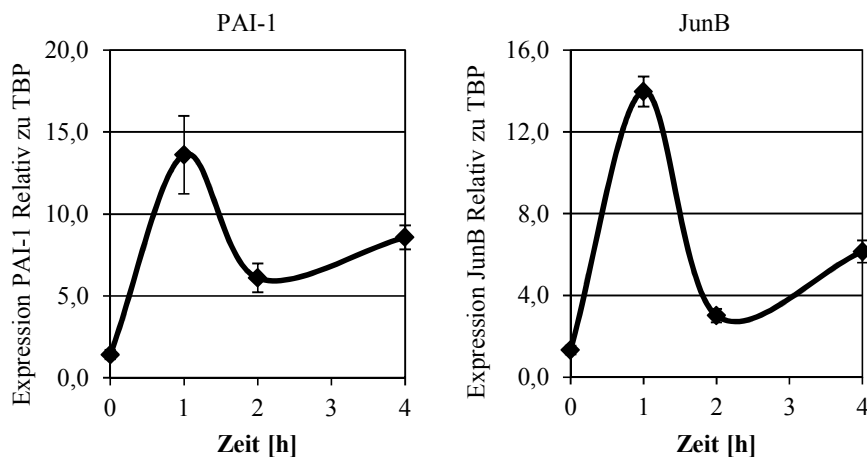
3.8.6 Einfluss von Smif bei der TGFβ-FGF2 induzierten Expression spezifischer TGFβ-Zielgene

Während Reporter-Assays zur Charakterisierung spezifischer Elemente eines Promotors hilfreich sind, reflektieren mRNA-Expressionsstudien die Summe aller regulativen Elemente was sowohl Transkription als auch mRNA Stabilität und Abbau betrifft. Wie in der Einleitung ausführlicher dargelegt wurde, kann die Aktivierung der TGFβ-Signalkaskade zur schnellen Aktivierung einzelner Gene führen aber auch aufgrund TGFβ-induzierter sekundärer Effekte mittel- und langfristig die Genexpression regulieren.

JunB und PAI-1 sind zwei Gene, deren Expression in vielen Zelltypen unmittelbar nach Aktivierung der TGFβ-Signalkaskade induziert wird^{49,99,186}. Mit diesen Daten übereinstimmende Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit erzielt werden (Abbildung 3.24a). Stimulation mit TGFβ führte innerhalb von 60 min zu einer mehr als 5-fachen Induktion der Expression von

PAI-1 und JunB. Nach 2 Stunden sank die Expression wieder auf ein Niveau, welches nur noch leicht über der basalen Expression lag.

a.



b.

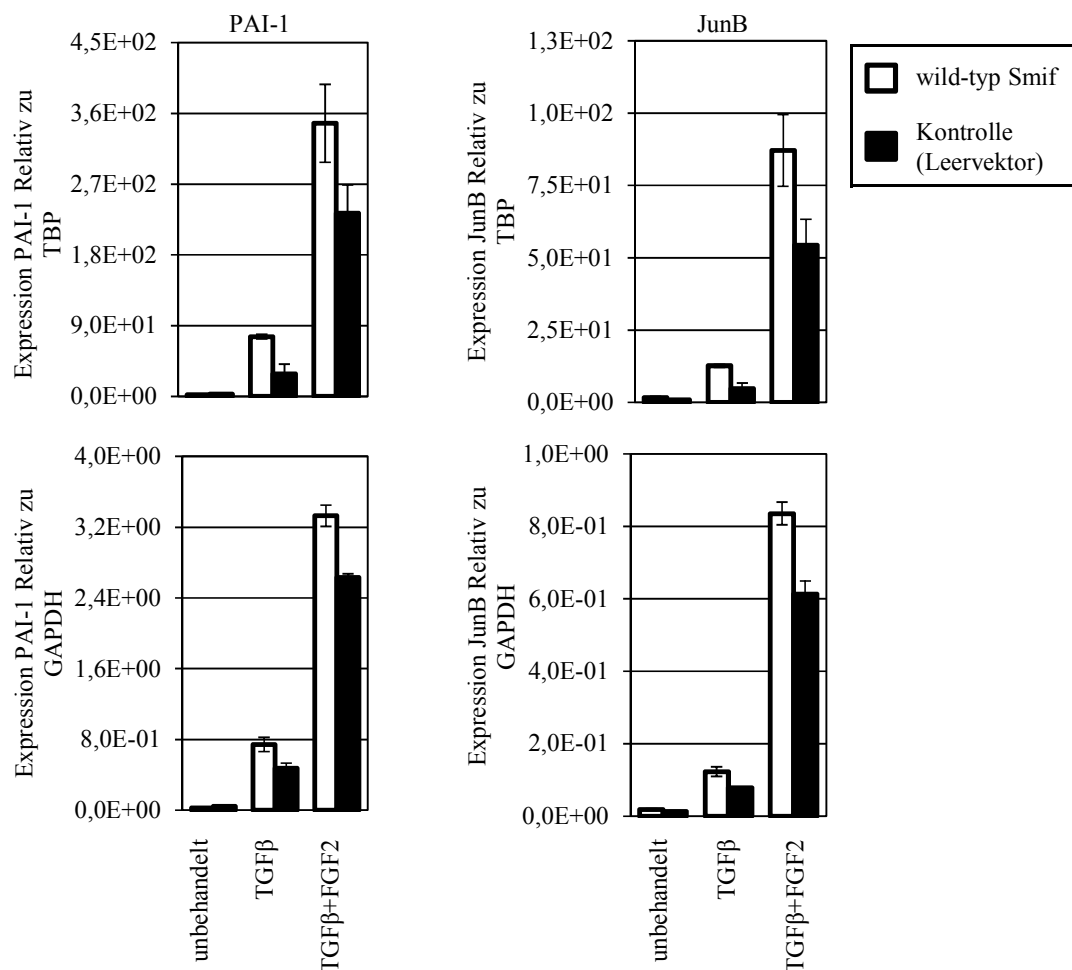


Abbildung 3.24 **TGFβ-vermittelte Aktivierung der frühen Zielgene PAI-1 und JunB:** a. Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von PAI-1 (links) und JunB (rechts) in NIH3T3 Zellen. NIH3T3 Zellen wurden dazu für 2 Tage in Medium mit 0,1 % FCS gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und in cDNA

umgeschrieben. Die Expression von *PAI-1* und *JunB* wurde mittels Realtime PCR relativ zur Expression von *TBP* bestimmt. b. Die Smif defiziente *Mef9* Zelllinie wurde mit wild-typ Smif rekonstituiert. Die Zellen wurden in Medium mit 0,1 % FCS für 3 Tage gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGF β mit oder ohne 5 ng/ml FGF2 für 1 h stimuliert. Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben und mittels Realtime PCR für Primer gegen *PAI-1*, *JunB*, *TBP* und *GAPDH* quantifiziert. Die Expression von *PAI-1* (oben) sowie *JunB* (unten) wurde sowohl auf *TBP* (links) als auch *GAPDH* (rechts) normalisiert.

Beide Gene sind durch eine Smif-abhängige TGF β -Aktivierung gekennzeichnet, wie Vergleiche zwischen *Mef*-Zelllinien von Smif *knock-out* und Smif positiven Zellen zeigten (Abbildung 3.24b). Sowohl die Expression von *PAI-1* als auch *JunB* war nach Stimulation mit TGF β in Smif *knock-out* *Mef*-Zellen signifikant reduziert. Kostimulation von TGF β und FGF2 steigerte die Expression beider Gene deutlich über das Maß der Aktivierung mit TGF β alleine. Gleichfalls konnte hier eine Smif abhängige Induktion der Expression gezeigt werden, was sich in dem signifikant verminderten Expressionslevel von *JunB* und *PAI-1* in Smif *knock-out* Zellen darstellte.

Um artifizielle Effekte aufgrund möglicher qualitativer Unterschiede der mRNA zu verringern, wurden mit dem *TATA-box binding protein* (*TBP*) und der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) zwei konstitutiv exprimierte Gene (*housekeeping genes*) als Referenz verwendet. Berechnungen der relativen Expression zeigten für beide Referenzgene gleiche Tendenzen, was die Unterschiede zwischen Smif *knock-out* und rekonstituierten *Mef*-Zellen betraf.

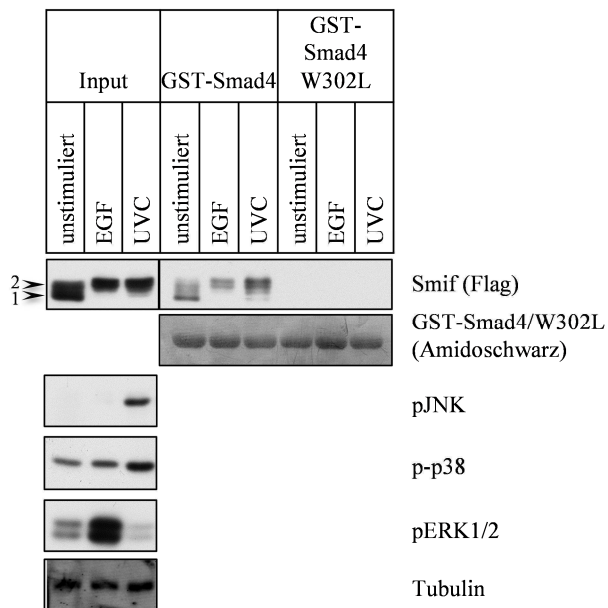
Vergleichbar den Experimenten mit Reporter-Konstrukten zeigte sich hier eine Abhängigkeit von Smif bei kooperativen Funktionen von proliferativen Stimuli auf die Regulation von TGF β -Zielgenen. Inwiefern spezifisch Phosphorylierungsereignisse dabei eine Rolle spielen, wurde nicht untersucht und könnte Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

3.9 Einfluss der Phosphorylierung von Smif auf Interaktionen mit TGF β Komponenten und Smad Promotorelementen

3.9.1 Phosphorylierungs-unabhängige Interaktion von Smif mit Smad4

Reporter-Assay Experimente zeigten eine Regulation der Funktion von Smif, wenn dieses phosphoryliert wird. Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.5) für Smad-Proteine gezeigt wurde, liegen die Ursachen solcher Phosphorylierungs-bedingten transkriptionellen Beeinflussungen in der veränderten Stabilität, Lokalisation, DNA-Bindung oder Assoziation mit Cofaktoren. Um molekular verstehen zu können, wie die Phosphorylierung von Smif dessen Funktion reguliert, wurden daher mittels biochemischen Verfahren solche Charakteristika untersucht. In der Literatur sind Smif-Smad4 Interaktionen experimentell durch *GST-Pulldown* als auch Koimmunpräzipitation beschrieben worden¹²⁹.

a.



b.

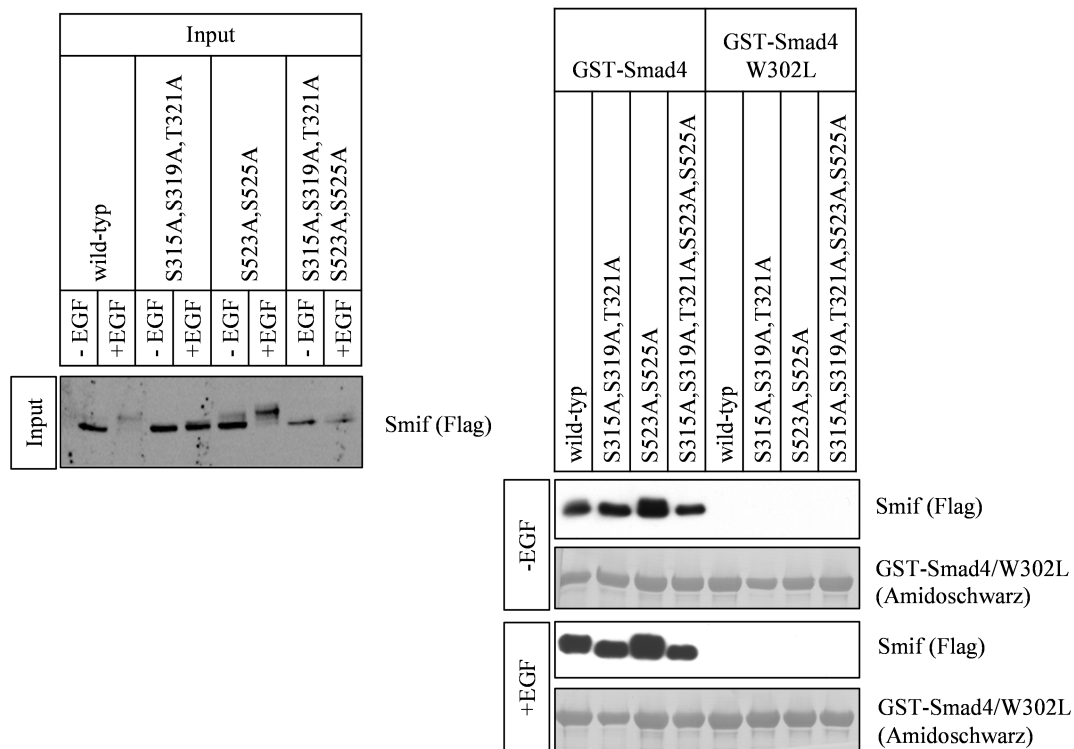


Abbildung 3.25 Die **Smif-Smad4 Interaktion ist unabhängig von der EGF oder UV vermittelten Phosphorylierung von Smif**: a. Phoenix-E Zellen wurden transient mit wild-typ Smif transfiziert und nach 24 h für 12 h in Medium ohne FCS gehungert. Die Zellen wurden anschließend entweder für 20 min mit 150 ng/ml EGF stimuliert oder mit 200 J/m² UVC bestrahlt und nach 60 min geerntet. Zelllysate wurden für einen GST-Pulldown mit GST-Smad4 oder GST-Smad4 W302L verwendet. Lysate und Präzipitate wurden im Western Blot analysiert. b. Phoenix-E Zellen wurden mit verschiedenen Smif-Konstrukten transfiziert, nach 24 h für 12 h gehungert und anschließend für 20 min mit 150 ng/ml EGF stimuliert. Zelllysate wurden für einen GST-Pulldown mit GST-Smad4 oder GST-Smad4 W302L verwendet. Lysate und Präzipitate wurden im Western Blot analysiert.

GST-Pulldown Experimente mit GST-Smad4 zeigten eine Kopräzipitation von Smif, welches in unbehandelten Phoenix-E Zellen exprimiert wurde (Abbildung 3.25). Im Einklang mit der Literatur, führte die GST-Smad4 W302L Punktmutation zu einer Blockierung der Interaktion und diente als Negativkontrolle, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Anhand der Migration in der SDS-PAGE zeigte sich, dass der überwiegende Anteil von Smif am S315,S319,T321 nicht phosphoryliert vorliegt. Eine präferenzielle Bindung von nicht phosphoryliertem Smif an GST-Smad4 konnte nicht beobachtet werden, da auch partiell auftretendes phosphoryliertes Smif, was anhand der Migration hin zu höherem Molekulargewicht nachweisbar war, kopräzipitiert wurde. Gleichfalls konnte Smif aus Lysaten von Zellen, in denen die Phosphorylierung von Smif mit EGF oder UV-Behandlung induziert wurde, mit GST-Smad4 nicht aber mit der Punktmutante GST-Smad4 W302L präzipitieren (Abbildung 3.25a). Umgekehrt führten Inaktivierung der Phosphorylierung an S315,S319,T321 oder S523,S525 allein oder kombiniert zu keiner Veränderung in der Bindung an GST-Smad4 (Abbildung 3.25b).

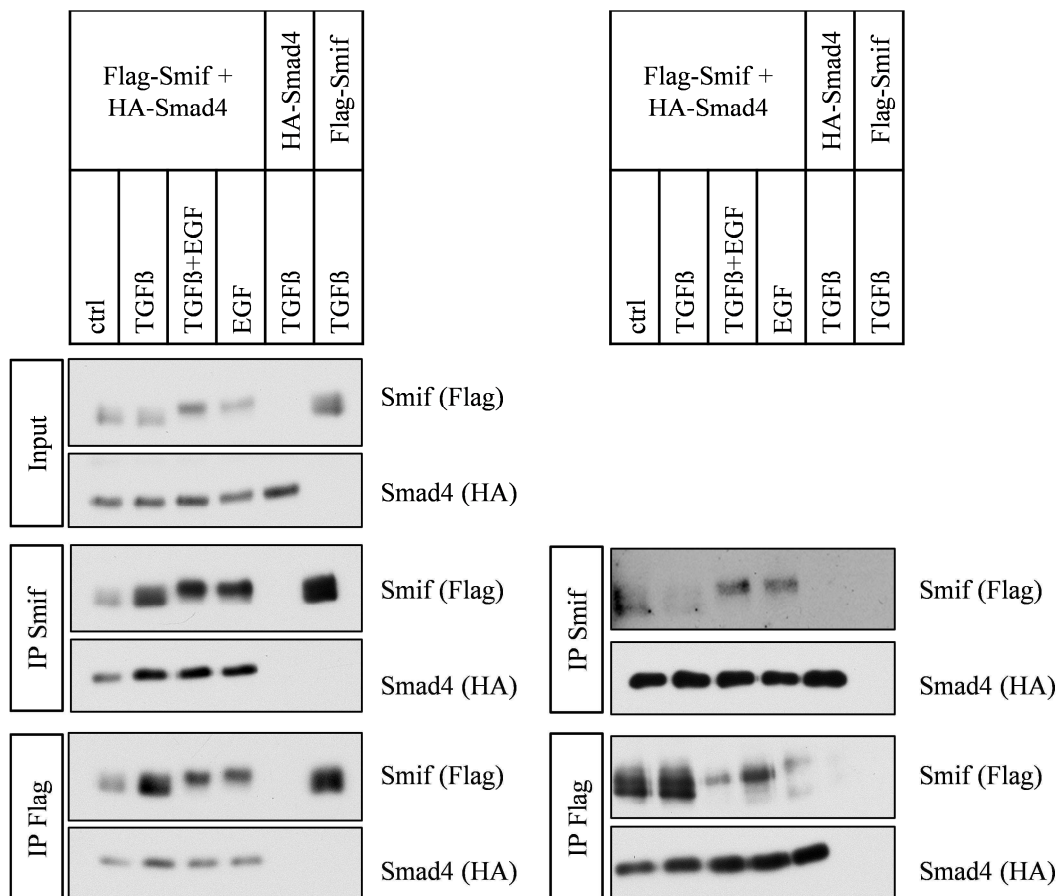


Abbildung 3.26 EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif beeinflusst die Smif-Smad4-Komplexbildung nicht: Phoenix-E Zellen, welche transient mit Flag-Smif und HA-Smad4 transfiziert wurden, wurden nach 12 h hungern im Medium mit 4 ng/ml TGF β oder 150 ng/ml EGF allein oder in Kombination für 60 min stimuliert. Proteinkomplexe wurden mittels Formalin quervernetzt. Lysate wurden durch chemische Behandlung mit Detergenzien sowie physikalisch durch Ultraschall präpariert und anschließend für Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern verwendet. Präzipitate sowie die Lysate wurden mittels Western Blot analysiert.

Koimmunpräzipitationen, bei denen Flag-Smif und HA-Smad4 in Phoenix-E Zellen exprimiert und immunpräzipitiert wurden, bestätigen die Ergebnisse der GST-*Pulldown* Experimente (Abbildung 3.26). Dabei zeigte sich, dass Smad4 indirekt über seine Assoziation mit Smif in Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Smif oder dessen Flag-*tag* kopräzipitiert wurde. Dies trat unabhängig von der Stimulation der Phoenix-E Zellen mit TGF β oder EGF und damit vom Phosphorylierungsstatus von Smif auf. In Kontroll-Immunpräzipitationen, in denen HA-Smad4 ohne Flag-Smif exprimiert wurde, konnte Smad4 nicht im Präzipitat nachgewiesen werden, was eine unspezifische Bindung von Smad4 an Flag- oder Smif-Antikörper gekoppelte Sepharose ausschließt. Umgekehrt zeigten Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Smad4 bzw. den HA-*tag* neben der Präzipitation von Smad4 kopräzipitiertes Smif. Die schwachen Signale im *Western Blot* deuten auf eine wenig effiziente Präzipitation hin. Auch hier trat die Interaktion von Smif mit Smad4 unabhängig von der Stimulation bzw. dem Phosphorylierungszustand von Smif auf.

Zusammenfassend deuten diese Interaktionsstudien auf eine Smif-Smad4 Interaktion, welche unter Bedingungen, in denen Smif phosphoryliert wird, stabil bleibt. Beobachtete funktionelle Effekte (siehe Abschnitt 3.8ff.) lassen sich daher nicht über Veränderungen dieser Wechselwirkungen erklären und scheinen andere molekulare Ursachen zu haben.

3.9.2 Indirekte Bindung von Smif über Smad4 an TGF β Promotoren

DNA-Protein-Assoziationen können u.a. *in vitro* durch Auftrennung von DNA-Protein-Komplexen in nativen Gelen mittels Elektromobility Shift Assays (EMSA) untersucht werden. Da bisher noch keine genauere mechanistische Charakterisierung über eine Smif vermittelte Genregulation erfolgte, wurde auf den Ergebnissen der Reporter-Assay aufbauend eine experimentelle Strategie zur Untersuchung des Einflusses von Smif auf Promotoren von TGF β -Zielgenen entwickelt. Wie im Abschnitt 3.8.1 gezeigt wurde, handelt es sich bei dem Smad-Bindungselement des SBE₄-luc Reporters nicht nur um ein durch Smad-reguliertes Promotorelement. Es wies gleichfalls eine Smif Abhängigkeit auf. Ausgehend von dessen repetitiven CAGACA Smad-DNA-Bindungselement wurde eine Fluoreszenz-markierte Sonde für EMSA Experimente generiert (Abbildung 3.27a) und auf dessen Smad bzw. Smif Assoziation hin untersucht.

In Einklang mit der Literatur⁴¹ zeigte sich im EMSA ein DNA-Protein-Komplex von bakteriell aufgereinigtem GST-Smad4 mit der Sonde (Abbildung 3.27b). GST-Protein bildete keinen Komplex mit der DNA, was auf die Spezifität der Bindung über Smad4 deutet. GST-Smif zeigte keine Ausbildung eines DNA-Protein Komplexes mit der Sonde. Interessanterweise zeigten Inkubationen von GST-Smad4 mit dem GST-Smif Fusionsprotein nicht aber mit GST-Protein eine verstärkte Signalintensität des DNA-Proteinkomplexes. Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Konzentration an GST-Smif. Die Interaktion von Smad4 mit Smif scheint daher dessen Assoziation mit der DNA zu unterstützen.

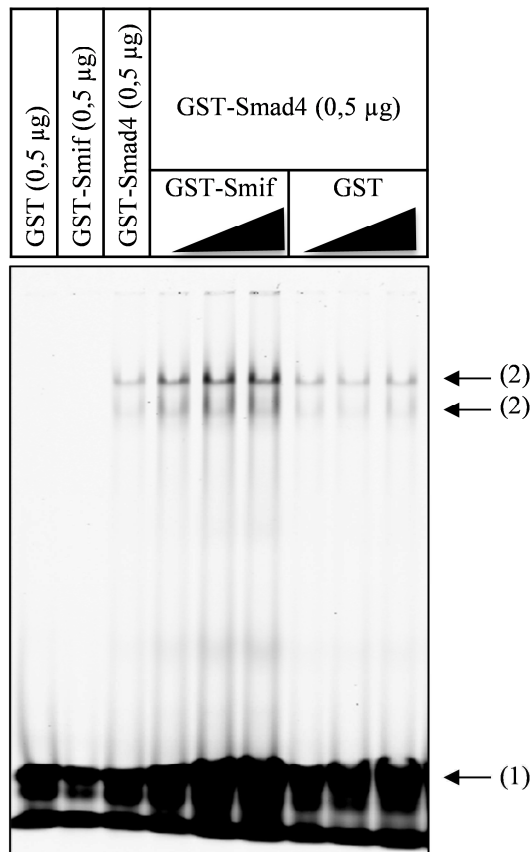
Veränderungen hinsichtlich des Laufverhaltens eines zu vermutenden Smad4-Smif-DNA-Komplexes gegenüber einem Smad4-DNA-Komplex traten im nativen Gel aber nicht auf. Eine

Methode zum Nachweis einer Smif Bindung an die DNA bilden „Antikörper-Supershift-Experimente“. Aufgrund des hohen molekularen Gewichts von Antikörpern und dem daraus resultierenden Anstieg der Masse eines DNA-Protein-Antikörper-Komplexes tritt eine deutlich verminderte Migration im nativen Gel auf. Einige der getesteten Anti-Smad4 Antikörper (B8, C20, C20X) verursachten einen solchen „Supershift“ im EMSA, was die Bindung von Smad4 an die Sonde nochmals direkt nachwies (Abbildung 3.27c). Andere Antikörper gegen Smad4 (H552, D6X) zeigten keine solche Eigenschaften, was an einer Blockierung des Epitopes im DNA-Proteinkomplex liegen könnte. Zugabe des einzigen verfügbaren Antikörpers gegen Smif zum EMSA Reaktionsansatz führte ebenfalls zu keiner veränderten Migration im nativen Gel.

a.

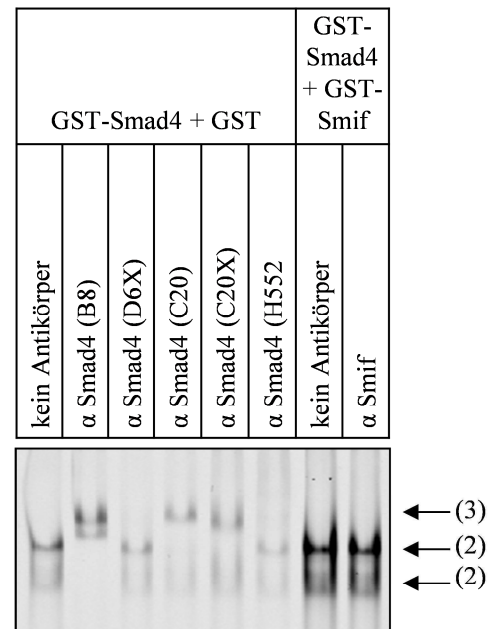


b.



(1) freie Sonde
 (2) DNA-Protein-Komplex

c.



(2) DNA-Protein-Komplex
 (3) „Supershift“

Abbildung 3.27 Smif verstärkt die Bindung von Smad4 an Smad-DNA-Bindungsmotive im Elektromobility Shift Assay (EMSA): a. Schematischer Aufbau der für den EMSA verwendeten Sonde. Das Smad-Bindungsmotiv wurde hervorgehoben. b. Gereinigtes rekombinantes GST-Smif und GST-Smad4 wurden zusammen mit der Sonde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. DNA-Protein-Komplexe wurden von freier ungebundener DNA mittels nichtdenaturierender Elektrophorese aufgetrennt. Die Sonde wurde mittels des gekoppelten Fluoreszenzmarkers (IR-Dye₆₈₀) im Odyssey Infrarot Scanner nachgewiesen. c. Gereinigtes rekombinantes GST-Smad4 und GST-Smif bzw. GST

(alle jeweils 0,5 µg) wurden zusammen mit der Sonde für 10 min inkubiert. Antikörper gegen Smad4 oder Smif wurden hinzugefügt. Der Ansatz wurde für weitere 20 min inkubiert. DNA-Protein-Komplexe wurden von freier ungebundener DNA mittels nichtdenaturierender Elektrophorese getrennt. Die Sonde wurde mittels des gekoppelten Fluoreszenzmarkers (IR-Dye₆₈₀) im Odyssey Infrarot Scanner nachgewiesen (Scanausschnitt dargestellt).

Abschließend wurde noch die Frage geklärt, inwiefern sich eine Phosphorylierung von Smif auf den Smad4-Smif-DNA-Komplex auswirkt. Wie in Abschnitt 3.6.1 gezeigt wurde, kann GST-Smif *in vitro* durch ERK an S315,S319,T321 phosphoryliert werden. Aufgereinigtes GST-Smif wurde dementsprechend *in vitro* phosphoryliert und im EMSA eingesetzt (Abbildung 3.28). *Western Blot* Analysen zeigten eine quantitative Phosphorylierung von GST-Smif durch ERK an, wie die langsamere Migration in der SDS-PAGE belegt. Sowohl GST-Smif, welches mit ERK phosphoryliert wurde, als auch GST-Smif aus Kontrollansätzen zeigten eine verstärkte Ausbildung von DNA-Protein-Komplexen im Vergleich zu Proben, in denen als Kontrolle GST Protein zugegeben wurde.

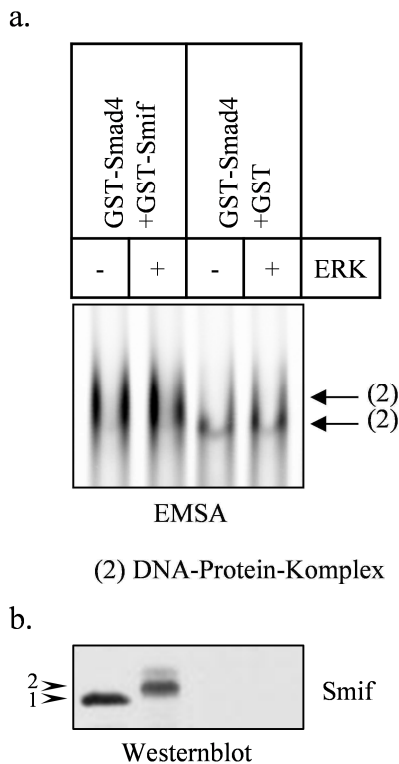


Abbildung 3.28 **Smif verstärkt die Bindung von Smad4 an die DNA unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus:** a. Gereinigtes rekombinantes Smif wurde *in vitro* ERK vermittelt phosphoryliert und anschließend im EMSA mit GST-Smad4 verwendet. DNA-Protein-Komplexe wurden von freier ungebundener DNA mittels nichtdenaturierender Elektrophorese getrennt. Die Sonde wurde mittels des gekoppelten Fluoreszenzmarkers (IR-Dye₆₈₀) im Odyssey Infrarot Scanner nachgewiesen (Scanausschnitt dargestellt). b. *Western Blot* von gereinigtem GST-Smif vor und nach Inkubation im ERK Kinase-Assay.

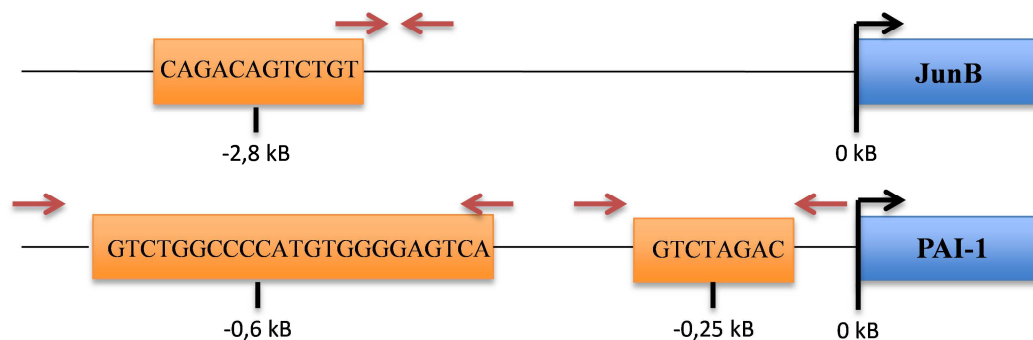
Wie später noch ausführlicher diskutiert wird, lässt sich ausgehend von diesen Experimenten eine indirekte Bindung von Smif über Smad4 an die DNA vermuten. Der direkte Beweis über ein „Antikörper-*Supershift*-Experiment“ fehlt aber bisher. Die Assoziation von Smad4 mit der

DNA ist in Gegenwart von Smif verstärkt, was eine mögliche molekulare Erklärung für die gesteigerte transkriptionelle Aktivierung von TGF β -Smad4 Zielgenen in Gegenwart von Smif bietet. Die Phosphorylierung von Smif scheint dabei die DNA-Protein-Interaktion *in vitro* nicht zu modifizieren.

3.9.3 Chromatin-Immunpräzipitation bestätigt eine DNA Assoziation von Smif *in vivo*

Die Fixierung von DNA-Protein-Interaktionen in intakten Zellen, die anschließende Isolierung potentieller DNA-assoziierter Proteine und der Nachweis kopräzipitierter DNA gilt als zuverlässiger Nachweis für eine DNA-Bindung. Voraussetzung ist dabei, dass der Bindungsort im Genom bekannt ist, um geeignete Primer für die PCR abzuleiten. Wie in Abschnitt 3.8.6 gezeigt wurde, werden die beiden TGF β -Zielgene PAI-1 und JunB Smif-abhängig durch TGF β induziert. Eine Literaturrecherche nach Smad-Bindungsstellen im Allgemeinen als auch für Smad4 im speziellen in den Promotoren von PAI-1 und JunB dienten dabei als Anhaltspunkte zur Lokalisation potentieller Smif-DNA-Bindungsstellen. Ausgehend davon wurden Primer für eine quantitative PCR abgeleitet (Abbildung 3.29a). Immunpräzipitate mit Antikörpern gegen Smif wurden auf das Vorhandensein von Genomfragmenten aus den Promotoren von JunB und PAI-1 mit Hilfe der angegebenen Primer getestet. So waren für alle eingesetzten Primer positive Signale in den Immunpräzipitationen mit Smif Antikörpern nachweisbar, während Präzipitate mit dem Kontrollantikörper mIgG negativ für DNA des PAI-1 Promotors waren bzw. signifikant geringere DNA Mengen des JunB Promotors enthielten (Abbildung 3.29b). Behandlung von Zellen mit TGF β erhöhte die Menge an präzipitierter DNA. Diese Experimente deuten somit auf eine Bindung von Smif an Promotorelemente von TGF β -Zielgenen, welche mit der Bindung von Smad-Proteinen an die DNA überlappt. Behandlung mit TGF β verstärkt die Bindung von Smif an die Promotoren von PAI-1 und JunB.

a.



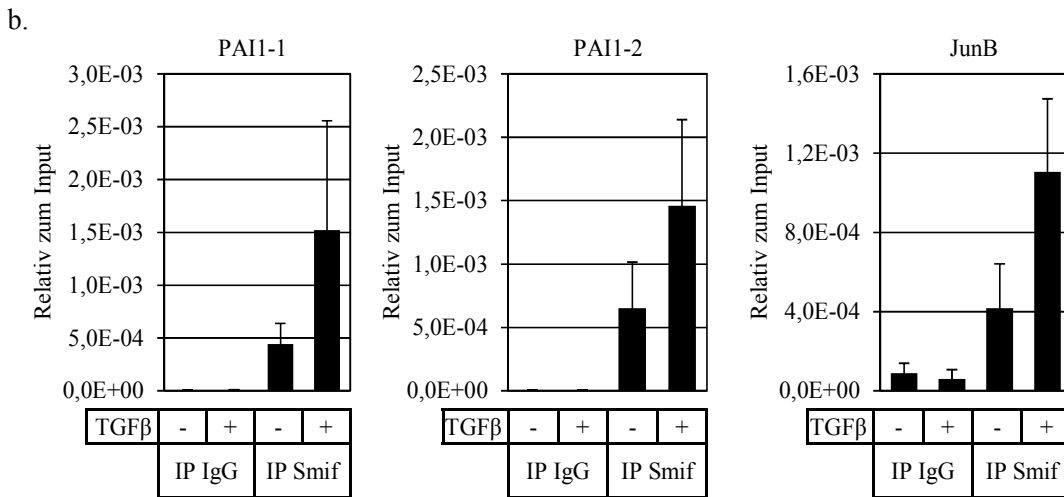


Abbildung 3.29 **Bindung von Smif an Smad-DNA-Bindungsstellen in der Promotorregion von TGFβ-Zielgenen:** a. Schematische Darstellung der Promotorregion der TGFβ-Zielgene JunB und PAI1. Smad-DNA-Bindungs-elemente wurden hervorgehoben (orange). PCR Primer zur Validierung der Chromatin-Immünpräzipitation wurden als Pfeile dargestellt. b. Realtime PCR auf Chromatin-Immünpräzipitation. Chromatin von unstimulierten und TGFβ stimulierten NIH3T3 Zellen wurde präpariert und für eine Chromatin-Immünpräzipitation mit Antikörpern gegen Smif eingesetzt. Die präzipitierte Menge an DNA wurde mittels Realtime PCR quantifiziert und relativ zum Input gesetzt.

Wo im Genom Smif bindet und inwiefern Überschneidungen mit Smad-Proteinen bestehen könnten weitergehende Analysen wie „CHIP on CHIP“ oder „CHIP Sequencing“ liefern. Im Rahmen dieser Arbeit stand aber die Frage im Vordergrund, inwiefern sich die DNA-Assoziation nach Stimulation mit proliferativen Stimuli verändert.

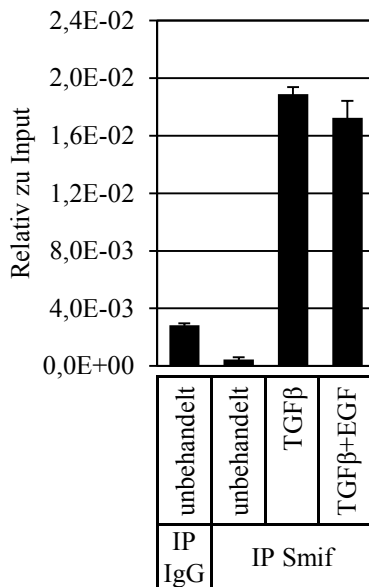


Abbildung 3.30 **Chromatin-Assoziation von Smif unabhängig von dessen EGF-vermittelter Phosphorylierung:** Phoenix-E Zellen wurden transient mit den SBE₄-luc Reporter und Flag-Smif transfiziert, nach 24 h für 12 h gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ allein oder in Kombination mit 150 ng/ml EGF für 1 h stimuliert. Chromatin wurde präpariert und für eine Chromatin-Immünpräzipitation mit Antikörpern gegen Flag eingesetzt. Das Präzipitat wurde auf DNA

des SBE₄-luc Reports mittels Realtime PCR mit Primern, welche im Luciferase-Gen binden, quantifiziert. Der DNA Gehalt ist relativ zum Input dargestellt.

Dazu wurden Phoenix-E Zellen mit dem SBE₄-luc Reporter zusammen mit Smif und Smad4 transfiziert und die Bindung von Smif untersucht (Abbildung 3.30). Wie auch für die endogenen Promotoren von PAI-1 und JunB zeigte sich hier eine TGF β -vermittelte Bindung von Smif an den Promotor des Reporter-Konstrukts. Stimulation mit EGF beeinflusste die durch TGF β -induzierte Bindung von Smif an die DNA nicht. Diese Daten stehen im Einklang mit den in Abschnitt 3.9.2 beschriebenen EMSA Experimenten. Die Bindung eines Smad4-Smif-Komplexes an die Sonde, welche aus dem SBE₄-luc Reporter abgeleitet war, war unabhängig von der Phosphorylierung von Smif.

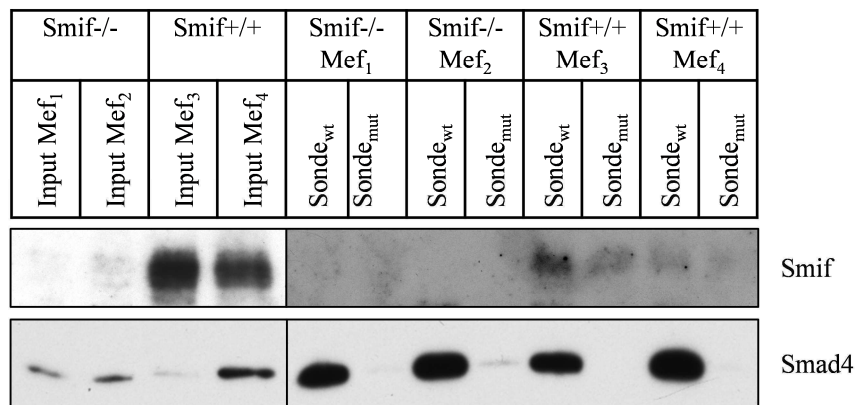
3.9.4 Bindung von Smif an DNA-Oligonukleotiden – DNA-Pulldown

Als dritte Methode zur Untersuchung der Bindung von Smif an DNA-Elemente wurden sogenannte *DNA-Pulldown* Experimente durchgeführt, welche anstelle eines GST-Proteins wie im Fall des *GST-Pulldowns* DNA als „Köder“ verwenden. Gegenüber den EMSA Experimenten in Abschnitt 3.9.2 können im *Western Blot* direkte Rückschlüsse über Phosphorylierungszustände von Smif-DNA-Komplexen gezogen werden.

Die verwendete Sonde entsprach in der Sequenz der in EMSA Experimenten eingesetzten Sonde (Vgl. Abbildung 3.31a mit Abbildung 3.27a). Die 5' Biotinylierung ermöglichte eine Immobilisierung an Streptavidin-Sepharose. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine Sonde mit Punktmutationen eingesetzt, um Sequenz-unspezifische Interaktionen auszuschließen. Wie in Abbildung 3.31b für Lysate von TGF β aktivierten HCT116 Zellen gezeigt ist, bindet endogenes Smad4 spezifisch an die *wild-typ* nicht aber an die mutierte DNA-Sequenz im *DNA-Pulldown*. Smif konnte gleichfalls aus Lysaten von HCT116 Zellen im *DNA-Pulldown* präzipitiert werden, wenngleich die Bindung nicht auf die *wild-typ* Sonde spezifiziert war. Ein schwächeres Signal war ebenfalls im *DNA-Pulldown* mit dem mutierten 5'-CAGACA-3' Sequenzmotiv nachweisbar. Weiterhin war gleichfalls eine Bindung verschiedenster Phosphorylierungszustände von Smif an die Sonden zu beobachten.

Eine genauere Charakterisierung hinsichtlich des Einflusses der Phosphorylierung von Smif auf die DNA-Protein-Interaktion wurde in Phoenix-E Zellen vorgenommen, welche Smif und Smad4 überexprimierten. Vergleichende Untersuchungen von Zelllysaten, welche mit TGF β allein oder in Kombination mit EGF stimuliert wurden, zeigten keine Veränderung in der Bindung von Smad4 und Smif (Abbildung 3.31c). Zusammen mit den EMSA und CHIP Experimenten unterstreicht dies eine DNA-Assoziation von Smif unabhängig von einer Mitogen-induzierten Phosphorylierung.

a.



b.

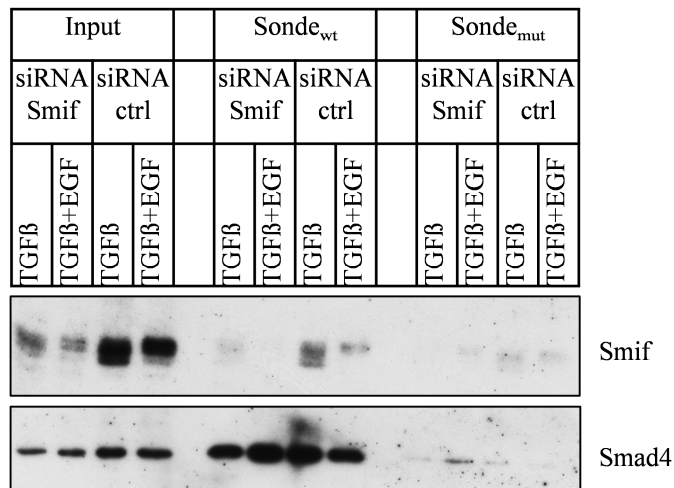
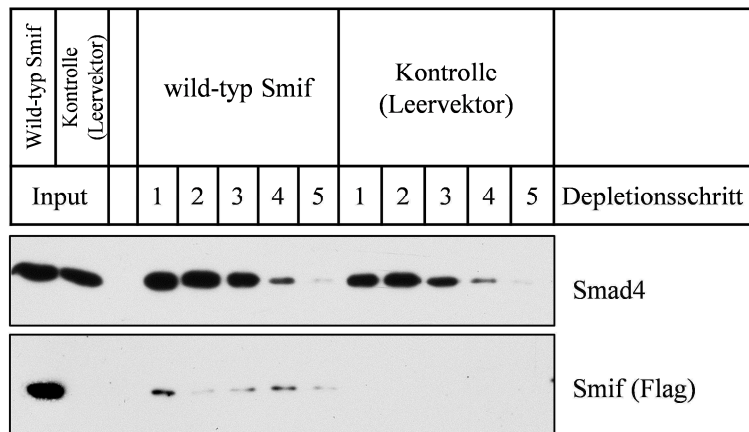


Abbildung 3.32 **Smif unabhängige Bindung von Smad4 an eine DNA Sonde mit Smad-DNA-Bindungsselement im DNA-Pulldown:** a. Lysate von Smif defizienten und wild-typ Maus Embryonalen Fibroblasten (Mef) wurden mit an Streptavidinagarose gekoppelter DNA-Sonde inkubiert. DNA-Protein-Komplexe wurden gereinigt und die Präzipitate im Western Blot analysiert. b. Endogenes Smif wurde in Hela Zellen mittels siRNA herunterreguliert. Lysate wurden im DNA-Pulldown eingesetzt. Präzipitate wurden im Western Blot analysiert.

Um auszuschließen, dass eine Sättigung der DNA-Sonde aufgrund einer Überladung mit Lysat für eine vergleichbare Bindung von Smad4 verantwortlich ist, wurden wiederholend *DNA-Pulldowns* mit dem Überständen durchgeführt, bis Smad4 depletiert war (Abbildung 3.33). Dreimaliges Wiederholen des *DNA-Pulldowns* führte dabei zu einer nahezu vollständigen Depletion von Smad4 aus dem Lysat. Vergleiche von Zelllysaten, welche entweder Smif-defizient waren (Mef-Zelllinien) oder Smif mittels siRNA herunterreguliert hatte (Phoenix-E Zellen), zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Bindung von Smad4 an die DNA-Sonde.

a.



b.

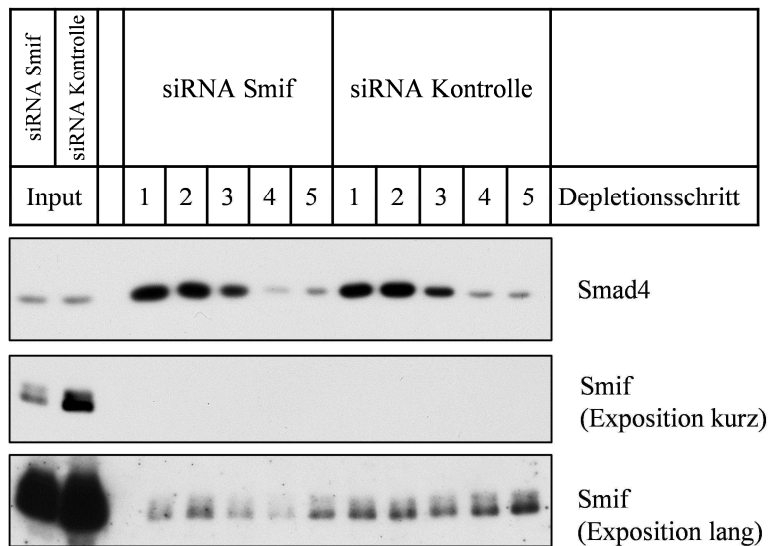


Abbildung 3.33 **Smif unabhängige Bindung von Smad4 an eine DNA Sonde mit Smad-DNA-Bindungselement im DNA-Pulldown:** Smif defiziente Maus Embryonale Fibroblasten (Mef), welche wild-typ Smif stabil überexprimieren (a.) oder Phoenix-E-Zellen, bei denen endogenes Smif mittels siRNA herunterreguliert wurde (b.), wurden mit TGF β stimuliert. Zelllysate wurden präpariert und im DNA-Pulldown eingesetzt. DNA-Protein-Komplexe wurde abgetrennt. Der Überstand wurde einem weiteren DNA-Pulldown mit frischer DNA-Sonden gekoppelter Sepharose zugeführt. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis Smad4 aus dem Überstand depletiert war.

3.10 Oligomerisierung von Smif und deren Einfluss auf die Rolle von Smif als Transkriptions-Co-Aktivator

3.10.1 Phosphorylierungs-unabhängige Oligomerisierung von Smif

In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde das Auftreten von Trimeren Smif Strukturen beschrieben. Die Oligomerisierung erfolgte dabei über α -Helices am C-Terminus des Proteins (Aminosäure 539 bis 582 – humane Sequenz). Deletion dieses Motivs führte zu einer funktionalen Einschränkung von Smif als Decapping Cofaktor¹³⁵.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Oligomerisierung von Smif gezeigt werden. Durchgeführte *GST-Pulldown* Experimente zeigten neben der Bindung von Smif an GST-Smad4 ebenfalls eine Assoziation mit GST-Smif (Abbildung 3.34a). Diese war unabhängig von einer Phosphorylierung von Smif. Nach Stimulation der Zellen mit EGF band phosphoryliertes Smif ähnlich Effizient an GST-Smif wie Smif aus Lysaten unstimulierter Zellen.

Darüber hinaus wurde die Oligomerisierung über Immunpräzipitationen untersucht. Dazu wurden Flag- als auch Myc-markiertes Smif exprimiert und mittels Antikörpern gegen Flag präzipitiert. Wie in Abbildung 3.34b zu sehen ist, wurde dabei myc-markiertes Smif kopräzipitiert, was auf eine Oligomerisierung deutet. Stimulation der Zellen mit EGF beeinflusste die Interaktion von Flag- und myc-Smif nicht, und bestätigt die Ergebnisse des *GST-Pulldown* Experimentes. Gleichfalls zeigten die Mutationen S315, S319, T321, welche den unphosphorylierten Zustand stabilisieren bzw. den phosphorylierten Zustand von Smif nachahmen keinen Einfluss auf die Bindung von myc-markiertem *wild-typ* Smif. Stimulation von Zellen mit TGF β führte ebenfalls zu keiner Beeinträchtigung der Smif Oligomerisierung.

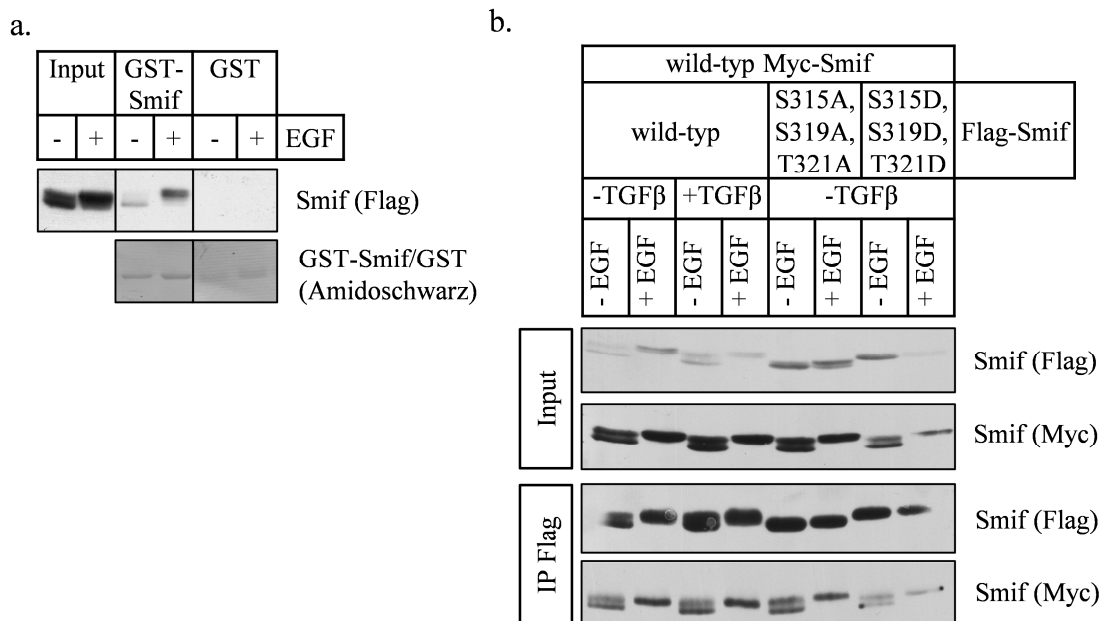


Abbildung 3.34 Oligomerisierung von Smif ist unabhängig von pro-mitogener Stimulation: a. *wild-typ* Flag-Smif wurde transient in Phoenix-E Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden für 12 h gehungert und anschließend mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Zelllysate wurden im *GST-Pulldown* mit GST-Smif verwendet. Präzipitate wurden im Western Blot analysiert. b. Wild-typ myc-Smif wurde mit wild-typ, Phosphorylierungs-defizienten oder Phosphorylierungs-Mimikry Flag-Smif in Phoenix-E Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden mit 4 ng/ml TGF β für 60 min, 150 ng/ml EGF für 20 min oder in Kombination von TGF β und EGF, wobei TGF β eine Stunde vor Stimulation mit EGF hinzugegeben wurde, behandelt. Zelllysate wurden präpariert. Flag-Smif wurde mittels Flag-Immunpräzipitation isoliert. Die Präzipitate wurden auf Flag-Smif selbst als auch co-präzipitiertes myc-Smif im Western Blot hin analysiert.

3.10.2 Smad4 assoziiert mit oligomeren Smif Komplexen

Aufgrund des in der Literatur beschriebenen funktionellen Zusammenhangs zwischen Oligomerisierung von Smif und der Decapping Aktivität, stellte sich die Frage, inwiefern die Oligomerisierung von Smif für dessen Funktion als Transkriptions-Cofaktor essentiell ist. Die Smif-Smad4 Bindungsstelle wurde am N-Terminus (Aminosäuren 1-101) identifiziert¹²⁹.

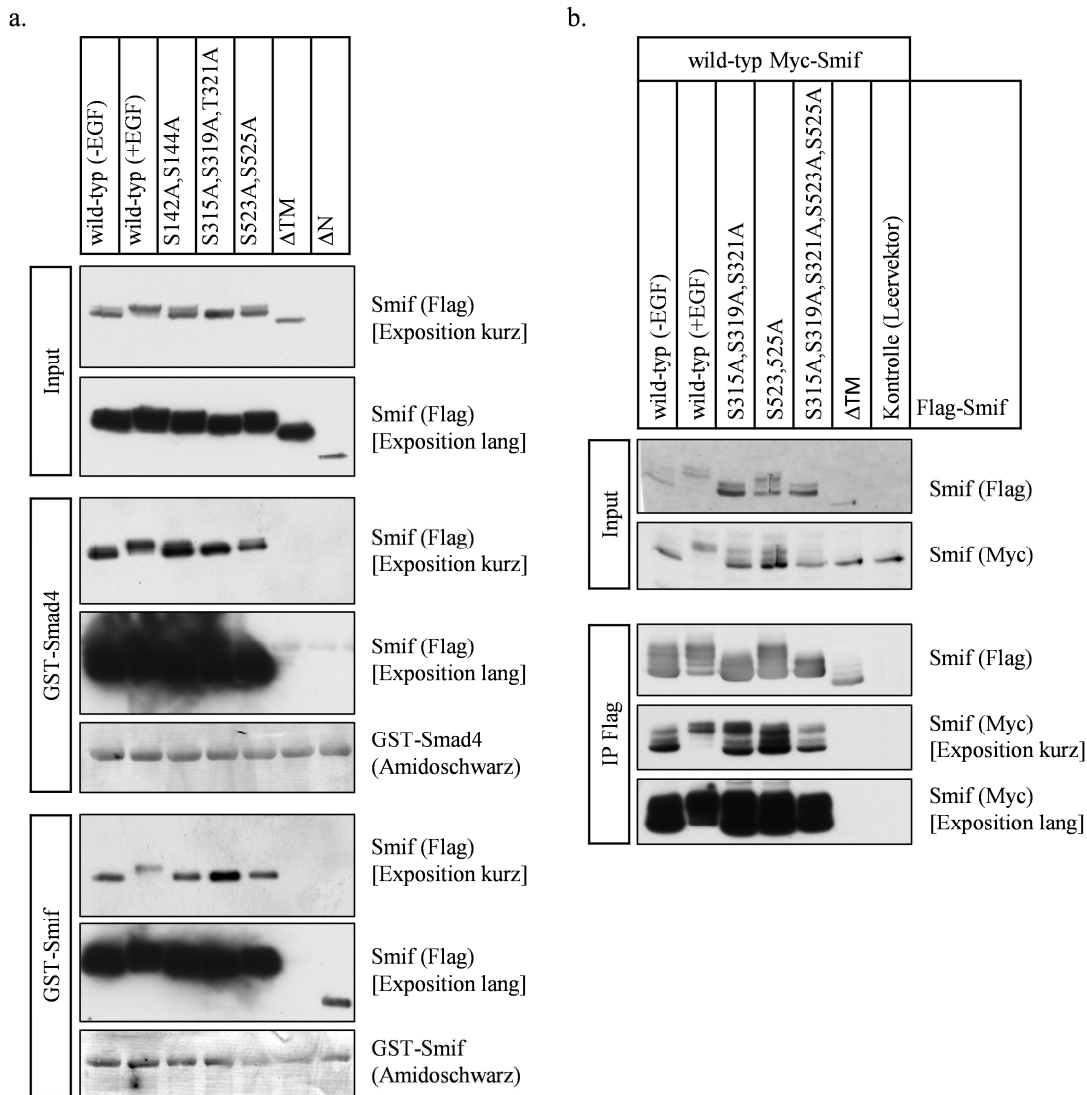


Abbildung 3.35 Die Oligomerisierung von Smif spielt für die Assoziation mit Smad4 eine wesentliche Rolle: a. Phoenix-E Zellen wurde mit verschiedenen Phosphorylierungs-defizienten Smif-Konstrukten sowie N-terminalen (Δ N) und C-terminalen (Δ TM) Deletionskonstrukten transfiziert. Die Zellen wurden, wenn angeführt, mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Lysate wurden im GST-Pulldown mit GST-Smif und GST-Smad4 eingesetzt. b. Wild-typ Myc-Smif wurde mit Flag-Smif wild-typ, Phosphorylierungs-defizienten oder einem C-terminalen (Δ TM) Deletionskonstrukt in Phoenix-E Zellen überexprimiert. Zelllysate wurden präpariert. Die Zellen wurden, wenn angeführt, mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Flag-Smif wurde mittels Flag-Immünpräzipitation isoliert. Die Präzipitate wurden auf Flag-Smif selbst als auch co-präzipitiertes myc-Smif im Western Blot hin analysiert.

Interessanterweise zeigten in dieser Arbeit durchgeführte *GST-Pulldown* Experimente, dass die Deletion des Trimerisierungsmotives am C-Terminus (Smif- Δ TM) und einer damit verbundene Blockierung der Oligomerisierung die Bindung an GST-Smad4 unterbindet (Abbildung 3.35a). Smif- Δ TM, welches nicht an GST-Smif bindet, zeigte gleichfalls keine Assoziation mit GST-Smad4. Demgegenüber unterband die Deletion des N-Terminus von Smif (Smif- Δ N) ebenfalls die Bindung an GST-Smad4. Untersuchungen der Oligomerisierung zwischen Smif- Δ N und GST-Smif zeigten eine Interaktion beider Proteine im Western Blot, wenngleich das Signal deutlich schwächer war im Vergleich zu *wild-typ* Smif. Analysen der verwendeten Lysate zeigten aber eine deutlich verminderte Expression des Smif- Δ N Konstruktes, so dass relativ betrachtet von einer ähnlich effizienten Bindung von Smif- Δ N an GST-Smif ausgegangen werden kann. Punktmutationen ausgewählter Phosphorylierungsstellen neben S315,S319,T321 wie S142,S144 und S523,S525 beeinflussten die Bindung an GST-Smif nicht. Darüber hinaus konnten im Einklang mit zuvor dargestellten Ergebnissen keine Veränderungen in der Bindung an GST-Smad4 beobachtet werden, wenn Smif mittels EGF phosphoryliert wurde.

Koimmunpräzipitationen bestätigten die Ergebnisse des *GST-Pulldowns* (Abbildung 3.35b). Eine Abhängigkeit der Assoziation von myc-markierten Smif mit Flag-markierten Smif war an die Präsenz des C-Terminus geknüpft, wie an einer fehlenden Kopräzipitation von myc-Smif mit Flag-Smif- Δ TM zu erkennen ist. Intakte Phosphorylierungsstellen S315,S319,T321 und S523,S525 waren für die Oligomerisierung nicht ausschlaggebend, was in einer unveränderten Interaktion der Phosphorylierungs-defizienten Konstrukte mit myc-Smif beobachtet werden konnte.

3.10.3 Oligomeres Smif reguliert die TGF β -vermittelte Genexpression

Ausgehend von der bisher unbekanntem Rolle der Oligomerisierung von Smif für die Interaktion mit Smad4, wurde untersucht inwiefern sich die Deletion des C-Terminus auf die transkriptionelle Aktivität auswirkt. Dazu wurden Smif-defiziente Mef-Zelllinien mit *wild-typ* Smif oder Smif- Δ TM rekonstituiert und die Aktivität des Smif abhängigen TGF β -Reporters SBE₄-luc getestet (Abbildung 3.36). Wie zu erwarten war, führte die Expression von *wild-typ* Smif zu einer deutlich stärkeren Aktivierung des TGF β -Reporterkonstruktes SBE₄-luc im Vergleich zu Kontrollvektor infizierten Zellen. Demgegenüber zeigten Zellen mit Smif- Δ TM eine wesentlich schwächere Aktivierung, welche leicht über der von Kontrollinfizierten Mef-Zellen lag. *Western Blot* Untersuchungen zeigten eine Expression beider Konstrukte, wobei ein schwächeres Signal für Smif- Δ TM im Vergleich zu *wild-typ* Smif erkennbar war. FACS Analysen auf die IRES vermittelte GFP Expression des Konstrukts wiesen aber keine Unterschiede auf, was auf vergleichbare Infektion bzw. ähnliche mRNA Level beider Konstrukte deutet.

Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine entscheidende Rolle des Oligomerisierungsmotives für die Interaktion von Smif mit Smad4 und dessen Funktion als Transkriptions-Cofaktor.

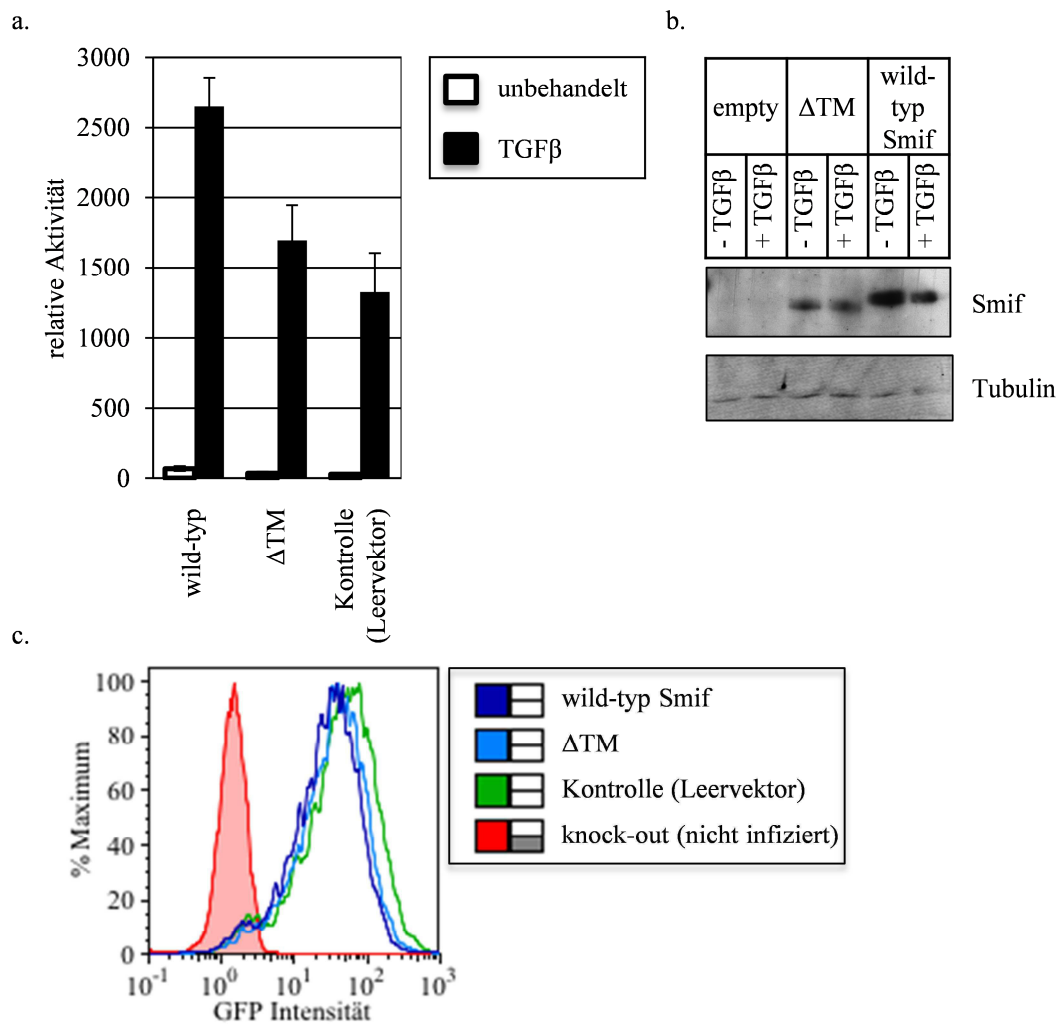


Abbildung 3.36 Die Funktion von Smif als Transkriptions-Cofaktor ist abhängig von seiner Oligomerisierung: a. Mef Zelllinien wurden mit wild-typ Smif und einem C-terminalen Deletionskonstrukt (Δ TM) rekonstituiert. Die Zellen wurden mit dem SBE₄-luc Reporter transfiziert, nach 24 h für 12 h gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGF β für 18 h stimuliert. Die firefly Luciferase-Aktivität wurde relativ zur renilla Luciferase-Aktivität bestimmt. b. Zellysate aus den Reporter-Assays wurden anschließend im Western Blot auf die Expression von Smif hin analysiert. c. FACS Analyse der GFP Expression in den Mef Zelllinien.

3.11 Einfluss der Phosphorylierung von Smif im mRNA Decapping

Neben der Funktion von Smif als Cofaktor in der Smad4-vermittelten TGF β -Signalantwort wurde Smif als Untereinheit im Dcp2-Dcp1a (Smif) Decapping Komplexes beschrieben. Beobachtete funktionelle Effekte in den Reporter-Assays könnten daher auf Veränderungen in der Degradation der Reporter mRNA und damit des Decapping Prozesses zurückzuführen sein. Um dies auszuschließen, wurde untersucht, inwieweit unter den verwendeten Bedingungen Veränderung in der Interaktion von Smif mit dem Decapping Komplex und dessen Lokalisation auftraten.

3.11.1 Phosphorylierungs-unabhängige Assoziation von Smif und Dcp2

GST-Pulldown Experimente zeigten eine effiziente Bindung von Smif an GST-Dcp2. Vergleichbar mit GST-Smad4 und GST-Smif GST-Pulldown Experimenten zeigte eine vorherige Stimulation der Zellen mit EGF oder ultraviolettem Licht keine Veränderung in der Bindung von Smif an GST-Dcp2 (Abbildung 3.37a). Dies deutet auf eine phosphorylierungs-unabhängige Bindung zwischen Smif und Dcp2. Gleichfalls zeigten Inaktivierung einzelner Phosphorylierungsstellen wie S142,S144, der EGF induzierten Phosphorylierungsstelle S315,S319,T321 sowie S523,S525 ebenfalls keinen Einfluss auf die Interaktion mit GST-Dcp2 und stützen diese Hypothese (Abbildung 3.37b). Deletionskonstrukte, bei denen der N-Terminus (Aminosäure 1-101) bzw. der für die Oligomerisierung notwendige C-Terminus (Δ TM) entfernt wurde, zeigten keine Bindung an GST-Dcp2. Dies steht im Einklang mit Daten in der Literatur, die eine strukturelle Bedeutung von N- und C-Terminus für die Interaktion mit Dcp2 beschreiben¹³⁵.

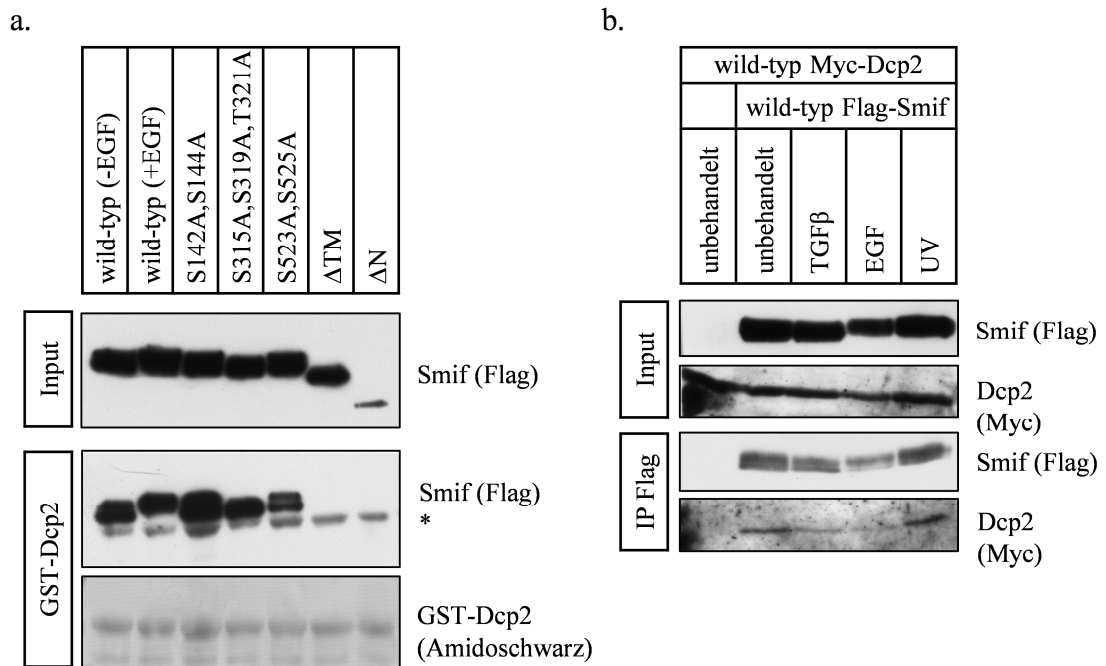


Abbildung 3.37 Mitogen-induzierte Phosphorylierung von Smif wirkt sich nicht auf dessen Interaktion mit Dcp2 aus: a. Phoenix-E Zellen wurde mit verschiedenen Phosphorylierungs-defizienten Smif-Konstrukten sowie N-terminalen (Δ N) und C-terminalen (Δ TM) Deletionskonstrukten transfiziert. Zellen, die wild-typ Smif exprimierten wurden zusätzlich mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Lysate wurden im GST-Pulldown mit GST-Dcp2 eingesetzt. Kreuzreaktionen der Antikörper mit GST-Dcp2 wurden mit * gekennzeichnet. b. myc-Dcp2 wurde mit wild-typ Flag-Smif in Cos1 Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden für 12 h in Medium ohne FCS gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGF β für 60 min, 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert oder mit 200 J/m² UVC bestrahlt und 60 min später geerntet. Zellysate wurden präpariert und Flag-Smif wurde mittels Flag-Immunpräzipitation isoliert. Die Präzipitate wurden auf Flag-Smif selbst als auch co-präzipitiertes myc-Dcp2 im Western Blot hin analysiert.

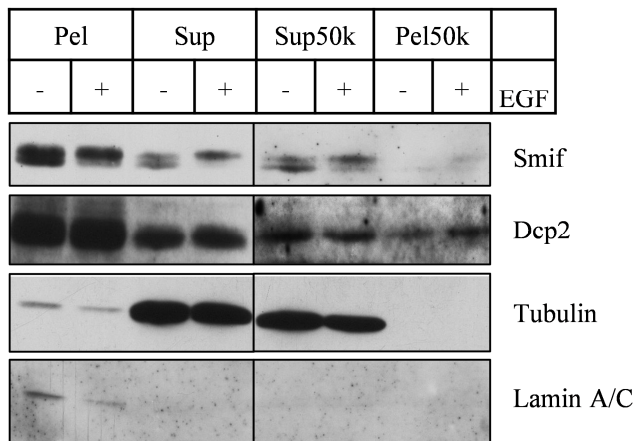
Immunpräzipitation in Cos1 Zellen, in denen Smif und Dcp2 co-exprimiert wurden, zeigten zu den GST-Pulldown Experimenten übereinstimmende Ergebnisse (Abbildung 3.37). Myc-

markiertes Dcp2 co-präzipitierte unter verschiedenen Bedingungen wie TGF β , EGF- oder UV-Stimulation mit Flag-markiertem Smif. Myc-Dcp2 zeigte keine Bindung an die für die Immunpräzipitation eingesetzten Flag-Agarose-Beads in Abwesenheit von Flag-Smif und deuten auf eine spezifische Bindung.

3.11.2 Einfluss der Phosphorylierung auf die Lokalisation von Smif in *P-Bodies*

mRNA *Decapping* findet in zytoplasmatischen Strukturen, welche als „*Processing Bodies*“ (*P-Bodies*) bezeichnet werden, statt. Diese können unter anderem mittels Ultrazentrifugation post-nukleärer Lysate isoliert werden. Alternativ lassen sich ihre granulären Strukturen im Zytoplasma über Immunfluoreszenz-Färbungen nachweisen.

a.



b.

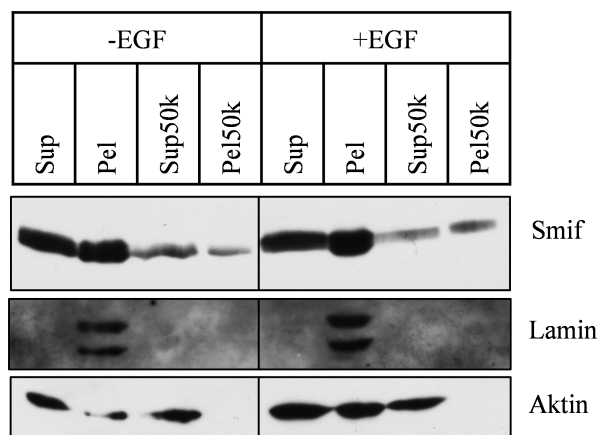


Abbildung 3.38 Phosphorylierungs-unabhängige Lokalisation von Smif in *P-Bodies*: a. *Cos1*-Zellen wurden mit HA-Dcp2 und wild-typ Flag-Smif transfiziert. *P-Bodies* wurden mittels Ultrazentrifugation post-nukleärer Zellysate isoliert und mittels Western Blot analysiert. b. *Hela* Zellen wurden für 18 h gehungert und mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. *P-Bodies* wurden mittels Ultrazentrifugation post-nukleärer Zellysate isoliert und mittels Western Blot analysiert

Um den Einfluss der Phosphorylierung von Smif auf dessen Lokalisation in *P-Bodies* zu untersuchen, wurden diese aus EGF stimulierten und unstimulierten *Hela* Zellen bzw. *Cos1*-

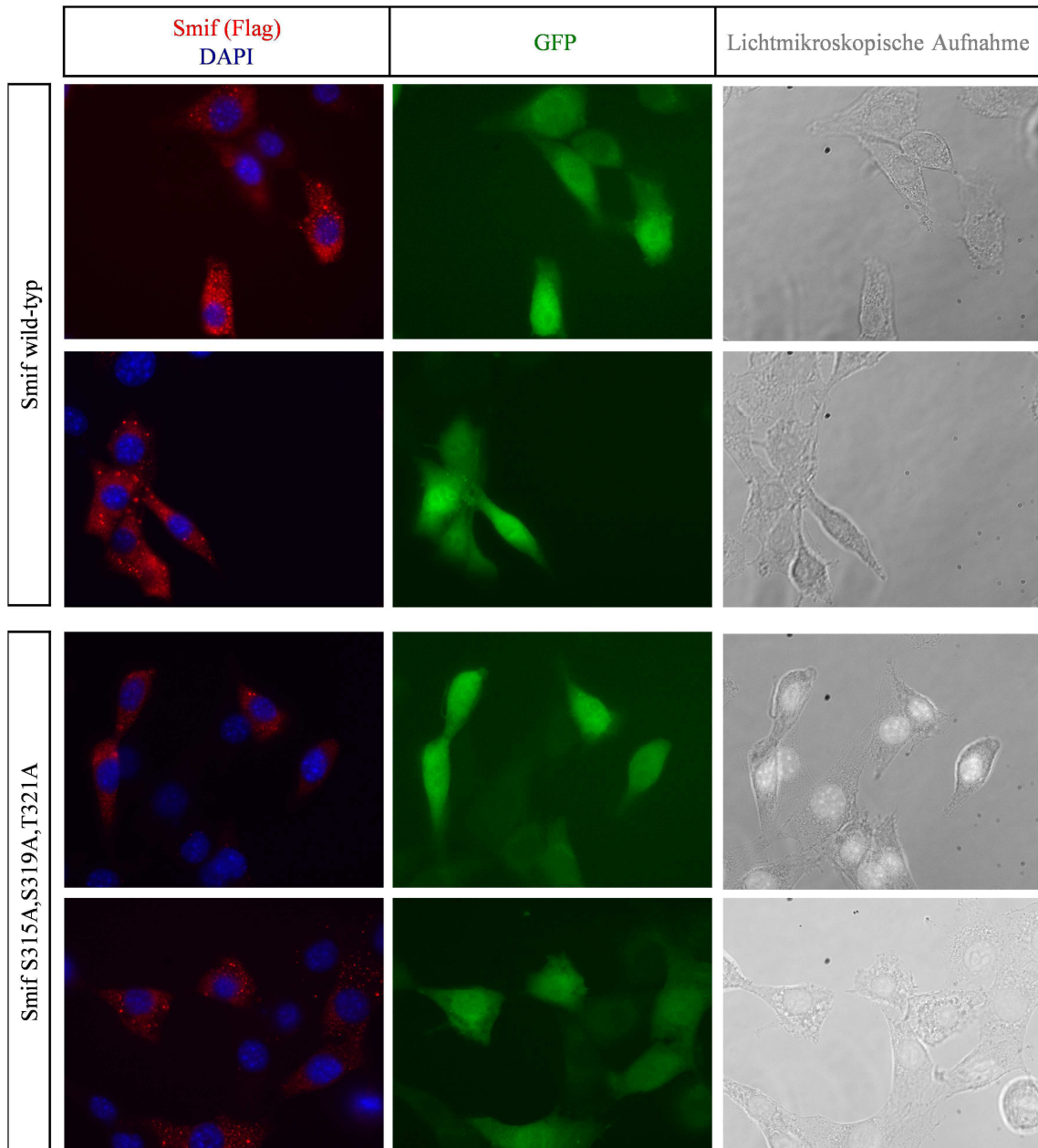
Zellen, welche mit Flag-Smif und myc-Dcp2 transfiziert wurden, präpariert. Entsprechend dem *Western Blot* in Abbildung 3.38 zeigte sich, dass Smif über die zytoplasmatische (post-nukleäre) und nukleäre Fraktion relative gleichmäßig verteilt war. Geringe Mengen an Tubulin in der nukleären Fraktion deuten auf einen geringen Grad an unlysierten Zellen hin, welche diese Fraktion verunreinigen. Ultrazentrifugation bei 50.000 g führte zu einer Anreicherung von Smif und Dcp2 im Pellet. Demgegenüber sind Tubulin und Aktin als Marker für das Cytosol in dieser Fraktion nicht nachweisbar und deuten auf eine Anreicherung von *P-Bodies* im Pellet. Vergleiche hinsichtlich der Anreicherung phosphorylierungsspezifischer Zustände von Smif in der *P-Body* Fraktion zeigten keine Unterschiede. Gleichfalls führte die Stimulation von Cos-1 Zellen mit EGF zu keiner Veränderung in der Lokalisation von Dcp2 in der *P-Body* Fraktion. Zusammenfassend deutet dies darauf, dass die EGF-vermittelte Phosphorylierung an S315,S319,T321 keinen Einfluss auf die Lokalisation von Smif selbst als auch dessen Interaktionspartner Dcp2 hat.

Die Untersuchung ausgewählter Phosphorylierungs-defizienter Smif-Konstrukte ergab keine Unterschiede hinsichtlich dessen Lokalisation in *P-Bodies*. In Immunfluoreszenzfärbungen (Abbildung 3.39) lässt sich deutlich *wild-typ* Smif in granulären Strukturen im Zytoplasma nachweisen. Substitution von S315,S319,T321 zu Alanin beeinflusste die Lokalisation in *P-Bodies* nicht. Inaktivierung der S523,S525 Phosphorylierungsstelle wirkte sich ebenfalls nicht auf die Lokalisation von Smif in *P-Bodies* aus.

Auf Grundlage der Fraktionierungsexperimente hätte man eine Färbung von Smif im Zellkern erwartet. Smif konnte aber unter den experimentellen Bedingungen nicht im Zellkern nachgewiesen werden. Dies könnte möglicherweise mit der schwachen Fluoreszenzintensität zusammenhängen. Eine gleichmäßige Verteilung eines zu erwartenden Fluoreszenzsignals über den gesamten Zellkern könnte daher unter die Detektionsgrenze gefallen sein.

GFP zeigte eine diffuse Verteilung über die gesamte Zelle. In GFP negative Zellen war keine Färbung mit dem Flag/TxRed Antikörpern zu beobachten, was auf eine Spezifität der Färbung deutet.

Zusammenfassend konnte unter den hier verwendeten Bedingungen kein Einfluss einer EGF-vermittelten Phosphorylierung von Smif auf Interaktion und Lokalisation von Faktoren, welche mit dem *Decapping* assoziieren, beobachtet werden. Bezogen auf die durchgeführten Experimente bestehen keine Hinweise einer Beeinflussung des *Decapping* durch die Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321.



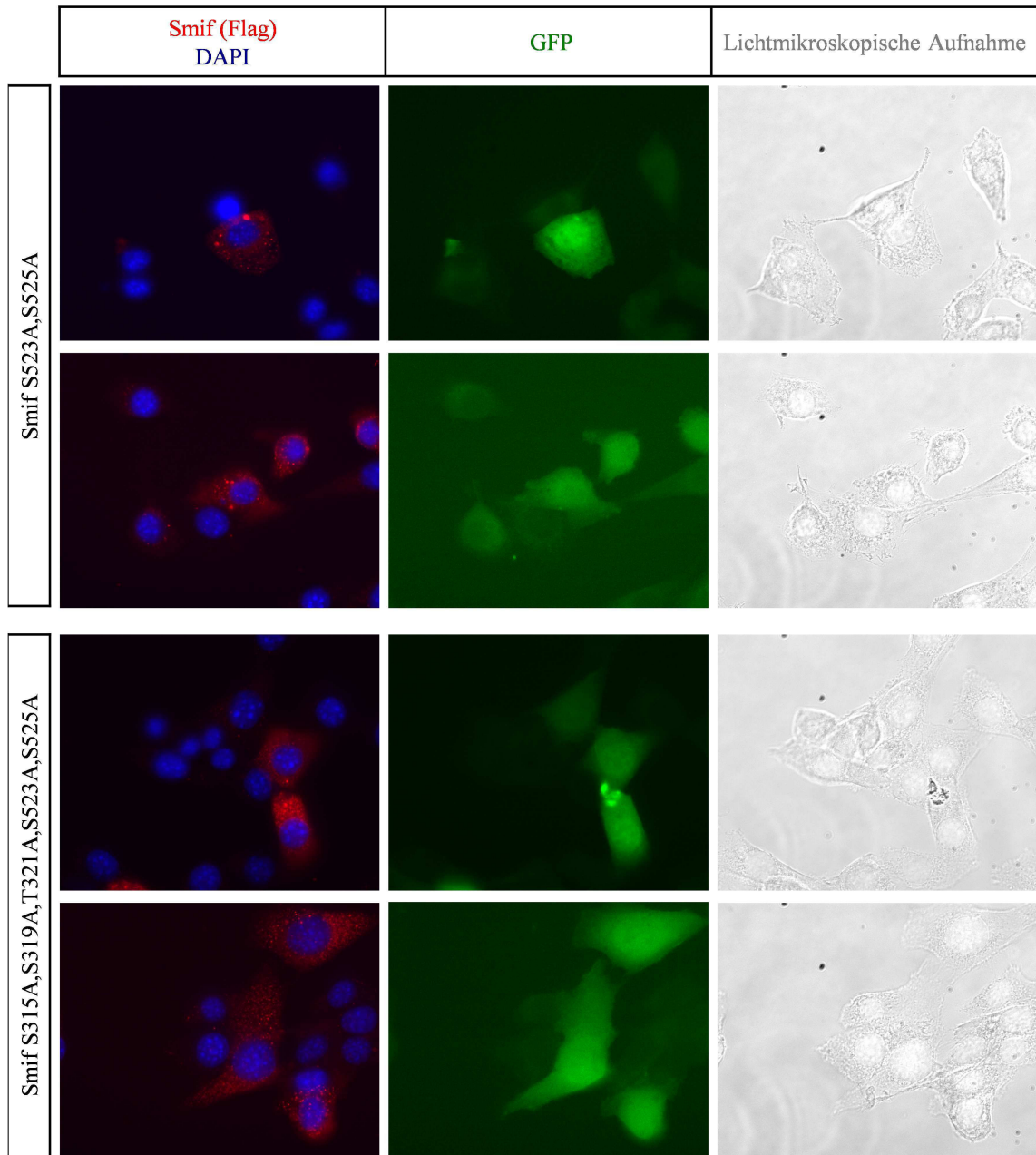


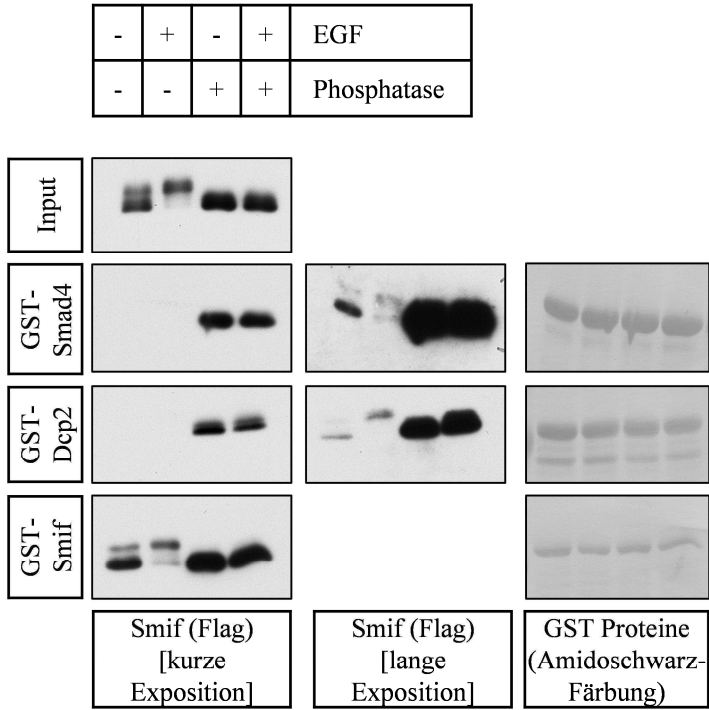
Abbildung 3.39 Untersuchung der Lokalisation von Smif mittels Immunfluoreszenz: Maus Embryonale Fibroblasten (Mef), die entweder wild-typ Smif oder Phosphorylierungs-defizientes Smif stabil exprimierten, wurden mittels Antikörpern gegen den Flag-tag der Smif-Konstrukte angefärbt. Die Retroviralen Smif-Konstrukte exprimierten zusätzlich über eine IRES das Fluoreszenzmolekül eGFP. Gebundene Flag-Antikörper wurden mittels TexasRed markierten anti-Maus Antikörper nachgewiesen.

3.12 Einfluss weitere Phosphorylierungsstellen auf die Funktion von Smif – N-terminale Phosphorylierung reguliert die Interaktion mit Smad4

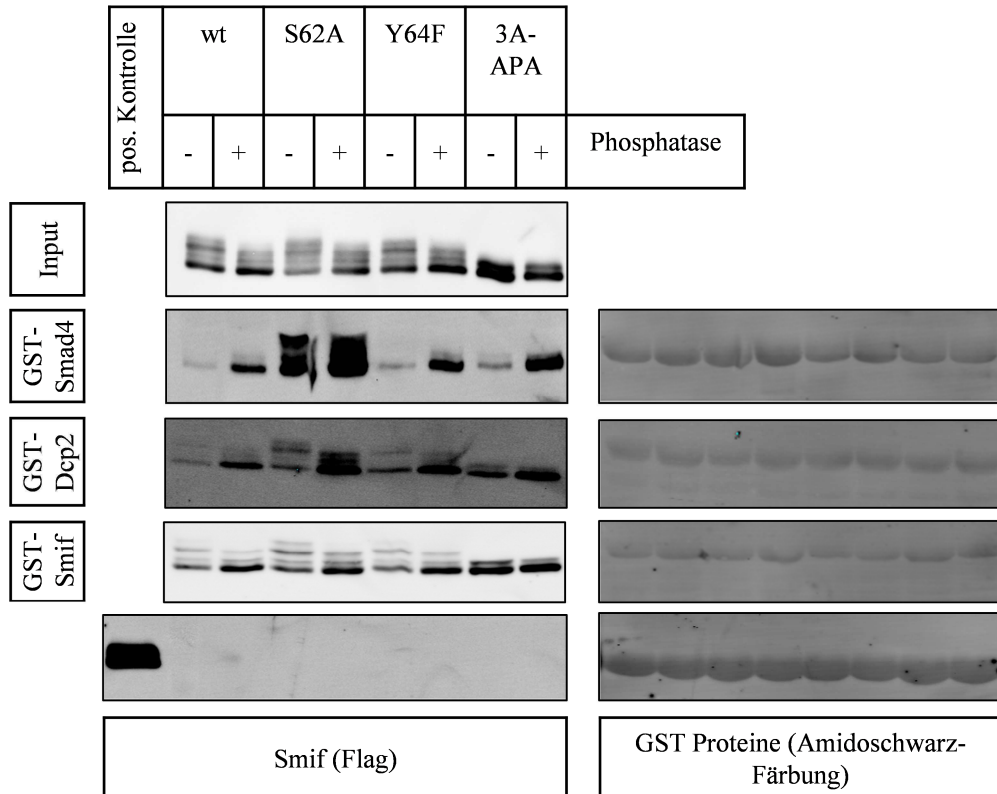
Mit der deutlich gestiegenen Zahl an publizierten Phosphorylierungsstellen stellte sich die Frage, inwiefern andere Phosphorylierungsstellen eine funktionelle Relevanz haben. Zur Beantwortung der Frage wurde in einem Versuchsansatz Smif aus Zelllysaten *in vitro* dephosphoryliert und dessen Interaktion mit Smad4, Smif und Dcp2 untersucht. Interessanterweise zeigte sich dabei eine deutlich stärkere Bindung von dephosphoryliertem Smif an GST-Smad4 als auch GST-Dcp2. Die Bindung von Smif an GST-Smif blieb nahezu unbeeinflusst (Abbildung 3.40a). Sowohl die Assoziation von Smif mit Smad4 als auch mit Dcp2 wird über den N-Terminus vermittelt. Demgegenüber steht eine C-terminal bedingte Oligomerisierung von Smif. Die Verstärkung der Interaktion von Smif mit Smad4 als auch Dcp2 durch Phosphatasebehandlung deutet auf eine mögliche inhibitorische Phosphorylierung von Smif. Aufgrund überlappender Interaktionsstellen zwischen Smad4 und Dcp2 wurden daher potentielle Phosphorylierungsstellen im N-Terminus von Smif inaktiviert und deren Bindungseigenschaften gegenüber Smad4 und Dcp2 untersucht (Abbildung 3.40b). Dabei zeigte sich eine verstärkte Bindung von Smif S62A an GST-Smad4 und GST-Dcp2 in Vergleich zu *wild-typ* Smif. Dephosphorylierung dieses Konstruktes erhöhte dessen Interaktion leicht, während die von *wild-typ* Smif deutlich gesteigert wurde. Serin 62 wurde mehrfach als eine Phosphorylierungsstelle in der Literatur beschrieben^{181,187-189}. Tyrosin 64, welches ebenfalls phosphoryliert wird^{181,188-190}, zeigte, wie *wild-typ* Smif, eine schwache Interaktion mit GST-Smad4 und GST-Dcp2, wenn die Phosphorylierungsstelle durch Phenylalanin-Substitution inaktiviert wurde. *In vitro* Dephosphorylierung von Smif Y64F erhöhte dessen Bindung an GST-Smad4 und GST-Dcp2 vergleichbar der von *wild-typ* Smif. Inaktivierung der Phosphorylierungsstellen an S315,S319,T321 in Kombination mit S523,S525 zeigte ebenfalls eine verstärkte Interaktion nach Behandlung mit Phosphatase. Zusammenfassend deuten die Daten auf eine Phosphorylierung von Smif an Serin 62, welches die N-terminal vermittelte Interaktion mit Smad4 und Dcp2 negativ beeinflusst.

Die Beeinflussung der Interaktion durch Phosphorylierung an S62 lässt eine Abhängigkeit der Smif-vermittelten Transkriptionsregulation von dieser Phosphorylierung im N-Terminus vermuten. Um dieser Frage nachzugehen wurden Reporter Assays durchgeführt. Überexpression von *wild-typ* Smif in Hela Zellen führte zu einer etwa 10-%ige Erhöhung der Transkriptionsaktivität des SBE₄-luc Reporters im Vergleich zur Kontrolltransfektion. Demgegenüber zeigten Zellen, welche mit Smif S62A transfiziert wurden, eine über 30-%ige Steigerung in der Reporter Aktivität nach Stimulation mit TGFβ (Abbildung 3.40c). Die Phosphorylierungs-bedingte Abhängigkeit der Smif-Smad4 Interaktion korreliert mit einer eingeschränkten Funktionalität von Serin 62 phosphoryliertem Smif.

a.



b.



c.

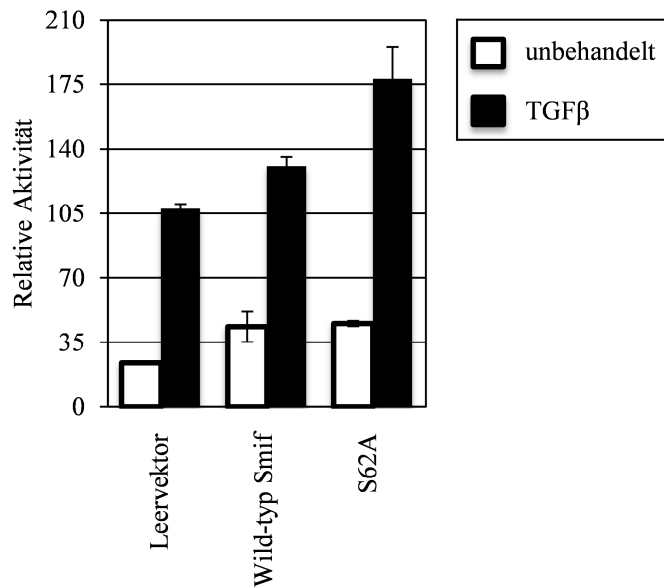


Abbildung 3.40 Phosphorylierung an Serin 62 inhibiert die Aktivität von Smif: a. Phoenix-E Zellen wurden mit wild-typ Smif transfiziert und mit 150 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Zellysate wurden präpariert und *in vitro* mit alkalischer Phosphatase für 45 min bei Raumtemperatur behandelt. Lysate wurden anschließend im GST-Pulldown mit GST-Smad4, GST-Dcp2 und GST-Smif eingesetzt. Präzipitate wurden mittels Western Blot analysiert. b. Unterschiedliche Phosphorylierungs-defiziente Smif-Konstrukte wurden in Phoenix-E Zellen exprimiert. Lysate wurden präpariert und *in vitro* mit alkalischer Phosphatase für 45 min bei Raumtemperatur behandelt. Lysate wurden anschließend im GST-Pulldown mit GST-Smad4, GST-Dcp2 und GST-Smif eingesetzt. Präzipitate wurden mittels Western Blot analysiert. c. Wild-typ Smif oder Smif S62A wurden transient in HeLa Zellen exprimiert. Zellen wurden mit dem SBE₄-luc Reporter transfiziert, nach 24 h für 12 h gehungert und anschließend mit 4 ng/ml TGFβ in Gegenwart von 2,5 % FCS für 18 h stimuliert. Die firefly Luciferase-Aktivität wurde relativ zur renilla Luciferase-Aktivität bestimmt.

4 Diskussion

4.1 Phosphorylierungs-bedingte Veränderung der Migration von Smif in der SDS-PAGE – Möglichkeiten und Grenzen dieser Analysemethode

Die Proteinphosphorylierung stellt eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen dar, durch die Funktion, Stabilität oder Lokalisation reguliert werden kann. Kinasen und Phosphatasen, welche diesen reversiblen Prozess katalysieren, agieren als Vermittler zwischen intrinsischen und extrinsischen Signalen und ihren Substraten den Effektorproteinen.

Zahlreiche Methoden zum Nachweis von Proteinphosphorylierungen existieren. Klassische Methoden stellen die *in vivo* oder *in vitro* Markierung von Proteinen mittels radioaktivem Phosphor oder die 2D-Gelelektrophorese dar. Spezifische Nachweismethoden von Phosphorylierungsstellen mit Antikörpern, welche Phosphopeptide erkennen, sind gleichfalls etabliert. Eine Methode, welche in den letzten Jahren verstärkt das Feld der Proteinphosphorylierung verändert hat, ist die Massenspektrometrie. Mit ihr lassen sich posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen qualitativ und quantitativ sowie Seitengruppenspezifisch nachweisen.

Auch in der SDS-PAGE lassen sich Proteinphosphorylierungen beobachten. So wurde dies beispielsweise für die Proteine E1A¹⁹¹ und CBP¹⁸² beschrieben. Die Phosphorylierung eines Proteins führt dabei zu einer verminderten Migration in der SDS-PAGE und einem Laufverhalten, was einem Protein höheren Molekulargewichts entspricht. Das veränderte Laufverhalten kann dabei auf unterschiedliche Konformationszustände im Polyacrylamidgel zurückgeführt werden oder durch eine verminderte Bindung von SDS an das Protein ausgelöst werden^{183,192}.

Interessanterweise zeigte sich im *Western Blot* mit Antikörpern gegen Smif in Lysaten humaner und muriner Zelllinien verschiedene Banden im Bereich um die 70 kDa (Abschnitt 3.2.1). Diese können zum einen durch posttranslationale Modifikationen, alternatives Protein-Splicing oder Kreuzreaktionen des Antikörpers bedingt sein. Letztere zwei Möglichkeiten können aufgrund folgender Beobachtungen ausgeschlossen werden: Expression eines cDNA Konstruktes, welche die für ein alternatives mRNA Splicing nötigen Intron Elemente nicht enthält, zeigt ein gleiches Bandenmuster in denselben Zelllinien. Herunterregulierung der Expression von Smif mittels genspezifischem *knock-out* oder siRNA führte zu einem Verlust aller beobachteten Banden im *Western Blot* und schließt eine Kreuzreaktion des Antikörpers nahezu aus. Zudem bestätigten Experimente mit Flag-markiertem Smif das Bandenmuster im *Western Blot*. Der Nachweis, dass es sich um eine Phosphorylierung handelt, wurde weiterhin durch Punktmutationen bestätigt. Serin zu Alanin-Substitutionen an verschiedenen potentiellen Phosphorylierungsstellen führte bei Mutationen S315A, S319A, T321A zu einem Verlust der Bande mit dem höheren Molekulargewicht (3.2.2). Umgekehrt Aspartat- bzw. Glutamat-Substitution an dieser Stelle führte zu einer vollständigen Verschiebung der Banden hin zu höheren Molekulargewicht,

selbst unter Bedingungen, in denen keine Phosphorylierung induziert wurde. Ein zweiter Ansatz, bei dem Smif *in vitro* dephosphoryliert wurde, bestätigte eine Phosphorylierungs-induzierte Migration von Smif hin zu höherem Molekulargewicht. Der Nachweis einer distinkten Bande in der SDS-PAGE nach Behandlung mit Phosphatase schließt darüber hinaus die Existenz anderer posttranslationaler Modifikationen wie Ubiquitinierung oder Glykosylierung unter den gemessenen Bedingungen (EGF Stimulation) aus. Wichtig ist dabei zu erwähnen, dass stabile Phosphorylierungs-Mimikry an S315,S319,T321 ihr Laufverhalten in der SDS-PAGE nach Behandlung mit Phosphatase nicht veränderten. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass die Phosphorylierung an S315,S319,T321 sekundär eine weitere Phosphorylierung an einer anderen Stelle induziert, welche für das veränderte Laufverhalten verantwortlich ist. Die Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321 stellt somit ein weiteres Beispiel eines Phosphorylierungs-induzierten anormalen Laufverhaltens in der SDS-PAGE dar.

Der Vorteil dieser Methode stellt die relativ einfache quantitative Analyse des Phosphorylierungszustandes dar, welche sich aus dem Verhältnis der Intensität der Banden ergibt. Gleichzeitig zeigen die Daten aus der Massenspektrometrie einen erheblichen Nachteil dieser Methode auf. Nach derzeitigem Stand deuten die Daten in der Literatur auf eine multiple Phosphorylierung von Smif, welche zum Teil unter bestimmten Bedingungen gleichzeitig auftreten (Abschnitt 3.1). Diese sind mittels SDS-PAGE bzw. *Western Blot* im Fall von Smif nicht erfassbar. Insofern können mittels SDS-PAGE und *Western Blot* weitergehende Aussagen über den Zustand anderer Phosphorylierungsstellen neben S315,S319,T321 nicht getroffen werden.

4.2 Der Phosphorylierungsstatus von Smif unter verschiedenen Bedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studien zur Untersuchung der Phosphorylierung von Smif zeigten eine induzierbare und quantitative Phosphorylierung von Smif unter unterschiedlichsten Bedingungen. Die Daten deuten darauf, dass die Phosphorylierung von Smif als Sensor extrazellulärer Stimuli wie Mitogene oder Stress als auch als Sensor für intrazelluläre Zustände wie Zellzyklusphasen dient. Die Phosphorylierung ist dabei ein regulatorisches Element für die Funktion von Smif als Transkriptions-Cofaktor. Sie weist damit Gemeinsamkeiten mit der Phosphorylierung der Linker Region von Smad-Proteinen auf.

4.2.1 Phosphorylierung von Smif in proliferierenden Zellen durch Mitogen aktivierte Signalkaskaden

Olsen et al. identifizierten in einem der ersten globalen Ansätze zur Charakterisierung der Phosphorylierung von Proteinen in HeLa Zellen 6600 Phosphorylierungsstellen in 2244 Proteinen, wovon 14 % der untersuchten Phosphorylierungsstellen durch EGF reguliert wurden. Darunter waren mit S142,S144; S353 und S315,S319,T321 mehrere Phosphorylierungsstellen von Smif. Während die ersten beiden Phosphorylierungsstellen statischer Natur waren, zeigte S315,S319,T321 eine EGF-vermittelte Induktion der Phosphorylierung¹⁷².

Eine EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321 konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 3.4). Aufgrund der quantitativen Verschiebung des Signals im *Western Blot* hin zum phosphoryliertem Zustand ist von einer nahezu vollständigen Phosphorylierung aller Smif Moleküle in Hela Zellen auszugehen. Dieser Effekt trat unabhängig von der Stimulation mit TGF β auf (Abbildung 3.8). Untersuchungen in Hela Zellen, welche Smif mit inaktivierten Phosphorylierungsstellen S142,S144 oder S353 exprimierten, zeigten eine EGF induzierte Phosphorylierung an S315,S319,T321 und deuten auf eine Phosphorylierung von Smif unabhängig vom Phosphorylierungsstatus an den beiden anderen Stellen (Abbildung 3.4). Zwar wurde die Präsenz der Phosphorylierung an S142,S144 bzw. S353 nicht bestätigt, aber in Anbetracht des gleichen zellulären Systems sowie gleichen Bedingungen, was Hungerphasen und Konzentration an EGF betrifft, ist eine Phosphorylierung an beiden Stellen wahrscheinlich.

Die Phosphorylierung von Smif konnte in weiteren humanen und murinen zellulären Systemen bestätigt werden, was auf eine generelle EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif in Zellen mit aktivierbaren EGF Signalweg deutet. Studien mit anderen Proliferation stimulierenden Faktoren wie *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2) oder Interleukin-3 (IL-3) führten ebenfalls zu einer nahezu vollständigen Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321 (Abschnitt 3.3). Die Phosphorylierung an S315,S319,T321 scheint somit nicht nur auf EGF begrenzt sondern durch zahlreiche Mitogene bestimmt zu sein. Eine Phosphorylierung von Smif über Hela Zellen hinaus in NIH3T3, Ba/F3 oder Phoenix E Zellen deutet auf eine generelle Phosphorylierung in Zelltypen unterschiedlicher entwicklungsbiologischer Herkunft.

Verschiedene experimentelle Ansätze zeigten dabei, dass ERK1/2 Kinasen für die Phosphorylierung von Smif verantwortlich sind (Abschnitt 3.6.1). Inhibition von MEK1/2 durch den UO126 Inhibitor deuten auf MEK1/2 selbst oder durch MEK1/2 aktivierte Kinasen wie ERK1/2. RNA-Interferenz basierende *knock-down* Experimente in NIH3T3 Zellen, schließen MEK1/2 aus und deuten auf ERK1/2 oder nachfolgende Kinasen. Zwei Punkte sind hierbei zu erwähnen. Zum einen zeigten Stimulationsexperimente mit UV keinen Einfluss von ERK auf die Phosphorylierung von Smif. Smif wird daher in Abhängigkeit vom situativem Hintergrund durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert. Zweitens konnte die FGF2 vermittelte Phosphorylierung von Smif in Zellen mit ERK1 oder ERK2 Herunterregulation nicht beeinflusst werden. Wenngleich für ERK1 und ERK2 spezifische Funktionen in der Literatur beschrieben sind^{193,194}, scheint die Phosphorylierung von Smif durch ERK1/2-Kinasen redundant zu sein. Eine vollständige Blockierung der Expression von ERK1 und ERK2 zusammen konnte nicht erreicht werden, was die beobachtete partielle Inhibition der FGF2-vermittelten Phosphorylierung von Smif erklären könnte. Eliminierung von ERK1 und ERK2 zusammen führt in adulten Mäusen innerhalb kürzester Zeit zum Tod durch multiples Organversagen, was auf eine essentielle Rolle von ERK bei der normalen Homöostase deutet¹⁹⁵. Es ist daher vorstellbar, dass in den Experimenten mit NIH3T3 Zellen diejenigen mit einem vollständigen Verlust von ERK1 und ERK2 negativ selektioniert wurden, währenddessen Zellen mit einer Restaktivität an ERK1/2 überlebten.

In weitergehenden Experimenten konnte eine direkte Phosphorylierung von Smif durch ERK *in vitro* nachgewiesen werden. Die dabei verwendeten bakteriell aufgereinigten Proteine ERK1

und GST-Smif schließen Kontaminationen mit anderen eukaryontischen Kinasen aus. Mutationen an S315, S319, T321 blockierten die Phosphorylierung partiell. Kombinationen mit anderen Phosphorylierungsstellen konnten dabei das Phosphorylierungssignal nicht vorständig eliminieren und deuten auf weitere ERK-vermittelte Phosphorylierungen über die getesteten Phosphorylierungsstellen hinaus hin.

Aminosäuresequenzen um Serin 315 und Serin 319 entsprechen publizierten ERK Konsensus-Sequenzen und würden eine ERK vermittelte Phosphorylierung von Smif stützen^{196,197}. Gleichfalls konnte in einem proteomischen Ansatz Smif als Interaktionspartner von ERK1 identifiziert werden¹⁹⁸. Die Kinetik der FGF2- als auch der EGF-vermittelten Aktivierung von ERK liegt unabhängig vom den verwendeten zellulären Systemen im Bereich von wenigen Minuten^{172,199-201}. Messungen von pERK1/2 im Rahmen dieser Arbeit bestätigen eine schnelle Aktivierung beider Kinasen zum Zeitpunkt oder unmittelbar vor der Phosphorylierung von Smif. Eine temporäre Korrelation der Aktivierung von ERK und Phosphorylierung von Smif unterstützt eine ERK vermittelte Phosphorylierung von Smif *in vivo*. Vergleichbare Kinetiken bei der ERK vermittelten Phosphorylierungen anderer Komponenten der TGFβ-Signalkaskade nach Stimulation mit EGF sind in der Literatur beschrieben. Hier wurden Phosphorylierungen in der Linker Region von Smad-Proteinen nach 15 bis 30 min für Smad3 bzw. nach 10 min für Smad1 gemessen^{150,157}.

Hela Zellen zeigten eine EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif in Gegenwart von aktivierten ERK1/2. Inhibition von MEK1/2 durch UO126 und indirekte Blockierung von ERK hob die EGF-vermittelte Phosphorylierung von Smif interessanterweise nicht auf (Abbildung 3.10b). Stattdessen deuten Studien mit Inhibitoren gegen p38 und JNK auf eine EGF-vermittelte Phosphorylierung über diese beiden MAP-Kinasen (Abbildung 3.14b). Sowohl p38 als auch JNK können in Hela Zellen durch EGF aktiviert werden. Ähnlich der Kinetik von ERK erfolgt dies innerhalb weniger Minuten^{202,203}. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass EGF aktiviertes JNK, p38 oder ERK Smif phosphorylieren. Während ERK durch Inhibition von MEK durch UO126 inaktiv ist, würden JNK bzw. p38 diese Funktion übernehmen. In diesem Fall muss davon ausgegangen werden, dass die JNK und p38 Inhibitoren SP600125 und SB203580 direkt oder indirekt die ERK-Aktivität blockieren, da sich eine Inhibition der Phosphorylierung nach Stimulation mit EGF in Gegenwart dieser Inhibitoren sonst nicht erklären lässt. Alternativ könnte ERK aufgrund einer Lokalisation in einem anderen Kompartiment für eine Phosphorylierung von Smif nicht zur Verfügung stehen. Studien zur Aktivität dieser drei MAP-Kinasen unter den verwendeten Bedingungen könnten näheren Aufschluss darüber liefern.

4.2.2 MAP-Kinase vermittelte Phosphorylierung von Smif nach zellulärem Stress

Unterschiedlichste Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Cytokine initiieren intrazellulär p38- und JNK-MAP-Kinase Kaskaden nach Behandlung von Zellen mit UV-Licht oder osmotischem Stress²⁰⁴. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Smif nach Aussetzung zellulärem Stress durch UVC Bestrahlung oder hohe Salzkonzentrationen an S315, S319, T321 phosphoryliert wird (Abbildung 3.9). Die Verschiebung des Signals in der SDS-PAGE hin zum

phosphorylierten Zustand war dabei vorständig und zeigt eine quantitative Phosphorylierung an. Studien mit Inhibitoren zeigten, dass JNK sowie p38 MAP-Kinasen Smif dabei phosphorylieren. Inhibitoren gegen JNK und p38 beeinflussten die FGF2 vermittelte Phosphorylierung von Smif durch ERK in NIH3T3 Zellen nicht und deuten auf eine Spezifität der Inhibitoren unter den verwendeten Bedingungen (Abbildung 3.14a). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass ERK UV-vermittelt Smif phosphoryliert. Dies spiegelt sich auch in dem Aktivierungsstatus der Kinasen wieder. Während aktivierende Phosphorylierungen von JNK1/2 und p38 nachweisbar sind, sind die Level an phosphorylierten ERK1/2 niedrig. Gleichfalls beeinflusst der MEK-Inhibitor UO126 die UV-vermittelte Phosphorylierung von Smif in murinen Fibroblasten nicht (Abbildung 3.13).

Sowohl JNK als auch p38 bilden neben ERK eine Untergruppe der MAP-Kinase Familie. Untersuchungen hinsichtlich ihrer Substratspezifität mittels Peptid-Bibliotheken zeigten für ERK2, p38 α , p38 δ und JNK2 keine Unterschiede innerhalb der ersten 9 Aminosäuren um die Phosphorylierungsstelle selbst²⁰⁵. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass Smif durch unterschiedliche MAP-Kinasen phosphoryliert werden kann.

Adapterproteine bzw. Lokalisation der Kinase stellen weitere Bedingungen für eine Phosphorylierung dar. JNK kann sowohl nukleär als auch cytoplasmatisch lokalisiert sein. Eine Interaktion von JNK mit Smif-haltigen P-Bodies im Cytoplasma nach Induktion zellulären Stress mit Arsenat wurde in der Literatur beschrieben²⁰⁶. Es konnte auch eine Phosphorylierung von Smif an S315, S319, T321 nach Arsenat Behandlung in einer anderen Studie gezeigt werden, wenngleich die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase nicht identifiziert wurde²⁰⁷. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte JNK als direkte MAP-Kinase sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bei der Phosphorylierung von Smif an S315 in Folge zellulären Stresses durch Anisomycin oder Sorbitol nachgewiesen werden¹³¹. Diese Daten stehen im Einklang mit Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit und deuten auf eine generelle Phosphorylierung von Smif unabhängig vom Induktor des zellulären Stresses. Im Gegensatz zu den Daten von Rzekowski et al.¹³¹, welche der p38 MAP-Kinase keine oder eine geringe Rolle bei der Phosphorylierung von Smif zuordnen, deuten die Daten im Rahmen dieser Arbeit auf eine Rolle beider JNK und p38 MAP-Kinase Unterfamilien. Weder Inhibition von JNK oder p38 MAP-Kinasen allein blockierte die UV-vermittelte Phosphorylierung von Smif (Daten nicht gezeigt). Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation und Aktivität von p38 unter den unterschiedlichen Bedingungen könnten eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz sein. Literaturrecherchen zeigten keine Daten hinsichtlich einer Co-Lokalisation von p38 mit Smif-haltigen P-Body-Strukturen. Aber RNA bindende Proteine wie TTP, welche mit Smif assoziieren können, wurden schon als p38 MAP Kinase Substrate identifiziert^{208,209}.

4.2.3 Veränderungen des Phosphorylierungszustandes von Smif während des Zellzyklus

Während des Zellzyklus treten zahlreiche Veränderungen in den Expressionslevel, der Lokalisation oder den posttranslationalen Modifikationen von Proteinen auf. Veränderungen in

der Proteinphosphorylierung im Zellzyklus wurden für über 1000 Proteine in der Literatur beschrieben^{178,180}.

Zellzyklusphasen stabilisierende Inhibitoren wie Nocodazol und Taxol nicht aber Thymidin zeigten eine veränderte Migration von Smif in der SDS-PAGE (Abbildung 3.15 & Abbildung 3.16). Phosphatase-Experimente konnten eine Phosphorylierung dem veränderten Laufverhalten zuordnen. Während Thymidin²¹⁰ Zellen im G1/S Übergang blockiert, arretieren Zellen in Gegenwart von Nocodazol²¹¹ oder Taxol^{212,213} in der Prometaphase der Mitose und deuten auf eine Phosphorylierung von Smif in der Mitose, welche zügig nach Übergang in G1 aufgelöst wird. Substitutionen am S315,S319,T321 zu Alanin blockierten partiell die phosphorylierungsbedingte Verschiebung in der SDS-PAGE und deutet auf eine Phosphorylierung an S315,S319,T321 und darüber hinaus (Abbildung 3.16). Ähnliche Ergebnisse wurden schon bei Experimenten mit dem Phosphatase-Inhibitor Okadainsäure erzielt (Vgl. Abbildung 3.4 & Abbildung 3.16). Gemeinsamkeiten zwischen beiden Experimenten ließen sich auch bei der Zellmorphologie beobachten. In beiden Fällen trat eine Auflösung von Zytoskelettstrukturen mit einem Abrunden der Zellen, welche als Suspension im Medium schwimmen, auf. Okadainsäure scheint somit Mitose-ähnliche Zustände in der Zelle zu induzieren, was in der Literatur schon beschrieben wurde²¹⁴. Ob weitere Phosphorylierung von Smif während der Mitose auftreten wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Interessant ist dabei aber ein Blick in die Literatur. Phosphorylierungen von Smif an S315,S319,T321 in der Mitose wurden in zwei von drei proteomischen Ansätzen beschrieben^{178,180}. In einem dritten Experiment, in dem eine Phosphorylierung an dieser Stelle identifiziert wurde, konnte keine Anreicherung gegenüber der S-Phase nachgewiesen werden¹⁷⁹. Daneben wurden auch andere Zellzyklus-regulierte Stellen an S12, S353, T401, S525, S527 nachgewiesen, welche, bis auf S525, S527, wo Widersprüche zwischen den Publikationen auftreten, in der Mitose angereichert waren¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Auffällig ist dabei, dass S12 und S353 eine sehr hohe Stöchiometrie der Phosphorylierung (78 % für S12 & 99 % für S353) aufwiesen¹⁸⁰. Es ist daher vorstellbar, dass neben S315,S319,T321 weitere Phosphorylierungsstellen mit einem hohen Grad an Phosphorylierung vorliegen. In Experimenten mit Okadainsäure im Rahmen dieser Arbeit, in denen S353 in Smif inaktiviert wurde, konnten aber keine Veränderung in der Migration während der SDS-PAGE beobachtet werden. Potentiell phosphoryliertes S353 lässt daher keine Erklärung für das Laufverhalten in der SDS-PAGE von Smif aus Mitose-arretieren Zellen zu.

Studien von Swetloff et al. vermuteten eine posttranslationale Modifikation von Smif in der Metaphase II der Oogenese ausgehend von einem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE. Diese Proteinmodifikation, welche nicht genauer charakterisiert werden konnte, korreliert mit einer Destabilisierung der P-Body Strukturen im Cytoplasma²¹⁵. In Anbetracht eines in der Literatur beschriebenen phosphorylierungs-bedingten Abbaus Smif-haltiger P-Bodies¹³¹, ist daher zu vermuten, dass in der Meiose eine Phosphorylierung an S315,S319,T321 auftritt.

Cyclin-dependent kinases (CDKs) bilden zusammen mit Aurora-Kinasen, Polo-like Kinasen und NIMA Kinasen wesentliche Kinasen in der mitotischen Phosphorylierung²¹⁶. CDK-vermittelte Phosphorylierungsstellen weisen wie MAP-Kinasen ein Prolin in Position +1 auf²¹⁷. Ein in der Mitose aktiver CDK1-Cyclin B1 Komplex wäre daher als verantwortliche Kinase für die Phosphorylierung von Smif vorstellbar. *In vitro* Kinase-Assays mit

CDK1-Cyclin B1 Kinase zeigten eine Phosphorylierung von Smif, welche aber, wie Studien mit Phosphorylierungs-defizienten Mutanten zeigten, nicht an S315,S319,T321 stattfand (Abbildung 3.18). Die Phosphorylierung kleinerer Degradationsfragmente deutet auf eine Phosphorylierung nahe dem N-Terminus, da Smif C-terminal von GST fusioniert wurde und GST selbst keine Phosphorylierung durch CDK1-Cyclin B1 zeigte. Inwiefern andere Aminosäuren von Smif durch CDKs phosphoryliert werden, könnte Gegenstand weitere Experimente sein.

Parallel dazu wurden Studien mit Inhibitoren, welche MEK oder CDKs *in vivo* in U2OS Zellen blockieren, durchgeführt (Abbildung 3.17). Die Inhibition von MEK und indirekt von ERK durch den Inhibitor UO126 führte zu keiner Veränderung im Phosphorylierungszustand von Smif. Zelltyp-abhängige Funktionen von ERK während dem G2/M Übergang sind in der Literatur beschrieben^{218,219}. Wenngleich Mitogen-aktiviertes ERK Smif phosphoryliert, scheint ERK keine Rolle bei der mitotischen Phosphorylierung zu spielen. Dafür sprechen auch Messungen der Aktivität von ERK unter den verwendeten experimentellen Bedingungen. Nocodazol behandelte U2OS Zellen wiesen eine deutlich verminderte Aktivität (pERK) auf, als unsynchronisierte Zellen. Im Gegensatz dazu hob die Blockierung von CDKs durch Purvalanol A die Phosphorylierung von Smif auf, was auf eine direkte oder indirekte Rolle von CDKs deutete. Dabei kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass der durch Nocodazol bedingte mitotische Arrest durch die Blockierung von CDKs aufgehoben wurde und die Zellen im Zellzyklus weiterliefen²²⁰. Experimente im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass beim Übergang von der Mitose in den G1-Zyklus Smif zügig dephosphoryliert wird (Abbildung 3.15b).

Inwiefern andere Kinasen bei der Zellzyklus bestimmten Phosphorylierung von Smif eine Rolle spielen, wurde nicht untersucht. Interessant hierbei ist, dass T315 eine Konsensus-Sequenz für Nek6 aufweist, welche zur Familie der NIMA-Kinasen gehört. Ausgeschlossen werden kann ebenfalls nicht, dass die Phosphorylierung durch Störungen in der Mikrotubulinstruktur induziert wurden, welche durch Nocodazol und Taxol hervorgerufen werden. Aktivierungen der MAP-Kinasen ERK, JNK oder p38 wurden unter solchen Bedingungen beschrieben^{221,222}.

Die Beeinflussungen der TGFβ-Signalkaskade durch den Zellzyklus ist in der Literatur beschrieben worden. Die direkte Phosphorylierungen von Smad2 und Smad3 durch G1/S aktive CDK2 oder CDK4 Kinasen blockiert dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor^{159,223}. Phosphorylierungen von Smad2/3 während der Mitose wurden ebenfalls beschrieben. Die Kinase Mps1, welche durch Nocodazol aktiviert wird, kann Smad2/3 an ihren C-terminale SSXS-Motiv phosphorylieren und aktivieren. Mps1 nutzt durch Phosphorylierung des SSXS-Motives den gleichen Aktivierungsmechanismus von R-Smad-Proteinen, wie der TGFβ-Rezeptor Komplex²²⁴. Ähnlichkeiten zwischen der Nocodazol vermittelten Phosphorylierung von R-Smad-Proteinen und Smif könnten auf Mps1 als mögliche Kinase für Smif hindeuten. Interessant dabei ist, dass der direkte Interaktionspartner von Smif, Smad4, Mps1 bindet und die Mps1 vermittelte Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 verstärkt²²⁴.

4.2.4 TGF β -vermittelte Phosphorylierung von Smif

Wie schon zuvor kurz angesprochen zeigte TGF β keine Einfluss auf die Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321 (Abbildung 3.8). Dies ist insofern interessant, als dass TGF β -vermittelte Aktivierungen intrazellulärer Kinasekaskaden beschrieben sind (siehe Abschnitt 1.2.4). MAP-Kinasen können über den nicht-kanonischen Signalweg des TGF β -Rezeptors aktiviert werden. JNK oder ERK vermittelte Phosphorylierungen in der Linker-Region von Smad-Proteinen wurden beispielsweise für Smad1 nach Stimulation mit BMP¹⁵⁰ oder Smad3 nach Stimulation mit TGF β beschrieben²²⁵. Eine TGF β -vermittelte Aktivierung von ERK kann dabei innerhalb weniger Minuten auftreten²²⁶. Aber auch andere Kinasen wie CDK2/4 oder GSK phosphorylieren Smad3 in der Linker Region TGF β -vermittelt²²⁷. Darüber hinaus ist der TGF β -Rezeptor selbst eine Serin/Threonin-Kinase und könnte Smif potentiell phosphorylieren. In Anbetracht dieser Daten wäre eine TGF β -vermittelte Phosphorylierung von Smif durchaus vorstellbar, konnte aber unter allen gemessenen Bedingungen nicht beobachtet werden. Entweder ist Smif einer Phosphorylierung unter diesen Bedingungen nicht zugänglich, weil möglicherweise die Signalstärke der aktivierten Kinasen in den verwendeten experimentellen Systemen nicht ausreichend ist. Alternativ könnte eine partielle Phosphorylierung von Smif durch TGF β -Liganden induziert werden, welche unterhalb der Nachweisgrenze durch die SDS-PAGE lag.

4.3 Phosphorylierungs-regulative Elemente beeinflussen die Funktion von Smif als Transkriptions-Cofaktor

4.3.1 Smif ist ein positiver Regulator der TGF β -Antwort – Charakterisierung von zwei Smif abhängigen TGF β -Zielgenen: PAI-1 und JunB

Überexpression von Smif verstärkt die Smad4-vermittelte TGF β -Antwort in verschiedenen Reporter-Assays und führt zu einer verstärkten Induktion von JunB nach Stimulation mit TGF β ¹²⁹. Umgekehrt zeigte eine genetische Inaktivierung des Smif Locus eine verminderte TGF β -Antwort¹³⁰. Diese Daten in der Literatur konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Rekonstitution von Mef-Zellen aus Smif *knock-out* Embryonen mit *wild-typ* Smif führte in Reporter-Assays mit SBE₄-luc und 3TP-lux zu einer verstärkten TGF β -Antwort im Vergleich zu Kontrollvektor transduzierten Zellen (Abbildung 3.19 & Abbildung 3.23). Umgekehrt konnte in NIH3T3 Zellen gezeigt werden, dass die Herunterregulation von Smif mittels siRNA die Aktivierung des SBE₄-luc Reporters negativ beeinflusste (Abbildung 3.20). Darüber hinaus konnte auf endogene Ebene eine Abhängigkeit von Smif bei der TGF β -induzierten Expression von PAI-1 und JunB gezeigt werden (Abbildung 3.24). PAI-1 und JunB stellen klassische TGF β -Zielgene dar, welche über den TGF β -Smad-Signalweg reguliert werden^{49,99,186}. Bisher sind Smif regulierte TGF β -Zielgene noch nicht genauer charakterisiert worden. JunB und PAI-1 stellen daher erste Vertreter dieser Gruppe dar. Im Einklang dazu stehen CHIP-Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, und eine

Bindung von Smif an Promotoren von PAI-1 und JunB zeigten (Abbildung 3.29). Reporter-Assays unterstützen eine Smif abhängige Regulation von JunB und PAI-1. Der SBE₄-luc Reporter besteht aus Smad-Bindungselemente des murinen JunB Promotors⁴¹. Der 3TP-lux Reporter enthält Elemente des humanen PAI-1 Promotors¹⁸⁵. Eine Bindung von Smif an diese Reporter-Konstrukte konnte mittels CHIP nachgewiesen werden (Abbildung 3.30 bzw. Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Uneingeschränkte Funktionalität von S315,S319,T321 Phosphorylierungs-defizienten Smif für die TGFβ-Signalkaskade

Vergleichende Studien in Zellen, welche *wild-typ* oder Phosphorylierungs-defizientes Smif S315A,S319A,T321A exprimierten, zeigten keine Unterschiede in der TGFβ-vermittelten Aktivierung von Reporter-Konstrukten SBE₄-luc und 3TP-lux (Abbildung 3.19 & Abbildung 3.23). Eine solche Hypothese konnte in Interaktionsstudien untermauert werden, welche keine Veränderungen in der Assoziation von *wild-typ* und Phosphorylierungs-defizientem Smif mit GST-Smad4 zeigten. Wie in den folgenden Abschnitten noch näher diskutiert wird, zeigten sich aber unter Bedingungen, bei denen die Phosphorylierung von Smif stimuliert wurde, phosphorylierungs-bedingte Effekte von Smif auf die Aktivität in den Reporter-Assays. Diese Beobachtungen ließe sich mit einer TGFβ-unabhängigen Phosphorylierung von Smif erklären und stehen im Einklang mit Daten, die keinen Einfluss von TGFβ auf die Phosphorylierung von Smif an S315,S319,T321 im *Western Blot* zeigten.

4.3.3 Etablierung von Modellsystemen zur Bestimmung des Einflusses mitogener Signalwege auf den TGFβ-Signalweg und deren Beeinflussung durch Smif

Wie in der Einleitung näher dargelegt wurde, agieren unterschiedliche Signalwege nicht individuell, sondern sind vielmehr in ein Netzwerk eingebunden, in dem sie sich gegenseitig beeinflussen. Zahlreiche Studien untersuchten den Einfluss von mitogenen Signalwegen auf den TGFβ-Signalweg. Allgemeine Rückschlüsse ließen sich dabei selten ziehen. Die vielfältigsten Beobachtungen, welche von synergistischen bis hin zu antagonistischen Effekten reichten, deuten auf eine starke Abhängigkeit vom zellulären Hintergrund als auch von den untersuchten Genen bzw. verwendeten Reporter Systemen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei in der Literatur gängig-verwendete Reporter Systeme SBE₄-luc und 3TP-lux getestet. Während der SBE₄-luc Reporter neben einer Minimalpromotorsequenz repetitive Smad-Bindungselemente enthält, weißt der 3TP-lux Reporter mit einer Kombination aus repetitiven „*TPA-response-elementen*“ und TGFβ-regulatorischen Elementen aus dem PAI-1 Promotor eine höhere Komplexität auf^{41,185}. Beide Reporter zeigten in Fibroblasten (NIH3T3 & Mef Zellen) eine TGFβ-vermittelte Aktivierung auf, welche Smif abhängig war.

Interessant ist ihr entgegengesetztes Verhalten bei gleichzeitiger Stimulation mit FGF2 oder EGF (Abbildung 3.22). Während die Transkriptionsaktivität des SBE₄-luc Reporters in

Gegenwart von FGF2 oder EGF inhibiert wird, verstärkt EGF nicht aber FGF2 die Aktivität des 3TP-lux Reporters. Dabei ist zu beachten, dass für alle Experimente mit dem gleichen zellulären System und gleichen stimulatorischen Bedingungen gearbeitet wurde.

Molekular ließe sich dies mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktorkomplexen an der DNA erklären. SBE₄-luc wird sehr stark über Smad3/4 aber weniger über Smad2/4 Transkriptionsfaktorkomplexe aktiviert^{41,228}. Im Einklang dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Smad4-Bindung an das Smad-Bindungselement des Reporters *in vitro* nachgewiesen werden (EMSA-Abbildung 3.27 & DNA-Pulldown-Abbildung 3.31). Die im EMSA beobachtete verstärkte Assoziation von Smad4 in Gegenwart von Smif lässt daher eine verstärkte Anreicherung von Smad3/4-Smif Komplexen an der DNA vermuten. Dies würde molekular erklären, warum Smif die Transkriptionsaktivität des SBE₄-luc Reporters steigert (siehe Abschnitt 4.4). Direkte Bindungen andere Transkriptionsfaktoren wurden im Rahmen der Charakterisierung des SBE₄-luc Reporters in der Literatur nicht beschrieben. Es ist daher vorstellbar, dass EGF bzw. FGF2 direkt über Phosphorylierungen von Smad-Proteinen Einfluss auf die Stabilität, nukleäre Lokalisation, Bindung an die DNA oder Aktivierung der Transkriptionsmaschinerie nimmt. ERK vermittelte inhibitorische Phosphorylierungen von Smad3 sind in der Literatur beschrieben¹⁵⁷. Ein alternatives Szenario wurde in Verrecchia et al. diskutiert. AP-1 Transkriptionsfaktoren können in Konkurrenz mit Smad-Proteinen um den limitierenden Cofaktor CBP/p300 treten und abhängig vom Promotor die TGFβ-vermittelte Genaktivierung negativ beeinflussen. Inhibitorische Effekte bei der TGFβ-vermittelten Transkription durch AP-1 Proteine wurden dabei für den SBE₄-luc Reporter gezeigt⁹⁷.

Im Gegensatz zum SBE₄-luc Reporter verstärkt EGF die TGFβ-Antwort in 3TP-lux Reporter-Assays. Ebenso wie der SBE₄-luc Reporter erfolgt die transkriptionelle Aktivierung des Reporters über TGFβ aktivierte Smad3/4 Komplexe²²⁹. Veränderungen in der Proteinstabilität scheinen daher eher unwahrscheinlich, da in diesem Fall ähnliche Effekte zwischen beiden Reporter-Assays zu erwarten wären. Das Design des 3TP-lux Reporters erlaubt aber auch noch eine andere mögliche Erklärungen. Das „TPA-response-elementen“ DNA Motiv kann zahlreiche verschiedene Transkriptionsfaktoren binden. Eine Bindung des Smad3/4 Komplexes an dieses Motiv im 3TP-lux Reporter wurde gezeigt und als funktionell relevant für die TGFβ-vermittelte Aktivierung des 3TP-lux Reporters identifiziert^{95,229}. Aber auch Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie wie c-Jun, Fos oder JunB können daran binden²³⁰. In einem alternativen Szenario könnten Smad3/4 Komplexe vom 3TP-lux Reporter nach Stimulation verdrängt oder inaktiviert werden und Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie die Aktivierung des Reporters übernehmen. Dieser Möglichkeit widerspricht aber die schwache Aktivierung des 3TP-lux Reporters durch EGF allein, welche mögliche negative Effekte von EGF auf Smad3/4 Komplexe nicht kompensieren könnte. Des Weiteren wurde eine Smad4-abhängige Aktivierung des 3TP-lux Reporters nach Stimulation mit EGF oder HGF in Abwesenheit von TGFβ in der Literatur beschrieben¹⁵⁴. Es liegt daher nahe, dass im Gegensatz zum SBE₄-luc Reporter potentiell negative Effekte im 3TP-lux Reporter durch Interaktionen mit AP-1 Transkriptionsfaktoren kompensiert werden. Physikalische und funktionelle Kooperationen zwischen Smad3/4 und c-Jun/Fos bzw. JunB/c-Fos bei der Aktivierung des „TPA-response-elemente“ sind in der Literatur beschrieben^{97,98}.

Zusammenfassend stehen diese Daten im Einklang mit der gängigen Vorstellung, dass die TGF β -Antwort neben einer Zelltypspezifität auch Kontext abhängig ist. Das Beispiel beider Reporterkonstrukte zeigt, dass unter gleichen zellulären Bedingungen unterschiedliche TGF β -Antworten möglich sind und veranschaulicht die Bedeutung der Gesamtheit aller Promotorelemente für die Regulation der Transkription^{6,7,47,231}.

4.3.4 Regulierung der Aktivität von Smif über dessen Phosphorylierung

Die Aktivität beider getesteter Reporterkonstrukte SBE₄-luc und 3TP-lux war sowohl in Gegenwart von TGF β allein als auch zusammen mit EGF oder FGF2 von der Expression von Smif abhängig und deutet auf eine Rolle von Smif bei der Transkriptionsregulation (Abschnitt 3.8). Dieser funktionelle Zusammenhang konnte durch direkte physikalische Interaktionen bekräftigt werden, welche zwischen Smif und Smad4 (GST-Pulldown) als auch Smif und Smad-DNA-Komplexen (*DNA-Pulldown* bzw. CHIP) unabhängig von der Phosphorylierung von Smif beobachtet wurden (Abschnitt 3.9). Zur Untersuchung, inwiefern die EGF- oder FGF2-bedingte Phosphorylierung von Smif eine Rolle spielen könnte, wurden Phosphorylierungs-defiziente Smif-Konstrukte generiert. Dabei zeigte sich, dass die Phosphorylierung an S315,S319,T321 bei der synergistischen Aktivierung des 3TP-lux Reporters nach Stimulation mit TGF β und EGF notwendig ist. Gleichzeitig ließen sich antagonistische Effekte von FGF2 bei der TGF β -vermittelten Transkription des SBE₄-luc Reporter genes nicht aufheben, wenn Phosphorylierungsstellen durch Substitution mit Alanin inaktiviert wurden. Experimente mit dem 3TP-lux Reporter in Gegenwart von EGF deuten daher auf eine funktionelle Relevanz der Phosphorylierung an S315,S319,T321 hin. Im Gegensatz dazu scheint die Phosphorylierung an S315,S319,T321 für die inhibitorischen Effekte von FGF2 gegenüber der Expression des SBE₄-luc Reporters nicht notwendig zu sein oder durch andere Phosphorylierungen kompensiert zu werden. In Anbetracht der Tatsache, dass Smif ein multiphosphoryliertes Protein ist, wurden weitere Phosphorylierungsstellen inaktiviert und ihr Einfluss auf die TGF β -EGF/FG2 Transkriptionsregulation getestet. Interessanterweise verstärkte die Inaktivierung an S523,S525 Effekte, die durch Blockierung der Phosphorylierung an S315,S319,T321 in 3TP-lux Reporter-Assays auftraten. Auch inhibitorische Effekte von FGF2 auf den SBE₄-luc Reporter wurden partiell unterdrückt.

Vergleiche zwischen den beiden Reportersystemen SBE₄-luc und 3TP-lux zeigten gegensätzliche Einflüsse der Phosphorylierung von Smif. Im Fall des 3TP-lux Reporters korrelierte die Phosphorylierung von Smif positiv mit der Aktivierung des Reporters, während im Fall des SBE₄-luc Reporters die Phosphorylierung negativ auf die Aktivierung des Reporters wirkte. Mit S523,S525 sind dabei identische Phosphorylierungsstellen relevant. Veränderungen in der DNA Assoziation bzw. Interaktion mit Smad4 von phosphoryliertem Smif konnten nicht gezeigt werden. Molekulare Erklärungen sind daher in der Smif-abhängigen Veränderung der Aktivität weiterer Faktoren zu suchen (Abbildung 4.1). Die Phosphorylierungs-abhängige Inhibition des SBE₄-luc Reporters lässt entweder die Bindung eines FGF2 abhängigen Repressors vermuten, welcher mit Smif wechselwirkt. Umgekehrt könnte alternativ bedingt

durch eine Phosphorylierung von Smif die Bindung eines Aktivators verloren gehen. Charakterisierungen der Transkriptionsregulation zeigten die Notwendigkeit des Cofaktors CBP/p300 für die Smif vermittelte Aktivierung¹²⁹. Inwiefern die Bindung von CBP an Smad4 durch Phosphorylierung von Smif beeinflussbar ist, ist bisher offen, könnte aber eine mögliche molekulare Erklärung darstellen. Alternativ könnte die Bindung eines Repressors wie z.B. AP-1 Transkriptionsfaktoren abhängig von der Phosphorylierung von Smif sein.

Wie im Abschnitt 4.3.3 erklärt wurde, legen Studien in der Literatur eine komplexere Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung des 3TP-lux Reporters nahe. EGF-vermittelte Phosphorylierungen von Smad-Proteinen bestimmen die Aktivierung des 3TP-lux Reporters mit¹⁵⁴. Eine Bindung von AP-1 Transkriptionsfaktoren, welche durch EGF in ihrer Expression induziert sowie durch MAP-Kinasen phosphoryliert und aktiviert werden, könnte die Transkriptionsaktivierung mitbestimmen²³². Phosphoryliertes Smif, welches die Transkription des 3TP-lux Reporters erhöht, könnte dabei in seiner phosphorylierten Form die Bindung dieser Faktoren stabilisieren.

Unterschiede zwischen EGF und FGF2 bei der Aktivierung positiver als auch negativer Cofaktoren, welche mit Smif interagieren, könnten ebenfalls erklären, warum die Phosphorylierung die Transkription einmal unterstützt ein anderes Mal blockiert. Identifizierung weiterer Interaktionspartner von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Smif in Gegenwart von EGF oder FGF2 könnten Anhaltspunkte dafür liefern.

Eine direkte Phosphorylierung von Smif an S523,S525 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. *In vitro* Kinase-Assays mit ERK1 zeigten keine Phosphorylierung an dieser Position. Aber in Anbetracht der funktionellen Konsequenzen einer Serin zu Alanin Substitution an dieser Stelle lässt sich eine Phosphorylierung indirekt schlussfolgern. Gleichzeitige Phosphorylierungen an S523 und S525 wurden mehrfach nachgewiesen. Ebenfalls sind Phosphorylierungen zusammen mit S315,S319,T321 in unterschiedlichen humanen und murinen Systemen detektiert worden^{181,188,189,233,234}. Darüber hinaus, konnte eine Insulin-induzierte Phosphorylierung an S525 in murinen Leberzelllinien nachgewiesen werden¹⁷⁷. Interessant ist gleichfalls die Isolierung von S523,S525 phosphoryliertem Smif aus nukleären Extrakten von Hela Zellen, was eine hier gezeigte phosphorylierungs-abhängige Regulation von Smif bei der TGFβ-vermittelten Transkription unterstützt²³⁵. Substitution von Serin zu Alanin an S523,S525 beeinflusste die Assoziation mit GST-Smad4 nicht. Im Einklang dazu zeigte die TGFβ-vermittelte Aktivierung des SBE₄-luc Reporters keine Beeinflussung durch Inaktivierung dieser Phosphorylierungsstelle. Anders in Reporter-Assays mit 3TP-lux, wo die Transkription des Luciferase-Reportergenese vermindert war, wenn S523,S525 durch Alanin substituiert wurde. Möglicherweise führte die Überexpression des EGF-Rezeptors zu partiellen Liganden-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors, wodurch *wild-type* Smif über eine Phosphorylierung stimuliert wurde, während dies im Fall des Phosphorylierungs-defizienten Smif-Konstrukts blockiert war.

Zusammenfassend deutet dies auf eine Phosphorylierung von Smif durch unterschiedliche Signalkaskaden infolge dessen die Funktion als Cofaktor beeinflusst wird. Untersuchungen mehrerer Phosphorylierungsstellen scheint auf eine Redundanz oder Synergie der Phosphorylierungsstellen zu deuten. Gegensätzliche Effekte müssen in einer Phosphorylierungs-

bedingten Abhängigkeit von Smif in der Wechselwirkung mit anderen Faktoren liegen, welche DNA-Kontext- und Stimulus-abhängig sind. Effekte von EGF bzw. FGF2 konnten durch Inaktivierung von Phosphorylierungsstellen von Smif nicht vollständig aufgehoben werden. Es ist durchaus möglich, dass weitere Phosphorylierungen von Smif eine Rolle spielen. Außerdem ist eine Beeinflussung weiterer Komponenten der Transkriptionsmaschinerie durch EGF als auch FGF2 annehmbar. Letzteres zeigt sich in der EGF/FGF2 vermittelten Beeinflussung beider Reporter-Konstrukte in Smif *knock-out* Zellen.

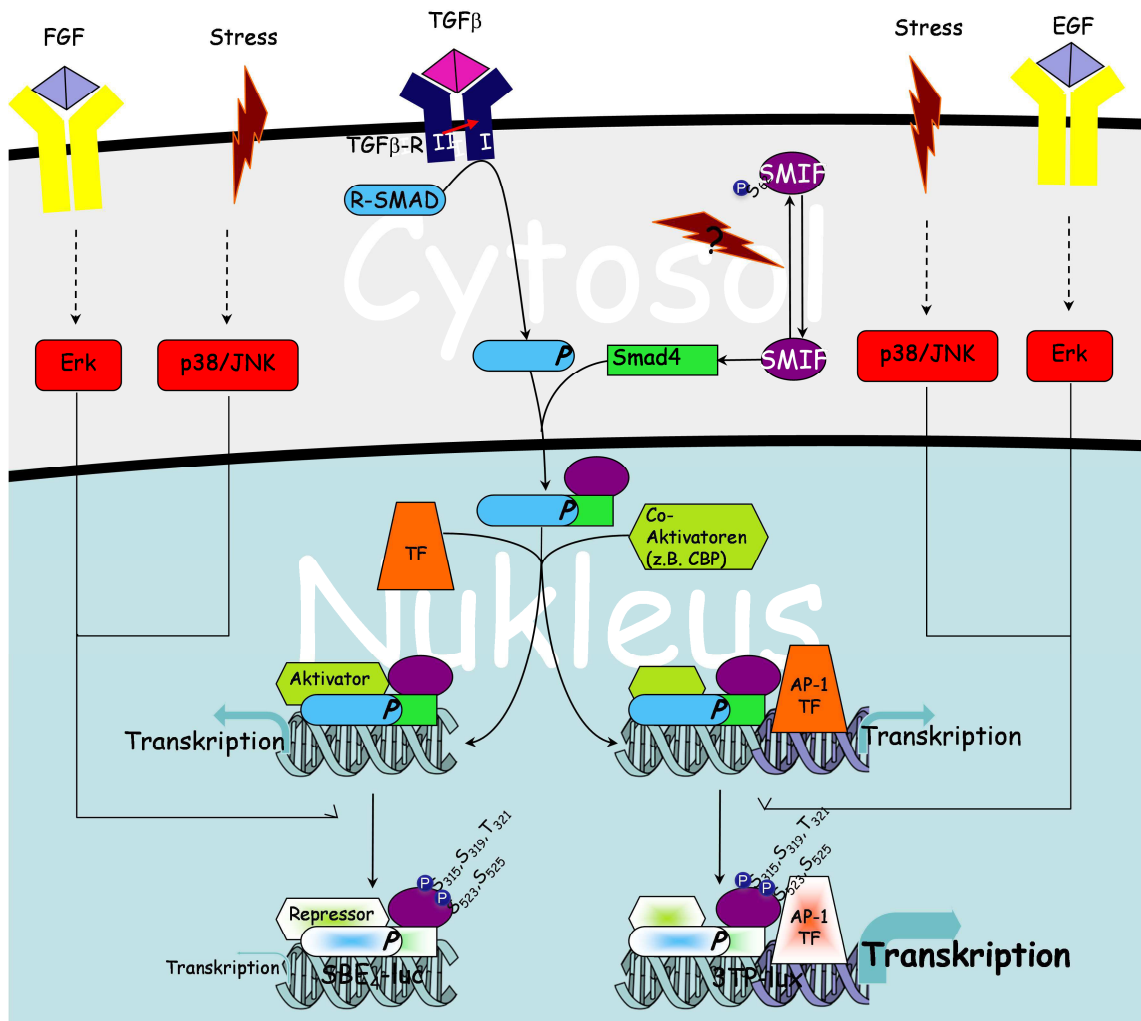


Abbildung 4.1 **Modell der Beeinflussung der Transkriptionsregulation des Cofaktors Smif durch Phosphorylierung:** Mitogen oder Stress-induzierte Aktivierung intrazellulärer Signalwege führt zur Phosphorylierung von Smif. In Abhängigkeit von regulativen Elementen des Promotors interagiert Smif mit unterschiedlichen Faktoren, welche die Transkription mitbestimmen. Smif könnte dabei über seine Phosphorylierung Einfluss auf die Interaktion mit Aktivatoren wie CBP, Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder Repressoren nehmen, aus denen positive bis hin zu negativen Konsequenzen für die Transkription resultieren. Phosphorylierungen im N-Terminus von Smif regulieren dessen Interaktion mit Smad4 und folglich die Initiierung der Signalkaskade.

4.3.5 Negative Regulation von Smif durch N-terminale Phosphorylierung

Phosphorylierungen an S315,S319,T321 als auch S523,S525 zeigten keine Auswirkungen auf die Interaktion mit Smad4. Ihr Einfluss auf die TGF β -Signalkaskade schien daher andere molekulare Ursachen zu haben (siehe Abschnitt 4.3.4). Gleichzeitig waren diese Phosphorylierungsstellen von der Smad4-Interaktionsdomäne, welche sich am N-Terminus von Smif befindet, deutlich entfernt.

Anders verhält es sich mit Serin an Position 62 (Abbildung 3.40). Dephosphorylierung von Smif *in vitro* erhöhte signifikant die Interaktion mit Smad4 und Dcp2. Die Smif Oligomerisierung blieb davon unbeeinflusst. Sowohl Smad4 als auch Dcp2 interagierten mit dem N-Terminus von Smif. Dagegen wird die Trimerisierung von Smif über den C-Terminus vermittelt. Direkte Interaktionen von Smif mit Smad4 und Dcp2 deuten auf eine inhibitorische Phosphorylierungsstelle in der Interaktionsdomäne von Smif. Punktmutationen von Serin 62, welche als Phosphorylierungsstelle in Smif identifiziert wurde, bestätigten dies. Serin zu Alanin Substitution an Position 62, welches eine Phosphorylierung blockiert, zeigte eine stärkere Interaktion von Smif mit Smad4 und Dcp2. Parallel dazu wurde die Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Phosphatase zum großen Teil aufgehoben. Experimente mit dem SBE₄-luc Reporter konnten diese Daten *in vivo* funktionell bestätigen.

Die deutlichen Veränderungen im Phosphatase Assay als auch die Unterschiede in der Bindung von *wild-typ* und S62A Smif lassen auf eine häufige Phosphorylierung von *wild-typ* Smif unter den verwendeten Zellkulturbedingungen (10 % FCS) schließen. Wie Serin 62 dabei phosphoryliert wird, ist bisher offen. Aufgrund unveränderter Bindungseigenschaften von Smif, welches durch EGF oder UV phosphoryliert wurde (Abbildung 3.25), scheiden diese Signalwege als potentielle Aktivatoren einer Phosphorylierung von Serin 62 aus. Andere Faktoren, welche auch im FCS sind, scheinen darüber zu bestimmen. Die Identifizierung einer Kinase, welche für die Phosphorylierung verantwortlich ist, könnte weiterhin Aufschluss darüber liefern, wie diese Phosphorylierung funktionell Einzuordnen ist. Eine Phosphorylierung an Serin 62 wurde bisher *in vitro* in humanen und murinen Zelllinien identifiziert¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Darüber hinaus wurde in verschiedenen Mausgeweben (Niere, Lunge, Milz) eine Phosphorylierung an dieser Position identifiziert, was auf eine generelle Phosphorylierung *in vivo* deutet¹⁸¹. Quantitative Aussagen fehlen bisher.

Ausgehend von den ersten funktionellen Daten führt die Phosphorylierung an Serin 62 zu einer Inaktivierung von Smif. Beeinträchtigungen in der Interaktion zwischen Serin 62 phosphoryliertem Smif und Dcp2 lassen negative Beeinflussungen im *Decapping* vermuten, da Smif die katalytische Untereinheit Dcp2 positiv stimuliert²³⁶. In unmittelbarer Nähe zu Serin 62 befindet sich mit Arginin 59 eine Aminosäure, welche von *S. cerevisiae* bis zu höheren Eukaryonten hoch konserviert ist. Substitution dieser Aminosäure durch Alanin führt zur Inaktivierung von Smif in *Decapping* Assays^{132,237}. Nicht nur funktionell scheinen sich die Phosphorylierung an S62 und die R59A Mutation zu ähneln. Auch strukturelle Gemeinsamkeiten bestehen dabei. Mit dem Austausch einer basischen Aminosäure durch das aliphatische Alanin kommt es zur Neutralisierung der positiven Ladung an dieser Position. Vergleichbar dazu verändert die Phosphatgruppe mit ihrer negativen Ladung die Polarität um

die phosphorylierte Aminosäure und kann benachbarte positive Ladungen neutralisieren. Weitere strukturelle Daten könnten Aufschluss darüber geben, wie eine Phosphorylierung an Serin 62 die Funktion von Smif bestimmt.

4.4 Smif Oligomere und Smif-Smad4 DNA-Komplexe – Mechanistisches Model für eine Smif vermittelte Transkriptionsregulation

Ursprüngliche Charakterisierungen der Smif Smad4 Interaktion zeigten eine Smad4 Bindungsdomäne am N-Terminus zwischen Aminosäure 1 und 101¹²⁹. Gleichfalls konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass Deletion des N-Terminus von Smif die Assoziation mit GST-Smad4 aufhebt. Interessanterweise zeigte ein Deletionskonstrukt des C-Terminus von Smif ($\Delta 539-582$ bzw. ΔTM) auch keine Bindung an GST-Smad4 und war als solches bisher nicht beschrieben (Abbildung 3.35). Im Einklang dazu zeigten Reporter-Assays mit SBE₄-luc in Mef Zellen, eine funktionelle Inaktivierung eines C-terminal verkürzten Smif-Konstrukts und verdeutliche die Rolle des C-Terminus für die Funktion von Smif als Transkriptions-Cofaktor (Abbildung 3.36).

Kürzlich erschienene Strukturdaten in der Literatur beschrieben eine Ausbildung von homotrimeren Smif Komplexen, welche über α -helices am C-Terminus vermittelt werden. Die Oligomerisierung von Smif war dabei für dessen Funktion im Decapping essentiell¹³⁵. Eine C-terminal bedingte Oligomerisierung von Smif konnte hier mittels Co-Immunpräzipitation und GST-Pulldown bestätigt werden (Abbildung 3.34 & Abbildung 3.35). Funktionelle Experimente im Rahmen dieser Arbeit vermuten darüber hinaus die Notwendigkeit der Ausbildung von Oligomeren für die allgemeine funktionelle Integrität von Smif, als auch die Funktion von Smif als Transkriptions-Cofaktor eingeschränkt ist, wenn der C-Terminus fehlt.

Bisher offen blieb die Frage, welche Stöchiometrie Smif-Smad4-Komplexe aufweisen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Smad-Transkriptionsfaktorkomplexe als R-Smad und Smad4 Heterodimer oder Heterotrimer auftreten können^{28-30,34,238-240}. Darüber hinaus sind homotrimere Smad4-Komplexe in der Literatur beschrieben³². Im Fall einer 1 zu 1 Stöchiometrie könnte Smif mehrere Smad4-Moleküle aufgrund seiner trimeren Struktur quervernetzen und die Bindung an Promotoren verstärken (Abbildung 4.2 Modell 1). Daten im Rahmen dieser Arbeit sowie im Zusammenhang mit der Literatur könnten eine solche Hypothese unterstützen. DNA Bindungsexperimente mit gereinigtem Smad4 zeigten in Gegenwart von Smif eine verstärkte Assoziation von Smad4 an Smad-DNA-Bindungselemente. Die dabei verwendete Sonde bestand aus zwei Smad-DNA-Bindungselementen und würde eine Assoziation mehrere Smad-Moleküle pro Molekül der Sonde vermuten. Smif würde in einem solchen Model zwei oder mehrere Smad-Moleküle binden und deren Bindung durch Erhöhung der Avidität an die DNA verstärken. Dies würde mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität korrelieren, welche im Rahmen dieser Arbeit sowohl für Reporterkonstrukte als auch endogen für bestimmte TGF β -Zielgene nachgewiesen wurde.

Die Hypothese einer Smif vermittelten Verstärkung der DNA-Assoziation von Smad4 kann zusätzlich durch Daten in der Literatur gestützt werden. Die Affinität von Smad-Proteinen für die DNA ist sehr niedrig und wird erst durch Interaktion mit anderen Faktoren oder durch repetitive DNA Bindungselemente verstärkt³⁹. In diesem Zusammenhang konnte demonstriert werden, dass der Transkriptions-Cofaktor Tob in vergleichbaren Experimenten die Assoziation von Smad4 an Smad-DNA-Bindungselemente verstärkt²⁴¹. Promotorstudien zeigten in mehreren TGF β -Zielgenen wie PAI-1, IgCa oder p21^{Cip1} mehrere Smad-Bindungselemente, was auf eine Assoziation mehrere Smad-Komplexe deutet^{40,93,94,106}. Die Ausbildung unterschiedlicher R-Smad-Smad4-Komplexe scheint die Situation *in vivo* noch komplexer zu gestalten. Unterschiedliche Studien kommen dort zu dem Schluss, dass aktive Smad-Transkriptionskomplexe aus einem Molekül Smad4 und einem oder zwei R-Smad Molekülen bestehen^{28,29,239}. Insofern würde dort ein Modell mit reinen Smad4-Komplexen, wie es in den EMSA Experimenten verwendet würde, wahrscheinlich nicht auftreten. Eine Vernetzung mehrere R-Smad-Smad4-Komplexe, welche unterschiedliche DNA-Elemente binden, wäre dort eher vorstellbar (Abbildung 4.2 Modell 1 rechts). Dies könnte auch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten von *DNA-Pulldown* Experimenten erklären, welche entgegen den EMSA Experimenten keine Smif-abhängige Bindung von Smad4 zeigten. Während in den EMSA Experiment Smad4-Homooligomere an die Sonde binden, assoziiert möglicherweise ein Smad4-R-Smad-Komplex an die zwei Smad-DNA-Bindungselemente der Sonde im *DNA-Pulldown*.

Strukturanalysen zur Bindung von Smad4 an DNA-Elemente zeigten intramolekulare Restrukturierungen von freiem Smad4 bei der Bindung an die DNA. So müssen die auto-inhibitorischen Effekte von MH1 und MH2 Domäne, welche direkt interagieren, durch Konformationsänderungen überwunden werden^{242,243}. Gleichfalls zeigt die MH1 Domäne von Smad4, welche an die DNA bindet, beträchtliche strukturelle Reorganisationen auf²⁴⁴. Smif könnte diese Prozesse induzieren oder stabilisieren. Ein solches Modell würde eine alternative Hypothese zu einem Modell, wo Smif Smad4 quervernetzt, darstellen (Abbildung 4.2 Modell 2). Welches der beiden Modelle die Beobachtung einer Smif-vermittelten Verstärkung der DNA Assoziation von Smad4 beschreibt, ist noch zu klären und erfordert weitere strukturelle Daten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine direkte Interaktion von Smif mit DNA-Elementen nachgewiesen werden. Im Einklang damit konnten in Hochdurchsatzverfahren, die die Bindung von etwa 4000 humanen Proteinen an 460 unterschiedliche DNA-Sequenzen untersuchten, keine DNA-Smif Interaktion nachgewiesen werden⁴⁴.

Es wurde weiterhin der Frage nachgegangen, inwiefern die Phosphorylierung von Smif für die Oligomerisierung eine Rolle spielt. Sowohl *GST-Pulldown* Experimente als auch Smif-Smif Co-Immunpräzipitationen zeigten keine Beeinflussung der Interaktion, wenn Smif durch EGF phosphoryliert wurde (Abbildung 3.34). Gleichzeitig wurden Phosphorylierungs-defiziente Smif-Konstrukte sowie *in vitro* dephosphoryliertes Smif auf ihr Verhalten hin zur Ausbildung von Oligomeren getestet. Auch hier traten keine Unterschiede im Vergleich zum *wild-typ* auf und deuten auf eine Oligomerisierung unabhängig von der Phosphorylierung von Smif (Abbildung 3.35). Interessanterweise wurden unmittelbar vor bzw. im Beginn des Oligomerisierungsmotives zahlreiche Phosphorylierungsstellen identifiziert. Mit S523,S525

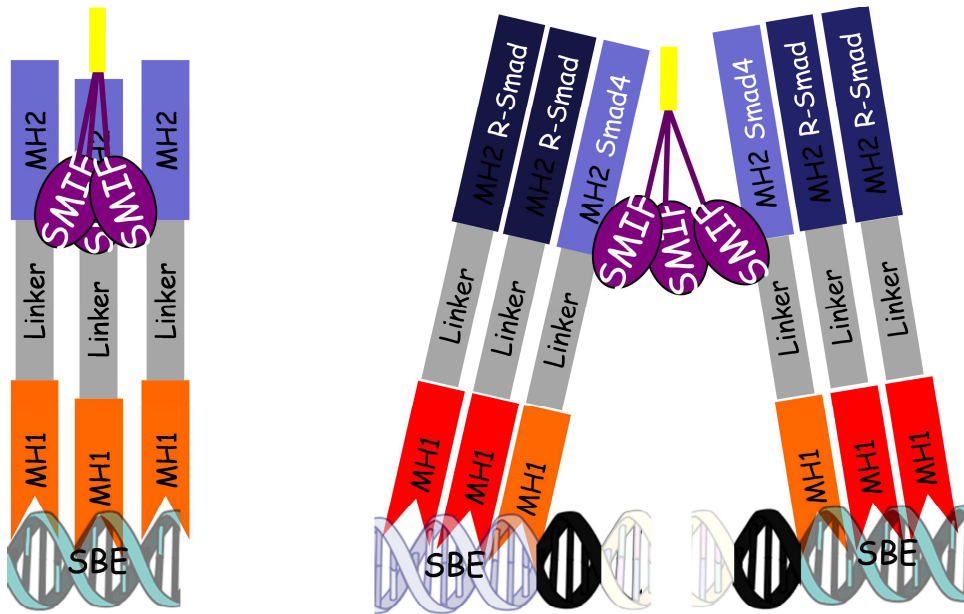
wurden zwei davon getestet, welche für die TGF β -vermittelte Signaltransduktion relevant waren. Biochemische Daten zeigten aber keine Beeinflussung der Oligomerisierung von Smif, wenn beide Phosphorylierungsstellen inaktiviert wurden. Unterschiede in der TGF β -Signaltransduktion nach Phosphorylierung dieser beiden Serine können daher nicht durch Veränderungen im Oligomerisierungszustand erklärt werden.

Die indirekte DNA-Assoziation von Smif über Smad4 wurde mittels drei verschiedener Methoden untersucht sowie deren Beeinflussung durch Phosphorylierung von Smif. Sowohl beide *in vitro* Ansätze (EMSA und *DNA-Pulldown*) als auch der *in vivo* Ansatz (CHIP) zeigte keine Beeinflussung der Smif DNA-Interaktion, wenn Smif EGF-vermittelt oder *in vitro* ERK1 vermittelt phosphoryliert wurde (Abschnitt 3.9). Unterschiede in der Transkriptionsregulation von unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen von Smif sind über Veränderungen in der DNA Assoziation daher nicht erklärbar.

Ursprüngliche Experimente in unserem Labor zeigten mittels Reporter-Assay Experimenten das Vorhandensein einer Transkriptions-Aktivierungsdomäne zwischen Aminosäure 124 und 390¹²⁹. Experimente im Rahmen dieser Arbeit zeigten einen zweiten Mechanismus, wie Smif durch Verstärkung der Smad4-DNA Assoziation die Transkription positiv beeinflusst. Die Oligomerisierung von Smif, welche für die Aktivität von Smif essentiell ist, könnte dabei als „Quervernetzer“ mehrere Smad4 Moleküle die Bindung an die DNA verstärken.

Weiterführende Experimente, welche die Stöchiometrie der Smif-Smad4-Komplexe und die Ausbildung von Transkriptionsfaktorkomplexen im Hinblick auf die Gesamtheit aller Promotorelemente eines Genes untersuchen, stehen noch aus.

Modell 1: Quervernetzung von Smad4 durch Smif Trimere stabilisiert die DNA Assoziation von Smad4



Modell 2: Aktivierungsbedingte Konformationsänderungen von Smad4 werden durch Smif initiiert oder stabilisiert.

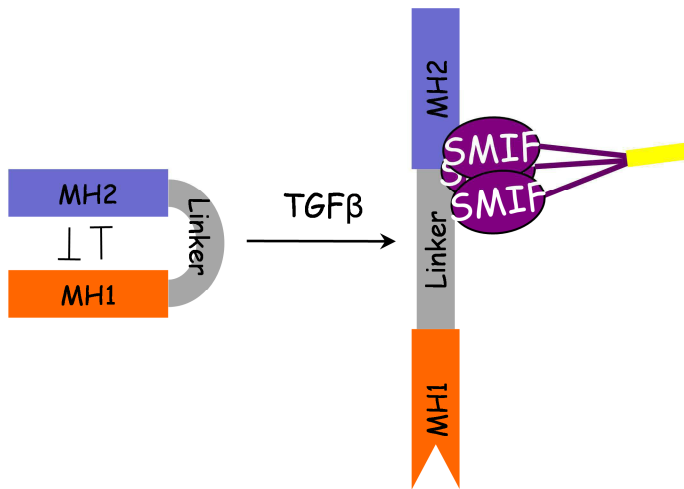


Abbildung 4.2 **Modelle einer Smif vermittelten Transkriptionsregulation:** Modell 1: Bedingt durch eine Oligomerisierung von Smif und einer 1:1 Stöchiometrie mit Smad4 wird die Bindung der niedrig-affinen Smad Moleküle an die DNA durch Erhöhung der Avidität gesteigert. Modell 2: Interaktion von Smif mit Smad4 induziert oder stabilisiert Konformationsänderungen von Smad4, die dessen DNA-Assoziation erhöht.

4.5 Könnte die Funktion von Smif im Decapping Ursache für Veränderungen in der TGF β -Signaltransduktion sein?

Wie in der Einleitung schon aufgeführt wurde, könnte Smif die mRNA Expression nicht nur auf Ebene der Transkription regulieren. Als Untereinheit des Decapping-Komplexes assoziiert Smif mit der katalytischen Untereinheit Dcp2, welche die Cap Struktur der mRNA hydrolytisch abbaut und das so freigesetzte 5' Ende Exonukleasen und einer vollständigen Degradation zugänglich macht. Inwiefern genetische Inaktivierungen von Smif diese Prozesse *in vivo* beeinflussen ist nicht eindeutig geklärt. Analysen von Smif *knock-out* Mef Zellen oder CD4+ T-Zellen zeigten keine Unterschiede in der basalen Expression von mRNAs in *Microarray* Experimenten (Daten nicht gezeigt). Wie in der Einleitung schon angesprochen, beeinflusst nukleäres Decapping die Aktivität der RNA-Polymerase II. Inwiefern dies aber das mRNA Gleichgewicht beeinflusst, ist noch offen, da Expressionsdaten in der Studie nicht erfasst wurden¹⁴⁰. Dcp2 *knock-out* Mäuse deuten darüber hinaus auf eine Redundanz verschiedener Decapping-Enzyme²⁴⁵.

Andere Studien beschreiben eine Rolle von Decapping-Faktoren bei der Expression von induzierbaren Genen²⁴⁶. Entgegen Studien mit Dcp2 *knock-out* Mäusen zeigten andere Experimente in höheren Eukaryonten eine Dcp2-spezifische Regulation definierter mRNAs²⁴⁷. Ebenfalls wurde eine negative Beeinflussung einiger hundert Genen beschrieben, wenn Smif überexprimiert wurde¹³¹. Interessant hierbei ist, dass bestimmte TGF β -Zielgene nicht über eine Transkription reguliert werden, sondern über deren mRNA Stabilität. Regulationen von mRNA bindenden Faktoren über den nicht-kanonischen TGF β -Signalweg werden in diesem Zusammenhang diskutiert. Ob der Smad-Signalweg dort eine Rolle spielen könnte, ist bisher offen²⁴⁸.

Daten in der Literatur zeigen, dass einzelne Punktmutationen des Smif Proteins (D20A oder R58A) die Aktivität des Decapping-Komplexes *in vitro* zerstören¹³². Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher getestet, inwiefern sich einzelne Punktmutationen auf die Funktion von Smif im Decapping auswirken könnten. Dazu wurde die Interaktion von Smif mit Dcp2 untersucht. Zusätzlich wurde mittels biochemischer Ansätze sowie Immunfluoreszenz die Lokalisation in *P-Bodies* untersucht. Die Inaktivierung verschiedener Phosphorylierungsstellen zeigte dabei keine Beeinflussung der Interaktion im GST-Pulldown (Abbildung 3.37). Im Einklang mit Daten in der Literatur zerstörte die Deletion des C-Terminus eine Bindung an GST-Dcp2¹³⁵. Gleichfalls zeigte eine N-terminale Deletion von Smif keine Interaktion mit Dcp2 und unterstützt Daten von Lykke-Anderson, welcher in einer der ersten Publikation über den humanen Smif-Dcp2 Komplex eine Bindung des N-terminalen Fragmentes (Aminosäuren 1-148) an Dcp2 in Co-Immunpräzipitationen erwähnte¹³². Parallel dazu zeigten Punktmutationen, welche einzelne Phosphorylierungsstellen inaktivierten, keine Veränderung hinsichtlich dessen Lokalisation in granulären cytosolischen Strukturen (Abbildung 3.39). Umgekehrt wurde untersucht, inwiefern eine Mitogen oder Stress induzierte Phosphorylierung von Smif dessen Lokalisation in Decapping-Komplexen beeinflusst. Interaktionsstudien mit GST-Dcp2 als auch Studien zur Assoziation mit *P-Bodies* zeigten dabei keine Unterschiede zwischen unstimulierten und EGF stimulierten Zellen und liefern hier keine Hinweise auf eine Beeinflussung der

Decapping-Aktivität durch Phosphorylierung von Smif (Abbildung 3.38). Im Hinblick auf die beobachteten funktionellen Effekte dieser Konstrukte deutet dies auf Phosphorylierungs-abhängige Regulationsmechanismen von Smif bei der Smad4 vermittelten TGF β -Antwort nicht aber beim Decapping hin.

Nichtsdestotrotz kann eine Beeinflussung der enzymatischen Aktivität anhand dieser Experimente nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Studien. Rzeckowski et al. zeigten für Serin 315 von Smif mit Hilfe von inaktivierenden Mutationen oder Phosphorylierungs-Mimikry keine Unterschiede in *in vitro* Decapping Assays und deuten auf eine phosphorylierungs-unabhängige Aktivität. *In vivo* Daten lassen aber eine selektive Beeinflussung der mRNA Stabilität einzelner Gene wie IL-8 nach einer IL-1 bedingten Phosphorylierung von Smif an S315 vermuten. Gleichzeitig zeigte diese Studie eine Dislokation von phosphoryliertem Smif aus den *P-Body* Strukturen ins Cytoplasma, wenn die Zellen mit Anisomycin oder Sorbitol einem zellulären Stress ausgesetzt wurden¹³¹. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte biochemische Fraktionierung zur Isolierung von *P-Bodies* nach Stimulation der Phosphorylierung von Smif zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen und stehen im Gegensatz zu Beobachtungen von Rzeckowski et al. Mögliche Erklärungen dafür könnten in den verschiedenen Bedingungen und den damit assoziierten Veränderungen anderer Faktoren, welche für die Bildung und Stabilität von *P-Bodies* bestimmend sind, liegen.

Größe und Zahl von *P-Bodies* können durch Veränderungen in der Translation als Folge von zellulärem Stress variieren¹³⁸. Teilweise wurden dabei Korrelationen mit einer Phosphorylierung von Smif gezeigt^{131,207}. Bisher ist aber offen, inwiefern sich daraus Veränderungen im Decapping ergeben. Genetische Inaktivierung von Faktoren, welche *P-Body* Strukturen in *S. cerevisiae* bestimmen, zeigten keine oder nur geringfügige Veränderungen im mRNA Abbau¹³⁸. Es ist daher kritisch zu betrachten, inwiefern sich Veränderungen in der Struktur von *P-Bodies* als Marker für Veränderungen im Decapping ableiten lassen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Smif, das in *P-Bodies* lokalisiert, einer Phosphorylierung zugänglich ist (siehe Abschnitt 4.2.2). Experimente im Rahmen dieser Arbeit zeigten keine Hinweise auf Veränderungen im Decapping, wenn die Phosphorylierung von Smif durch Mitogene oder zellulären Stress induziert wurde oder bestimmte Phosphorylierungsstellen, welche für die TGF β -vermittelte Signaltransduktion essentiell waren, inaktiviert wurden. Studien in der Literatur deuten aber auf eine Spezifität des Smif-Dcp2 Decapping-Komplexes für einzelne mRNAs. Phosphorylierungs-regulative Mechanismen wurden dabei in *S. cerevisiae*²⁴⁹, *A. thaliana*²⁵⁰ und Säugern¹³¹ beschrieben. Solche Fragestellungen konnten mit dem hier verwendeten Repertoire an Experimenten nicht erfasst werden. Experimente wie *Microarray* Analysen oder Sequenzierungen, welche die Gesamtheit der mRNA in Zellen in Abhängigkeit von Smif und den verschiedenen Bedingungen bestimmten, müssten dazu herangezogen werden.

5 Zusammenfassung

Cytokine der TGF β -Familie regulieren zahlreiche biologische Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Embryogenese oder die Immun-Antwort. Liganden-Rezeptor-Komplexe vermitteln die Phosphorylierung von R-Smad-Proteinen und leiten die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade ein. R-Smad-Proteine assoziieren mit Smad4 und translozieren in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren zahlreiche Gene regulieren. Die Spezifität und Stärke der TGF β -vermittelten Transkriptionsregulation wird zusätzlich durch Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren sowie Cofaktoren bestimmt. Einer dieser Co-Aktivatoren ist Smif, welcher TGF β -vermittelt an Smad4 bindet.

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben unterschiedlichste Phosphorylierungen in Smif im Rahmen von Hochdurchsatzverfahren. Funktionelle Konsequenzen dieser posttranslationalen Modifikation sind aber noch nicht geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zahlreiche Faktoren wie EGF, FGF2 oder zellulärer Stress identifiziert werden, welche Phosphorylierungen in der Transkriptionsdomäne induzieren. Unterschiedliche Kinasen modifizierten dabei die gleiche Phosphorylierungsstelle. Die Phosphorylierung von Smif beeinflusste dessen Funktion als Cofaktor, wie Reporter Assays mit Phosphorylierungsdefizienten Smif zeigten. Experimente wie *GST-Pulldown*, Immunpräzipitationen oder Chromatin-Immunpräzipitationen ließen dabei keine Abhängigkeit von der Phosphorylierung von Smif bei der Ausbildung von Smif-Smad-Transkriptionsfaktorkomplexen erkennen.

Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass Smif Oligomere bildet, die für die Interaktion mit Smad4 und die Transkriptionsregulation essentiell waren. Zusätzlich konnte eine verstärkte Assoziation von Smad4 mit DNA-Bindungselementen in Gegenwart von Smif beobachtet werden. Beide Experimente geben neue mechanistische Einblicke in die Rolle von Smif als Transkriptions-Cofaktor.

Untersuchungen der Smad4-Interaktionsdomäne von Smif führten zur Identifizierung einer weiteren Phosphorylierungsstelle, die die Bindung mit Smad4 negativ beeinflusst. Inaktivierung dieser Phosphorylierung durch Alanin-Substitution verstärkte die Assoziation von Smif an Smad4 und deren Aktivität bei der TGF β -vermittelten Transkription.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine Regulation der TGF β -Signaltransduktion durch Phosphorylierung von Smif. In Abhängigkeit von der Phosphorylierungsstelle wird dabei entweder direkt Einfluss auf die Transkription genommen oder die Interaktion mit Smad4 auf der Stufe der Transkriptionsinitiation reguliert. Die Einbettung der TGF β -Signalkaskade in ein Netzwerk mit anderen Signalen stellt in vielen Prozessen wie der embryonalen Entwicklung bis hin zu pathologischen Veränderungen wie Krebs eine zentrale Rolle dar. Die Charakterisierung funktionell wichtiger Phosphorylierungen von Smif tragen daher zum Verständnis der Beeinflussung der TGF β -Signaltransduktion bei.

6 Abstract

The TGF β pathway plays a critical role in regulating many biological processes like cell proliferation & differentiation, embryonic development, and immune function. After phosphorylation of receptor-associated Smads (R-Smad) by the ligand activated TGF β -receptor complex, R-Smads bind to common Smad4 and translocate into the nucleus, where they regulate the expression of TGF β -target genes. To fine-tune the response at the transcriptional level, the Smad complex can assemble with other transcription factors and additionally with co-factors to further define the amplitude and specificity of transcriptional activity. Smif binds Smad4 and acts as a co-factor in the TGF β signaling.

Large-scale proteomic screens by several research groups demonstrated that Smif is a multiphosphorylated protein, but functional consequences are not well studied so far. Here, we show that different MAP kinases being activated by diverse extracellular stimuli such as EGF, FGF2 or stress can phosphorylate Smif in its transcriptional domain. Most importantly, by using several TGF β dependent reporter constructs we demonstrate that phosphorylation of Smif modulates its transcriptional activity. Mutation of Smif phosphorylation sites leads to the abrogation of this effect demonstrating that stress or mitogen induced phosphorylation of Smif is capable to regulate the TGF β response. Biochemical approaches like GST-pulldown, Co-Immunoprecipitation or Chromatin-Immunoprecipitation indicate that the formation of Smif containing transcription factor complexes was not affected by its phosphorylation in the transcriptional domain.

Interestingly we identified that oligomeric structures of Smif are required for the interaction with Smad4 and hence its function in TGF β mediated transcription activation. Additionally Smad4 binding to its corresponding DNA elements was enhanced in the presence of Smif. Taken together these findings give new insights into the molecular mechanism underlying the function of Smif as a transcription co-factor.

Besides this, we have evidence that phosphorylation of Smif within its Smad4 binding domain regulates the Smif-Smad4 complex formation. Substitution of serine to alanine enhances the formation of a Smif-Smad4 complex and shows a positive effect on Smif mediated TGF β response.

In summary, these data show that phosphorylation of Smif poses regulatory elements for its function in the TGF β signal transduction. Thus different phosphorylation sites of Smif can interfere differentially ranging from regulation of the activity of Smif containing transcription factor complexes to the formation of these complexes itself. The influence of other signaling pathways on TGF β mediated gene transcription is a well-known phenomenon that is important for embryonic development or tumorigenesis. Identification of regulatory phosphorylations of Smif induced by other signaling pathways describes an additional layer of modulation of TGF β signaling cross-talk.

7 Literaturverzeichnis

1. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M. & Sporn, M. B. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **78**, 5339–5343 (1981).
2. Roberts, A. B. *et al.* Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by EGF. *Nature* **295**, 417–419 (1982).
3. Frolik, C. A., Dart, L. L., Meyers, C. A., Smith, D. M. & Sporn, M. B. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3676–3680 (1983).
4. Heldin, C. H., Miyazono, K. & Ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465–471 (1997).
5. Massagué, J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem* **67**, 753–791 (1998).
6. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
7. Schmierer, B. & Hill, C. S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **8**, 970–982 (2007).
8. Blobel, G. C., Schiemann, W. P. & Lodish, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1350–1358 (2000).
9. Bierie, B. & Moses, H. L. TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 29–40 (2006).
10. Prud'homme, G. J. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab. Invest.* **87**, 1077–1091 (2007).
11. Yamashita, H., Ten Dijke, P., Franzén, P., Miyazono, K. & Heldin, C. H. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem* **269**, 20172–20178 (1994).
12. Souchelnytskyi, S., Ten Dijke, P., Miyazono, K. & Heldin, C. H. Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *EMBO J* **15**, 6231–6240 (1996).
13. Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massagué, J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341–347 (1994).
14. Wieser, R., Wrana, J. L. & Massagué, J. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* **14**, 2199–2208 (1995).
15. Feng, X. H. & Derynck, R. A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J* **16**, 3912–3923 (1997).

16. Chen, Y. G. *et al.* Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **12**, 2144–2152 (1998).
17. Lo, R. S., Chen, Y. G., Shi, Y., Pavletich, N. P. & Massagué, J. The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J* **17**, 996–1005 (1998).
18. Savage, C. *et al.* Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 790–794 (1996).
19. Savage-Dunn, C. TGF-beta signaling. *WormBook* 1–12 (2005).doi:10.1895/wormbook.1.22.1
20. Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. & Gelbart, W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster. *Genetics* **139**, 1347–1358 (1995).
21. Raftery, L. A., Twombly, V., Wharton, K. & Gelbart, W. M. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila. *Genetics* **139**, 241–254 (1995).
22. Raftery, L. A. & Sutherland, D. J. TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads. *Dev. Biol* **210**, 251–268 (1999).
23. Massagué, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* **19**, 2783–2810 (2005).
24. Xu, L., Kang, Y., Cöl, S. & Massagué, J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell* **10**, 271–282 (2002).
25. Inman, G. J., Nicolás, F. J. & Hill, C. S. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol. Cell* **10**, 283–294 (2002).
26. Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M. & Nishida, E. Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep* **1**, 176–182 (2000).
27. Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. & Wrana, J. L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* **95**, 779–791 (1998).
28. Chacko, B. M. *et al.* The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat. Struct. Biol* **8**, 248–253 (2001).
29. Chacko, B. M. *et al.* Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* **15**, 813–823 (2004).
30. Qin, B. Y. *et al.* Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. *Mol. Cell* **8**, 1303–1312 (2001).
31. Qin, B. Y., Lam, S. S., Correia, J. J. & Lin, K. Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control. *Genes Dev* **16**, 1950–1963 (2002).
32. Jayaraman, L. & Massague, J. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J. Biol. Chem* **275**, 40710–40717 (2000).

33. Ten Dijke, P. & Hill, C. S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci* **29**, 265–273 (2004).
34. Wu, J. W. *et al.* Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* **8**, 1277–1289 (2001).
35. Xu, L., Alarcón, C., Cöl, S. & Massagué, J. Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *J. Biol. Chem* **278**, 42569–42577 (2003).
36. Randall, R. A., Germain, S., Inman, G. J., Bates, P. A. & Hill, C. S. Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *EMBO J* **21**, 145–156 (2002).
37. Schmierer, B. & Hill, C. S. Kinetic analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling reveals a mechanism for transforming growth factor beta-dependent nuclear accumulation of Smads. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9845–9858 (2005).
38. Zawel, L. *et al.* Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol. Cell* **1**, 611–617 (1998).
39. Shi, Y. *et al.* Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**, 585–594 (1998).
40. Dennler, S. *et al.* Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* **17**, 3091–3100 (1998).
41. Jonk, L. J., Itoh, S., Heldin, C. H., Ten Dijke, P. & Kruijer, W. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J. Biol. Chem.* **273**, 21145–21152 (1998).
42. Frederick, J. P., Liberati, N. T., Waddell, D. S., Shi, Y. & Wang, X.-F. Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Mol. Cell. Biol* **24**, 2546–2559 (2004).
43. Ishida, W. *et al.* Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J. Biol. Chem* **275**, 6075–6079 (2000).
44. Hu, S. *et al.* Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling. *Cell* **139**, 610–622 (2009).
45. Yagi, K. *et al.* Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J. Biol. Chem* **274**, 703–709 (1999).
46. Massagué, J. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **1**, 169–178 (2000).
47. Feng, X.-H. & Derynck, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **21**, 659–693 (2005).
48. Goumans, M. J. & Mummery, C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 253–265 (2000).

49. Piek, E. *et al.* Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**, 19945–19953 (2001).
50. Nakao, A. *et al.* Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**, 631–635 (1997).
51. Takase, M. *et al.* Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **244**, 26–29 (1998).
52. Imamura, T. *et al.* Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* **389**, 622–626 (1997).
53. Hayashi, H. *et al.* The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**, 1165–1173 (1997).
54. Shi, W. *et al.* GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J. Cell Biol* **164**, 291–300 (2004).
55. Ebisawa, T. *et al.* Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem* **276**, 12477–12480 (2001).
56. Kavsak, P. *et al.* Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell* **6**, 1365–1375 (2000).
57. Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K. & Imamura, T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2809–2817 (2003).
58. Hata, A., Lagna, G., Massagué, J. & Hemmati-Brivanlou, A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* **12**, 186–197 (1998).
59. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L. & Thomsen, G. H. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**, 687–693 (1999).
60. Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D. J., Hemmati-Brivanlou, A. & Derynck, R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 974–979 (2001).
61. Lin, X., Liang, M. & Feng, X. H. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem* **275**, 36818–36822 (2000).
62. Lin, X. *et al.* PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* **125**, 915–928 (2006).
63. Knockaert, M., Sapkota, G., Alarcón, C., Massagué, J. & Brivanlou, A. H. Unique players in the BMP pathway: small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**, 11940–11945 (2006).
64. Chen, H. B., Shen, J., Ip, Y. T. & Xu, L. Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Genes Dev* **20**, 648–653 (2006).
65. Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* **19**, 128–139 (2009).

66. Yamaguchi, K. *et al.* Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **270**, 2008–2011 (1995).
67. Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R. & Gespach, C. Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J. Biol. Chem* **272**, 1429–1432 (1997).
68. Wang, W., Zhou, G., Hu, M. C., Yao, Z. & Tan, T. H. Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J. Biol. Chem* **272**, 22771–22775 (1997).
69. Shibuya, H. *et al.* Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development. *EMBO J.* **17**, 1019–1028 (1998).
70. Chaudhury, A. *et al.* TGF-beta-mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nat. Cell Biol.* **12**, 286–293 (2010).
71. Hussey, G. S. *et al.* Identification of an mRNP complex regulating tumorigenesis at the translational elongation step. *Mol. Cell* **41**, 419–431 (2011).
72. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G. & Hata, A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* **454**, 56–61 (2008).
73. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Nguyen, P. H., Lagna, G. & Hata, A. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell* **39**, 373–384 (2010).
74. Goumans, M. J. *et al.* Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol. Cell* **12**, 817–828 (2003).
75. Goumans, M.-J. *et al.* Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* **21**, 1743–1753 (2002).
76. Roelen, B. A., Van Rooijen, M. A. & Mummery, C. L. Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev. Dyn* **209**, 418–430 (1997).
77. Lebrin, F. *et al.* Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* **23**, 4018–4028 (2004).
78. Blokzijl, A., Ten Dijke, P. & Ibáñez, C. F. Physical and functional interaction between GATA-3 and Smad3 allows TGF-beta regulation of GATA target genes. *Curr. Biol* **12**, 35–45 (2002).
79. Blokzijl, A. *et al.* Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J. Cell Biol* **163**, 723–728 (2003).
80. Annes, J. P., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell. Sci.* **116**, 217–224 (2003).
81. Munger, J. S. *et al.* The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**, 319–328 (1999).

82. Green, J. B., New, H. V. & Smith, J. C. Responses of embryonic *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell* **71**, 731–739 (1992).
83. Saka, Y. & Smith, J. C. A mechanism for the sharp transition of morphogen gradient interpretation in *Xenopus*. *BMC Dev. Biol.* **7**, 47 (2007).
84. Dyson, S. & Gurdon, J. B. The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors. *Cell* **93**, 557–568 (1998).
85. Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. & De Robertis, E. M. Dorsal-ventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589–598 (1996).
86. Zimmerman, L. B., De Jesús-Escobar, J. M. & Harland, R. M. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599–606 (1996).
87. Groppe, J. *et al.* Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **420**, 636–642 (2002).
88. Esparza-Lopez, J. *et al.* Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J. Biol. Chem* **276**, 14588–14596 (2001).
89. Stenvers, K. L. *et al.* Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol. Cell. Biol* **23**, 4371–4385 (2003).
90. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. & Wrana, J. L. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol* **5**, 410–421 (2003).
91. Denissova, N. G., Pouponnot, C., Long, J., He, D. & Liu, F. Transforming growth factor beta -inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6397–6402 (2000).
92. Chen, X. *et al.* Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* **389**, 85–89 (1997).
93. Seoane, J., Le, H.-V., Shen, L., Anderson, S. A. & Massagué, J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**, 211–223 (2004).
94. Pardali, K. *et al.* Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem* **275**, 29244–29256 (2000).
95. Liberati, N. T. *et al.* Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 4844–4849 (1999).
96. Wong, C. *et al.* Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1821–1830 (1999).
97. Verrecchia, F. *et al.* Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. *Oncogene* **20**, 3332–3340 (2001).

98. Zhang, Y., Feng, X. H. & Derynck, R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* **394**, 909–913 (1998).
99. Keeton, M. R., Curriden, S. A., Van Zonneveld, A. J. & Loskutoff, D. J. Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta. *J. Biol. Chem.* **266**, 23048–23052 (1991).
100. Chen, C.-R., Kang, Y., Siegel, P. M. & Massagué, J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* **110**, 19–32 (2002).
101. Yagi, K. *et al.* c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J. Biol. Chem* **277**, 854–861 (2002).
102. Alliston, T., Choy, L., Ducey, P., Karsenty, G. & Derynck, R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* **20**, 2254–2272 (2001).
103. Kang, J. S., Alliston, T., Delston, R. & Derynck, R. Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J* **24**, 2543–2555 (2005).
104. Hanai, J. *et al.* Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J. Biol. Chem* **274**, 31577–31582 (1999).
105. Pardali, E. *et al.* Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes. *J. Biol. Chem* **275**, 3552–3560 (2000).
106. Zhang, Y. & Derynck, R. Transcriptional regulation of the transforming growth factor-beta -inducible mouse germ line Ig alpha constant region gene by functional cooperation of Smad, CREB, and AML family members. *J. Biol. Chem* **275**, 16979–16985 (2000).
107. Shi, M. J. & Stavnezer, J. CBF alpha3 (AML2) is induced by TGF-beta1 to bind and activate the mouse germline Ig alpha promoter. *J. Immunol.* **161**, 6751–6760 (1998).
108. Kang, Y., Chen, C.-R. & Massagué, J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* **11**, 915–926 (2003).
109. Karlsson, G. *et al.* Gene expression profiling demonstrates that TGF-beta1 signals exclusively through receptor complexes involving Alk5 and identifies targets of TGF-beta signaling. *Physiol. Genomics* **21**, 396–403 (2005).
110. Yang, Y.-C. *et al.* Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 10269–10274 (2003).
111. Mullen, A. C. *et al.* Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell* **147**, 565–576 (2011).
112. Hess, J., Angel, P. & Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.* **117**, 5965–5973 (2004).
113. Näär, A. M., Lemon, B. D. & Tjian, R. Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 475–501 (2001).

114. Rosenfeld, M. G., Lunyak, V. V. & Glass, C. K. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* **20**, 1405–1428 (2006).
115. Kato, Y., Habas, R., Katsuyama, Y., Näär, A. M. & He, X. A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. *Nature* **418**, 641–646 (2002).
116. De Caestecker, M. P. *et al.* The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 2115–2122 (2000).
117. Wang, G., Long, J., Matsuura, I., He, D. & Liu, F. The Smad3 linker region contains a transcriptional activation domain. *Biochem. J.* **386**, 29–34 (2005).
118. Yahata, T. *et al.* The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors. *J. Biol. Chem.* **275**, 8825–8834 (2000).
119. Postigo, A. A., Depp, J. L., Taylor, J. J. & Kroll, K. L. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J* **22**, 2453–2462 (2003).
120. Verschueren, K. *et al.* SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J. Biol. Chem* **274**, 20489–20498 (1999).
121. Sun, Y. *et al.* Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Mol. Cell* **4**, 499–509 (1999).
122. Wang, W., Mariani, F. V., Harland, R. M. & Luo, K. Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 14394–14399 (2000).
123. Luo, K. *et al.* The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev* **13**, 2196–2206 (1999).
124. Wu, J. W. *et al.* Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell* **111**, 357–367 (2002).
125. Stroschein, S. L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. & Luo, K. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **286**, 771–774 (1999).
126. Luo, K. Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 65–70 (2004).
127. Xi, Q. *et al.* A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators. *Cell* **147**, 1511–1524 (2011).
128. Xi, Q., He, W., Zhang, X. H.-F., Le, H.-V. & Massagué, J. Genome-wide impact of the BRG1 SWI/SNF chromatin remodeler on the transforming growth factor beta transcriptional program. *J. Biol. Chem.* **283**, 1146–1155 (2008).
129. Bai, R.-Y. *et al.* SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFbeta signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 181–190 (2002).

130. Leibig, W. K. Smif ist ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung und Autoimmunität *in vivo* [Dissertation]. (2009).
131. Rzeckowski, K. *et al.* c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *J. Cell Biol.* **194**, 581–596 (2011).
132. Lykke-Andersen, J. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8114–8121 (2002).
133. Collier, J. & Parker, R. Eukaryotic mRNA decapping. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 861–890 (2004).
134. Cho, H., Kim, K. M. & Kim, Y. K. Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex. *Mol. Cell* **33**, 75–86 (2009).
135. Tritschler, F. *et al.* DCP1 forms asymmetric trimers to assemble into active mRNA decapping complexes in metazoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 21591–21596 (2009).
136. Franks, T. M. & Lykke-Andersen, J. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol. Cell* **32**, 605–615 (2008).
137. Parker, R. & Sheth, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* **25**, 635–646 (2007).
138. Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 430–436 (2009).
139. Van Dijk, E. *et al.* Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* **21**, 6915–6924 (2002).
140. Brannan, K. *et al.* mRNA decapping factors and the exonuclease Xrn2 function in widespread premature termination of RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell* **46**, 311–324 (2012).
141. Kretschmar, M., Doody, J. & Massagué, J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* **389**, 618–622 (1997).
142. Wrighton, K. H., Lin, X. & Feng, X.-H. Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res* **19**, 8–20 (2009).
143. Wrighton, K. H. & Feng, X.-H. To (TGF)beta or not to (TGF)beta: fine-tuning of Smad signaling via post-translational modifications. *Cell. Signal* **20**, 1579–1591 (2008).
144. Javelaud, D. & Mauviel, A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* **24**, 5742–5750 (2005).
145. Guo, X. & Wang, X.-F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* **19**, 71–88 (2009).
146. Cornell, R. A. & Kimelman, D. Activin-mediated mesoderm induction requires FGF. *Development* **120**, 453–462 (1994).
147. LaBonne, C. & Whitman, M. Mesoderm induction by activin requires FGF-mediated intracellular signals. *Development* **120**, 463–472 (1994).

148. Pera, E. M., Ikeda, A., Eivers, E. & De Robertis, E. M. Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev* **17**, 3023–3028 (2003).
149. Fuentealba, L. C. *et al.* Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* **131**, 980–993 (2007).
150. Sapkota, G., Alarcón, C., Spagnoli, F. M., Brivanlou, A. H. & Massagué, J. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol. Cell* **25**, 441–454 (2007).
151. Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massagué, J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* **13**, 804–816 (1999).
152. Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K. & Moses, H. L. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J. Biol. Chem* **274**, 37413–37420 (1999).
153. Brown, J. D., DiChiara, M. R., Anderson, K. R., Gimbrone, M. A., Jr & Topper, J. N. MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem* **274**, 8797–8805 (1999).
154. De Caestecker, M. P. *et al.* Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev* **12**, 1587–1592 (1998).
155. Mori, S. *et al.* TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* **23**, 7416–7429 (2004).
156. Yoshida, K. *et al.* Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am. J. Pathol* **166**, 1029–1039 (2005).
157. Matsuura, I., Wang, G., He, D. & Liu, F. Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry* **44**, 12546–12553 (2005).
158. Kamaraju, A. K. & Roberts, A. B. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J. Biol. Chem* **280**, 1024–1036 (2005).
159. Matsuura, I. *et al.* Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* **430**, 226–231 (2004).
160. Nakao, A. *et al.* TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* **16**, 5353–5362 (1997).
161. Shi, Y. *et al.* Human SMAD4 is phosphorylated at Thr9 and Ser138 by interacting with NLK. *Mol. Cell. Biochem.* **333**, 293–298 (2010).
162. Seong, H.-A., Jung, H. & Ha, H. Murine protein serine/threonine kinase 38 stimulates TGF-beta signaling in a kinase-dependent manner via direct phosphorylation of Smad proteins. *J. Biol. Chem.* **285**, 30959–30970 (2010).
163. Roelen, B. A. J. *et al.* Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* **285**, C823–830 (2003).

164. Zeng, Y. A., Rahnama, M., Wang, S., Sosu-Sedzorme, W. & Verheyen, E. M. *Drosophila* Nemo antagonizes BMP signaling by phosphorylation of Mad and inhibition of its nuclear accumulation. *Development* **134**, 2061–2071 (2007).
165. Morén, A., Raja, E., Heldin, C.-H. & Moustakas, A. Negative regulation of TGF β signaling by the kinase LKB1 and the scaffolding protein LIP1. *J. Biol. Chem.* **286**, 341–353 (2011).
166. Saha, D., Datta, P. K. & Beauchamp, R. D. Oncogenic ras represses transforming growth factor-beta /Smad signaling by degrading tumor suppressor Smad4. *J. Biol. Chem* **276**, 29531–29537 (2001).
167. Liang, M. *et al.* Ubiquitination and proteolysis of cancer-derived Smad4 mutants by SCF^{Skp2}. *Mol. Cell. Biol* **24**, 7524–7537 (2004).
168. Lo, R. S., Wotton, D. & Massagué, J. Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J* **20**, 128–136 (2001).
169. Yang, S., Nugent, M. A. & Panchenko, M. P. EGF antagonizes TGF-beta-induced tropoelastin expression in lung fibroblasts via stabilization of Smad corepressor TGIF. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **295**, L143–151 (2008).
170. Band, A. M., Björklund, M. & Laiho, M. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates transforming growth factor- β signaling by destabilizing ski and inducing Smad7. *J. Biol. Chem.* **284**, 35441–35449 (2009).
171. Nagata, M. *et al.* Identification of a phosphorylation site in c-Ski as serine 515. *J. Biochem.* **148**, 423–427 (2010).
172. Olsen, J. V. *et al.* Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635–648 (2006).
173. Simon, P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* **19**, 1439–1440 (2003).
174. Dellaire, G., Nisman, R., Eskiw, C. H. & Bazett-Jones, D. P. In situ imaging and isolation of proteins using dsDNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **32**, e165 (2004).
175. Jiao, X., Wang, Z. & Kiledjian, M. Identification of an mRNA-decapping regulator implicated in X-linked mental retardation. *Mol. Cell* **24**, 713–722 (2006).
176. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* (1989).
177. Monetti, M., Nagaraj, N., Sharma, K. & Mann, M. Large-scale phosphosite quantification in tissues by a spike-in SILAC method. *Nat. Methods* **8**, 655–658 (2011).
178. Dephoure, N. *et al.* A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 10762–10767 (2008).
179. Daub, H. *et al.* Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol. Cell* **31**, 438–448 (2008).
180. Olsen, J. V. *et al.* Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* **3**, ra3 (2010).

181. Huttlin, E. L. *et al.* A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* **143**, 1174–1189 (2010).
182. Kovács, K. A., Steinmann, M., Magistretti, P. J., Halfon, O. & Cardinaux, J.-R. CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 36959–36965 (2003).
183. Billings, P. C. *et al.* Anomalous electrophoretic mobility of *Drosophila* phosphorylated H1 histone: is it related to the compaction of satellite DNA into heterochromatin? *Nucleic Acids Res.* **6**, 2151–2164 (1979).
184. Schlessinger, J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* **306**, 1506–1507 (2004).
185. Wrana, J. L. *et al.* TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**, 1003–1014 (1992).
186. De Groot, R. P. & Kruijer, W. Transcriptional activation by TGF beta 1 mediated by the dyad symmetry element (DSE) and the TPA responsive element (TRE). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 1074–1081 (1990).
187. Choudhary, C. *et al.* Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol. Cell* **36**, 326–339 (2009).
188. Rush, J. *et al.* Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 94–101 (2005).
189. Rikova, K. *et al.* Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* **131**, 1190–1203 (2007).
190. Gu, T. *et al.* A novel fusion of RBM6 to CSF1R in acute megakaryoblastic leukemia. *Blood* **110**, 323–333 (2007).
191. Smith, C. L., Debouck, C., Rosenberg, M. & Culp, J. S. Phosphorylation of serine residue 89 of human adenovirus E1A proteins is responsible for their characteristic electrophoretic mobility shifts, and its mutation affects biological function. *J. Virol.* **63**, 1569–1577 (1989).
192. Wegener, A. D. & Jones, L. R. Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Evidence for a protein structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits. *J. Biol. Chem.* **259**, 1834–1841 (1984).
193. Mazzucchelli, C. *et al.* Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**, 807–820 (2002).
194. Vantaggiato, C. *et al.* ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J. Biol.* **5**, 14 (2006).
195. Blasco, R. B. *et al.* c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* **19**, 652–663 (2011).
196. Davis, R. J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **268**, 14553–14556 (1993).

197. Songyang, Z. *et al.* A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6486–6493 (1996).
198. Kriegsheim, A. von, Preisinger, C. & Kolch, W. Mapping of signaling pathways by functional interaction proteomics. *Methods Mol. Biol.* **484**, 177–192 (2008).
199. Pursiheimo, J.-P., Kieksi, A., Jalkanen, M. & Salmivirta, M. Protein kinase A balances the growth factor-induced Ras/ERK signaling. *FEBS Lett.* **521**, 157–164 (2002).
200. Preger, E. *et al.* Alternative splicing generates an isoform of the human Sef gene with altered subcellular localization and specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1229–1234 (2004).
201. Kiyatkin, A. *et al.* Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J. Biol. Chem.* **281**, 19925–19938 (2006).
202. Singhirunnusorn, P. *et al.* Transient suppression of ligand-mediated activation of epidermal growth factor receptor by tumor necrosis factor- α through the TAK1-p38 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 12698–12706 (2007).
203. Nishimura, M. *et al.* TAK1-mediated serine/threonine phosphorylation of epidermal growth factor receptor via p38/extracellular signal-regulated kinase: NF- κ B-independent survival pathways in tumor necrosis factor α signaling. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5529–5539 (2009).
204. Rosette, C. & Karin, M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274**, 1194–1197 (1996).
205. Sheridan, D. L., Kong, Y., Parker, S. A., Dalby, K. N. & Turk, B. E. Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J. Biol. Chem.* **283**, 19511–19520 (2008).
206. Wasserman, T. *et al.* A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation. *Mol. Biol. Cell* **21**, 117–130 (2010).
207. Blumenthal, J., Behar, L., Elliott, E. & Ginzburg, I. Dcp1a phosphorylation along neuronal development and stress. *FEBS Lett.* **583**, 197–201 (2009).
208. Lykke-Andersen, J. & Wagner, E. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev.* **19**, 351–361 (2005).
209. Zhu, W. *et al.* Gene suppression by tristetraprolin and release by the p38 pathway. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **281**, L499–508 (2001).
210. Bostock, C. J., Prescott, D. M. & Kirkpatrick, J. B. An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Exp. Cell Res.* **68**, 163–168 (1971).

211. Zieve, G. W., Turnbull, D., Mullins, J. M. & McIntosh, J. R. Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp. Cell Res.* **126**, 397–405 (1980).
212. Schiff, P. B. & Horwitz, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1561–1565 (1980).
213. Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D. & Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 9552–9556 (1993).
214. Ajiro, K., Yoda, K., Utsumi, K. & Nishikawa, Y. Alteration of cell cycle-dependent histone phosphorylations by okadaic acid. Induction of mitosis-specific H3 phosphorylation and chromatin condensation in mammalian interphase cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 13197–13201 (1996).
215. Swetloff, A. *et al.* Dcp1-bodies in mouse oocytes. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4951–4961 (2009).
216. Nigg, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 21–32 (2001).
217. Songyang, Z. *et al.* Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr. Biol.* **4**, 973–982 (1994).
218. Bodart, J.-F. L. Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *J. Cell. Biochem.* **109**, 850–857 (2010).
219. Roberts, E. C., Hammond, K., Traish, A. M., Resing, K. A. & Ahn, N. G. Identification of G2/M targets for the MAP kinase pathway by functional proteomics. *Proteomics* **6**, 4541–4553 (2006).
220. D’Angiolella, V., Mari, C., Nocera, D., Rametti, L. & Grieco, D. The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev.* **17**, 2520–2525 (2003).
221. Subbaramaiah, K., Hart, J. C., Norton, L. & Dannenberg, A. J. Microtubule-interfering agents stimulate the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of ERK1/2 AND p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 14838–14845 (2000).
222. Shtil, A. A. *et al.* Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells. *Oncogene* **18**, 377–384 (1999).
223. Zelivianski, S., Cooley, A., Kall, R. & Jeruss, J. S. Cyclin-dependent kinase 4-mediated phosphorylation inhibits Smad3 activity in cyclin D-overexpressing breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **8**, 1375–1387 (2010).
224. Zhu, S., Wang, W., Clarke, D. C. & Liu, X. Activation of Mps1 promotes transforming growth factor-beta-independent Smad signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 18327–18338 (2007).
225. Velden, J. L. J. van der, Alcorn, J. F., Guala, A. S., Badura, E. C. H. L. & Janssen-Heininger, Y. M. W. c-Jun N-terminal kinase 1 promotes transforming growth factor- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition via control of linker phosphorylation and transcriptional activity of Smad3. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 571–581 (2011).

226. Hartsough, M. T. & Mulder, K. M. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 7117–7124 (1995).
227. Wang, G., Matsuura, I., He, D. & Liu, F. Transforming growth factor- β -inducible phosphorylation of Smad3. *J. Biol. Chem.* **284**, 9663–9673 (2009).
228. Funaba, M. & Mathews, L. S. Identification and characterization of constitutively active Smad2 mutants: evaluation of formation of Smad complex and subcellular distribution. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1583–1591 (2000).
229. Yingling, J. M. *et al.* Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 7019–7028 (1997).
230. Angel, P. & Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 129–157 (1991).
231. Derynck, R., Zhang, Y. & Feng, X. H. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* **95**, 737–740 (1998).
232. Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483–16486 (1995).
233. Mayya, V. *et al.* Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal* **2**, ra46 (2009).
234. Zanivan, S. *et al.* Solid tumor proteome and phosphoproteome analysis by high resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **7**, 5314–5326 (2008).
235. Beausoleil, S. A. *et al.* Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12130–12135 (2004).
236. She, M. *et al.* Structural basis of dcp2 recognition and activation by dcp1. *Mol. Cell* **29**, 337–349 (2008).
237. She, M. *et al.* Crystal structure of Dcp1p and its functional implications in mRNA decapping. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 249–256 (2004).
238. Correia, J. J., Chacko, B. M., Lam, S. S. & Lin, K. Sedimentation studies reveal a direct role of phosphorylation in Smad3:Smad4 homo- and hetero-trimerization. *Biochemistry* **40**, 1473–1482 (2001).
239. Inman, G. J. & Hill, C. S. Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 51008–51016 (2002).
240. Wu, J. W., Fairman, R., Penry, J. & Shi, Y. Formation of a stable heterodimer between Smad2 and Smad4. *J. Biol. Chem.* **276**, 20688–20694 (2001).
241. Tzachanis, D. *et al.* Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat. Immunol.* **2**, 1174–1182 (2001).
242. Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Lagna, G. & Massagué, J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* **388**, 82–87 (1997).
243. Kim, J., Johnson, K., Chen, H. J., Carroll, S. & Laughon, A. Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**, 304–308 (1997).

244. Baburajendran, N., Jauch, R., Tan, C. Y. Z., Narasimhan, K. & Kolatkar, P. R. Structural basis for the cooperative DNA recognition by Smad4 MH1 dimers. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8213–8222 (2011).
245. Song, M.-G., Li, Y. & Kiledjian, M. Multiple mRNA decapping enzymes in mammalian cells. *Mol. Cell* **40**, 423–432 (2010).
246. Geisler, S., Lojek, L., Khalil, A. M., Baker, K. E. & Collier, J. Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes. *Mol. Cell* **45**, 279–291 (2012).
247. Li, Y., Song, M.-G. & Kiledjian, M. Transcript-specific decapping and regulated stability by the human Dcp2 decapping protein. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 939–948 (2008).
248. Dibrov, A., Kashour, T. & Amara, F. M. The role of transforming growth factor beta signaling in messenger RNA stability. *Growth Factors* **24**, 1–11 (2006).
249. Yoon, J.-H., Choi, E.-J. & Parker, R. Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **189**, 813–827 (2010).
250. Xu, J. & Chua, N.-H. Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *EMBO J.* **31**, 1975–1984 (2012).

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro, 10 ⁻⁶
A.d.	Aqua destillata
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMP	<i>bone morphogenetic proteins</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Cu	Curie
Da	Dalton
DAPI	4',6 Diamidino-2-phenylindol
Dcp	<i>decapping enzyme</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	et aliter
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²), gramm
GFP/eGFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde(n)
HA	Hemagglutinin
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
J	Joule
K	kilo, 10 ³
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
L	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli, 10 ⁻³
M	Mol pro Liter, molar
M-Phase	Mitotische Phase
Mef	murine embryonale Fibroblasten
min	Minute(n)
miRNA	microRNA

mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
n	nano, 10^{-9}
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pondus Hydrogenii (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
PI	Propidium Iodid
PMSF	Phenylmetansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
R-Smad	Rezeptor-assoziierte Smad
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
<i>S. cerevisiae</i>	Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
Smif	Smad4 interacting factor
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (unit)
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis (<i>weight/volume</i>)

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

9 Danksagung

Viele Menschen haben direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihnen möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Küster danke ich für die freundliche Bereitschaft, diese Dissertation in den Fachbereich Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Justus Duyster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Gelegenheit, an diesem äußerst interessanten Projekt zu arbeiten. Er hat mir viel Vertrauen entgegengebracht und Freiraum für selbständige Arbeiten gegeben. Für die fachlichen Diskussionen und wertvollen Vorschläge sowie die großzügige Unterstützung des Projekts möchte ich ihm ausdrücklich danken.

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation am hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar anzufertigen.

Besonders danken möchte ich ebenfalls Frau Dr. Wibke Kathrin Leibig für Ihre engagierte Einführung in das Thema, Ihre fachliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an diejenigen, die das ganze Labor durch ihren organisatorischen Einsatz am Laufen halten: unseren TAs Astrid Fröschl, Claudia Mugler, Petra Schenk, Jana Sänger, Melanie Sickinger, Sabine Wötzel und Frau Budak.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Duyster danke ich für die nette und teilweise äußerst lustige Arbeitsatmosphäre, für die sehr gute Zusammenarbeit, für viele hilfreiche und fruchtbare Diskussionen und diverse nette gemeinsame Unternehmungen.