

Quantitative Analyse der ALK1-vermittelten Signalverarbeitung in einzelnen lebenden Endothelzellen in Abhängigkeit von Krankheits-assoziierten Mutationen

Antragsteller

Prof. Dr. Alexander Loewer
Technische Universität Darmstadt
Fachbereich Biologie
Schnittspahnstraße 13
64287 Darmstadt

Zielsetzung

Ziel dieses Projekts ist es, ein besseres Verständnis für die molekulare Funktionsweise des ALK1 – Signalwegs in einzelnen lebenden Endothelzellen zu entwickeln und durch krankheitsassoziierte Mutationen ausgelöste Veränderungen in der Signalverarbeitung zu untersuchen. Dazu wollen wir eine Kombination von quantitativen zeitaufgelösten Messungen in einzelnen Zellen und computergestützter Bild- und Datenanalyse verwenden. Zahlreiche Studien belegen, dass die Dynamik von Signalverarbeitungsprozessen die zelluläre Antwort auf ein gegebenes Signal bestimmen kann. Um die Dynamik der ALK1-vermittelte Signalverarbeitung zu charakterisieren, werden wir die Translokation von SMAD1/5/8 in den Zellkern einzelner lebender Endothelzellen über die Zeit mittels fluoreszierender Reporter bestimmen. Dabei werden wir uns auf die Stimulierung mit BMP9 und 10 konzentrieren und Gemeinsamkeiten und Unterschiede herausarbeiten. Als Vergleich werden wir die Aktivierung durch angiogene Ligande wie BMP2 und 6 untersuchen. Um die Bedeutung der SMAD1/5/8-Dynamik für die zelluläre Antwort zu ermitteln, werden wir sowohl die Expression definierter Zielgene messen als auch phänotypische Änderungen in Migration und Proliferation verfolgen.

Anschließend wollen wir untersuchen, welche Effekte HHT-assoziierte Mutationen auf die Dynamik des Signalwegs in einzelnen Endothelzellen haben. Mutationen in den BMP9/10-Rezeptoren Endoglin und ALK1 sowie in SMAD4 gehören zu den häufigsten Ursachen der HHT. Um die zellulären Auswirkungen der ALK1-Mutationen besser zu verstehen, werden wir krankheitsrelevante Mutationen durch Cas9 vermittelte genomische Editierung in Endothelzellen einfügen, die fluoreszierende Reporter für SMAD1/5/8 exprimieren. Um die Notwendigkeit somatischer Mutationen für die Ausprägung des Phänotyps zu untersuchen, werden wir sowohl homozygote als auch heterozygote Mutationen einführen. Anhand dieser Zellmodelle werden wir Änderungen in der dynamischen SMAD1/5/8-Antwort auf BMP9/10-Stimulation bestimmen und die zellulären Auswirkungen anhand von Zielgen-Expression und phänotypischen Änderungen ermitteln.

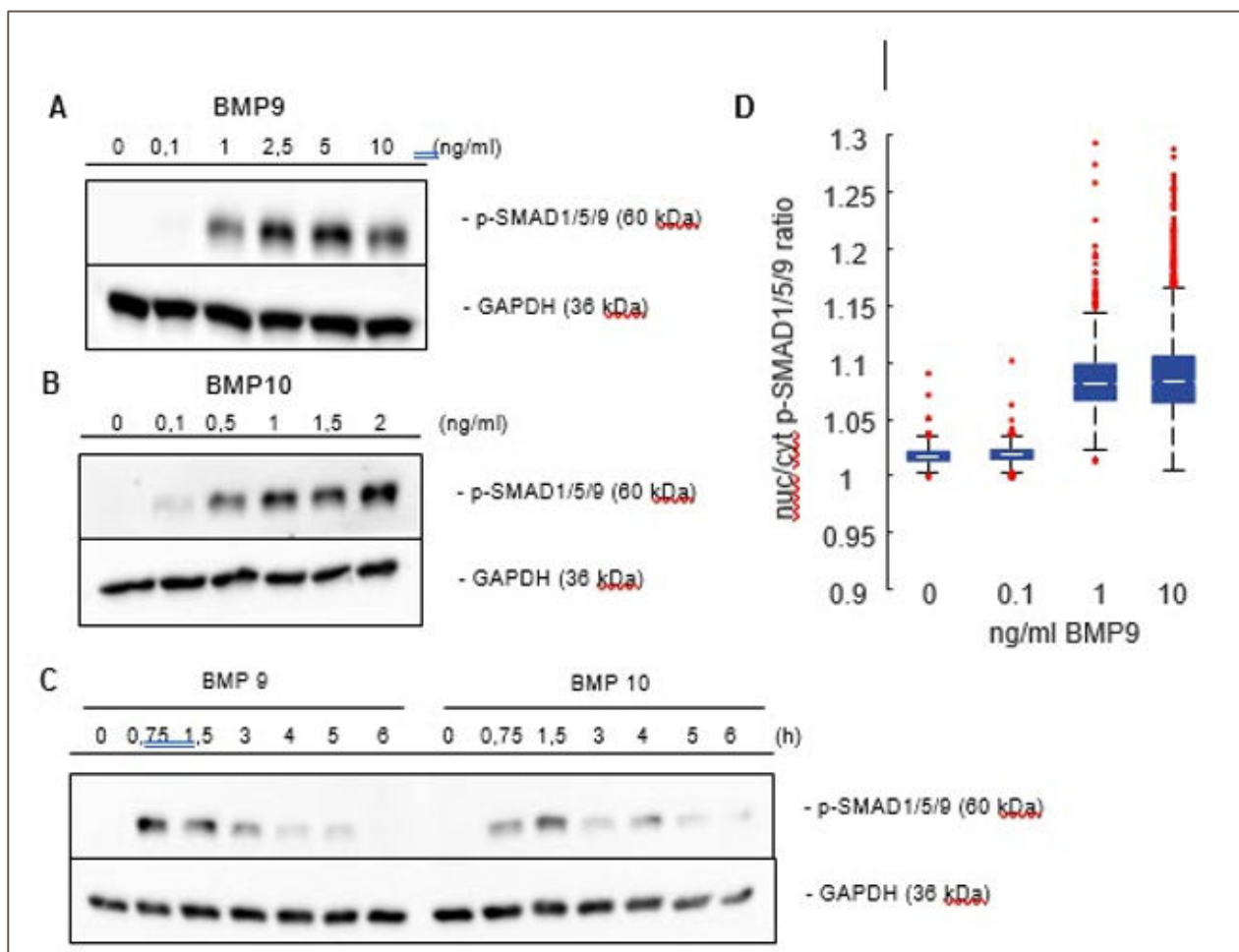
...

Zeitraumen

Das Projekt ist auf 36 Monate ausgelegt und wurde Ende Mai 2019 mit der Förderzusage durch die Morbus Osler-Stiftung begonnen (6 Monate). Bisher ist die Förderung auf 12 Monate beschränkt.

Bisherige Arbeiten

Die bisherigen Arbeiten fokussierten sich auf die Etablierung des zellulären Systems zur Charakterisierung der ALK1-vermittelten Signalverarbeitung. Mittels Western Blot-Analysen der SMAD1/5/9 Phosphorylierung validierten wir, dass die etablierte endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926 sensitiv gegenüber BMP9 und BMP10 ist und führten erste Studien zur vergleichenden Dynamik durch (Abb. 1A-C). Interessanterweise lassen sich bereits erste Unterschiede in der Amplitude und Dauer der Signalverarbeitung im Vergleich der beiden Liganden erkennen (Abb. 1C). Über Immunfluoreszenzstudien konnten wir weiterhin validieren, dass die Translokation von SMAD1/5/9 in den Zellkern als Maß für die ALK1-vermittelte Signalverarbeitung nutzbar ist (Abb. 1D).



...



Abbildung 1: ALK1-vermittelte Signalverarbeitung in EA.hy926-Zellen

- A-B)** Western Blot Analyse der SMAD1/5/9-Phosphorylierung nach Stimulation mit den angegebenen Dosen BMP9 (A) und BMP10 (B).
- C)** Zeitaufgelöste Western Blot Analyse der SMAD1/5/9-Phosphorylierung nach Stimulation mit BMP9 (1 ng/mg) und BMP10 (0,5ng/ml).
- D)** Analyse der Translokation von SMAD1/5/9 in den Zellkern 1,5 h nach Stimulation mit den angegebenen Dosen BMP9 mittels Immunofluoreszenz. N>1000 Zellen/Bedingung. Alle Zellen wurden vor der Stimulation für 20 h in Medium ohne FBS inkubiert.

Zur Erzeugung fluoreszierender Reporter haben wir lentivirale Expressionskonstrukte kloniert, die SMAD1, SMAD5 oder SMAD9 als N-terminale Fusionen mit dem gelb-fluoreszierenden Protein mVenus unter Kontrolle des human Ubiquitin C-Promoters exprimieren. Zur Zeit sind wir im Prozess, lentivirale Partikel zu produzieren und EA.hy926-Zellen damit zu transduzieren. Als alternative Strategie haben wir weiterhin Vektoren erzeugt, die die Cas9-vermittelte Insertion der Reporterkonstrukte in den humanen AAVS1-Lokus vermitteln, der als Genomic Safe Harbour eine stabile Expression der Fusionsproteine ermöglicht. Wir werden diese Strategie parallel zur lentiviralen Transduktion weiterverfolgen.

Neue Entwicklungen

Neuere Studien haben gezeigt, dass die ALK1-vermittelte Signalverarbeitung durch Bindung von FKBP12 an den Rezeptor gedämpft wird. Der Immunmodulator FK506 (Tacrolimus) bindet an FKBP12 und löst dieses vom Rezeptor, wodurch die Aktivität von ALK1 verstärkt wird. Fallbeschreibungen legen nahe, dass dies die Symptome der HHT mildert. Da das therapeutische Fenster von FK506 durch die starke Wirkung auf das Immunsystem sowie durch weitere bekannte Nebenwirkungen eingeschränkt ist, wären für die Therapie von HHT Substanzen wünschenswert, die die Bindung von FKBP12 an ALK1 verhindern, ohne durch Komplexbildung mit Calcineurin immunsuppressiv zu wirken. Die Arbeitsgruppe Hausch an der TU Darmstadt entwickelt solche Substanzen, deren Wirkung auf BMP9-Phosphorylierung wir in ersten Experimenten bestätigen konnten (Abb. 2 A-B). Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse wollen wir FKBP12-Inhibitoren in die ursprünglich geplanten Untersuchungen integrieren.

...



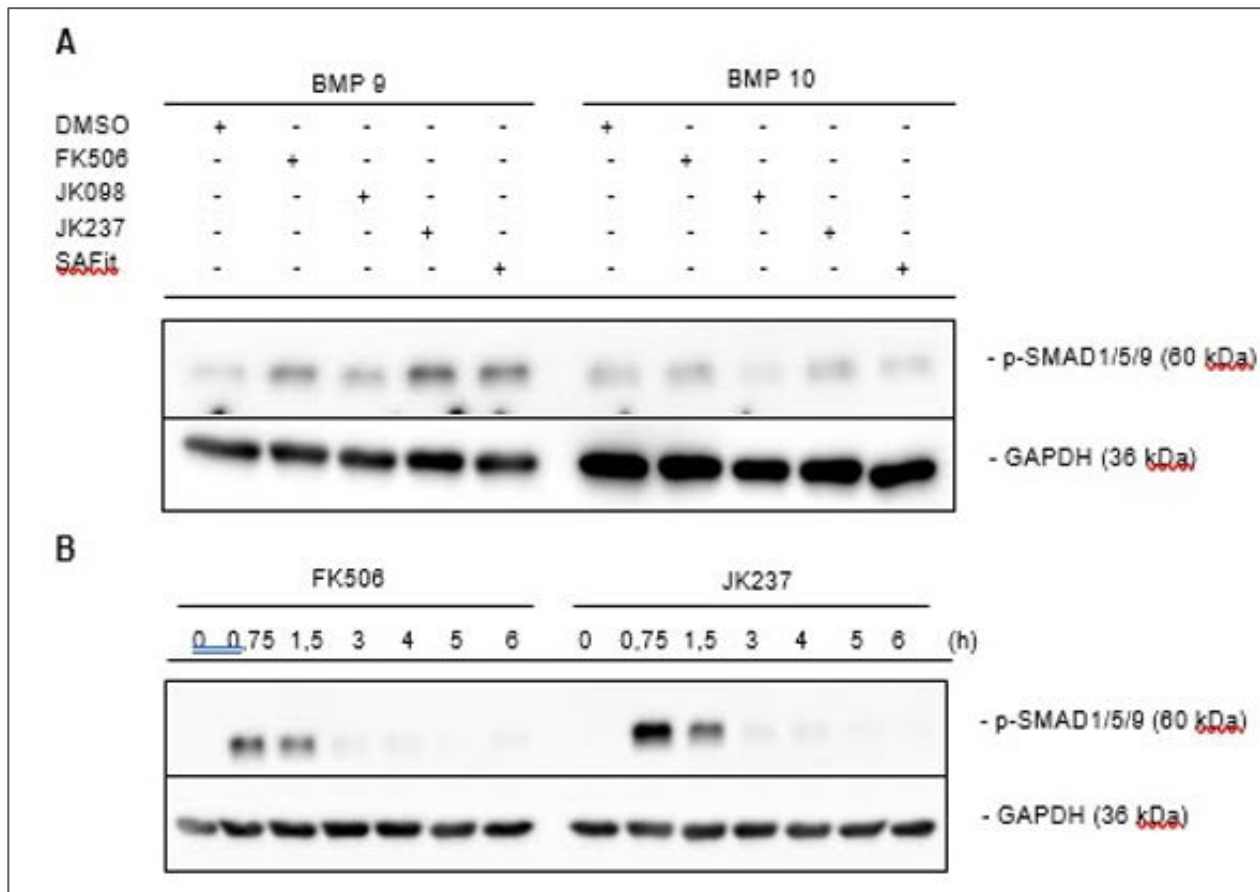


Abbildung 2: FKB12-Inhibitoren verstärken die ALK1-vermittelte Signalverarbeitung.

- A)** Western Blot Analyse der SMAD1/5/9-Phosphorylierung nach Stimulation von EA.hy296 Zellen mit BMP9 (0,5 ng/ml) und BMP10 (0,1 ng/ml). Zellen wurden 1 h vor der Stimulation mit den angegebenen FKBP12 (FK506, JK098 und JK237) bzw. FKBP51 (SAFit)-Inhibitoren (jeweils 10 μ M) behandelt.
- B)** Western Blot Analyse der SMAD1/5/9-Phosphorylierung nach Stimulation von EA.hy296 Zellen mit BMP9 (0,5 ng/ml) zu den angegebenen Zeitpunkten. Zellen wurden 1 h vor der Stimulation mit FK506 bzw. JK237 (je 10 μ M) behandelt. Alle Zellen wurden vor der Stimulation für 20 h in Medium ohne FBS inkubiert.

