

**Analyse der konditionell-induzierten
Überexpression von Smad7 in epithelialen
Geweben der adulten Maus**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

Thorsten Maass
geboren in Bad Kreuznach

Mainz, 2006

Tag der mündlichen Prüfung: Mainz, 1. August 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Epitheliale Gewebe	2
1.1.1. Haut	3
1.2. TGF-β	5
1.2.1. TGF- β Superfamilie	5
1.2.2. Signaltransduktion der TGF- β Superfamilie	7
1.2.2.1. Rezeptoren und Rezeptoraktivierung	7
1.2.2.2. Intrazelluläre Signalweiterleitung	9
1.2.2.3. Regulation der Signaltransduktion	11
1.3. Biologische Funktionen von TGF-β und Activin	13
1.3.1. TGF- β und Activin in der Haut	13
1.4. Cre/loxP-Rekombinasesystem	16
1.5. Ziel der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	20
2.1.1. Versuchstiere	20
2.1.2. Chemikalien und Enzyme	20
2.1.3. Antikörper und Kits	20
2.1.3.1. Antikörper	20
2.1.3.2. Kits	21
2.1.4. Oligonucleotide	21
2.1.4.1. Genotypisierungsprimer	21
2.1.4.2. RT-PCR-Primer	21
2.1.5. Häufig verwendete Lösungen	23
2.1.5.1. Wasser	23
2.1.5.2. Lösungen für molekularbiologische Methoden	23
2.1.5.3. Lösungen für histologische Methoden	24
2.1.5.4. Sonstige Lösungen	25
2.1.6. Geräte	25
2.1.7. Verbrauchsmaterialien	26
2.1.8. Computer und Software	26
2.2. Methoden	27
2.2.1. molekularbiologische Methoden	27
2.2.1.1. Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA	27
2.2.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
2.2.1.3. DNA-Gelelektrophorese	29
2.2.1.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben	29
2.2.1.5. Reverse Transkriptase Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR)	29

2.2.2.	Histologische Methoden	31
2.2.2.1.	Anfertigung von Kryoschnitten	31
2.2.2.2.	X-Gal-Färbung	31
2.2.2.3.	Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung	31
2.2.2.4.	Nachweis der Zellproliferation mittels BrdU-Markierung	32
2.2.3.	Weitere Methoden	33
2.2.3.1.	Aktivierung der cre-Rekombinaseaktivität	33
2.2.3.2.	Durchflußzytometrie und Bestimmung der Gesamtzellzahl in Thymus und Milz	33
2.2.3.3.	Präparation und Rasterelektronenmikroskopie von Zähnen	33
2.2.4.	statistische Analysen	34
3.	Ergebnisse	35
3.1.	Verwendete transgene Mauslinien	36
3.1.1.	K5-Smad7	36
3.1.2.	K14-creER ^{T2}	39
3.2.	Zucht doppeltransgener Tiere	40
3.2.1.	Experimentell verwendete Genotypen	40
3.3.	Induktion der Rekombination und Zeiteinteilung	41
3.4.	Nachweis der Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes und der Expression von transgenspezifischem Smad7	42
3.4.1.	Nachweis der Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes	42
3.4.1.1.	Nachweis der Rekombination mittels PCR	42
3.4.1.2.	Analyse der Reportergenexpression	44
3.4.2.	Expressionsnachweis von transgenspezifischem Smad7	47
3.5.	Auftretende Phänotypische Veränderungen	49
3.5.1.	Mortalität	49
3.5.2.	Körpergewichtsverlauf	50
3.5.3.	Tasthaare	52
3.5.4.	Fellerscheinungsbild	53
3.5.5.	Zähne	55
3.6.	Weiterführende Analysen	58
3.6.1.	Durchflußzytometrische Analysen des Thymus und der Milz	58
3.6.1.1.	Analyse der T-Zellen des Thymus der Linie K5-Smad7-tg1	59
3.6.1.2.	Analyse der T-Zellen des Thymus der Linie K5-Smad7-tg2	63
3.6.1.3.	Analyse der Milz zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8	67
3.6.2.	Histologische Untersuchungen der Haut	67
3.6.2.1.	HE-Färbungen	68
3.6.2.2.	BrdU-Färbungen	69
3.6.3.	Regulation von Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade in der Haut	71

4. Diskussion	73
4.1. Konditionell-induzierbares Expressionssystem für die adulte Maus	74
4.1.1. Verwendete Expressionssysteme	74
4.1.2. Genetischer Hintergrund	75
4.1.3. Züchtung doppeltransgener Tiere	76
4.1.4. Induktion der Rekombination und Expression von transgenspezifischem Smad7	76
4.2. Auftretende Phänotypische Veränderungen	77
4.2.1. Makroskopisch sichtbare phänotypische Veränderungen	77
4.2.2. Phänotypische Veränderungen der Haut	78
4.2.3. Phänotypische Veränderungen des Thymus	80
4.3. Vergleich der beiden verwendeten K5-Smad7-tg-Linien	81
4.4. Zukünftige Arbeiten	83
4.4.1. Weitere Analysen der phänotypischen Veränderungen	83
4.4.2. Anwendungsmöglichkeiten für dieses Tiermodell	84
5. Zusammenfassung	85
6. Literatur	87
7. Anhang	112
7.1. Abkürzungsverzeichnis	113

Auflistung der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1.1.	Entwicklung epithelialer Anhangsorgane	2
Abb. 1.2.	Aufbau der Haut	4
Abb. 1.3.	Grundstruktur der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie	5
Abb. 1.4.	Mitglieder der TGF- β -Superfamilie	6
Abb. 1.5.	Bildung des Ligand-Rezeptorkomplexes und Rezeptoraktivierung	8
Abb. 1.6.	Smad-Struktur und Smad-Verwandschaft	10
Abb. 1.7	Intrazelluläre Signalweiterleitung durch Smads	11
Abb. 1.8.	Induzierbare cre-Rekombinase (K14-creER ^{T2} -Transgenkonstrukt)	16
Abb. 1.9.	Induzierbares Expressionssystem (K5-Smad7-Transgenkonstrukt)	17
Abb. 3.1.	K5-Smad7-Konstrukt	36
Abb. 3.2.	Genotypisierung mittels PCR zur Identifizierung K5-Smad7-transgener Tiere	36
Abb. 3.3.	Reportergenexpression der beiden K5-Smad7-Linien adulter Tieren im Alter von 6 Wochen	38
Abb. 3.4.	K14-reER ^{T2} -Konstrukt	39
Abb. 3.5.	Genotypisierung mittels PCR zur Identifizierung K14-creER ^{T2} -transgener Tiere	39
Abb. 3.6.	Rekombiniertes K5-Smad7-Konstrukt	42
Abb. 3.7.	Nachweis der Rekombination mittels PCR zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8	43
Abb. 3.8.	Reportergenexpression der Linie K5-Smad7-tg1 zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8	45
Abb. 3.9.	Reportergenexpression der Linie K5-Smad7-tg2 zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8	46
Abb. 3.10.	Transgenspezifische Expression von Smad7 zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8	48
Abb. 3.11.	Mortalitätsverlauf der beiden K5-Smad7-Linien	49
Abb. 3.12.	Körpergewichtsverlauf der Tiere der K5-Smad7-tg1-Linie	50
Abb. 3.13.	Körpergewichtsverlauf der Tiere der K5-Smad7-tg2-Linie	51
Abb. 3.14.	Erscheinungsbild der Tasthaare zum Zeitpunkt T0	52
Abb. 3.15.	Erscheinungsbild der Tasthaare zum Zeitpunkt Ti+8	53
Abb. 3.16.	Erscheinungsbild des Fells zum Zeitpunkt T0	53

Abb. 3.17.	Erscheinungsbild des Fells zum Zeitpunkt T_{i+8}	54
Abb. 3.18.	Erscheinungsbild der Schneidezähne zum Zeitpunkt T_0	55
Abb. 3.19.	Erscheinungsbild der Schneidezähne zum Zeitpunkt T_{i+8}	56
Abb. 3.20.	Schneide- und Backenzähne der Linie K5-Smad7-tg1 zum Zeitpunkt T_{i+8}	57
Abb. 3.21.	Relative T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T_0 (K5-Smad7-tg1-Linie)	59
Abb. 3.22.	Gesamtzahl der T-Zellen zum Zeitpunkt T_0 (K5-Smad7-tg1-Linie)	60
Abb. 3.23.	Relative T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T_{i+8} (K5-Smad7-tg1-Linie)	61
Abb. 3.24.	Gesamtzahl der T-Zellen zum Zeitpunkt T_{i+8} (K5-Smad7-tg1-Linie)	62
Abb. 3.25.	Relative T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T_0 (K5-Smad7-tg2-Linie)	63
Abb. 3.26.	Gesamtzahl der T-Zellen zum Zeitpunkt T_0 (K5-Smad7-tg2-Linie)	64
Abb. 3.27.	Relative T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T_{i+8} (K5-Smad7-tg2-Linie)	65
Abb. 3.28.	Gesamtzahl der T-Zellen zum Zeitpunkt T_{i+8} (K5-Smad7-tg2-Linie)	66
Abb. 3.29.	HE-Färbung der Rückenhaul zum Zeitpunkt T_0	68
Abb. 3.30.	HE-Färbung der Rückenhaul zum Zeitpunkt T_{i+8}	69
Abb. 3.31.	Proliferationsrate zum Zeitpunkt T_0	70
Abb. 3.32.	Proliferationsrate zum Zeitpunkt T_{i+8}	70
Abb. 3.33.	Expression von Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade zum Zeitpunkt T_0	71
Abb. 3.34.	Expression von Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade zum Zeitpunkt T_{i+8}	72

Tabellen

Tab. 1.1.	Typ I- und Typ II-Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie	7
Tab. 3.1.	Gewählte Zeiteinteilung	41
Tab. 3.2.	Expressionsstärke von transgensspezifischem Smad7 zu den Zeitpunkten T_0 und T_{i+8}	48
Tab. 3.3.	Absolute T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T_0 (K5-Smad7-tg1-Linie)	60
Tab. 3.4.	Absolute T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T_{i+8} (K5-Smad7-tg1-Linie)	62
Tab. 3.5.	Absolute T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T_0 (K5-Smad7-tg2-Linie)	64
Tab. 3.6.	Absolute T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T_{i+8} (K5-Smad7-tg2-Linie)	66

1. Einleitung

1.1. Epitheliale Gewebe

Epitheliale Gewebe bedecken alle Körperoberflächen eines Organismus und stellen somit die Grenzschicht zwischen dem Organismus und dessen Umwelt dar. Im adulten Organismus übernehmen diese Gewebe im Allgemeinen die Funktion einer Barriere und dienen zum Schutz vor mechanischen Verletzungen, eindringenden Mikroorganismen und vor Verlust von Körperflüssigkeiten. Daneben fungieren epitheliale Gewebe auch als Filter, die z.B. einen gezielten Stoffaustausch mit der äußeren Umgebung gewährleisten (Campbell, 1996).

Epitheliale Gewebe differenzieren sich während der Organogenese des Embryos aus zwei der drei embryonalen Keimblättern, nämlich dem Ektoderm bzw. dem Entoderm. Aus dem Ektoderm bilden sich unter anderem die epithelialen Zellen der Haut und des Vorder- bzw. Enddarmes, aus dem Entoderm epitheliale Zellen der Atmungsorgane, des Darmes (außer Vorder- und Enddarm), des Harnweges und des Geschlechtraktes (Campbell, 1996). Während der Embryonalentwicklung bilden sich durch Wechselwirkungen von epithelialen und mesenchymalen Geweben auch sogenannte epitheliale Anhangsgebilde, wie Zähne und Haare. Die Bildung dieser Anhangsgebilde ist gut untersucht (Thesleff *et al.*, 1995) und es konnte gezeigt werden, daß sich die Entwicklung von Zähnen und Haaren nicht nur morphologisch, sondern auch molekular ähnelt (Sundberg *et al.*, 1994).

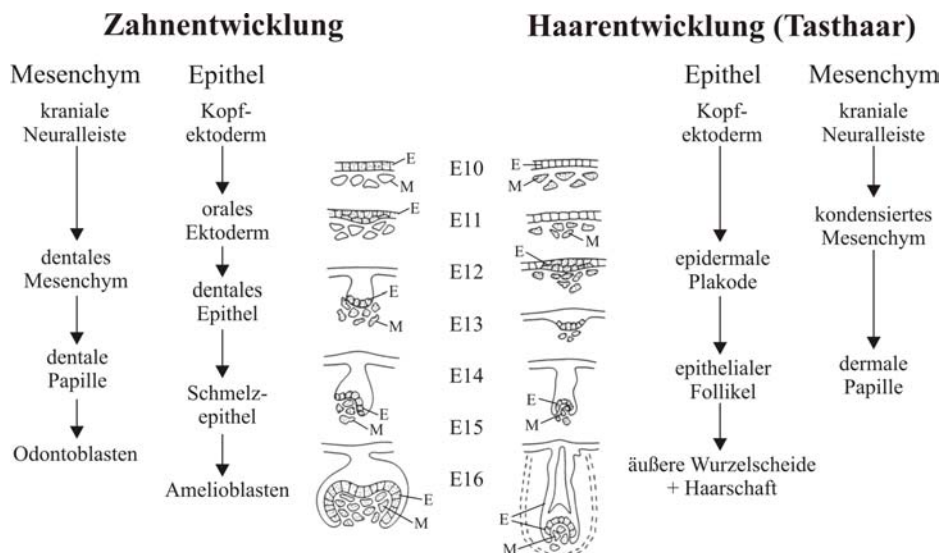


Abb. 1.1. Entwicklung epithelialer Anhangsorgane (nach Kratochwil *et al.*, 1996)

Schematische Gegenüberstellung der Frühentwicklung von Zähnen und Tasthaaren der Maus. Unterhalb einer Verdickung des Epithels bildet sich eine mesenchymale Kondensation. Anschließend wachsen die Epithelzellen in das Mesenchym ein und umschließen dabei eine mesenchymale Papille. Die jeweiligen Differenzierungsschritte der epithelialen (E) bzw. mesenchymalen (M) Derivate ist mit Pfeilen dargestellt. Die Entwicklungsstadien E10-E16 entsprechen dem Alter des Embryos 10-16 Tage *post coitum*.

1.1.1. Haut

Die Haut bedeckt die gesamte Körperoberfläche und stellt mit einem Anteil von ca. 16% des Gesamtkörpergewichtes das größte Organ dar. Die Haut besteht aus zwei Hauptkompartimenten, dem apikalen Oberflächenepithel (= Epidermis) und dem basalen Corium (= Dermis).

Die Epidermis, ein stratifiziertes (= mehrschichtiges) Epithel, läßt sich in vier Schichten unterteilen. Die unterste Schicht, das *stratum germinativum* (Basalschicht), enthält neben den epidermalen Stammzellen (Alonso *et al.*, 2003) auch ruhende, sich teilende und früh differenzierte Keratinozyten. Daneben lassen sich auch andere Zellen, wie z.B. Melanozyten, Langerhans- und Merkelzellen finden. Über der Basalschicht befindet sich das *stratum spinosum* (Stachelzellschicht). Diese Schicht geht in das *stratum granulosum* (Granulaschicht) über. Die oberste Schicht der Epidermis bildet das *stratum corneum* (Hornschicht). Die Zellen dieser Schicht besitzen keine Zellkerne mehr und sind stark keratinisiert. Diese Zellen werden kontinuierlich abgestoßen und durch Zellen ersetzt, die der Basalschicht entstammen. Die Erneuerung epidermaler Zellen erfolgt über einen Zeitraum von ~7-10 Tagen, ausgehend von den sich teilenden Zellen der Basalschicht über das Auswandern und gleichzeitige Differenzieren dieser Zellen in die Hornschicht. In der Hornschicht verbleiben diese Zellen 4-6 Tage ehe sie abgestoßen werden (Bogovski, 1997). Neben der Organisation in Zellschichten weist die Epidermis eine klonale Organisation mit einer Ausdehnung von jeweils ~10 Zellen auf. Diese Organisation beruht darauf, daß eine epitheliale Stammzelle nicht nur für die Erneuerung der direkt über ihr liegenden Zellen, sondern auch für die der benachbarten Zellen der Basalschicht verantwortlich ist (Mackenzie, 1997).

Unterhalb der Basalmembran befindet sich die Dermis, ein lockeres Bindegewebe, dessen Matrix durch ein Netzwerk von retikulären und elastischen Fasern gebildet wird. Innerhalb der Dermis lassen sich Melanozyten, Histozyten, Fettzellen, Muskelzellen, Nerven, Blutgefäße, Mastzellen und in Abhängigkeit von Umgebungsbedingungen auch eingewanderte inflammatorische Zellen finden. Die Haarfollikel sind in die Dermis eingebettet.

Unter der Dermis befindet sich die Subcutis (= Hypodermis), welche die Haut mit darunterliegenden Strukturen wie Knochen oder Muskulatur verbindet. In weiten Bereichen stellt sich die Hypodermis in Form von subcutanem Fettgewebe dar (Abb. 1.2.).

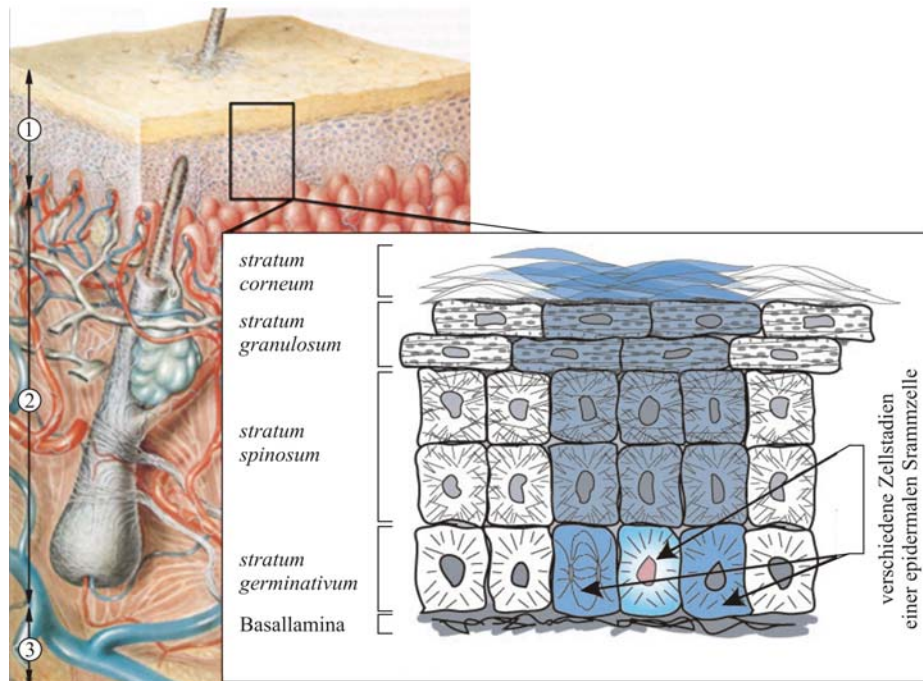


Abb.1.2. Aufbau der Haut (nach Alonso *et al.*, 2003)

Bei der Darstellung der Haut sind die Bereiche der Epidermis (1), der Dermis (2) und der Hypodermis (3) markiert. Die Vergrößerung zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Zellschichten der Epidermis. Daneben ist auch die prinzipielle säulenartige Organisation der Epidermis dargestellt, bei der die Zellen einer klonalen 'epidermalen Säule' bläulich markiert sind.

Epitheliale Gewebe, so auch die Epidermis, lassen sich durch ein spezifisches Expressionsmuster von Keratinkomponenten charakterisieren. Keratine sind Strukturproteine der epithelialen Intermediärfilamente und werden in zwei Typen eingeteilt, in Keratine des sauren Typ I (Keratine 9-20) bzw. des basischen Typ II (Keratine 1-8) (Moll *et al.*, 1982 ; Hesse *et al.*, 2001). Intermediärfilamente bilden sich aus einem Heterooligomer, bestehend aus einem sauren und einem basischen Keratin.

Das spezifische Expressionsmuster der Keratine der Epidermis bei adulten Mäusen ändert sich bei der Auswanderung und den Differenzierungsvorgängen der Keratinozyten. So werden in der Basalschicht der Epidermis die Keratine 5 und 14 exprimiert, während in den suprabasalen Schichten die Keratine 1 und 10 exprimiert werden. Neben den Keratinen 1 und 10 werden in den suprabasalen Schichten auch die Keratine 2, 9 und 11 exprimiert (Fuchs *et al.*, 1980).

Die Keratinexpression in den Haarfollikeln stellt sich etwas anders dar. So werden die Keratine 5 und 14 in der äußeren und die Keratine 1 und 10 in der inneren Wurzelscheide exprimiert (Heid *et al.*, 1986 ; Lynch *et al.*, 1986).

1.2. TGF- β

Die Entwicklung, Homöostase und Regeneration von Geweben erfordert ein koordiniertes System aus Wachstums- und Differenzierungsvorgängen, welches teilweise durch ein kompliziertes Netzwerk sezernierter Proteine gesteuert wird (Jacobson *et al.*, 1988 ; Rothe *et al.*, 1989 ; Jessel *et al.*, 1992 ; Alberts *et al.*, 1995). Einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren der dabei Einfluß auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen nimmt, ist dabei der *transforming growth factor-beta* (TGF- β), ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie (Roberts *et al.*, 1982 ; Kingsley, 1994).

1.2.1. TGF- β Superfamilie

Diese Superfamilie ist nach dem erstmals 1982 isolierten Wachstumsfaktor TGF- β benannt (Roberts *et al.*, 1982). Die Mitglieder dieser Superfamilie werden zunächst als Präproteine synthetisiert. Diese besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die diese Proteine für den sekretorischen Weg bestimmt. Daneben bestehen diese Proteine noch aus einer Prodomäne (50-375 AS) und einer C-terminalen reifen Domäne (110-140 AS). Innerhalb der reifen Domäne befindet sich ein Strukturmotiv bestehend aus 7 Cysteinen, die für die Ausbildung der Tertiärstruktur des Wachstumsfaktors verantwortlich sind. Hierbei bilden 6 der Cysteinreste innerhalb der reifen Domäne ein Strukturmotiv aus, das als 'cystein-knot' bezeichnet wird (Daopin *et al.*, 1992 ; Schlunegger *et al.*, 1992). Der verbleibende Cysteinrest bildet über eine weitere Disulfidbrücke Homo- bzw. Heterodimere zwischen zwei reifen Domänen aus. Der Prodomäne des Vorläuferproteins sind weitere Proteine assoziiert, die zum Einen für die korrekte Ausbildung der Tertiärstruktur der reifen Domäne, und zum Anderen für den Transport des Vorläuferproteins zur extrazellulären Matrix essentiell sind (Khalil, 1999). Zur Aktivierung wird der, über die beiden Prodomänen an die extrazelluläre Matrix gebundene Wachstumsfaktor durch proteolytische Abspaltung freigesetzt (Abb. 1.3.).

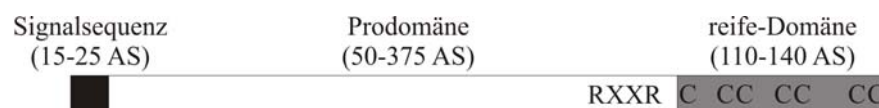


Abb. 1.3. Grundstruktur der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (nach Kingsley, 1994)

Schematische Darstellung der Präproform der TGF- β -Superfamilie. Die Signalsequenz bestimmt die Präproform für den sekretorischen Weg und wird im endoplasmatischen Reticulum abgespalten. Die Prodomäne ist für die korrekte Ausbildung der Tertiärstruktur der reifen Domäne und den Transport des Vorläuferproteins zur extrazellulären Matrix essentiell. Zur Aktivierung wird der Wachstumsfaktor am RXXR-Motiv von der Prodomäne abgespalten. Innerhalb der reifen Domäne sind die für die Ausbildung des 'cystein-knots' bzw. der Dimere verantwortlichen Cysteinreste eingezeichnet.

Die TGF- β -Superfamilie umfaßt in Vertebraten mittlerweile über 35 Mitglieder, welche sich aufgrund von Homologien in ihrer Aminosäuresequenz in Gruppen und Unterfamilien einteilen lassen (Kingsley, 1994 ; Chang *et al.*, 2002). So besteht die namensgebende TGF- β -Unterfamilie aus fünf Mitgliedern, nämlich TGF- β_{1-3} (Säugetier), TGF- β_4 (*Gallus*) und TGF- β_5 (*Xenopus*) (Kondaiha *et al.*, 1990 ; Burt *et al.*, 1992). Eine weitere Unterfamilie bilden die Activine, deren Mitglieder, wie z.B. die Activine- β A-E, aus Säugetieren stammen (Vale *et al.*, 1986 ; Ying *et al.*, 1997). Die größte Gruppe innerhalb dieser Superfamilie ist die *decapentaplegic-vegetal-related* (DVR-) Gruppe (Lyons *et al.*, 1991). Diese Gruppe ist nach den zuerst beschriebenen Mitgliedern *decapentaplegic* (dpp) aus *Drosophila* und *vegetal1* (vg1) aus *Xenopus* benannt. Innerhalb dieser Gruppe lassen sich zum Einen die dpp-Unterfamilie, welche die *bone-morphogenetic-proteins* (BMP) 2 und 4 aus Säugern umfaßt und zum Anderen die 60A-Unterfamilie mit den Mitgliedern vg1, sowie den BMPs 5-8 aus Säugern (Wozney *et al.*, 1988 ; Lyons *et al.*, 1991) erkennen. Zur DVR-Gruppe zählen auch dorsalin (Basler *et al.*, 1993) aus *Gallus*, sowie die aus den Säugern stammenden BMPs 3, 9, 10, die *growth-differentiation-factors* (GDF) 1, 3, 5-7 (Lee *et al.*, 1991 & 1993 ; Storm *et al.*, 1994 ; Hogan, 1996) und nodal (Zhou *et al.*, 1993). Daneben gibt es noch weitere Faktoren, die zwar der TGF- β -Superfamilie angehören, sich aber nicht in Unterfamilien oder Gruppen einordnen lassen, wie z.B. die *müllerian inhibiting substance* (MIS) (Shen *et al.*, 1994), der *glial-derived-neurotropic-growth-factor* (GDNF) (Lin *et al.*, 1993), das Neurturin (Heukeroth *et al.*, 1999) oder das Artemin (Honma *et al.*, 2002) (Abb. 1.4.).

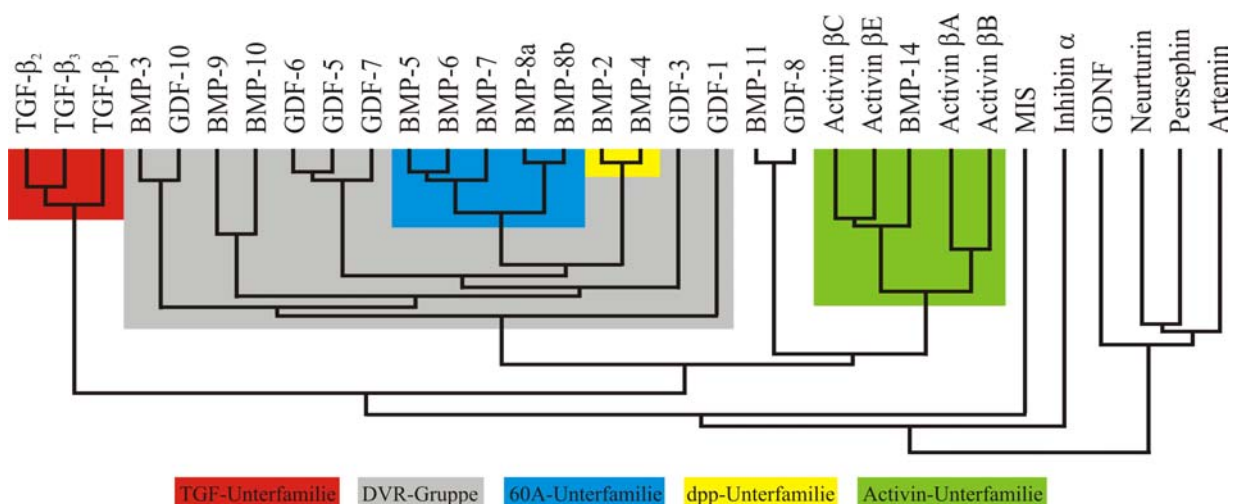


Abb. 1.4. Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (nach Chang *et al.*, 2002)

Darstellung ausgewählter Mitglieder der murinen TGF- β -Superfamilie. Aufgrund von Homologien in der Aminosäuresequenz lassen sich die verschiedenen Mitglieder der TGF- β -Superfamilie zusätzlich in Gruppen und Unterfamilien unterteilen.

1.2.2. Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie

1.2.2.1. Rezeptoren und Rezeptoraktivierung

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie vermitteln ihr Signal über Transmembranrezeptoren mit intrinsischer Serin/Threonin-Kinaseaktivität (Kraus, 1997). Hierbei gibt es zwei Rezeptortypen, den Typ I- und den Typ II-Rezeptor, die strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Derynck *et al.*, 1997). So verfügen beide Rezeptortypen über eine N-terminale extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine Transmembrandomäne und eine C-terminale intrazelluläre Kinasedomäne (Massagué, 1998). Es gibt allerdings zwei bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Rezeptortypen. So läßt sich zum Einen im Typ I-Rezeptor eine hochkonservierte GS-Domäne finden und zum Zweiten ist die Rezeptorkinase des Typ II-Rezeptors im Gegensatz zu der Rezeptorkinase des Typ I-Rezeptors konstitutiv aktiv und wird permanent durch Autophosphorylierung und durch Phosphorylierung mittels zellulärer Kinasen aktiv gehalten (Wrana *et al.*, 1994). Entsprechend der Vielzahl der Liganden, gibt es eine Vielzahl von Subtypen der beiden Rezeptoren (Tab. 1.1.).

Typ-II-Rezeptoren	Liganden
T β RII ActRII ActRIIB BMPRII	TGF- β s Activine Activine BMP-2, BMP-4, BMP-7
Typ-I-Rezeptoren	
T β RI ActRI ActRIb BMPRIa BMPRIb	TGF- β s Activine, TGF- β , BMP-7 Activine BMP-2, BMP-4, BMP-7 BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5

Tab. 1.1. Typ I- und Typ II-Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie (nach Derynck *et al.*, 1997)
Beispiele für Subtypen der Typ I- und Typ II-Rezeptoren und deren Liganden.

Die Bildung des Ligand-Rezeptorkomplexes zu Beginn der Signaltransduktion vollzieht sich in mehreren Teilschritten, die sich je nach TGF- β -Unterfamilie unterscheiden. So wird TGF- β zunächst von einem Homodimer bestehend aus zwei TGF- β -Rezeptoren des Typ II (T β RII) gebunden und anschließend werden von diesem Komplex zwei Typ I TGF- β -Rezeptoren (T β RI) rekrutiert, die dann den signalweiterleitenden Ligand-Rezeptorkomplex bilden (Massagué *et al.*, 1998). Activine hingegen binden zunächst an ein Heterodimer bestehend aus den Activinrezepto-

ren Typ II (ActRII) und Typ IIB (ActRIIB), ehe sich mit zwei der Activin Typ I- (ActRI) bzw. der Activin Typ IB- (ActRIIB) Rezeptoren der signalweiterleitende Ligand-Rezeptorkomplex ausbildet (Derynck *et al.*, 1997). BMP-Liganden binden zunächst an einen Komplex bestehend aus dem BMP-Rezeptor Typ II (BMPRII) und einem der beiden Typ I BMP-Rezeptoren (BMPRIA / BMPRIIB). Dieser Komplex rekrutiert einen weiteren BMPRII und einen BMPRIA bzw. BMPRIIB um den signalweiterleitenden Ligand-Rezeptorkomplex zu bilden (Nohno *et al.*, 1995). Nach erfolgter Ausbildung des signalweiterleitenden Ligand-Rezeptorkomplexes wird nun die GS-Domäne der Typ I-Rezeptoren durch die Typ II Rezeptoren phosphoryliert, was zu einer Aktivierung der Rezeptorkinase der Typ I-Rezeptoren führt. Der aktiviert Typ I-Rezeptor wird nun von den intrazellulären Komponenten der Signalkaskade erkannt und kann diese Komponenten seinerseits durch Phosphorylierung aktivieren (Macias-Silva *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 1996) (Abb. 1.5.).

Die verschiedenen Liganden können zum Teil auch von verschiedenen Rezeptorkombinationen gebunden werden. So kann z.B. BMP2 an den ActRIIB binden (Hoodless *et al.*, 1996) oder ein BMP2-Signal durch eine Kombination von BMPRII und ActRI weitergeleitet werden (Liu *et al.*, 1995). Die biologische Bedeutung dieser Ligand-Rezeptor-Kombinationen ist noch unklar.

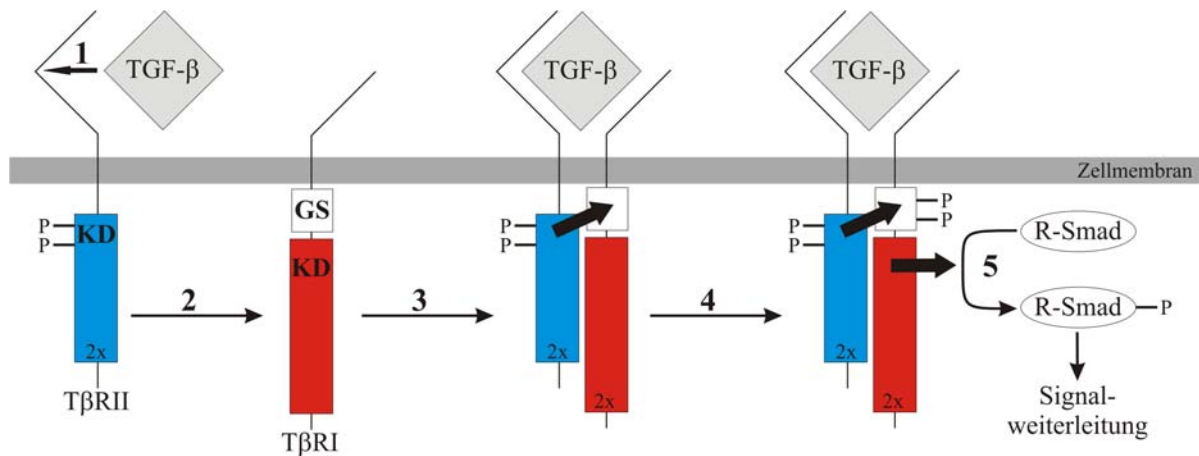


Abb. 1.5. Bildung des Ligand-Rezeptorkomplexes und Rezeptoraktivierung (nach Baker *et al.*, 1997)

Schematische Darstellung der Aktivierung der Typ I- und Typ II-Rezeptoren am Beispiel von TGF-β. Zunächst bindet der Ligand (TGF-β) an ein Homodimer des Typ II-Rezeptors (TβRII) (1) und nach Rekrutierung von zwei Typ I-Rezeptoren (TβRI) (2) bildet sich der signalweiterleitende Ligand-Rezeptorkomplex aus (3). Die Phosphorylierung der GS-Domänen (GS) der Typ I-Rezeptoren durch die Kinasen (KD) der Typ II-Rezeptoren aktiviert die Typ I-Rezeptoren (4), so daß diese nun die intrazellulären Komponenten (R-Smads) der Signalkaskade mittels Phosphorylierung aktivieren (5).

1.2.2.2. Intrazelluläre Signalweiterleitung

Als erste Komponente der intrazellulären Signalweiterleitung von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie wurde in *Drosophila mother-against-dpp* (Mad) als Signalmediator von dpp gefunden (Raftery *et al.*, 1995). In *C.elegans* fand man drei zu Mad homologe Gene, *small-body-size* (sma) 2-4, welche durch Mutationsanalysen der TGF- β -Signaltransduktionskaskade zugeordnet werden konnten (Savage *et al.*, 1996). Daneben entdeckte man auch in Vertebraten Mad-homologe Proteine, die als Smads bezeichnet werden (sma + Mad = Smad) (Derynck *et al.*, 1996) und für die ebenfalls gezeigt werden konnte, daß diese Proteine an der intrazellulären Signalweiterleitung der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie beteiligt sind (Zhang *et al.*, 1996 ; Yingling *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 1996 ; Graff *et al.*, 1996 ; Eppert *et al.*, 1996).

Aufgrund von Sequenzhomologien und ihrer Funktion bei der Signalweiterleitung lassen sich diese Smads in drei Gruppen unterteilen:

- a) rezeptorregulierte Smads (R-Smads),
- b) 'common-partner' Smad (Co-Smad) und
- c) inhibitorische Smads (I-Smads).

Der Grundaufbau der Smads ist bei allen drei der oben genannten Smad-Gruppen gleich und beinhaltet eine N-terminale und eine C-terminale Domäne, welche als MAD-homology-1- (MH1-) bzw. MAD-homology-2- (MH2-) Domäne bezeichnet werden. Beide MH-Domänen sind durch einen Proteinabschnitt variabler Länge (Linker) miteinander verbunden (Massagué, 1998). Innerhalb der Smads einer Gruppe sind diese Domänen vergleichsweise stark konserviert, während sie bei einem Vergleich der Smad-Gruppen untereinander zum Teil stark variieren (Derynck *et al.*, 1998). Innerhalb der beiden MH-Domänen lassen sich Struktur motive erkennen, welche für die Funktion der jeweiligen Smads von Bedeutung sind (Abb. 1.5).

Bei R- und Co-Smads befindet sich innerhalb der MH1-Domäne ein als ' β -hairpin' bezeichnetes Strukturmotiv. Im inaktiven Zustand der R-Smads sorgt dieses Strukturmotiv dafür, daß sich die MH1-Domäne an die MH2-Domäne anlagert und dadurch eine Ausbildung von Heterooligomeren bestehend aus R- und Co-Smads verhindert. Im aktiven Zustand wiederum ist dieses Strukturmotiv für die Ausbildung von Heterooligomeren aus R- und Co-Smads verantwortlich (Hata *et al.*, 1997 ; Kawabata *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2000). Daneben vermittelt dieses Strukturmotiv auch die Bindung an DNA-Sequenzmotive (Liu *et al.*, 1997 ; Shi *et al.*, 1998). Bei den I-Smads läßt sich keine definierte MH1-Domäne finden. Zwar gibt es zwischen den I-Smads Homologien in dem Bereich wo sich bei R- und Co-Smads die MH1-Domäne befindet, allerdings zeigen die I-Smads praktisch keine Homologie bezüglich dieser MH-Domäne zu den Vertretern der beiden

anderen Smad-Gruppen (Souchelnytski *et al.*, 1998). In der MH2-Domäne befindet sich bei R- und Co-Smads ein Strukturmotiv, welches als 'loop L3' bezeichnet wird und verschiedene Aufgaben hat. So vermittelt dieses Strukturmotiv bei den R-Smads die Typ I-Rezeptorspezifität (Lo *et al.*, 1998). Im aktivierten Zustand dient es den R-Smads zur Rekrutierung von Cofaktoren im Nukleus (Chen *et al.*, 1997). Bei dem Co-Smad ist dieses Strukturmotiv ebenfalls vorhanden und dient der Ausbildung von Heterooligomeren zwischen R- und Co-Smads (Maciais-Silva *et al.*, 1996). Bei den R-Smads befindet sich in der MH2-Domäne noch ein weiteres Strukturmotiv, das SSXS-Motiv. Dieses Motiv wird für Aktivierung der R-Smads mittels Phosphorylierung durch die Typ I-Rezeptoren benötigt (Kretzschmar *et al.*, 1997) (Abb. 1.6.).

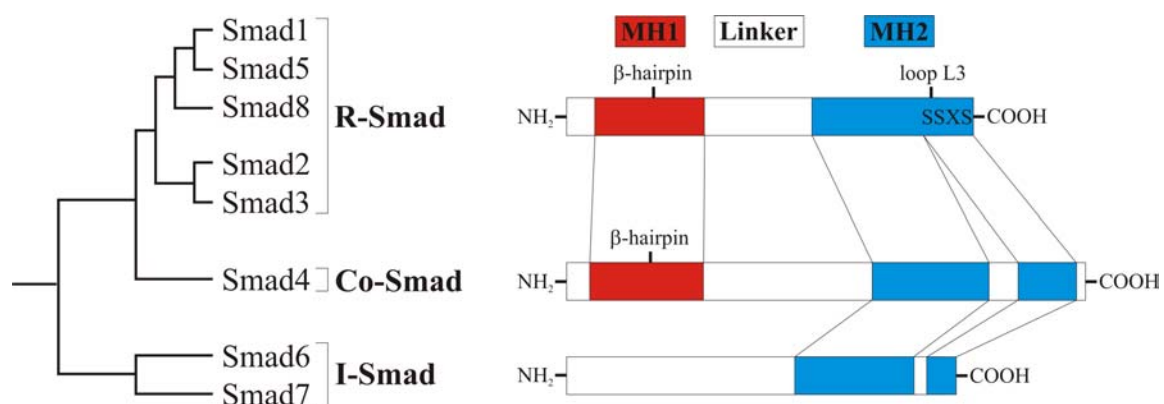


Abb. 1.6. Smad-Struktur und Smad-Verwandschaft (nach Itoh *et al.*, 2000)

Schematische Darstellung der Smad-Struktur und der phylogenetischen Verwandtschaft der drei Smad-Gruppen (R-, Co- und I-Smads). Innerhalb der beiden MH-Domänen sind Struktur motive (β -hairpin, loop L3 und SSXS-Motiv) gezeigt.

Nach erfolgter Ligandenbindung an die Rezeptoren und der darauf folgenden Rezeptoraktivierung binden die inaktiven R-Smads an den aktivierten Typ I-Rezeptor und werden durch dessen Serinkinase phosphoryliert und aktiviert. Die Aktivierung der R-Smads wird durch das membranassoziierte Protein *smad anchor for receptor activation* (SARA) unterstützt, welches inaktive R-Smads rekrutiert und dem aktivierten Typ-I-Rezeptor präsentiert (Tsukazaki *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung der R-Smads durch den aktivierten Typ-I-Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung der R-Smads, bei der sich die MH1- und MH2-Domänen trennen. Im nächsten Schritt bilden die aktivierten R-Smads mit dem Co-Smad Heterooligomere aus (Nakao *et al.*, 1997 ; Kawabata *et al.*, 1998) und translozieren in den Nukleus. Die R-Smads 1, 5, und 8 dienen der Signalweiterleitung der BMPs (Hoodles *et al.*, 1996 ; Graff *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 1996 ; Thomsen *et al.*, 1996 ; Suzuki *et al.*, 1996) und die R-Smads 2 und 3 der Signalweiterleitung der TGF- β s und Activine (Graff *et al.*, 1996 ; Eppert *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1996 ; Baker

et al., 1996 ; Lagna *et al.*, 1996). Im Nukleus bindet das Heterooligomer aus R- und Co-Smad direkt an sogenannte *smad-binding-elements* (SBE) die sich in Promotoren bzw. Regulations-elementen der Zielgene befinden (Yingling *et al.*, 1997). Dort werden von dem R-/Co-Smad-Heterooligomer weitere Transkriptionsfaktoren rekrutiert, welche die Affinität bzw. Spezifität zum Zielgen erhöhen (Liu *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999 ; Hata *et al.*, 2000) (Abb. 1.7.).

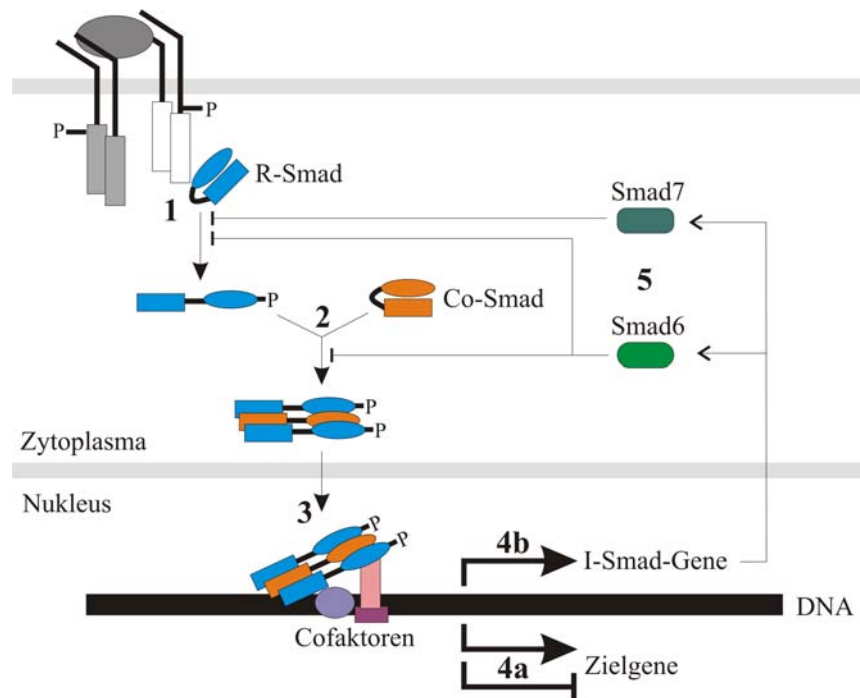


Abb. 1.7. Intrazelluläre Signalweiterleitung durch Smads (nach Itoh *et al.*, 2000)

Nach Phosphorylierung der R-Smads durch den Liganden-Rezeptorkomplex (1), bilden die aktivierten R-Smads mit dem Co-Smad einen heteromeren Komplex, bestehend aus zwei aktivierten R- und einem Co-Smad (2), der in den Nukleus (3) transloziert. Dort bindet dieser Komplex an die DNA und in Zusammenarbeit mit weitere Cofaktoren wird die Expression der Zielgene reguliert. In Abhängigkeit von den Cofaktoren werden die Zielgene aktiviert oder reprimiert (4a). Zu den Zielgenen die aktiviert werden gehören auch die Gene für die I-Smads (4b). Die I-Smads greifen wiederum hemmend in die Signaltransduktion ein (5).

1.2.2.3. Regulation der Signaltransduktion

Eine Möglichkeit der Regulation des Smad-Signalweges erfolgt durch einen 'negative Rückkopplungsmechanismus', der durch die I-Smads Smad6 (Imamura *et al.*, 1997) bzw. Smad7 (Nakao *et al.*, 1997) vermittelt wird (Abb. 1.6.). Smad6 fungiert hierbei als Inhibitor des BMP-Signalweges (Hata *et al.*, 1998), wohingegen Smad7 hauptsächlich den TGF- β -/Activin-Signalweg hemmt (Souchelnytski *et al.*, 1998 ; Ishisaki *et al.*, 1999). Für Smad7 konnte allerdings auch gezeigt werden, daß es ebenfalls die BMP-Signalweiterleitung inhibiert (Casellas *et al.*, 1998).

Die inhibierende Wirkung von Smad6 auf den BMP-Signalweg erfolgt dabei auf mehrere Arten. So ist Smad6 in der Lage aktiviertes Smad1 kompetitiv zu binden und somit die Ausbildung eines aktiven Smad1/Smad4-Komplexes zu verhindern (Hata *et al.*, 1998). Auch wirkt Smad6 in Verbindung mit Hoxc-8 bzw. Hoxc-9 als transkriptioneller Corepressor und verhindert so die Smad1-induzierte Aktivierung von Zielgenen (Bai *et al.*, 2000). Eine weitere Möglichkeit durch die Smad6 den BMP-Signalweg hemmt, erfolgt durch Bindung von Smad6 an den aktivierten Typ I-Rezeptor, wodurch eine weitere Aktivierung von R-Smads verhindert wird (Imamura *et al.*, 1997). Smad7 vermittelt seine inhibierende Wirkung auf den TGF- β -/Activin-Signalweg hauptsächlich durch Interaktion mit dem aktivierten Typ I-Rezeptor wodurch eine Phosphorylierung von Smad2 bzw. Smad3 und somit deren Aktivierung verhindert wird (Nakao *et al.*, 1997 ; Hayashi *et al.*, 1997). Daneben interagiert Smad7 auch mit Smurf1 bzw. Smurf2, zwei E3 Ubiquitinligasen, die eine Rezeptordegradation bewirken (Kavsak *et al.*, 2000 ; Ebisawa *et al.*, 2001). Die Wirkung von Smad6 auf den BMP-Signalweg erfolgt zeitverzögert, da Smad6 erst neusynthetisiert werden muß. Dies wird durch die Bindung des aktivierten Heterooligomers bestehend aus Smad1 bzw. Smad5 und Smad4 an den Smad6-Promoter vermittelt (Ishida *et al.*, 1999). Smad7 übt seine inhibierende Wirkung auf den TGF- β -/Activin-Signalweg fast umgehend aus, da dieses Protein akkumuliert im Zellkern vorliegt und nach Aktivierung des TGF- β -/Activin-Signalweges in das Zytoplasma exportiert wird (Itoh *et al.*, 1998). Allerdings bindet der entsprechende R-/Co-Smad-Komplex (Smad2 bzw. Smad3 und Smad4) auch an den Smad7-Promoter und induziert eine Neusynthese von Smad7 (Nagarajan *et al.*, 1999 ; Stopa *et al.*, 2000). Die Aktivität der I-Smads wird auch von anderen Signalwegen beeinflusst. So induzieren z.B. der *tumor necrosis factor-alpha* (TNF α) oder *interferon-gamma* (IFN γ) die Smad7-Expression (Bitzer *et al.*, 2000 ; Ulloa *et al.*, 1999).

Neben der durch die I-Smads vermittelten Regulation des Smad-Signalweges wird dieser auch durch den 'cross-talk' mit anderen Signalwegen reguliert. Dies erfolgt auf verschiedenen Ebenen der intrazellulären Signalweiterleitung und trägt sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Inhibierung des Signalweges bei. So verhindern MAP-Kinasen durch Phosphorylierung der Linkerregion der R-Smads die Ausbildung des R-/Co-Smadkomplexes bzw. die Akkumulation dieses Komplexes im Zellkern (Kretzschmar *et al.*, 1999 ; Funaba *et al.*, 2002). Eine weitere Regulationsmöglichkeit erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom. So führt dessen Aktivierung zu einer Degradation der Smads und/oder der aktivierten Typ-I-Rezeptoren (Zhu *et al.*, 1999, ; Zhang *et al.*, 2000 ; Kavsak *et al.*, 2000 ; Ebisawa *et al.*, 2001). Von Bedeutung ist ebenfalls die Regulation der vom R-/Co-Smad-Komplex rekrutieren Cofaktoren. So fungieren z.B. AP-1, TFE3, ATF-

2 oder p300 als Coaktivatoren (Zhang *et al.*, 1999 ; Brodin *et al.*, 2000) und TGIF, Ski und Sno (Wotton *et al.*, 1999 ; Luo *et al.*, 1999) als Corepressoren, deren Regulation wiederum Einfluß auf die Aktivierung der Zielgene hat.

1.3. Biologische Funktionen von TGF- β und Activin

TGF- β ist einer der wichtigsten pleiotropen Wachstumsfaktoren. So nimmt TGF- β Einfluß auf Proliferation, Differenzierung, Funktion und Apoptose von Zellen (Glick *et al.*, 1993 ; Motyl *et al.*, 1998 ; Guo *et al.*, 1999). Die essentielle Rolle von TGF- β zeigt sich in Untersuchungen bei denen TGF- β bzw. Komponenten der TGF- β -Signaltransduktion deletiert wurden. Tiere bei denen das TGF- β 1-Gen deletiert wurde zeigten embryonale Lethalität bzw. starben spätestens 4 Wochen nach ihrer Geburt und wiesen in allen Organen eine massive Infiltration von Makrophagen und T-Zellen auf. Daneben konnten bei diesen Tieren nekrotische Veränderungen und Läsionen in allen Organen beobachtet werden (Kulkarni *et al.*, 1993). Die Deletion des TGF- β Typ II-Rezeptors, bzw. von Smad2 oder Smad4 führte zu embryonaler Letalität im Bereich der Zeitpunkte E6,5-E10,5. Dabei zeigten diese Tiere jeweils schwere Störungen innerhalb ihrer Embryonalentwicklung (Masanobu *et al.*, 1996 ; Weinstein *et al.*, 1998 ; Sirard *et al.*, 1998). Veränderungen der TGF- β -Expression im adulten Organismus werden mit zahlreichen Krankheitsbildern wie Arteriosklerose (McCaffrey, 2000), Fibrosen (Border *et al.*, 1994 ; Bedossa *et al.*, 1995), Psoriasis (Li *et al.*, 2004) und autoimmunen Erkrankungen (Chen *et al.*, 1999 ; Horwitz *et al.*, 1999) in Verbindung gebracht. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Entstehung und Entwicklung von Krebs. Veränderungen der TGF- β -Expression und/oder Mutationen bei Komponenten des TGF- β -Signalweges können in Krebszellen nicht nur zu einer Resistenz gegenüber der antiproliferativen Wirkung von TGF- β führen (Knaus *et al.*, 1996 ; Hata *et al.*, 1998), sondern auch zu einer beschleunigten malignen Konversion (Böttlinger *et al.*, 1997 ; Amendt *et al.*, 1998) und einer Hemmung der Immunabwehr (Botti *et al.*, 1998 ; Letterio *et al.*, 1998 ; Ashcroft, 1999) führen. Daneben beschleunigt TGF- β auch die Tumorangiogenese (Wikstrom *et al.*, 1998 ; Breier *et al.*, 2002) und die epidermale-mesenchymale Transition von Tumorzellen (Oft *et al.*, 1998).

Neben TGF- β spielt auch Activin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Differenzierung und Funktion von Zellen, wie Untersuchungen zeigten, in denen Activin bzw. Komponenten der Activin-Signaltransduktion deletiert wurden.

Bei Tieren denen das Activin β A-Gen deletiert wurde, zeigte sich eine perinatale Letalität wobei diese Tiere innerhalb von 24h nach der Geburt starben. Darüber hinaus konnten Störungen während der Embryonalentwicklung festgestellt werden, wie z.B. die fehlende Ausbildung von Tasthaaren oder Schneidezähnen (Matzuk *et al.*, 1995). Deletionen der Activinrezeptoren des Typs IA bzw. IB führen zu schweren Störungen innerhalb der Emryonalentwicklung, sowie zu embryonaler Letalität (Gu *et al.*, 1998 & 1999).

Im adulten Organismus spielt Activin eine wichtige Rolle während Vorgängen der Wundheilung (Hübner *et al.*, 1996) und kann mit dem Krankheitsbild der Psoriasis in Verbindung gebracht werden (Werner *et al.*, 2001). Auch beeinflusst Activin die Differenzierung von Amelioblasten aus dem dentalen Epithel (Wang *et al.*, 2004)

1.3.1. TGF- β und Activin in der Haut

Die Regulation der Proliferation durch TGF- β findet in Abhängigkeit vom Zelltyp statt. So wirkt TGF- β auf die meisten Epithel-, Endothel- und hämatopoetischen Zellen antiproliferativ, indem diese Zellen in der G₁-Phase durch die Expression spezifischer Zellzyklusinhibitoren wie z.B. p15, p21 oder p27 arretiert werden (Hannon *et al.*, 1994 ; Datto *et al.*, 1995 , Reynisdóttir *et al.*, 1995). Auf Keratinozyten wirkt TGF- β *in vitro* als starker Inhibitor der Proliferation (Pittelkow *et al.*, 1988), hingegen zeigten Versuche, bei denen TGF- β *in vivo* in der Epidermis überexprimiert wurde, daß die Wirkung von TGF- β in der Haut wesentlich komplexer ist (Sellheyer *et al.*, 1993 ; Cui *et al.*, 1995 ; Fowlis *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1999 ; Chan *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2004). So zeigte sich bei diesen Versuchen, daß TGF- β sowohl antiproliferativ als auch proliferationsfördernd wirken kann. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Wirkung von TGF- β unter anderem dosisabhängig ist (Wang, 2001). Neben der Regulation von Proliferation und Apoptose wirkt TGF- β in der Haut chemotaktisch auf Makrophagen, Granulozyten, Langerhanszellen und Fibroblasten und stimuliert die Aktivität dieser Zellen. Dies ist speziell bei Wundheilungsvorgängen von Bedeutung (Roberts *et al.*, 1996). Somit spielt TGF- β auch bei der Regulation des Immunstatus der Haut eine wichtige Rolle (Kulkarni *et al.*, 1993 ; Roberts *et al.*, 1996 ; Ashcroft, 1999). Auch bei der Regulation des Haarzyklus ist TGF- β von Bedeutung während der Steuerung des Übergangs von der anagenen in die catagene Phase der Haare (Foitzik *et al.*, 2000).

Tiermodelle, bei denen in epidermalen Zellen die TGF- β -Signalweiterleitung durch Veränderung einzelner Komponenten des Signalweges gehemmt wurde, zeigten variable Phänotypen. So wie-

sen Tiere die konstitutiv einen dominant-negativen TGF- β -Typ II-Rezeptor unter Kontrolle des Keratin 5-Promotors exprimieren, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Karzinogenese im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen auf. Bei Karzinogeneseexperimenten konnte dabei eine erhöhte Proliferation in der Epidermis und eine erhöhte maligne Konversion von Tumoren beobachtet werden (Amendt *et al.*, 1998). Bei Tieren, denen das Smad3-Gen deletiert wurde, zeigten sich veränderte Phänotypen (Yang *et al.*, 1999 ; Yokozeki *et al.*, 2003). So zeigte sich bei diesen Tieren in Wundheilungsversuchen eine beschleunigte Wundheilung (Ashcroft *et al.*, 2000). Die konstitutive Überexpression von Smad7 unter Kontrolle des Keratin 5-Promotors führte zu einem Auftreten von verschiedenen Phänotypen. So kam es durch die Überexpression von Smad7 zu embryonaler bzw. perinataler Letalität. Des weiteren zeigte sich eine Hyperproliferation der Epidermis. Auch die Entwicklung der Haarfollikel war dahingehend beeinträchtigt, daß deren Entwicklung verzögert und deren Anordnung in der Haut unorganisiert war. Dabei konnte auch eine Reduzierung der Typ I bzw. der Typ II TGF- β -Rezeptoren, sowie der Activinrezeptoren der Typen IA, IB und IIA in der Haut gezeigt werden. Auch im Thymus konnten Veränderungen festgestellt werden. So war der Thymus dieser Tiere im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen um $\sim 2/3$ verkleinert und die Gesamtzahl der T-Zellen $\sim 50x$ reduziert. Ebenfalls war die T-Zellentwicklung dahingehend beeinträchtigt, daß sich die Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen veränderte (He *et al.*, 2002).

Wie TGF- β zeigt auch Activin eine komplexe Funktionsweise in der Haut. So wirkt Activin *in vitro* proliferationshemmend auf Keratinozyten (Shimizu *et al.*, 1998 ; Seishimi *et al.*, 1999), wohingegen sich bei Versuchen, in denen *in vivo* Activin βA in der Epidermis überexprimiert wurde zeigte, daß Activin auf Keratinozyten proliferationsfördernd wirkt (Munz *et al.*, 1999).

Auch konnte gesehen werden, daß Activin für die Induktion der catagenen Phase des Haarzyklusses von Bedeutung ist (Nakamura *et al.*, 2003).

Die Hemmung des Activinsignalweges in epidermalen Zellen durch die konstitutive Expression eines dominant-negativen Activin Typ IB-Rezeptors unter Kontrolle eines Keratin 14-Promotors führte im Tiermodell zu Verzögerungen der Haarfollikelentwicklung und des Haarzykluses. Bei Wundheilungsexperimenten konnte in diesen Tieren auch eine verzögerte Reepithelialisierung der Wunden gesehen werden (Bamberger *et al.*, 2005). Bei Tieren die Follistatin, ein löslicher Inhibitor von Activin (de Winter *et al.*, 1996), unter Kontrolle eines Keratin 14-Promotors exprimierten zeigten sich ein abnormales Fellerscheinungsbild sowie in Wundheilungsexperimenten eine beschleunigte Wundheilung (Wankell *et al.*, 2001).

1.4. Cre/loxP-Rekombinasesystem

Das Cre/loxP-Rekombinasesystem stammt aus dem Bakteriophagen P1. Dieses beinhaltet die Cre-(*causes recombination*)-Rekombinase eine zur Integrase-Familie gehörendes Enzym und DNA-Zielsequenzen, die loxP-(*locus of crossing over*)-sites. Die loxP-site besteht aus zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen, die durch eine assymetrische Sequenz voneinander getrennt sind. DNA-Segmente die sich zwischen zwei loxP-sites befinden werden je nach Orientierung der flankierenden loxP-sites (gleich- bzw. gegengerichtet) durch die Cre-Rekombinase deletiert bzw. invertiert (Lottspeich *et al.*, 1998).

Eine gewebs- bzw. zelltypspezifische Expression der Cre-Rekombinase und die daraus folgenden Rekombination der lox-P-sites, wird dabei durch die Verwendung von Minimalpromotoren erreicht. Um nun auch eine zeitliche Spezifität der Rekombination zu erreichen, wurden für die Cre-Rekombinase induzierbare Expressionssysteme entwickelt, bei denen die Cre-Expression bzw. Cre-Aktivität einem Effektormolekül abhängig ist. Als Beispiele für solche Expressionssysteme seien die 'tet-on'- bzw. 'tet-off'-Cre-Expressionssysteme genannt, bei denen in Ab- bzw. Anwesenheit des Effektormoleküls Tetracyclin der Promoter für die Cre-Rekombinase aktiviert wird (Baron *et al.*, 2000). Systeme in denen die Cre-Aktivität durch ein Effektormolekül reguliert wird, exprimieren konstitutiv eine chimäre Cre-Rekombinase, bestehend aus einer Ligandenbindungsdomäne (LBD) und der Cre-Rekombinase. In Abwesenheit des Effektormoleküls bindet diese Ligandenbindungsdomäne an einen ubiquitären Proteinkomplex, der die Aktivität der chimären Cre-Rekombinase hemmt. Die Bindung des Effektormoleküls an die Ligandenbindungsdomäne bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb dieser Domäne, so daß die chimäre Cre-Rekombinase den ubiquitären Proteinkomplex freisetzt und die Cre-Rekombinase aktiviert wird (Feil *et al.*, 1996). Um diese Systeme zu verbessern und Effekte wie Toxizität des Effektormoleküls oder Aktivierung der Systeme durch endogene Substanzen zu verringern bzw. zu verhindern, werden bei den chimären Cre-Rekombinasen mutierte Ligandenbindungsdomänen verwendet (Brocard *et al.*, 1998) (Abb. 1.8.).

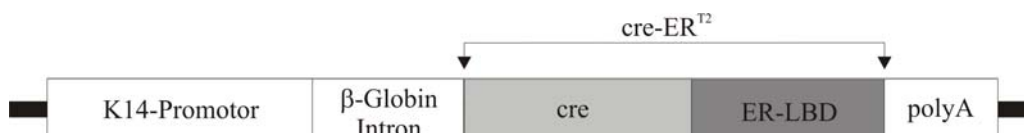


Abb. 1.8. Induzierbare cre-Rekombinase (K14-creER^{T2}-Transgenkonstrukt)

Schematische Darstellung des K14-creER^{T2}-Transgenkonstruktes. Dieses Konstrukt besteht aus dem humanen Keratin 14-Promoter (K14-Promoter), dem β-Globin Intron II des Kaninchens (β-Globin intron), der chimären Cre-Rekombinase (cre-ER^{T2}) und einem SV40-Polyadenylierungssignal (polyA). Die chimäre Cre-Rekombinase setzt sich aus der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 (cre) und der dreifachmutierten (^{G400V}, ^{M543A}, ^{L544A}) Ligandenbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors (ER-LBD) zusammen (Li *et al.*, 2000).

Eine gewebs- bzw. zelltypspezifische Überexpression des zu untersuchenden Transgens wird auch bei diesen Transgenkonstrukten durch die Verwendung von Minimalpromotoren erreicht. Um eine zeitliche Induzierbarkeit der Transgenüberexpression zu erreichen wird zwischen dem Promoter und dem zu untersuchenden Transgen ein loxP-flankiertes Reporter-gen (z.B. Gene für die β -Galaktosidase oder das *green fluorescent protein* (GFP) integriert, welches eine konstitutive Überexpression des Transgens verhindert. (Abb. 1.9.).

Diese Transgenkonstrukte haben dabei zwei Vorteile. Zunächst bietet die Untersuchung der Reporter-genexpression den Vorteil, daß Aussagen über den Beginn, die Stärke und das Muster der Expression des Transgenkonstruktes getroffen werden können. Da für eine Vielzahl von Genen bekannt ist, daß deren konstitutive transgene Überexpression zu Defekten während der Embryonalentwicklung und zu embryonaler bzw. perinataler Letalität führt, zeigen Transgenkonstrukte mit Reporter-gen ihren zweiten Vorteil. Die zeitliche Kontrolle über die Expression des zu untersuchenden Transgens ermöglicht somit, daß dieses z.B. erst im adulten Tier überexprimiert wird und somit etwaige Veränderungen des embryonalen Phänotyps umgangen werden können.



Abb. 1.9. Induzierbares Expressionssystem (K5-Smad7-Transgenkonstrukt)

Schematische Darstellung des K5-Smad7-Transgenkonstruktes. Dieses Konstrukt besteht aus dem bovinen Keratin 5-Promoter (K5-Promoter) (Blessing *et al.*, 1993), dem β -Globin Intron II des Kaninchen (β -Globin Intron) und einem loxP-flankierten lacZ-Genaus *E.coli* (β -Galactosidase). Dieses lacZ-Gen verfügt zusätzlich über eine SV40-Kernlokalisationssequenz (Fire *et al.*, 1990) und ein Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormon (polyA) (Werner *et al.*, 1993). 3' der zweiten loxP-Site findet sich die murine Smad7 cDNA (Smad7-cDNA) und ein weiteres Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormon (Klopcic, 2002).

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es zu analysieren, welche Effekte die Überexpression von Smad7 in epithelialen Geweben, speziell der Haut, in adulten Mäusen hat. Hierbei sollten die möglicherweise in den adulten Tieren auftretenden Phänotypen auch mit den auftretenden Phänotypen bei embryonaler Überexpression von Smad7 (vgl. 1.3.1.) verglichen werden.

Da der Keratin 5-Promoter bereits ab Tag 9,5 der Embryonalentwicklung aktiv ist (Byrne *et al.*, 1994) führte die konstitutive Überexpression von Smad7 unter Kontrolle dieses Promoters zu embryonaler, bzw. perinataler Letalität (He *et al.*, 2002). Um diese Letalität zu umgehen und die Auswirkungen der Smad7-Überexpression unter Kontrolle des Keratin 5-Promoters in adulten Mäusen untersuchen zu können, wurde auf zwei Transgensysteme zurückgegriffen, welche auf dem cre/loxP-System (Kühn *et al.*, 1997) beruhen, und somit eine induzierbare, konditionelle Überexpression von Smad7 in der adulten Maus ermöglichen (vgl. 1.4.). Als Effektorsystem wurde ein Transgensystem verwendet, bei dem zwischen Keratin 5-Promoter und Smad7-Transgen ein 'gefloxtes' lacZ-Reportergen eingebaut ist, welches im unrekombinierten Zustand die Überexpression von Smad7 verhindert (Klopčič, 2002). Desweiteren bietet diese Expressionssystem noch den Vorteil, daß durch das Expressionsprofil des Reportergens erste Rückschlüsse bezüglich der transgensspezifischen Expression von Smad7 gemacht werden können.

Um im adulten Tier die Rekombination des Effektorsystems und somit eine Überexpression von Smad7 zu erreichen, wurde als Induktorsystem ein K14-creER^{T2}-transgene Maus eingekreuzt, bei der eine induzierbare chimäre cre-Rekombinase unter Kontrolle des Keratin 14-Promoters konstitutiv exprimiert wird (Li *et al.*, 2000).

Die Kombination von Keratin 5-Promoter für das Effektorsystem und Keratin 14-Promoter für das Induktorsystem konnte gewählt werden, da gezeigt ist, daß Keratin 5 und Keratin 14 in den Zellen der Basalschicht der Epidermis stets koexprimiert werden. Auch ermöglicht dieses System die Induktion der Rekombination in den epidermalen Stammzellen, so daß alle epidermalen Zellen nach einmaliger Induktion der Rekombination Smad7 überexprimieren (vgl. 1.1.1.).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

Die verwendeten Mausstämme (C57BL/6 x SJL und FVB/NHSD) entstammen der Zucht des *specific-pathogen-free* (SPF)-Bereiches der ZVTE (Zentrale Versuchstiereinrichtung) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Die verwendeten Mauslinien K5-Smad7 tg1 bzw. tg2 wurden von Dr. Klopčič im Rahmen seiner Dissertation im Labor von Prof. Blessing generiert und zur Verfügung gestellt. Die Mauslinie K14-creER^{T2} (Li et al., 2000) wurde von D. Metzger (Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Illkirch, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Die für die Experimente verwendeten transgenen Tiere wurden heterozygot auf einem FVB/NHSD-Hintergrund gehalten. Während der Experimente wurden maximal 5 Tiere je Käfig gehalten und mit Standardhartfutter und Wasser *ad libidum* versorgt.

2.1.2. Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien, Feinchemikalien und Enzyme der Firmen AGS (Heidelberg), Biomol (Hamburg), Biozym (Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), DAKO (Hamburg), Difco (USA), Fluka (Buchs), Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedl-de-Haen (Selze), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) verwendet.

2.1.3. Antikörper und Kits

2.1.3.1. Antikörper

Für die Durchflußzytometrischen Analysen wurden die folgenden fluoreszenzmarkierten Antikörper der Firma BD Biosciences PharMingen (Belgien) verwendet: rat- α -mouse-CD4-PE und rat- α -mouse-CD8-FITC.

Für den Nachweis proliferierender Zellen bei BrdU-Färbungen wurde als Zweitantikörper der AP-konjugierte Antikörper goat- α -FITC-AP der Firma DAKO (Hamburg) verwendet.

2.1.3.2. Kits

Die Herstellung von cDNA für die RT-PCR-Analysen wurde mit dem '*RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*' der Firma MBI (St. Leon-Rot) durchgeführt und für alle PCR-Protokolle wurde das '*FailSafe PCR System*' der Firma Epicentre (USA) verwendet.

Der Nachweis von proliferierenden Zellen in der Haut erfolgte unter Verwendung des '*In Situ Cell Proliferation Kit*' der Firma Roche (Mannheim).

2.1.4. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) für die Genotypisierung der Versuchstiere, den Nachweis der Rekombination, sowie für RT-PCR-Analysen wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

2.1.4.1. Genotypisierungsprimer

- K14: 5'- ATA TGA CAG CAC TGA TGA GGC -3'
GenBank Acc.No.: U11076 (Stagger *et al.*, 1995) ; Pos.: 2135-2155
- K14-cre: 5'- GGT GTA CGG TCA GTA AAT TGG -3'
GenBank Acc.No.: X03453 (Sternberg *et al.*, 1986) ; Pos.: 509-489
- Smad7-for: 5'- ACA GCT CAA TTG GGA CAA CA -3'
GenBank Acc.No.: AF015260 (Nakao *et al.*, 1997) ; Pos.: 897-916
- Smad7-rev: 5'- ATG CAT GCC TGG AAT CCC -3'
GenBank Acc.No.: NG_001334 (George *et al.*, 1981) ; Pos.: 7019-7002

2.1.4.2. RT-PCR-Primer

- RT-Smad7-for: 5'- AGA GCG CTT TCC GCG TCC TG -3'
GenBank Acc.No.: Z32746 (Casatorres *et al.*, 1994) ; Pos.: 1284-1303
- RT-Smad7-rev: 5'- AGC GCA GAT CGT TTG G -3'
GenBank Acc.No.: NM_008543 (Nakao *et al.*, 1997) ; Pos.: 1462-1447

Das Primerpaar RT-Smad7-for & RT-Smad7-rev wurde ebenfalls für den Nachweis der Rekombination verwendet.

- Smad1-for: 5'- TTA CGA GGA ACC AAA ACA CTG -3'
GenBank Acc.No.: NM_008539 (Yingling *et al.*, 1996) ; Pos.: 1189-1209
- Smad1-rev: 5'- TGG TGA GTT CAT ACA CGG TCT -3'
GenBank Acc.No.: NM_008539 (Yingling *et al.*, 1996) ; Pos.: 1619-1599
- Smad2-for: 5'- GAA TTT GCT GCT CTT CTG GCT CAG -3'
GenBank Acc.No.: NM_010754 (Baker *et al.*, 1996) ; Pos.: 1273-1296
- Smad2-rev: 5'- GTC TTA TGC CCA ACA AGA CAT CA -3'
GenBank Acc.No.: NM_010754 (Baker *et al.*, 1996) ; Pos.: 1755-1733
- Smad3-for: 5'- GTG CCT CAG TGA CAG TGC TAT -3'
GenBank Acc.No.: NM_016769 (Labbe *et al.*, 1998) ; Pos.: 1235-1255
- Smad3-rev: 5'- GAC CAA GTT GGA TGG AGT TCT -3'
GenBank Acc.No.: NM_016769 (Labbe *et al.*, 1998) ; Pos.: 1678-1658
- Smad4-for: 5'- TGG ACG TTC AGG TAG GAG AGA -3'
GenBank Acc.No.: NM_008540 (Anna *et al.*, 1997) ; Pos.: 1429-1449
- Smad4-rev: 5'- CCT TCA CAA AGC TCA TCC TGA -3'
GenBank Acc.No.: NM_008540 (Anna *et al.*, 1997) ; Pos.: 1959-1939
- Smad5-for: 5'- AGA TAA TTC CCA GCC TAT GGA -3'
GenBank Acc.No.: NM_008541 (Meersseman *et al.*, 1997) ; Pos.: 895-915
- Smad5-rev: 5'- AAT CCA TGG TTG ACT GAC TGA -3'
GenBank Acc.No.: NM_008541 (Meersseman *et al.*, 1997) ; Pos.: 1389-1369
- Smad6-for: 5'- CAA CCC CTA CCA CTT CAG C -3'
GenBank Acc.No.: NM_008542 (Imamura *et al.*, 1997) ; Pos.: 1083-1101
- Smad6-rev: 5'- CAG TAT GCC AAA ACC GAT CT -3'
GenBank Acc.No.: NM_008542 (Imamura *et al.*, 1997) ; Pos.: 1476-1457
- Smad7-for: 5'- AAG TCA AGA GGC TGT GTT GC -3'
GenBank Acc.No.: NM_008543 (Nakao *et al.*, 1997) ; Pos.: 1954-1973
- Smad7-rev: 5'- TCT CAT AGT CAA AAG CCT TGA TGG AGA AA -3'
GenBank Acc.No.: NM_008543 (Nakao *et al.*, 1997) ; Pos.: 2553-2525
- TGF- β -RII-for: 5'- AGC AGA AGC TGA GCC CGT CCT GGG -3'
GenBank Acc.No.: NM_009371 (Lawler *et al.*, 1994) ; Pos.: 908-931
- TGF- β -RII-rev: 5'- GGG GCC ATG TAT CTT GCC GTT CCC -3'
GenBank Acc.No.: NM_009371 (Lawler *et al.*, 1994) ; Pos.: 1607-1584

2.1.5.3. Lösungen für histologische Methoden

10x PBS-Puffer: 1,5 M NaCl
1 M Na₂PO₄
in H₂O_{dd} ; pH 7,2

Eosin Y: 1 % Eosin Y (w/v)
in 70% Ethanol

10x AP-Puffer: 150 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
1,3 mM EDTA
in H₂O_{dd} ; pH 7,4

X-Gal-Fixierlösung: 0,8 % Glutaraldehyd (25%ig) (v/v)
0,1 M Phosphatpuffer ; pH 7,3
0,8 mM EGTA ; pH 8,0
2 mM MgCl₂
in H₂O_{dd}

X-Gal-Waschlösung: 0,1 M Phosphatpuffer ; pH 7,3
2 mM MgCl₂
10 % Na-Deoxycholat (w/v)
0,02 % Nonidet NP40 (v/v)
in H₂O_{dd}

X-Gal-Färbelösung: 0,06 % Kaliumferricyanid (w/v)
0,06 % Kaliumferrocyanid (w/v)
4 % X-Gal-Lösung (25mg/ml X-Gal in DMF) (v/v)
in H₂O_{dd}

2.1.5.4. sonstige Lösungen

<u>4-OHT-Lösung:</u>	0,1 % 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) (w/v) in Sonnenblumenöl
<u>FACS-Puffer:</u>	2 % FCS in 1x PBS ; pH 7,2
<u>10x ACK-Puffer:</u>	150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 1,3 mM EDTA in H ₂ O _{dd} ; pH 7,4

2.1.6. Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank Trockenofen WTC	WTB Binder Labortechnik (Tuttlingen)
Digitales Kamerasystem Cybertech CSI it	Hitachi (Japan)
Elektrophorseapparaturen EasyCast A2 bzw. B2	AGS (Heidelberg)
Durchflußzytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
Feinwaage BP61	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop AX70	Olympus (Hamburg)
Kryostat CM 1900	Leica (Bensheim)
Laborwaage BP 1200	Sartorius (Göttingen)
Lichtmikroskop VK 2	Olympus (Hamburg)
Mikrowelle Micromat 135	AEG (Nürnberg-Muggenhof)
Netzgerät Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
pH-Meter pH 537	WTB Binder Labortechnik (Tuttlingen)
Rasterelektronenmikroskop LEO 435 VP	Carl Zeiss (Oberkochen)
Spektralphotometer Helios γ	Spectronic Unicam (England)
Stereomikroskop SZ 40	Olympus (Hamburg)
Thermo-Cycler Gene E	Techne (Wertheim)
Ultraschall Sonifier B15	Branson (USA)
UV-Transilluminator 312nm	Renner (Darmstadt)
Zentrifugen: 5417R Eppendorf	Eppendorf (Hamburg)
Labofuge 400R	Heraeus (Hanau)

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläschen 24x50mm	Menzel (Braunschweig)
DNA-Molekulargewichtsstandard	
1kb DNA-Ladder	NEB (Frankfurt a. Main)
ϕ X174 x BsuR I	MBI (St. Leon-Rot)
Einbettmedien	
Aqua Poly Mount	Polyscience (USA)
Entellan	Merck (Darmstadt)
Einfriermedium Jung	Leica (Bensheim)
Kunststoffwaren	Eppendorf (Hamburg)
	Nunc (Wiesbaden)
	Greiner (Frickenhausen)
	Becton Dickinson Labware (USA)
Marker PAP-PEN	MBT (Wiesbaden)
Objektträger 25x75x1mm Poly-L-Lysin	Menzel (Braunschweig)
Pipetten	
Eppendorf Reasearch	Eppendorf (Hamburg)
Socorex	Socorex (Schweiz)

2.1.8. Computer und Software

Für die Verarbeitung der Daten, Sequenzbank- und Literaturrecherchen sowie die Bildverarbeitung wurden zum einen ein 'ApplePowerMac G3' und zum anderen ein 'PC (AMD 2,8GHz/1GbyteRAM)' verwendet. Die benutzten Programme waren hierbei: Adobe Acrobat 5.0, Adobe Photoshop 7.0 von Adobe, RPS-Blast (Altschul *et al.*, 1997), Blast 2 Sequences (Tatusova *et al.*, 1999), CorelDraw 10 und CorelPhotopaint 10 von Corel, DNA Strider 1.2 von CEA, Microsoft Excel 2000 und Microsoft Word 2000 von Microsoft, SPSS 9.0 von SPSS Inc., CellQuest Pro von BD, AIDA 3.44 von Raytest und der Netscape Communicator 8.0 von Netscape. Als Drucker standen Laserdrucker von Hewlett-Packard und Canon zur Verfügung. Zum einscannen von Diabildern wurde der Filmscanner LS-1000 der Firma Nikon benutzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA

a) Proteinase K-Verdau

Zunächst wurden die entnommenen Biopsien, bzw. Gewebestücke mit einer Proteinase K-Lösung ($c_{\text{Proteinase K}} = 500\mu\text{g/ml}$ in Proteinase K-Puffer) bei 55°C ü.N. verdaut.

Der Verdau von Ohrbiopsien erfolgte in $25\mu\text{l}$ Proteinase K-Lösung, welcher anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf $500\mu\text{l}$ Gesamtvolumen aufgefüllt und durch kurzes vortexen gemischt wurden. Danach wurde dieser Verdau entweder direkt für die PCR-Analysen (vgl. 2.2.1.2) weiterverwendet oder bei 4°C gelagert. Der Verdau von Hautproben, aus denen genomische DNA aufgereinigt werden sollte, erfolgte in $100\mu\text{l}$ Proteinase K-Lösung. Nach beendetem Verdau wurde dieser ebenfalls mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf $500\mu\text{l}$ Gesamtvolumen aufgefüllt, nicht verdaute Gewebeanteile bei $10000g$ für 5min abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches $1,5\text{ml}$ -Eppendorf-Gefäß überführt.

b) Aufreinigung genomischer DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

(Sambrook *et al.*, 1989)

Im ersten Schritt wurde dem in a) gewonnenen Überstand $50\mu\text{l}$ 3M Na-Acetat und $500\mu\text{l}$ Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-(50:49:1)-Lösung zugegeben und durch vortexen vermischt. Die anschließende Trennung von organischer und wässriger Phase erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C und $10000g$ für 10min . Im nächsten Schritt wurde nach Überführung der wässrigen Phase in ein frisches $1,5\text{ml}$ -Eppendorf-Gefäß diese mit $500\mu\text{l}$ Chloroform versetzt und gevortext. Die Trennung von Chloroform- und wässriger Phase erfolgte ebenfalls bei 4°C und $10000g$ für 10min . Nach einer Wiederholung dieses Schrittes wurde die wässrige Phase zur Fällung der genomischen DNA erneut in ein frisches $1,5\text{ml}$ -Eppendorf-Gefäß überführt, mit $0,7\text{Vol.}$ Isopropanol durch invertieren vermischt und die ausgefallene genomische DNA bei 4°C und $15000g$ für 60min abzentrifugiert. Die Entsalzung der genomischen DNA erfolgte durch eine Waschung mit 1ml 70% igem Ethanol. Nach Abzentrifugation der genomischen DNA bei 4°C und $15000g$ für 10min wurde diese Waschung wiederholt, ehe der Überstand vollständig abgenommen und das genomische DNA-Pellet an der Luft getrocknet wurde. Die abschließende Lösung der getrockneten genomische DNA erfolgte in einem dem Pellet entsprechenden Menge ($50\text{-}100\mu\text{l}$) 10mM Tris-HCl ; pH 8 0. Die gelöste genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.2.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels PCR (Saiki *et al.*, 1985) wurden die Mäuse hinsichtlich ihres Genotyps und erfolgter Rekombination der loxP-sites der Expressionskassette unter Verwendung des 'FailSafe PCR System' analysiert.

a) PCR-Ansatz

Lösung	Konzentration (Stammlösungen)	50µl-Ansatz	Endkonzentration
Template-DNA		3 µl*	
FailSafe Premix-Puffer D	2x	25 µl	1x
forward Primer	100 pM	0,5 µl	1 pM
reverse Primer	100 pM	0,5 µl	1 pM
H ₂ O _{dd}		20,6 µl	
FailSafe Enzymemix	2,5 U/µl	0,4 µl	1 U

* für die Genotypisierungs-PCRs wurden 3µl eines Ohrbiopsieverdaus eingesetzt bzw. 3µl einer 1:100 Verdünnung genomischer DNA für den Nachweis der Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes

b) PCR-Reaktionsprotokolle

K14-creER ¹²		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	1x
95°C	30 sec	
58°C	40 sec	35x
72°C	60 sec	
72°C	5 min	1x

K5-Smad7		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	1x
95°C	30 sec	
57°C	40 sec	35x
72°C	60 sec	
72°C	5 min	1x

Transgenrekombination		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	1x
95°C	30 sec	
57°C	40 sec	35x
72°C	60 sec	
72°C	5 min	1x

2.2.1.3. DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von PCR- und RT-PCR-Produkten, erfolgte in 1-1,5%igen horizontalen Agarosegelen, die mit 0,1µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE verwendet. Die PCR- bzw. RT-PCR-Produkte wurden mit 1/10Vol. 10x DNA-Auftragspuffer versetzt und anschließend vollständig auf das Gel aufgetragen. Mit BsuR I restringierte φX174 DNA diente als DNA-Molekulargewichtsstandard.

Die Dokumentation der Gelelektrophorese erfolgte auf einem UV-Transilluminator unter Verwendung eines digitalen Kamerasystems. Die Bilder wurden dann entweder mittels einen Thermodruckers ausgedruckt oder gespeichert (.tif-Format).

2.2.1.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben

(Chomczynski *et al.*, 1987)

Tiefgefrorene Gewebeproben wurden unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100mg des Gewebepulvers in 1ml '*Tri Reagent*' überführt und die Gesamt-RNA gemäß den Angaben des Herstellers Sigma-Aldrich (Deisenhofen) isoliert.

Die Qualität der auf diesem Weg isolierten Gesamt-RNA wurde abschließend auf einem herkömmlichen 1%igen Agarosegel überprüft und deren Quantität und Reinheit mit einem Photometer durch Messung der OD260/280 bestimmt.

2.2.1.5. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkriptasereaktion (RT) wurde mit oligo-dT-Primern des RT-PCR-Kits '*Revert-Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*' gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die anschließende PCR erfolgte unter Verwendung des '*FailSafe PCR System*' mit den in 2.1.4.2. beschriebenen RT-PCR-Primerpaaren.

Hierbei wurden stets für alle RT-Reaktionen 3µg Gesamt-RNA und für die nachfolgenden PCR-Reaktionen 10% der RT-Reaktion als Template verwendet.

PCR-Reaktionsprotokoll

RT-PCR-Protokoll		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	1x
95°C	30 sec	35x
58°C	40 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5 min	1x

Um die Expressionsstärke der untersuchten Gene 'semi-quantitativ' zu bestimmen, wurden alle PCR-Reaktionen und die folgende Gelelektrophorese für ein Tier gleichzeitig ausgeführt. Die Intensität der erhaltenen Banden wurde mit dem Programm 'IQ Mac 1.2' bzw. 'AIDA 3.44' bestimmt.

Als Kontrolle und endogener Standard zur Bestimmung der Expression der untersuchten Gene, diente hierbei der Nachweis von β -Actin. Die Intensität der Bande von β -Actin wurde dabei als 100% definiert und die Intensität der Banden des zu bestimmenden Gens damit in Relation gesetzt. Dies wurde für mindesten 3 Tiere jeder Gruppe durchgeführt. Dadurch erhielt man eine Aussage über die relative Expression der betrachteten Gene im Verhältnis zu der Expression von endogenem β -Actin. Hierdurch konnten erste Aussagen über eine etwaige Expressionsänderung der betrachteten Gene getroffen werden.

2.2.2. Histologische Methoden

2.2.2.1. Anfertigung von Kryoschnitten

Die für die histologischen Analysen verwendeten Kryoschnitte wurden in einer Dicke von 6µm angefertigt, auf mit Polylysin beschichtete Objektträger überführt und luftgetrocknet. Alle weiteren Färbe- und Waschschrte wurden in Glasküvetten durchgeführt. Die Eindeckung der gefärbten Kroyschnitte erfolgte je nach Bedarf mit hydrophilem (Aquamount) oder mit hydrophobem Eindeckmedium (Entellan).

2.2.2.2. X-Gal-Färbung

Zunächst wurden die angefertigten Kryoschnitte bei RT für 20min in der X-Gal-Fixierlösung fixiert und anschließend 3x für jeweils 5min im X-Gal-Waschpuffer gewaschen. Die Färbung erfolgte bei 37°C im Brutschrank für 15min-12h. Abschließend wurden die Schnitte mit H₂O_{dd} kurz gewaschen und eingedeckt.

2.2.2.3. Hämatoxilin/Eosin (HE)-Färbung

Die angefertigten Kryoschnitte wurden zunächst bei RT für 20min in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend 3x für jeweils 5min in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte bei RT für 5min in 'Gill No.3 Hämatoxylin' der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) inkubiert und unter fließendem Leitungswasser entwickelt. Die so behandelten Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%ig, 50%ig, 70%ig) dehydriert und dann bei RT für 3min mit Eosin Y gefärbt. Abschließend wurden diese Schnitte in einer weiter aufsteigenden Alkoholreihe (70%ig, 90%ig, 96%ig, 100%ig) vollständig dehydriert, in Xylol überführt und eingedeckt.

2.2.2.4. Nachweis der Zellproliferation mittels BrdU-Markierung

Vor Entnahme der Gewebeproben wurde den Versuchstieren zunächst das Thymidinanalogon BrdU (5-Brom-2'-Deoxyuracil) (30µg BrdU pro g Körpergewicht) *intra peritoneal* (i.p.) injiziert. Nach einer Inkubationsdauer von 90min wurden dann die Gewebeproben entnommen. In dieser Zeit wurde das BrdU in die genomische DNA sich replizierender Zellen eingebaut.

Der Nachweis der Proliferation erfolgte unter Verwendung des '*In Situ Cell Proliferation Kit*' gemäß den Angaben des Herstellers Roche (Mannheim). Für die Analyse unter dem Lichtmikroskop wurden die Schnitte dann mit einem goat- α -FITC-AP (Verdünnung 1:60 in Inkubationspuffer) bei 37°C für 1h in einer feuchten Kammer inkubiert und 3x für 5min in PBS gewaschen. Die Färbung mit '*Fast-Red*' der Firma Roche (Mannheim) erfolgte nach einer Vorinkubation von 5min bei RT in AP-Puffer nach Angaben des Herstellers. Dabei betrug die Farbdetektion maximal 30min bei RT. Abschließend wurden die Schnitte noch mit '*Gill No.3 Hämatoxylin*' der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) gegengefärbt (vgl. 2.2.2.3.).

Die Bestimmung der Proliferationsrate der Keratinozyten erfolgte durch Auszählung aller BrdU-positiver und -negativer Zellen der interfollikulären Bereiche der Epidermis von jeweils mindestens 3 Tieren einer Gruppe. Hierbei wurde die Anzahl der proliferierenden Zellen in Verhältnis zu den nichtproliferierenden Zellen gesetzt und es konnte eine Aussage über den prozentualen Anteil proliferierender Zellen in der Epidermis getroffen werden.

2.2.3. Weitere Methoden

2.2.3.1. Aktivierung der cre-Rekombinase

Um die cre-Rekombinase zu aktivieren wurde den Versuchstieren über einen Zeitraum von 6 Tagen alle 24h 0,1mg 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) *intra peritoneal (i.p.)* injiziert. Vor der Injektion wurde die 4-OHT-Lösung noch bei RT für 15min im Ultraschallbad behandelt.

2.2.3.2. Durchflußzytometrie und Bestimmung der Gesamtzellzahl in Thymus und Milz

Nach Entnahme des Thymus und der Milz wurden diese zunächst in 1ml FACS-Puffer gewaschen und durch einen Nylonsieb (Porengröße 40µm) gedrückt. Nach Abzentrifugation der Zellen bei 4°C mit 200g für 5min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml ACK-Puffer resuspendiert und darin auf Eis für 2min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x in 1ml FACS-Puffer gewaschen und in 1ml FACS-Puffer resuspendiert. Für die Färbung der Zellen wurden 50µl dieser Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1µl Antikörperlösung (Verdünnung 1:50 für jeden Antikörper in FACS-Puffer) auf Eis für 15min inkubiert. Abschließend wurde die Zellsuspension mit FACS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 500µl aufgefüllt und direkt hinsichtlich der relativen Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen durchflußzytometrisch analysiert.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahlen erfolgte durch Auszählen der lebenden T-Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 100µl der in FACS-Puffer resuspendierten Zellen 1:10 mit FACS-Puffer verdünnt. Um die lebenden von den toten T-Zellen unterscheiden zu können wurden zunächst 20µl dieser Verdünnung mit 20µl Trypanblau vermischt, wodurch sich tote T-Zellen blau färbten. Anschließend wurden die lebenden T-Zellen ausgezählt.

2.2.3.3. Präparation und Rasterelektronenmikroskopie von Zähnen

Zunächst wurde der Mäuseschädel möglichst gründlich von vorhandenem Gewebe freipräpariert ehe er bei 55°C ü.N. in 10ml Proteinase K-Lösung (vgl. 2.2.1.1.) inkubiert wurde. Danach wurde der Schädel mit Leitungswasser gewaschen und in einer 10%igen Waschpulverlösung bei 55° für 24h inkubiert. Dadurch konnten alle Gewebereste entfernt und die Zähne dem Kiefer entnommen werden. Nach erfolgter lichtmikroskopischer Betrachtung wurden die für die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung vorgesehenen Zähne in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%ig,

50%ig, 70%ig, 90%ig, 100%ig) vollständig dehydriert und in einem Exikator getrocknet. Die unbeschichteten Zähne wurden dann im Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde dabei von H. Götz und B. Schwarz (Angewandte Struktur- und Mikroanalytik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) durchgeführt. Hierbei wurden die Rückstreuelektronen mit einem 4-Quadrant-Rückstreuelektronen-detektor im *variable pressure*-(VP)-Modus detektiert.

2.2.4. Statistische Analysen

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm SPSS 9.0 durchgeführt.

Für die Darstellung der Daten der einzelnen untersuchten Gruppen wurde der Mittelwert (MW) und dessen Standardabweichung des Mittels (SEM) errechnet. Abweichungen zwischen den verschiedenen Gruppen innerhalb der Versuche wurden mittels einem nichtparametrischen Test, dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Ein $p \leq 0,005$ wurde als signifikante, ein $p \leq 0,001$ als hochsignifikante Abweichung gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Verwendete transgene Mauslinien

3.1.1. K5-Smad7

Für die Analysen wurden zwei Mauslinien verwendet, die beide das in 1.5. vorgestellte K5-Smad7-Konstrukt in ihr Genom integriert haben: K5-Smad7-tg1 und K5-Smad7-tg2 (Abb. 3.1.).



Abb. 3.1. K5-Smad7-Konstrukt

Schematische Darstellung des K5-Smad7-Konstruktes. Die Positionen der verwendeten Genotypisierungsprimer und die erwartete PCR-Produktgröße wurden eingezeichnet.

Die Genotypisierung der Tiere bezüglich des K5-Smad7-Konstruktes erfolgte mittels PCR (vgl. 2.2.1.1. & 2.2.1.2.) unter Verwendung des Primerpaares K5-Smad7-for und K5-Smad7-rev (vgl. 2.1.4.1.). Dieses Primerpaar lieferte bei transgenen Tieren der beiden K5-Smad7-Linien jeweils ein PCR-Produkt von 760bp Größe (Abb. 3.2.).

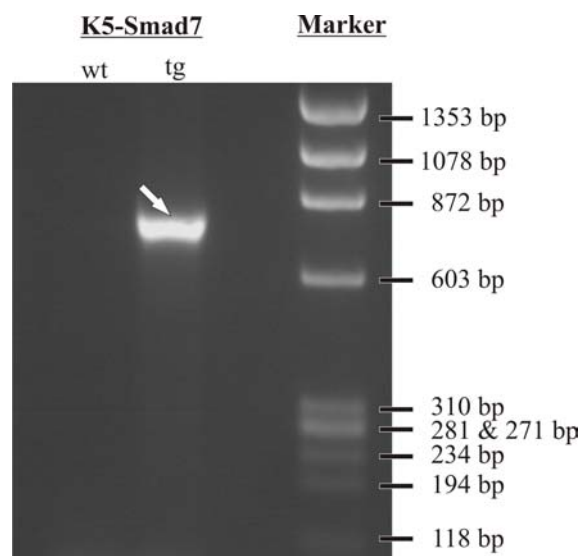


Abb. 3.2. Genotypisierung mittels PCR zur Identifizierung K5-Smad7-transgener Tiere

Die Genotypisierung erfolgte unter Verwendung des Primerpaares Smad7-for und Smad7-rev. K5-Smad7-transgene Tiere (tg) lieferten ein 760bp großes PCR-Produkt, während Wildtypiere (wt) kein Produkt lieferten. Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174 x BsuR I verwendet.

Auch wurde untersucht, in welchen Organen und Geweben das Reportergen im adulten Tier exprimiert wird und somit der K5-Promoter der beiden K5-Smad7-Konstrukte aktiv ist. Zu diesem Zweck wurden Kryoschnitte verschiedener Organe, der Rückenhaut, der Zunge sowie von Ohr- und Schwanzbiopsien adulter Tiere der beiden K5-Smad7-Linien angefertigt und mit X-Gal gefärbt (vgl. 2.2.2.1. & 2.2.2.2.). Hierbei zeigte sich, daß zwar bei beiden K5-Smad7-Linien das Reportergen in den gleichen Organen und Geweben exprimiert wird, dies allerdings in unterschiedlich starker Ausprägung.

Die Linie K5-Smad7-tg1 zeigte eine starke und kontinuierliche Reportergenexpression in der Basalschicht der Epidermis und um die äußere Wurzelscheide der Haarfollikel (Abb. 3.3.B). Auch die Basalschicht der Zunge wies eine Reportergenexpression auf (Abb. 3.3.D). Daneben waren auch epitheliale Zellen des Thymus deutlich gefärbt (Abb. 3.3.E). Die Linie K5-Smad7-tg2 wies eine schwächere Reportergenexpression auf. Bei der Färbung von Ohr- und Schwanzbiopsien ließ sich keine kontinuierlich durchgehende Färbung der Basalschicht der Epidermis und der Haarfollikel erkennen. In der Rückenhaut beschränkte sich die Färbung auf die Haarfollikel und wie in der Basalschicht der Zunge, konnten in der Basalschicht der Epidermis nur vereinzelt angefärbte Zellen nachgewiesen werden. Auch im Thymus konnten weniger Zellen angefärbt werden (Abb. 3.3.F-J).

Bei beiden K5-Smad7-Linien wurden auch verschiedene andere Organe (Leber, Milz, Herz, Gehirn, Gonaden, Lunge, Gehirn, Nieren) hinsichtlich einer Reportergenexpression untersucht. Dabei konnte keine Expression des Reportergens nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

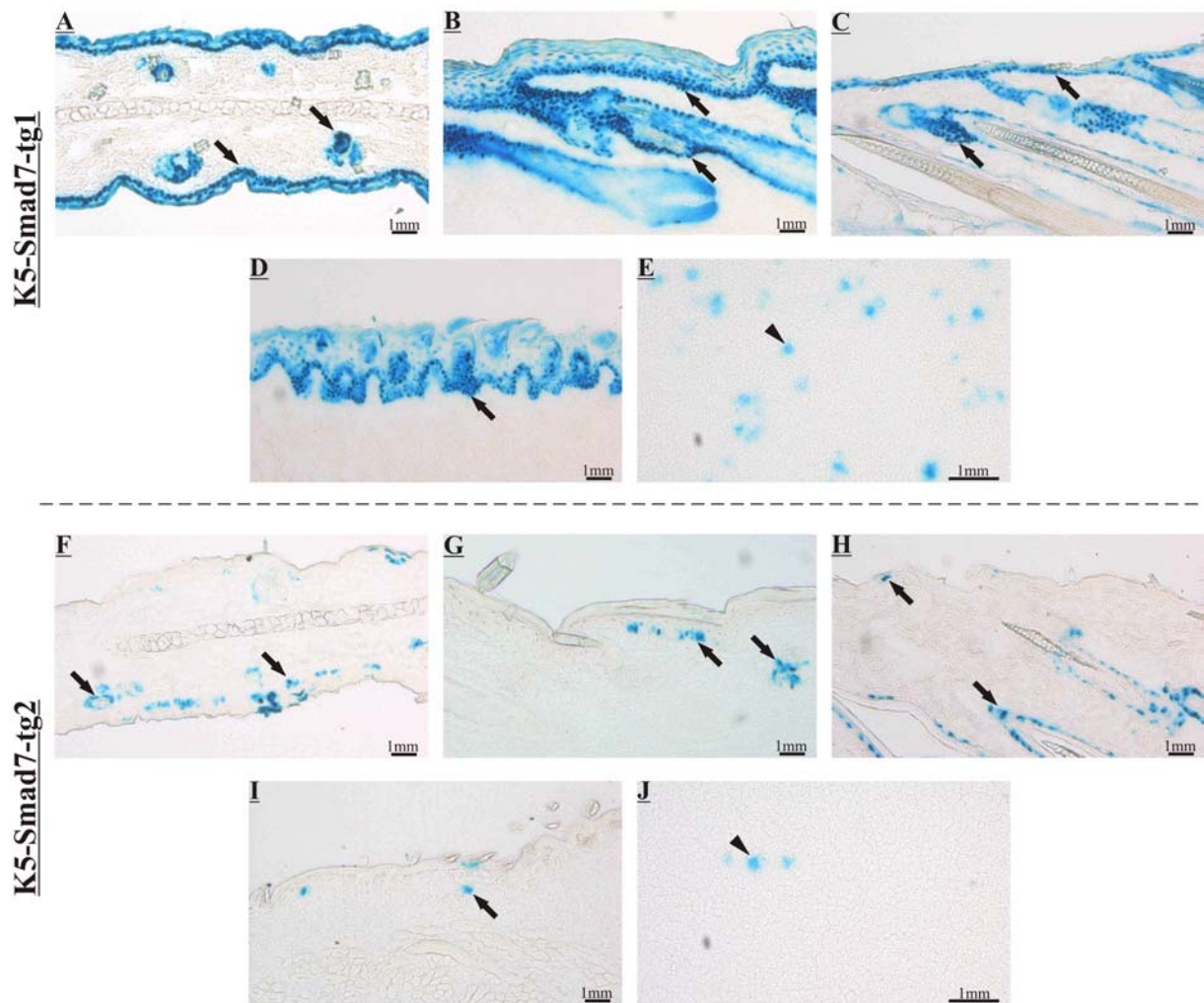


Abb. 3.3. Reporterexpression der beiden K5-Smad7-Linien adulter Tieren im Alter von 6 Wochen
 Mit X-Gal gefärbte Kryoschnitte von Ohrbiopsien (A & F), Schwanzbiopsien (B & G), der Rückenhaut (C & H), der Zunge (D & I) sowie des Thymus (E & J) der beiden verwendeten K5-Smad7-Linien (tg1 & tg2). Pfeile markieren Zellen der Basalschicht und der äußeren Wurzelscheide, Pfeilspitzen epitheliale Zellen im Thymus.

3.1.2. K14-creER^{T2}

Um eine zeitlich kontrollierte und gewebsspezifische Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes zu erreichen, wurde eine in 1.5. vorgestellte Mauslinie verwendet, welche als Transgenkonstrukt eine chimäre Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Keratin 14-Promoters trägt (Li *et al.*, 1999) (Abb. 3.4.). Als Effektormolekül für die Aktivierung der Cre-Rekombinase dient 4-Hydroxy-tamoxifen (vgl. 1.4.).

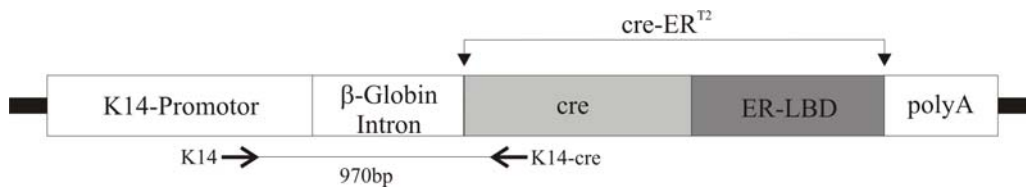


Abb. 3.4. K14-reER^{T2}-Konstrukt

Schematische Darstellung des K14-creER^{T2}-Konstruktes. Die Positionen der verwendeten Genotypisierungsprimer und die erwartete PCR-Produktgröße wurden eingezeichnet.

Die Genotypisierung der Tiere auf dieses Transgenkonstrukt erfolgte ebenfalls mittels PCR (vgl. 2.2.1.1. & 2.2.1.2.). Das verwendete Primerpaar K14 und K14-cre (vgl. 2.1.4.1.) lieferte bei K14-creER^{T2}-transgenen Tieren ein PCR-Produkt von 970bp Größe (Abb. 3.5.).

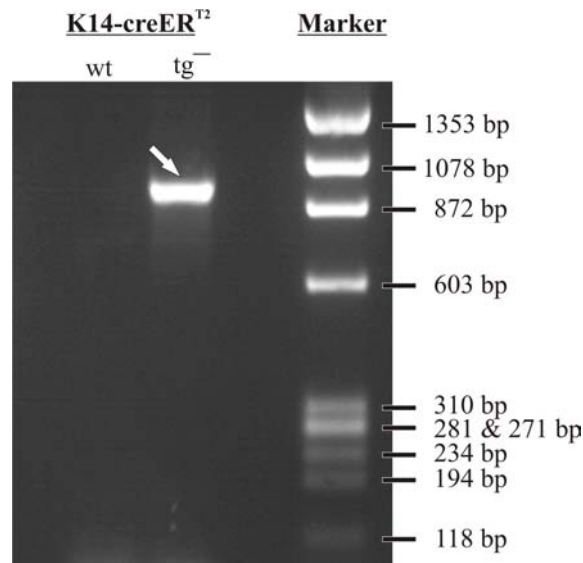


Abb. 3.5. Genotypisierung mittels PCR zur Identifizierung K14-creER^{T2}-transgener Tiere

Die Genotypisierung erfolgte unter Verwendung des Primerpaares K14 und K14-cre. K14-creER^{T2}-transgene Tiere (tg) lieferten ein 970bp großes PCR-Produkt, während Wildtypiere (wt) kein Produkt lieferten. Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174 x BsuR I verwendet.

3.2. Zucht doppeltransgener Tiere

Für die Zucht doppeltransgener Tiere wurden heterozygot-transgene Tiere der beiden K5-Smad7-Linien mit heterozygot-transgenen Tieren der K14-creER^{T2}-Linie verpaart.

Gemäß den Mendelschen Regeln sollten bei diesen Verpaarungen 25% der Nachkommen Wildtypen (wt), 25% einfachtransgen für K14-creER^{T2} (K14), 25%, einfachtransgen für K5-Smad7-tg1 bzw. -tg2 (tg1 / tg2) und 25% doppeltransgen für K14-creER^{T2} und K5-Smad7-tg1 bzw. -tg2 (dtg1 / dtg2) sein. Dieses Verhältnis stellte sich auch näherungsweise ein:

a) K14-creER^{T2} x K5-Smad7-tg1: 30,6% wt ; 24,5% K14 ; 23,7% tg1 ; 21,2% dtg1

b) K14-creER^{T2} x K5-Smad7-tg2: 24,3% wt ; 28,1% K14 ; 23,1% tg2 ; 24,5% dtg2

Dabei wurden bei den Verpaarungen K14-creER^{T2} x K5-Smad7-tg1 632 Tiere bzw. 476 Tiere bei den Verpaarungen K14-creER^{T2} x K5-Smad7-tg2 gezüchtet.

3.2.1. Experimentell verwendete Genotypen

Für die Analyse der induzierten Überexpression von Smad7 in adulten Tieren wurden folgende Tiere je K5-Smad7-Linie weiterverwendet: Wildtypen (wt), einfachtransgene für K5-Smad7-tg1 bzw. -tg2 (tg1 / tg2) sowie doppeltransgene Tiere (dtg1 / dtg2).

Die doppeltransgenen Tiere beider K5-Smad7-Linien wurden des weiteren zusätzlich in zwei Gruppen unterteilt, in doppeltransgene Tiere bei denen die Aktivität der Cre-Rekombinase induziert (dtg1+ / dtg2+) bzw. nicht induziert (dtg1- / dtg2-) wurde. Grund für diese Maßnahme war, daß beschrieben ist, daß die Cre-Rekombinase des K14-creER^{T2}-Konstruktes auch im uninduzierten Zustand eine gewisse Aktivität besitzt (Li *et al.*, 1999). Die uninduzierten doppeltransgenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien dienten somit als weitere Kontrolle, mit denen die Auswirkungen der uninduzierten Cre-Rekombinaseaktivität auf das untersuchte System bestimmt wurden.

Insgesamt wurden während den Versuchen folgende Anzahl von Tieren je Gruppe untersucht:

a) K5-Smad7-tg1-Linie: 36 wt ; 52 tg1 ; 32 dtg1- ; 54 dtg1+

b) K5-Smad7-tg2-Linie: 24 wt ; 27 tg2 ; 21 dtg2- ; 28 dtg2+

3.3. Induktion der Rekombination und Zeiteinteilung

Die bei den Experimenten verwendeten Tiere der verschiedenen Gruppen wurden im Alter von 6 Wochen in den Versuch genommen. Die Induktion der Rekombination erfolgte durch *i.p.* Injektion von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) im Abstand von 24 Stunden für 6 Tage (vgl. 2.2.3.1.). Anschließend wurden die Tiere über einen Zeitraum von 10 Wochen auf das Auftreten etwaiger Phänotypen hin beobachtet (Tab. 3.1.).

Zeitpunkt	Alter der Tiere [Wochen]	Zeit nach Induktion [Wochen]
T0	6	-
Ti	7	0
Ti+2	9	2
Ti+4	11	4
Ti+6	13	6
Ti+8	15	8
Ti+10	17	10

Tab. 3.1. gewählte Zeiteinteilung

Zum Zeitpunkt T0 wurden die verschiedenen Tiere in den Versuch genommen. Der Zeitpunkt Ti beschreibt die Woche in der den Tieren 4-OHT injiziert wurde. Die weiteren Zeitpunkte Ti+n stellen Zeitpunkte n Wochen nach Beendigung der 4-OHT Gabe dar.

3.4. Nachweis der Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes und der Expression von transgenspezifischem Smad7

Um nun festzustellen, ob parallel zu den auftretenden Phänotypen zum Zeitpunkten T0 bzw. Ti+8 auch eine Rekombination des Smad7-Konstruktes stattgefunden hatte und ob diese Rekombination auch die Expression von transgenspezifischem Smad7 zur Folge hatte, wurde dies zunächst bei den verschiedenen Tieren der beiden K5-Smad7-Linien untersucht.

3.4.1. Nachweis der Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes

Der Nachweis der Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes (Abb. 3.6.) erfolgte auf zwei Arten. Zum Einen mittels PCR, um festzustellen, ob eine Rekombination stattgefunden hat und zum Anderen über die histologische Betrachtung der Reporterexpression, um die Effizienz der Rekombination zu verifizieren.



Abb. 3.6. Rekombiniertes K5-Smad7-Konstrukt

Schematische Darstellung des rekombinierten K5-Smad7-Konstruktes. Die Positionen der Primer und die erwartete PCR-Produktgröße für den Nachweis der Rekombination mittels PCR wurden eingezeichnet.

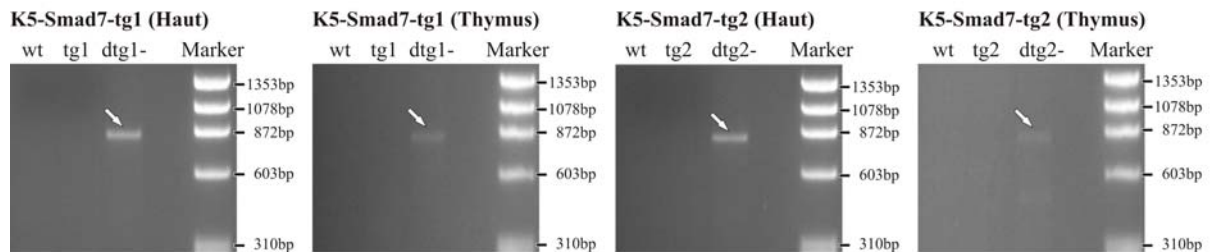
3.4.1.1. Nachweis der Rekombination mittels PCR

Der Nachweis der Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes mittels PCR erfolgte mit aufgereinigter genomischer DNA (vgl. 2.2.1.1. & 2.2.1.2.) der Haut bzw. des Thymus als Template, unter Verwendung des Primerpaares RT-Smad7-for und RT-Smad7-rev (vgl. 2.1.4.2.). Dieses Primerpaar lieferte bei erfolgter Cre-vermittelter Rekombination ein PCR-Produkt von 870bp Größe.

Zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 zeigte sich, sowohl in der Haut als auch im Thymus, weder bei den Wildtyptieren noch bei den einfachtransgenen Tieren beider K5-Smad7-Linien ein Rekombinationssignal. Bei den uninduzierten doppeltransgenen Tieren der beiden K5-Smad7-Linien hingegen, wurde sowohl zum Zeitpunkt T0 als auch zum Zeitpunkt Ti+8 eine Rekombination in Haut und Thymus nachgewiesen. Die induzierten doppeltransgenen Tiere beider K5-Smad7-Linien zeigten zum Zeitpunkt Ti+8 ebenfalls in Haut und Thymus ein Rekombinationssignal, wobei die Intensität des Rekombinationssignals bei den induzierten doppeltransgenen Tieren der

Linie K5-Smad7-tg1 im Vergleich zu den uninduzierten doppeltransgenen Tieren stärker war. Die induzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 wiesen zum Zeitpunkt Ti+8 in Haut und Thymus ebenfalls Rekombinationssignale auf, die in ihrer Intensität jedoch nahezu unverändert im Vergleich zu denen der uninduzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie waren (Abb. 3.7.).

A) Zeitpunkt T0



B) Zeitpunkt Ti+8

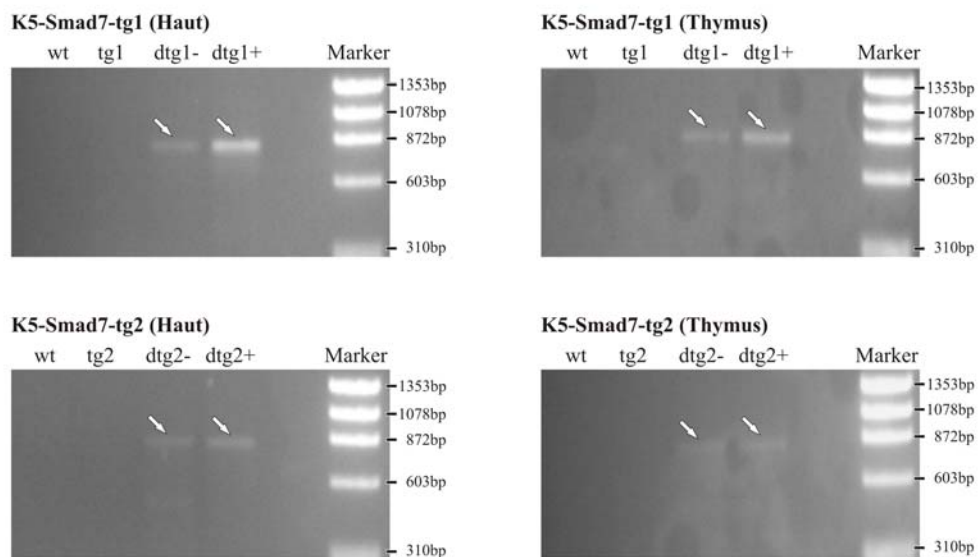


Abb. 3.7. Nachweis der Rekombination mittels PCR zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8

Der Nachweis der Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes erfolgte unter Verwendung des Primerpaares RT-Smad7-for und RT-Smad7-rev. Tiere bei denen eine Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes stattgefunden hat lieferten ein 870bp großes PCR-Produkt. In (A) ist der Rekombinationsnachweis mittels PCR in Haut und Thymus der verschiedenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien zum Zeitpunkt T0 und in (B) zum Zeitpunkt Ti+8 gezeigt. Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174 x BsuR I verwendet.

3.4.1.2. Analyse der Reporterexpression

Zum Nachweis der Rekombination durch Analyse der Reporterexpression wurden zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 Kryoschnitte von Ohrbiopsien, der Rückenhaut und dem Thymus angefertigt und mit X-Gal gefärbt (vgl. 2.2.2.1. & 2.2.2.2.). Hierbei sollten Zellen, bei denen eine Rekombination stattgefunden hat, das Reporter-gen nicht mehr exprimieren und somit β -Galaktosidase nicht mehr nachweisbar sein.

Zum Zeitpunkt T0 als auch zum Zeitpunkt Ti+8 zeigten die Wildtypen keine Reporterexpression und die einfachtransgenen Tiere dieser Linie eine unveränderte Expression des Reporter-gens. Bei den uninduzierten doppeltransgenen Tiere der K5-Smad7-tg1-Linie konnte gesehen werden, daß bereits zum Zeitpunkt T0 vereinzelt Zellen der epidermalen Basalschicht nicht mehr anzufärben waren. Bei der Betrachtung des Thymus konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob im Thymus weniger Zellen das Reporter-gen exprimieren.

Zum Zeitpunkt Ti+8 nahm die Anzahl der nicht mehr anfärbbaren Zellen bei uninduzierten doppeltransgenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg1-Linie Tieren zu. Die induzierten doppeltransgenen Tiere dieser Linie hingegen zeigten zum Zeitpunkt Ti+8 eine deutliche Reduktion der Reporterexpression. Es wurden jedoch auch weiterhin ein gewisser Anteil von Basalzellen der Epidermis und der epithelialen Zellen des Thymus angefärbt, und bei der Betrachtung der Haut zeigte sich, daß es um die Haarfollikel herum nur eine vereinzelte Reduktion der Reporterexpression gab (Abb. 3.8.).

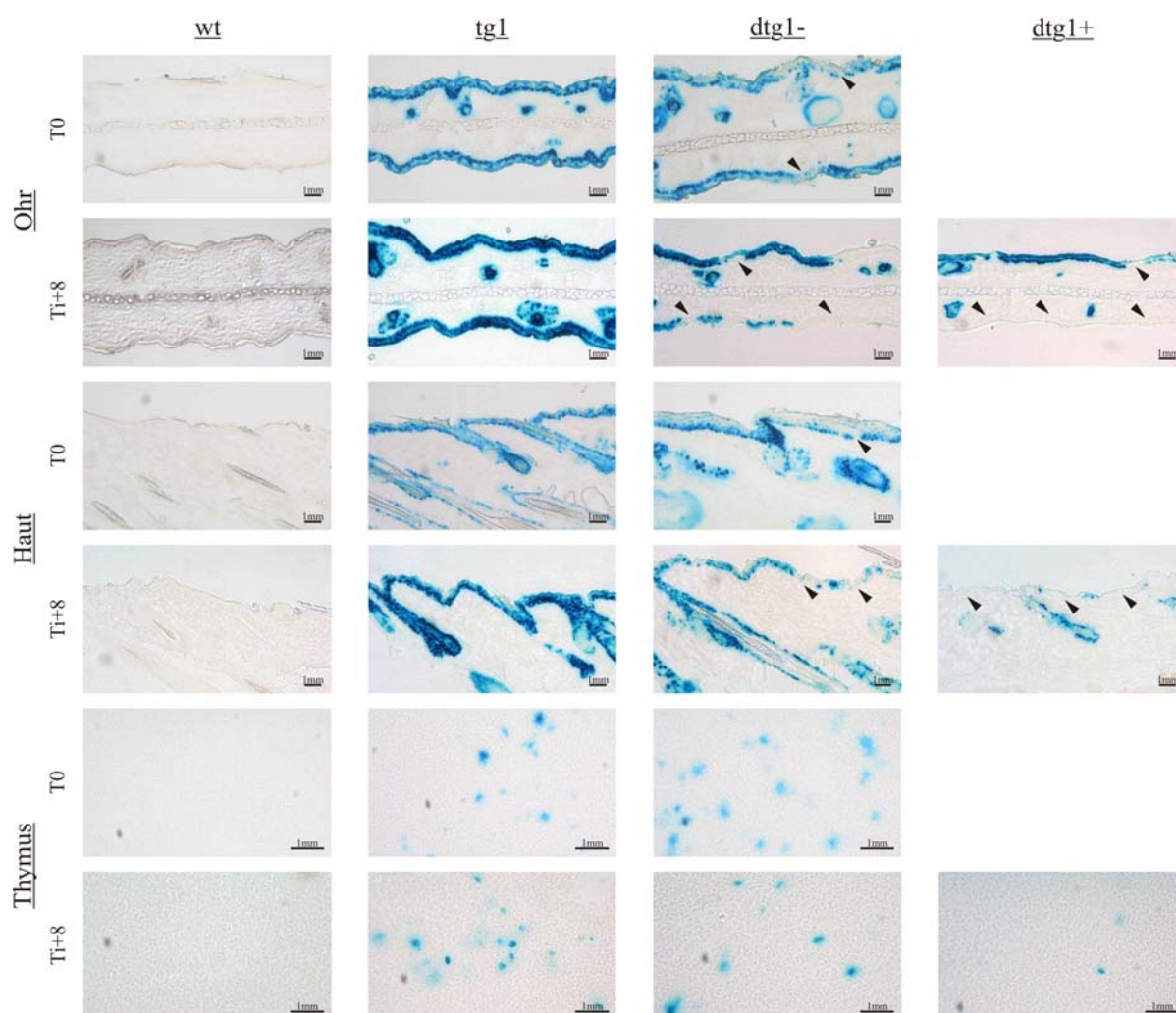


Abb. 3.8. Reporterexpression der Linie K5-Smad7-tg1 zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8

Mit X-Gal gefärbte Kryoschnitte von Ohrbiopsien (Ohr), der Rückenhaut (Haut), sowie des Thymus (Thymus) der verschiedenen Tiere der K5-Smad7-tg1-Linie (wt / tg1 / dtg1- / dtg1+) zum Zeitpunkt T0 und Ti+8. Pfeilspitzen markieren epitheliale Zellen der Basalschicht die nicht mehr angefärbt werden konnten.

Bei der Betrachtung der Reporterexpression zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 bei den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 konnte erkannt werden, daß die Reporterexpression der einfachtransgenen Tieren dieser Linie unverändert blieb. Auch bei den uninduzierten doppeltransgenen Tieren konnten keine Veränderungen zwischen den Zeitpunkten T0 und Ti+8 in der Reporterexpression beobachtet werden. Bei den induzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie zeigte sich zum Zeitpunkt Ti+8 nur bei den Ohrbiopsien eine leichte Reduktion der Reporterexpression in den epithelialen Zellen der Basalschicht der Epidermis (Abb. 3.9.).

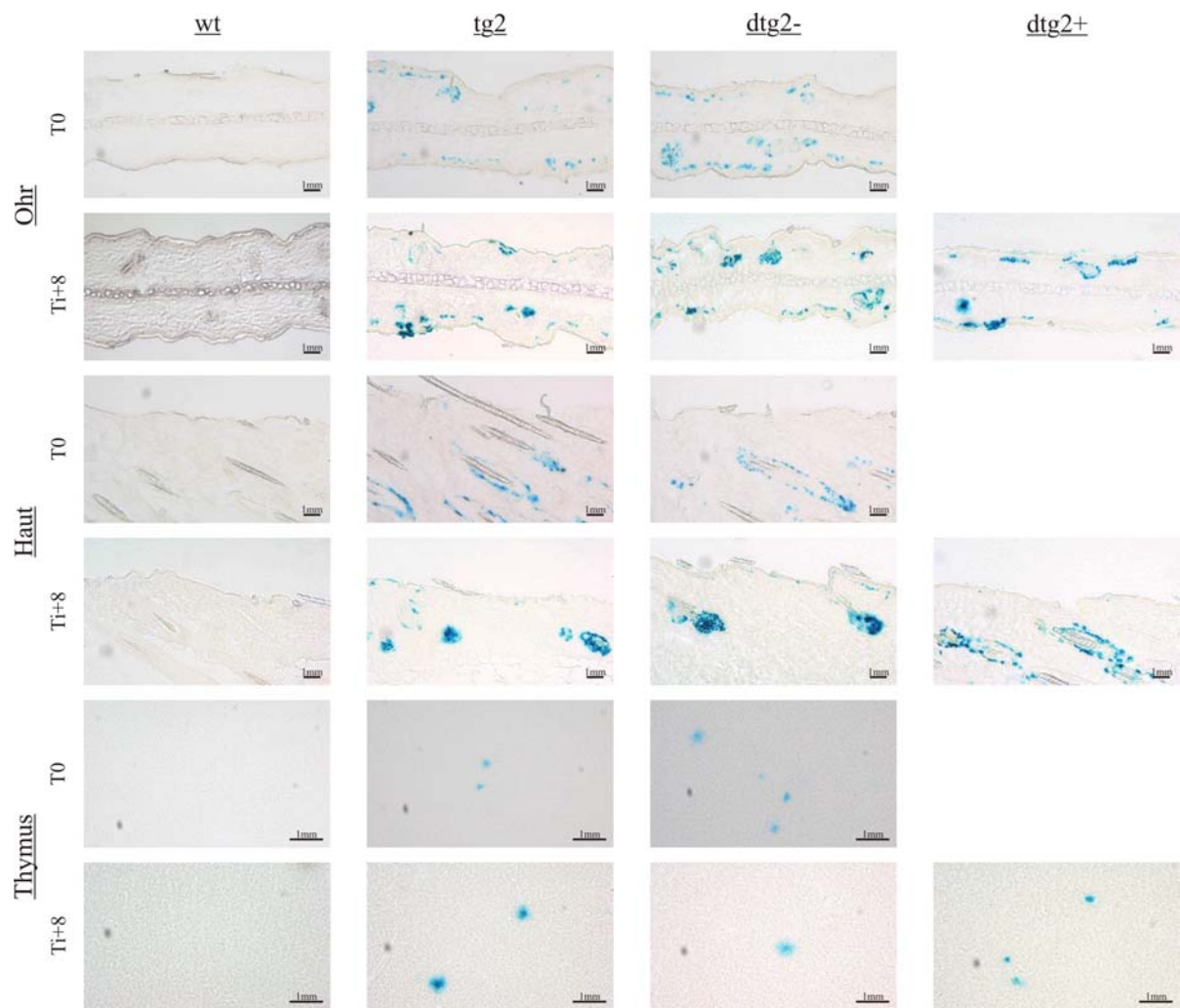


Abb. 3.9. Reporterexpression der Linie K5-Smad7-tg2 zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8

Mit X-Gal gefärbte Kryoschnitte von Ohrbiopsien (Ohr), der Rückenhaut (Haut), sowie des Thymus (Thymus) der verschiedenen Tiere der K5-Smad7-tg1-Linie (wt / tg2 / dtg2- / dtg2+) zum Zeitpunkt T0 und Ti+8.

3.4.2. Expression von transgenspezifischem Smad7

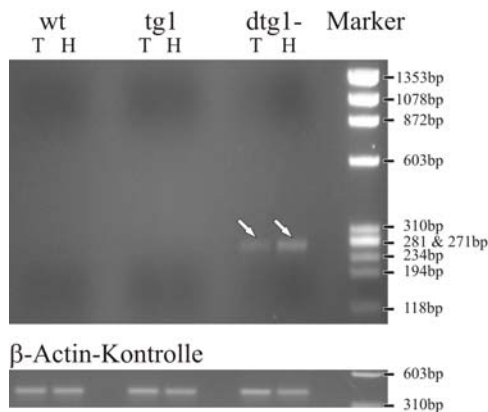
Um festzustellen, ob die erfolgte Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes auch eine Überexpression von Smad7 zur Folge hatte, wurden zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 die verschiedenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien mittels RT-PCR (vgl. 2.2.1.5. & 2.1.4.2.) auf transgenspezifische Expression von Smad7 hin untersucht. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus Haut bzw. Thymus der einzelnen Tiere isoliert und in cDNA umgeschrieben (vgl. 2.2.1.4.). Die verwendeten transgenspezifischen Primer RT-Smad7-for und RT-Smad7-rev flankieren das β -Globin-Intron des K5-Smad7-Konstruktes (Abb. 3.6.) und lieferten eine 870bp große Bande für genomische DNA des rekombinierten K5-Smad7-Konstruktes bzw. eine 251bp große Bande für transgenspezifische Smad7-mRNA nach erfolgter RT-PCR.. Als Kontrolle diente endogenes β -Actin, welches mit dem Primerpaar β -Actin-for und β -Actin-rev nachgewiesen wurde und für β -Actin-mRNA eine 404bp große Bande bzw. für genomische β -Actin-DNA eine 945bp große Bande lieferte (vgl. 2.1.4.2.).

Weder zum Zeitpunkt T0 noch zum Zeitpunkt Ti+8 zeigten die Wildtypen bzw. einfachtransgenen Tieren der beiden K5-Smad7-Linien eine transgenspezifische Expression von Smad7 in Haut oder Thymus. Bei den uninduzierten doppeltransgenen Tieren der beiden K5-Smad7-Linien konnte sowohl zum Zeitpunkt T0 als auch zum Zeitpunkt Ti+8 eine transgenspezifische Expression von Smad7 in der Haut und im Thymus gezeigt werden. Dabei war auch erkennbar, daß bei diesen Tieren die transgenspezifische Expression von Smad7 zum Zeitpunkt Ti+8 etwas stärker war als zum Zeitpunkt T0. Die induzierten doppeltransgenen Tiere beider K5-Smad7-Linien wiesen zum Zeitpunkt Ti+8 eine deutliche transgenspezifische Expression von Smad7 in Haut und Thymus auf.

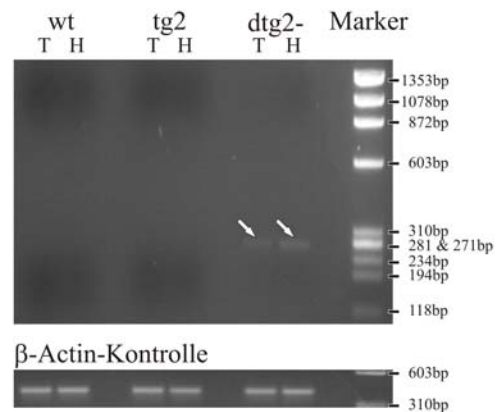
Es zeigte sich dabei für beide K5-Smad7-Linien, daß zum Zeitpunkt Ti+8 bei den induzierten doppeltransgenen Tieren einer Linie die transgenspezifische Expression von Smad7 gegenüber die der uninduzierten doppeltransgenen Tieren der gleichen Linie erhöht war. Bei dem Vergleich der beiden K5-Smad7-Linien gegeneinander wiesen die uninduzierten bzw. induzierten doppeltransgenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg1 eine wesentlich stärkere transgenspezifische Expression von Smad7 auf, als die vergleichbaren Tiere der Linie K5-Smad7-tg2. Auch wurde deutlich, daß zum Zeitpunkt Ti+8 die transgenspezifische Expressionszunahme von Smad7 bei den induzierten doppeltransgenen Tieren im Vergleich zu den uninduzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 stärker war als bei den entsprechenden Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 (Abb. 3.10. ; Tab.3.2.).

A) Zeitpunkt T0

K5-Smad7-tg1

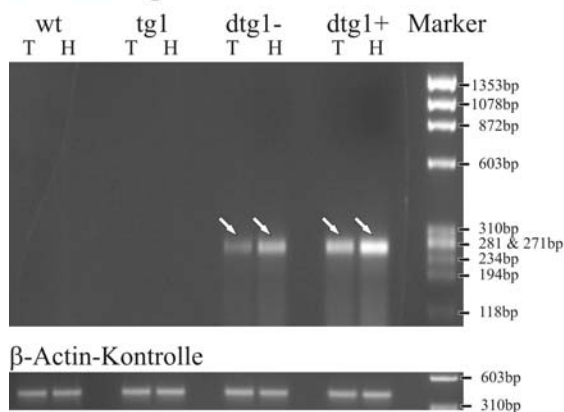


K5-Smad7-tg2



B) Zeitpunkt Ti+8

K5-Smad7-tg1



K5-Smad7-tg2

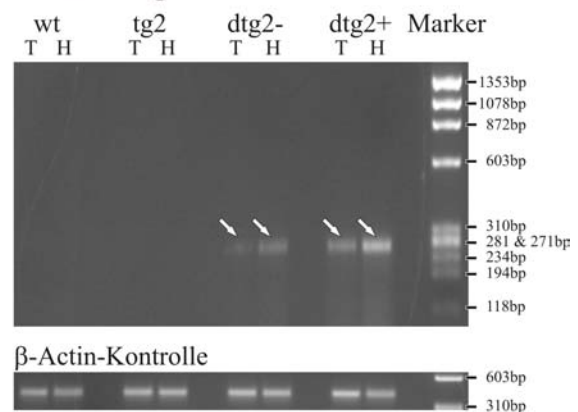


Abb. 3.10. Transgenspezifische Expression von Smad7 zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8

Nachweis der transgenspezifischen Expression von Smad7 mittels RT-PCR unter Verwendung des Primerpaares RT-Smad7-for und RT-Smad7-rev. Tiere die transgenspezifisches Smad7 exprimieren lieferten eine 251bp große Bande. In (A) ist der Expressionsnachweis von transgenspezifischem Smad7 in Haut (H) und Thymus (T) zum Zeitpunkt T0 gezeigt, und in (B) zum Zeitpunkt Ti+8. Als Kontrolle und Standard diente endogenes β -Actin mit einer Produktgröße von 404bp. Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174 x BsuR I verwendet.

	wt	tg1	dtg1-	dtg1+	tg2	dtg2-	dtg2+
Haut (T0)	0	0	56,9	---	0	17,6	---
Haut Ti+8)	0	0	185,4	301,5	0	55,7	159,6
Thymus (T0)	0	0	21,0	---	0	6,1	---
Thymus (Ti+8)	0	0	76,8	217,9	0	22,1	67,9

Tab. 3.2. Expressionsstärke von transgenspezifischem Smad7 zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8

Vergleich der relativen Expressionsstärke von transgenspezifischem Smad7 zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 in Haut und Thymus. Als Standard diente endogenes β -Actin, dessen Expressionsstärke als 100% definiert wurde.

Bei der Untersuchung anderer Organe hinsichtlich einer Expression von transgenspezifischem Smad7 konnte gesehen werden, daß weder zum Zeitpunkt T0 noch zum Zeitpunkt Ti+8 transgenspezifisches Smad7 exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt).

3.5. Auftretende phänotypische Veränderungen

3.5.1. Mortalität

Bei der Betrachtung der verschiedenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien zeigte sich, daß bei den induzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 ab dem Zeitpunkt T_{i+4} die Mortalität dieser Tiere zunimmt. Zum Zeitpunkt T_{i+10} erreichte diese eine Rate von $>85\%$ im Vergleich zu wildtyp, einfachtransgenen und uninduzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 (Abb. 3.11.A). Hinsichtlich des Geschlechtes konnte hierbei kein Unterschied bezüglich des Mortalitätsverlaufes festgestellt werden. Bei der Linie K5-Smad7-tg2 ließen im Gegensatz dazu keine Veränderung bezüglich der Mortalitätsrate erkennen (Abb. 3.11.B).

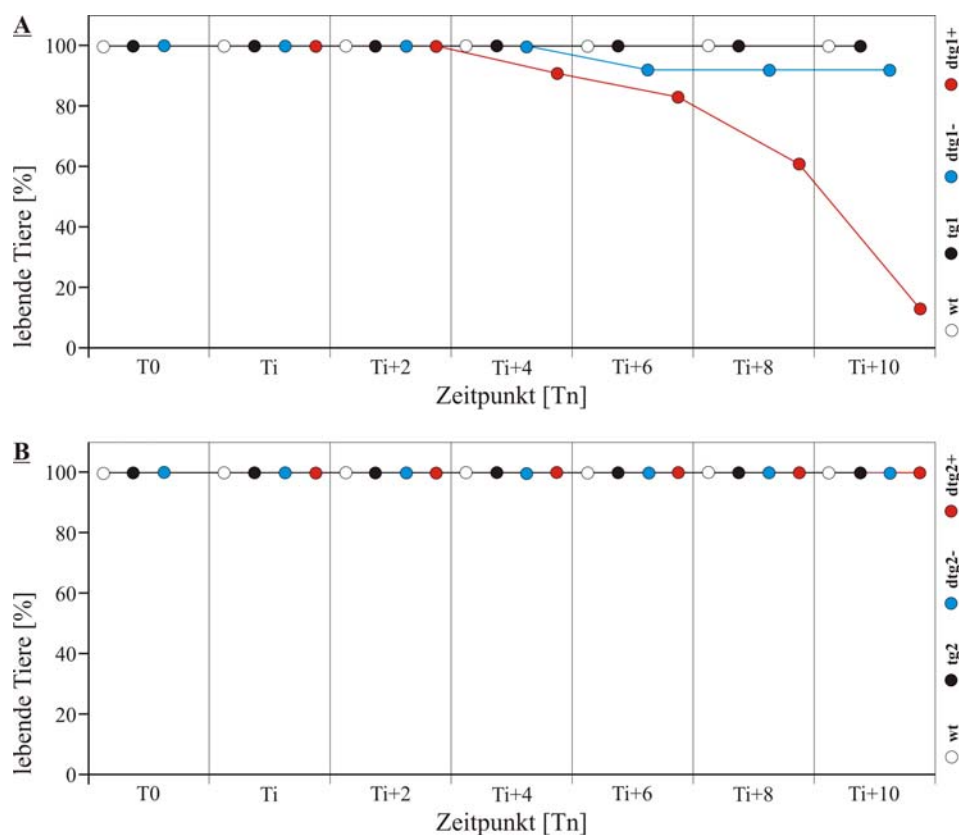


Abb. 3.11. Mortalitätsverlauf der beiden K5-Smad7-Linien

Mortalitätsverlauf über die Zeitpunkte T_0 bis T_{i+10} der verschiedenen Tiere der Linien K5-Smad7-tg1 (A) und K5-Smad7-tg2 (B). 100% entsprechen der Gesamtanzahl der betrachteten Tiere der beiden K5-Smad7-Linien. Zum Zeitpunkt T_i wurden die doppeltransgenen Tiere unterteilt (dtg1-/dtg1+ bzw. dtg2-/dtg2+) und deren Gesamtzahl nach Unterteilung erneut mit 100% definiert. Anzahl der betrachteten Tiere je Gruppe zum Zeitpunkt T_i : $n \geq 15$.

Aufgrund dieser Beobachtung wurden für die weiteren Analysen der beiden K5-Smad7-Linien neben dem Zeitpunkt T_0 als Ausgangspunkt, der Zeitpunkt T_{i+8} als Endzeitpunkt gewählt. Dies erfolgte, da zum Zeitpunkt T_{i+8} die Mortalitätsrate der induzierten doppeltransgenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg1 zwar ca. 40% betrug, jedoch eine deutliche Ausprägung der im weiteren Verlauf beschriebenen Phänotypen zu beobachten war.

3.5.2. Körpergewichtsverlauf

Parallel zu der erhöhten Mortalität der induzierten doppeltransgenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg1 zeigte sich sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen eine Reduktion des Körpergewichtes über die Zeitpunkte T0 bis Ti+8. Bei den Männchen wurde der Verlust an Körpergewicht ab dem Zeitpunkt Ti+4 und bei den Weibchen ab dem Zeitpunkt Ti+6 signifikant. Zum Zeitpunkt Ti+8 hat sich das Körpergewicht bei den induzierten doppeltransgenen Männchen dieser Linie um 52% und bei den Weibchen um 44% reduziert. Daneben erwies sich auch, daß bei den uninduzierten doppeltransgenen Männchen und Weibchen dieser K5-Smad7-Linie eine Reduktion ihres Körpergewichtes bis zum Zeitpunkt Ti+8 stattfand (Abb. 3.12.).

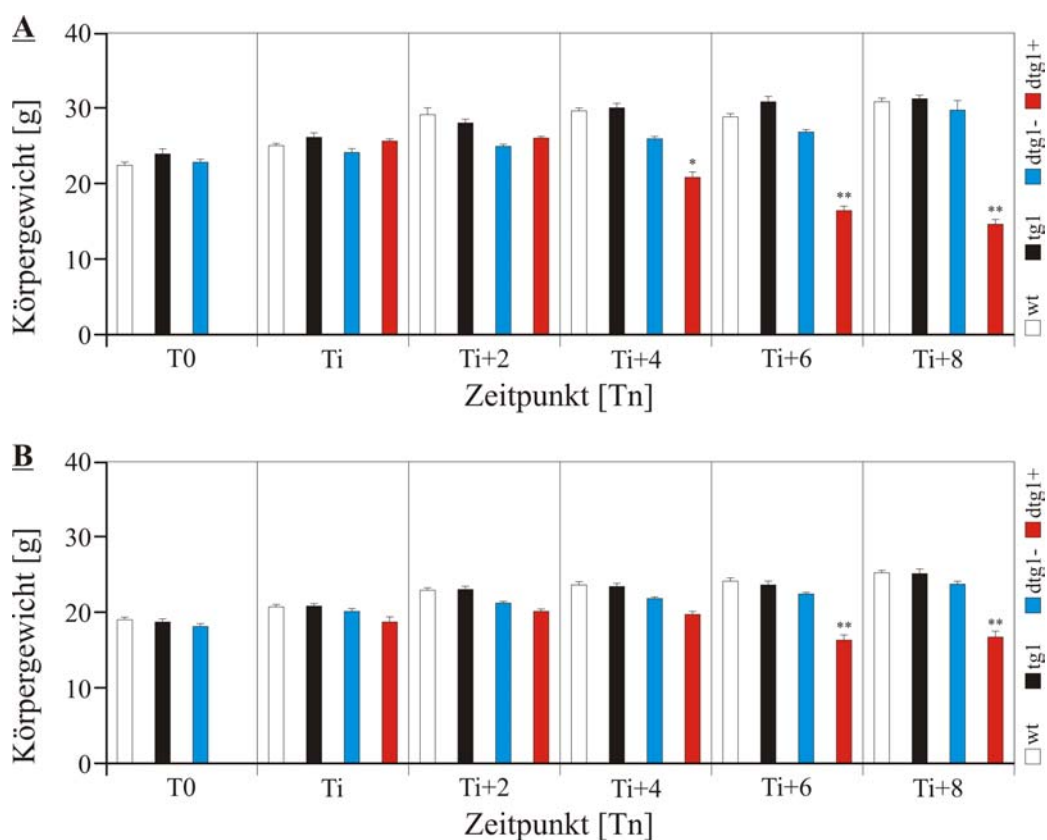


Abb. 3.12. Körpergewichtsverlauf der Tiere der K5-Smad7-tg1-Linie

Körpergewichtsverlauf von Männchen (A) und Weibchen (B) der verschiedenen Tiere der K5-Smad7-tg1-Linie (MW±SEM). Signifikante Abweichungen (* = $p < 0,005$; ** = $p < 0,001$) wurden markiert, wenn sie gegenüber der wt- und der tg1-Kontrollgruppe bestanden.

Bei der Betrachtung des Körpergewichtsverlaufs der verschiedenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg2 ergab sich, daß sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen keine Unterschiede bezüglich des Körpergewichtsverlaufes über die Zeitpunkte T0 bis Ti+8 festgestellt werden konnten (Abb. 3.13.).

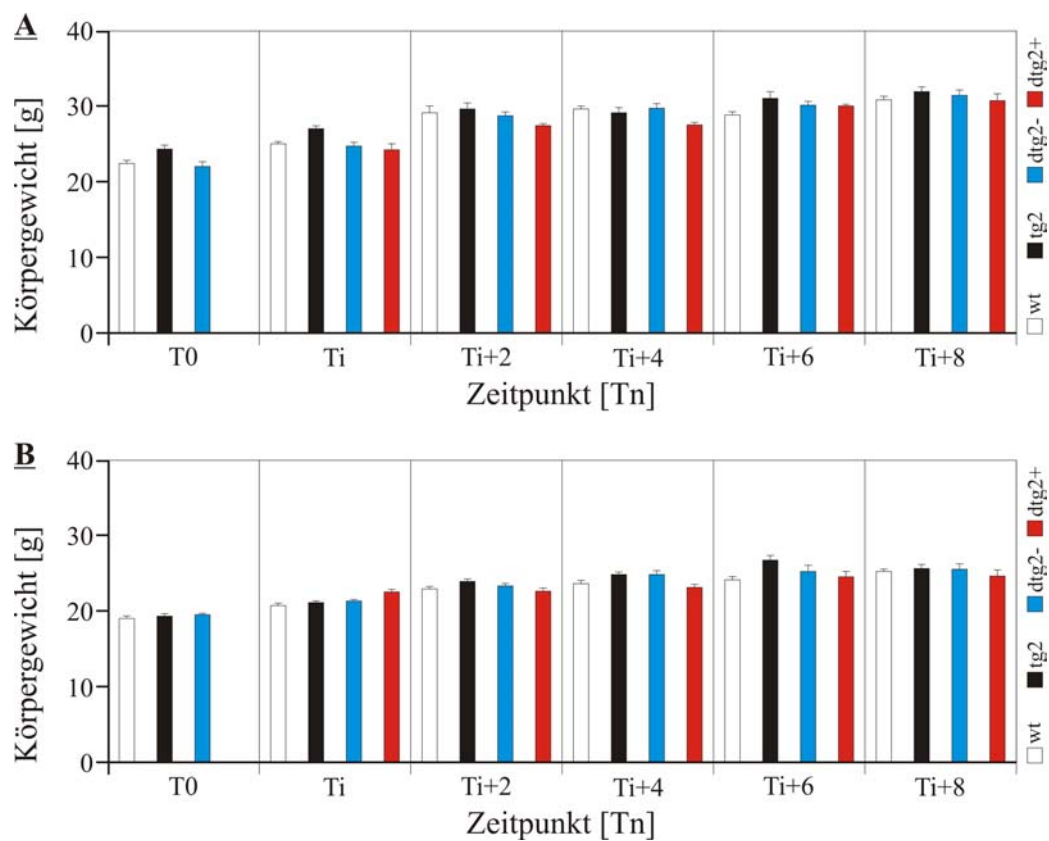


Abb. 3.13. Körpergewichtsverlauf der Tiere der K5-Smad7-tg2-Linie
Körpergewichtsverlauf von Männchen (A) und Weibchen (B) der verschiedenen Tiere der K5-Smad7-tg2-Linie (MW±SEM).

3.5.3. Tasthaare

Bereits zum Zeitpunkt T0 konnte bei den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 ein Unterschied im Erscheinungsbild der Tasthaare beobachtet werden. So waren die Tasthaare der uninduzierten doppeltransgenen Tiere im Vergleich mit den Wildtypen und einfachtransgenen Tieren dieser Linie reduziert und verkümmert ausgebildet (Abb. 3.14.).

Die verschiedenen Tieren der K5-Smad7-tg2-Linie zeigten hingegen keine Unterschiede die Ausbildung der Tasthaare betreffend (Abb. 3.14.)

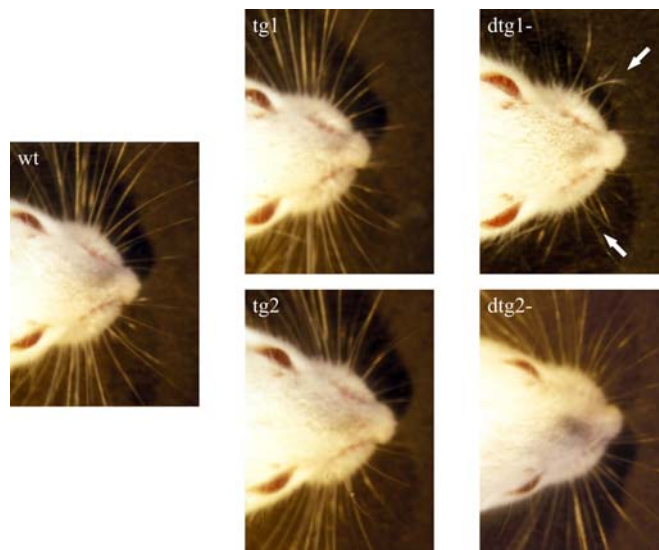


Abb. 3.14. Erscheinungsbild der Tasthaare zum Zeitpunkt T0

Abbildungen des Erscheinungsbildes der Tasthaare von Wildtyptieren (wt), einfachtransgenen Tieren (tg1/tg2) und uninduzierten doppeltransgenen Tieren (dtg1-/dtg2-) zum Zeitpunkt T0.

Zum Zeitpunkt Ti+8 stellten sich die Tasthaare der uninduzierten doppeltransgenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg1 weiterhin reduziert und verkümmert dar, allerdings zeigten sich zu diesem Zeitpunkt keine Änderungen in der Ausprägung dieser phänotypischen Veränderung im Vergleich zu dessen Ausprägung zum Zeitpunkt T0. Bei den induzierten doppeltransgenen Tieren hingegen verstärkte sich dieser Phänotyp zum Zeitpunkt Ti+8, so daß die Tasthaare dieser Tiere noch stärker reduziert und verkümmert erschienen. Dies führte zum Teil dazu, daß die Tasthaare dieser Tiere fast nur noch in Ansätzen zu erkennen waren (Abb. 3.15.).

Die verschiedenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg2 wiesen untereinander auch zu diesem Zeitpunkt nach Induktion keine Unterschiede im Erscheinungsbild der Tasthaare auf (Abb. 3.15.).

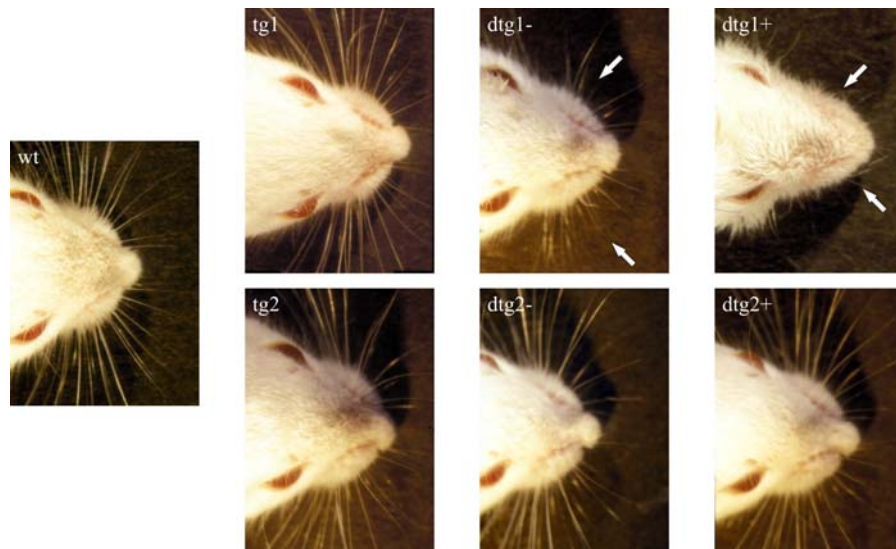


Abb. 3.15. Erscheinungsbild der Tasthaare zum Zeitpunkt Ti+8

Abbildungen des Erscheinungsbildes der Tasthaare von Wildtyptieren (wt), einfachtransgenen Tieren (tg1/tg2) und uninduzierten doppeltransgenen Tieren (dtg1-/dtg2-) zum Zeitpunkt Ti+8.

3.5.4. Fellerscheinungsbild

Zum Zeitpunkt T0 war kein Unterschied in dem Erscheinungsbild des Fells zwischen den verschiedenen Tieren der beiden K5-Smad7-Linien sichtbar (Abb. 3.16.).

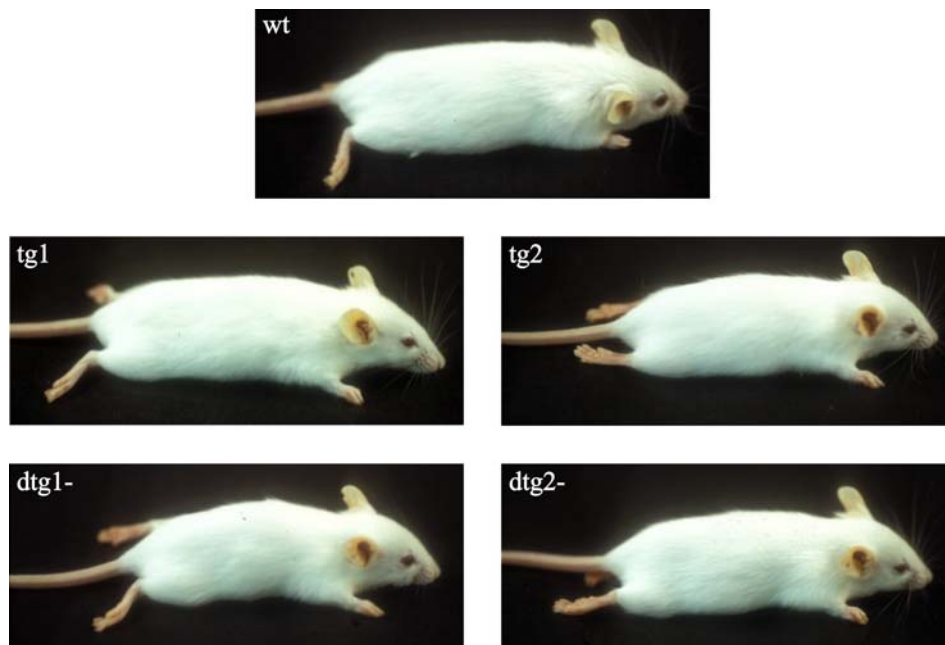


Abb. 3.16. Erscheinungsbild des Fells zum Zeitpunkt T0

Abbildungen des Erscheinungsbildes des Fells von Wildtyptieren (wt), einfachtransgenen Tieren (tg1/tg2) und uninduzierten doppeltransgenen Tieren (dtg1-/dtg2-) zum Zeitpunkt T0.

Zum Zeitpunkt Ti+8 zeigte sich bei den induzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 eine deutliche Veränderung im Erscheinungsbild des Fells. Diese Veränderung stellte sich in Form von ungeordnetem und zum Teil ausgedünntem Fell dar. Bei den uninduzierten doppeltransgenen Tiere dieser Linie war teilweise ebenfalls ein leicht ungeordnetes Fell zu erkennen, allerdings nicht derart stark ausgeprägt war wie bei den induzierten doppeltransgenen Tieren (Abb. 3.17.).

Bei den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 konnten auch zu diesem Zeitpunkt nach Induktion keine Unterschiede hinsichtlich des Fellerscheinungsbildes festgestellt werden (Abb. 3.17.).

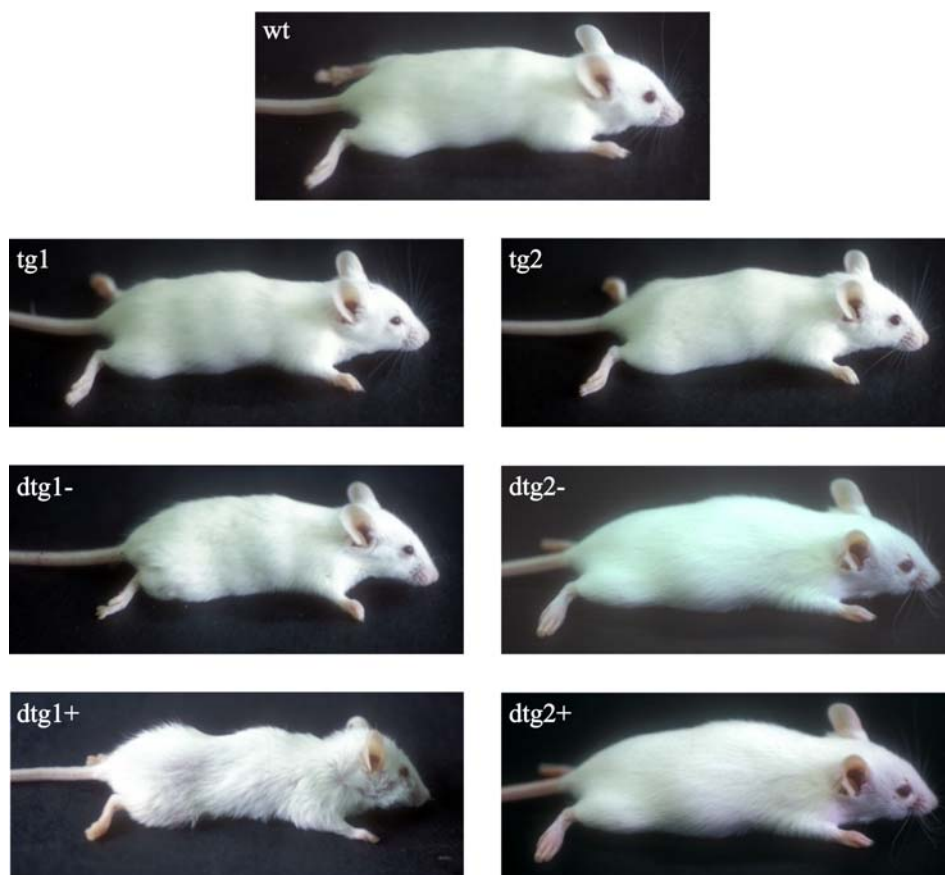


Abb. 3.17. Erscheinungsbild des Fells zum Zeitpunkt Ti+8

Abbildungen des Erscheinungsbildes des Fells von Wildtypen (wt), einfachtransgenen (tg1/tg2), uninduzierten doppeltransgenen (dtg1-/dtg2-) und induzierten doppeltransgenen (dtg1+/dtg2+) Tieren zum Zeitpunkt Ti+8.

3.5.5. Zähne

Zum Zeitpunkt T0 konnten zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 als auch bei den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 keine Unterschiede im Erscheinungsbild der Schneidezähne beobachtet werden (Abb. 3.18.).

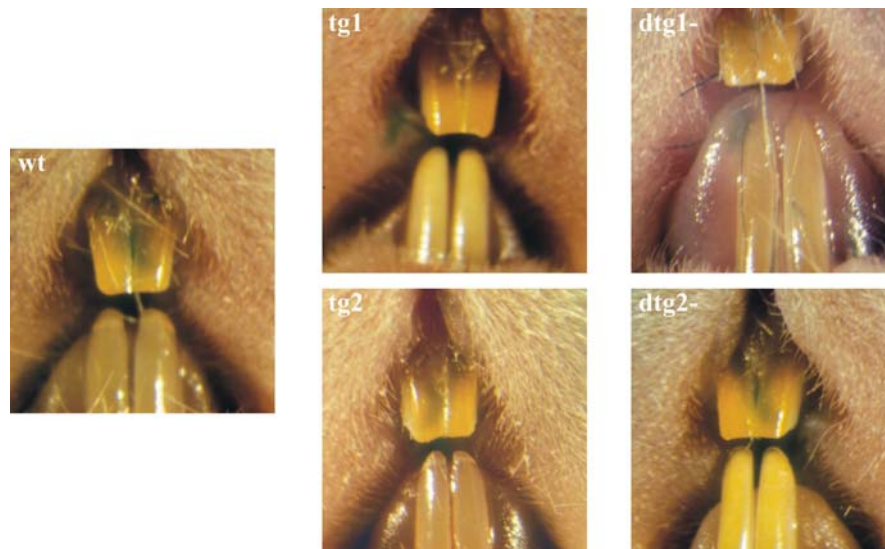


Abb. 3.18. Erscheinungsbild der Schneidezähne zum Zeitpunkt T0

Abbildungen des Erscheinungsbildes der Schneidezähne von Wildtypen (wt), einfachtransgenen (tg1/tg2), uninduzierten doppeltransgenen (dtg1-/dtg2-) und induzierten doppeltransgenen (dtg1+/dtg2+) Tieren zum Zeitpunkt Ti+0.

Zum Zeitpunkt Ti+8 zeigten sich bei den induzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 deutliche Veränderungen im Erscheinungsbild der Schneidezähne (Abb. 3.19.). So besaßen die Schneidezähne dieser Tiere im Vergleich zu denen der Wildtypen, der einfachtransgenen und der uninduzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie keine bzw. nur eine sehr schwache Verfärbung der Schneidezähne. Zudem waren die Schneidezähne dieser Tiere, speziell die oberen Schneidezähne, untypisch stark abgenutzt. Bei den uninduzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie konnte gesehen werden, daß diese Tiere zum Teil im Bereich der Zahnspitze der unteren Schneidezähne auch eine schwächere Zahnverfärbung aufwiesen, untypische Abnutzungerscheinungen ließen sich bei den Schneidezähnen dieser Tiere jedoch nicht erkennen.

Zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 konnte auch zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied hinsichtlich des Erscheinungsbildes der Schneidezähne festgestellt werden (Abb. 3.19.)

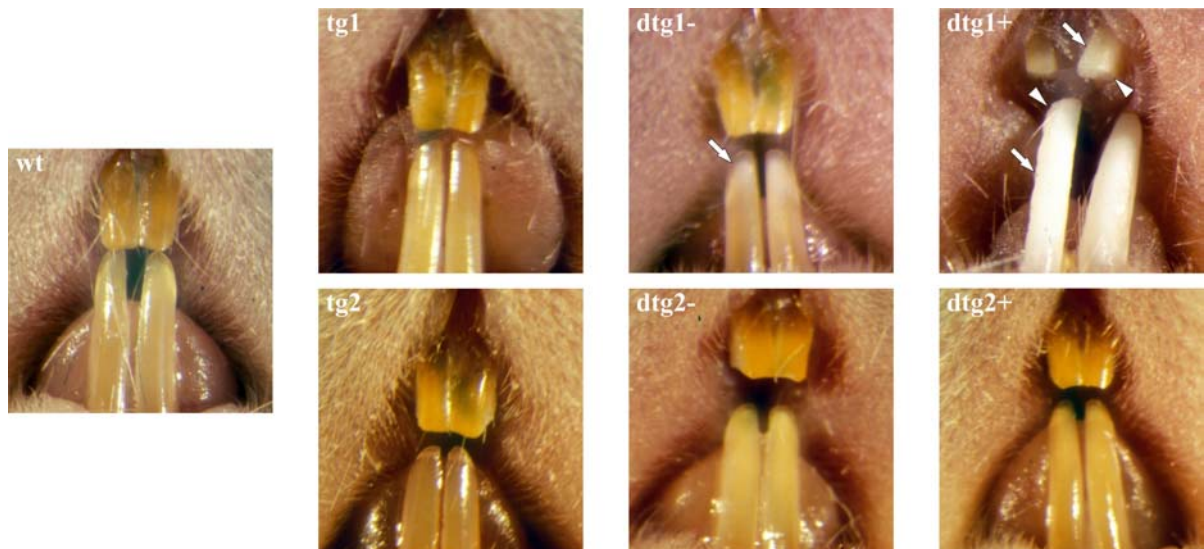


Abb. 3.19. Erscheinungsbild der Schneidezähne zum Zeitpunkt Ti+8

Abbildungen des Erscheinungsbildes der Schneidezähne von Wildtypen (wt), einfachtransgenen (tg1/tg2), uninduzierten doppeltransgenen (dtg1-/dtg2-) und induzierten doppeltransgenen (dtg1+/dtg2+) Tieren zum Zeitpunkt Ti+8. Pfeile markieren Veränderungen in der Zahnfärbung, Pfeilspitzen Veränderungen in der Zahnform.

Für eine nähere Begutachtung der Veränderungen der Schneidezähne bei den Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 wurden die unteren Schneidezähne dieser Tiere aus dem Kiefer herauspräpariert und mikroskopisch bzw. rasterelektronenmikroskopisch (vgl. 2.2.3.3.) betrachtet. Zusätzlich wurden auch die unteren Backzahnreihen betrachtet, um festzustellen, ob sich bei diesen Zähnen auch Veränderungen zeigten.

Es konnte gesehen werden, daß im Vergleich zu den Schneidezähnen der wildtyp bzw. uninduzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie bei den Schneidezähnen der induzierten doppeltransgenen Tieren die Schmelzschicht geschädigt und die Beißkante abgerundet war. Der Vergleich der Backenzähne der induzierten doppeltransgenen Tiere mit denen von wildtyp und uninduzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 zeigte, daß diese Zähne nicht von Veränderungen betroffen waren. (Abb. 3.20.).

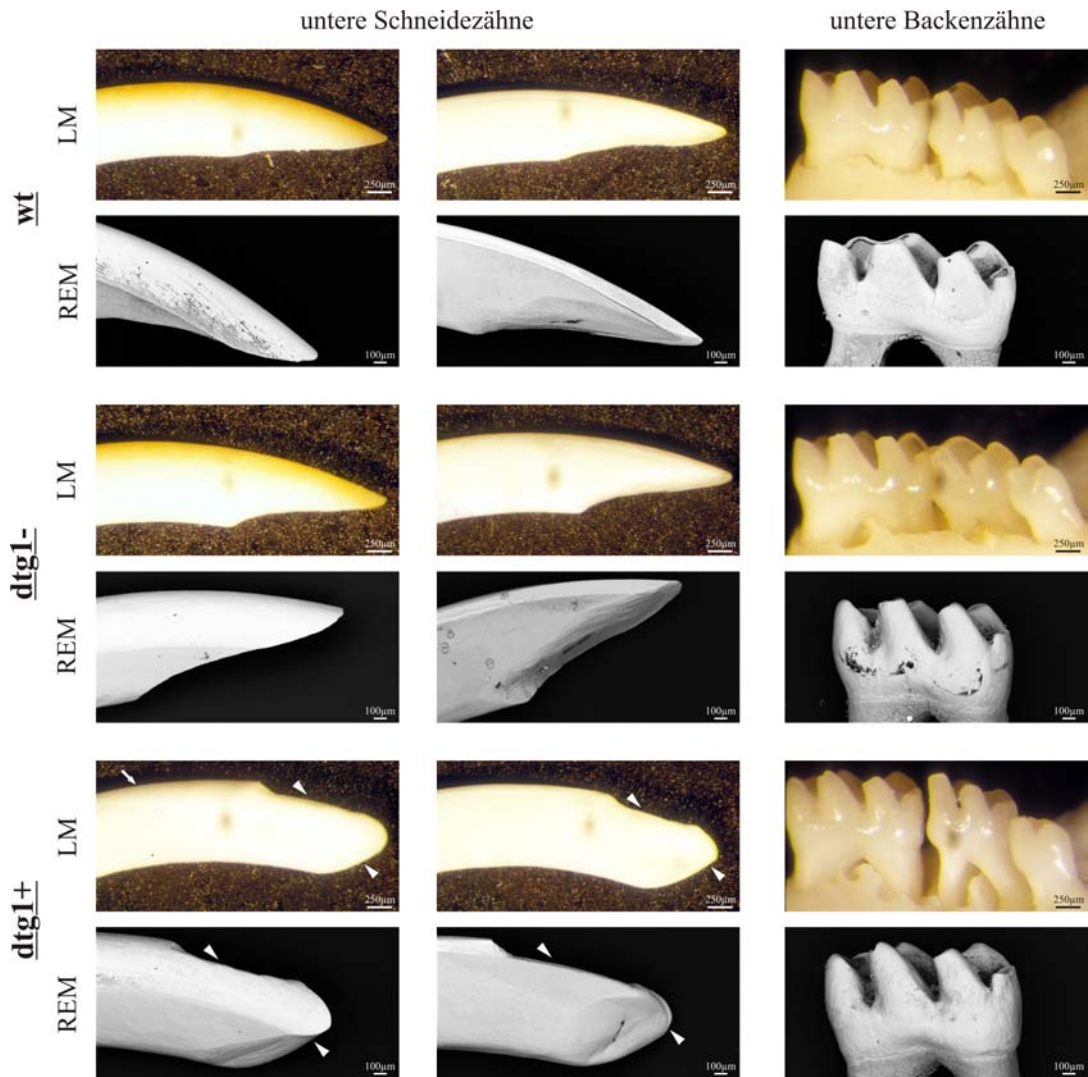


Abb. 3.20. Schneide- und Backenzähne der Linie K5-Smad7-tg1 zum Zeitpunkt Ti+8

Lichtmikroskopische (LM) und rasterelektronische (REM) Abbildungen des Erscheinungsbildes der unteren Schneidezähne bzw. unteren Backenzähne von Wildtypen (wt), uninduzierten doppeltransgenen (dtg1-) und induzierten doppeltransgenen (dtg1+) Tieren zum Zeitpunkt Ti+8. Pfeile markieren Veränderungen in der Zahnfärbung, Pfeilspitzen markieren Veränderungen der Schmelzschicht bzw. der Form der Beißkante der Zähne.

Auch bei den Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 wurden die unteren Schneidezähne bzw. unteren Backenzahnreihen auf diese Weise betrachtet, wobei sich weder bei den Schneidezähnen noch bei den Backenzähnen Veränderungen zwischen den verschiedenen Tieren dieser Linie zeigten (Daten nicht gezeigt).

3.6. Weiterführende Analysen

Neben den beobachteten Phänotypen (3.3.2.) wurden der Thymus und die Haut der verschiedenen Tiere der beiden verwendeten K5-Smad7-Linien weiteren Analysen zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 unterzogen. Hierbei wurde der Thymus mittels Durchflußzytometrie bezüglich Veränderungen seiner T-Zellpopulationen, und die Haut histologisch auf etwaige Veränderungen des Hautaufbaus untersucht. Zusätzlich wurde in der Haut auch nach Veränderungen der Expression von Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade gesucht.

3.6.1. Durchflußzytometrische Analysen des Thymus und der Milz

Wie in 1.3.1. beschrieben, wurde gezeigt, daß eine embryonale Überexpression von Smad7 unter Kontrolle des Keratin5-Promoters zu Veränderungen im Thymus führt. Da nachgewiesen werden konnte, daß die beiden verwendeten K5-Smad7-Linien im Thymus sowohl das Reporter-gen als auch nach erfolgter Induktion der Rekombination transgenspezifisches Smad7 überexprimieren, wurden die verschiedenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 mittels Durchflußzytometrie hinsichtlich der relativen Verteilung der einzelnen T-Zell-Populationen ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD8^+$ und $CD4^-CD8^-$) im Thymus untersucht. Zusätzlich wurde die Gesamtzahl der lebenden T-Zellen durch Auszählen bestimmt (vgl. 2.2.3.2.), und durch die Verbindung der Ergebnisse von Gesamtzellzahl und relativer Verteilung der T-Zellen konnten dann Aussagen über die absoluten Verteilungen der einzelnen T-Zellpopulationen getroffen werden.

In der Milz konnten weder die Expression des Reporter-gens noch eine transgenspezifische Smad7-Expression nachgewiesen werden, trotzdem wurden die Milzen der verschiedenen Gruppen der beiden K5-Smad7-Linien zusätzlich hinsichtlich der relativen Verteilungen ihrer T-Zellpopulationen ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^-CD8^-$) und der Gesamt-T-Zellzahl und zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 hin untersucht, um die Möglichkeit eines etwaigen peripheren Effektes zu überprüfen.

3.6.1.1. Analyse der T-Zellen des Thymus der Linie K5-Smad7-tg1

a) Zeitpunkt T0

Zum Zeitpunkt T0 zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg1-Linie keine Unterschiede in der relativen Verteilung der einzelnen T-Zell-Populationen (Abb. 3.21.).

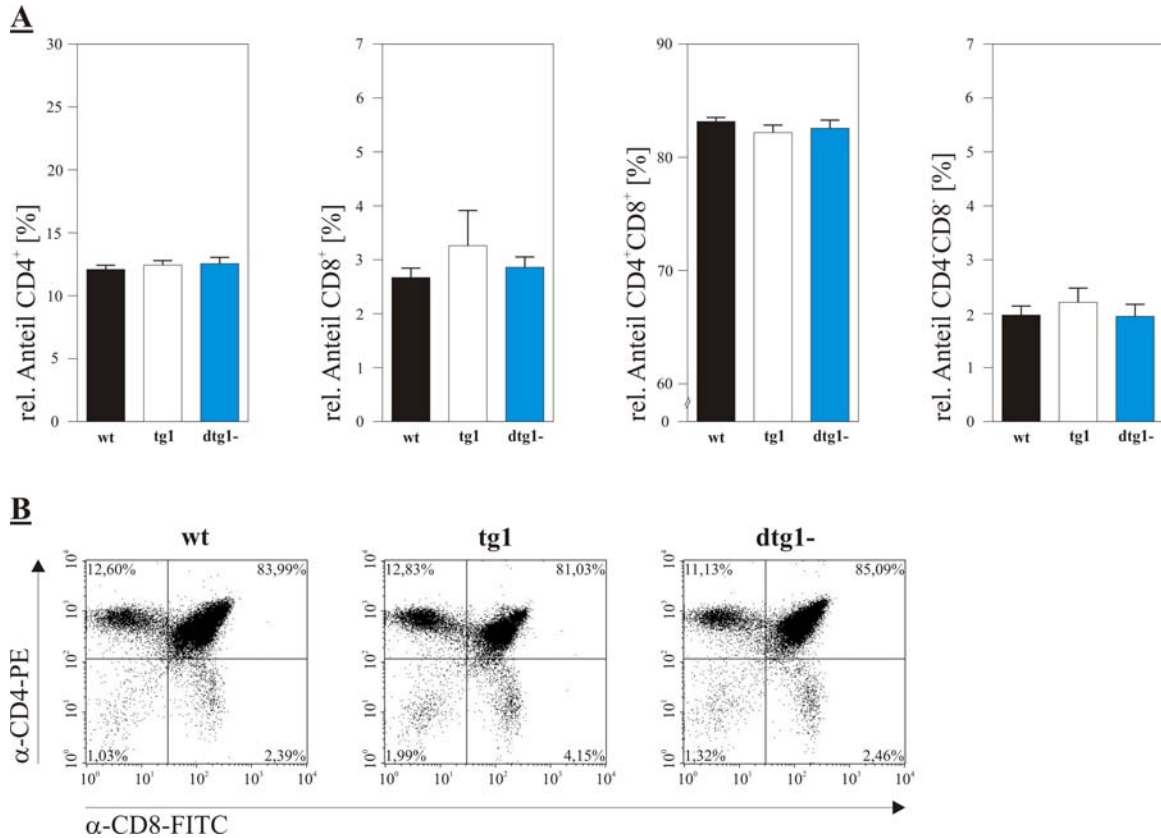


Abb. 3.21. Relative T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T0 (K5-Smad7-tg1-Linie)

In (A) sind die relativen Anteile der CD4⁺-, CD8⁺-, CD4⁺CD8⁺- und CD4⁻CD8⁻-T-Zellpopulationen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg1-Linie dargestellt (MW±SEM). In (E) sind Dot-Plots der einzelnen Gruppen gezeigt. Die relativen Anteile [%] der einzelnen T-Zellpopulationen wurden angegeben. Anzahl der untersuchten Tiere (n): n ≥ 7.

Auch hinsichtlich der Gesamtzahl der lebenden T-Zellen konnten zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (Abb.3.22.).

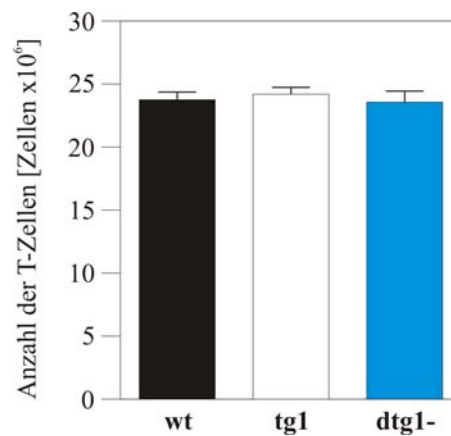


Abb. 3.22. Gesamtzahl der T-Zellen zum Zeitpunkt T0 (K5-Smad7-tg1-Linie)

Gegenüberstellung der Gesamtzahlen (Zellen x10⁶) der lebenden T-Zellen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg1-Linie zum Zeitpunkt T0 (MW±SEM). Anzahl der untersuchten Tiere (n): n ≥ 7.

Bei der Verbindung der Ergebnisse von Gesamtzellzahlen und der relativen Verteilungen der einzelnen T-Zellpopulationen der verschiedenen Tiere dieser Linie zeigte es sich, daß es zum Zeitpunkt T0 auch keine Unterschiede bezüglich der absoluten Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen gab (Tab. 3.2.).

Gruppe	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
wt	2,88	0,64	19,81	0,46
tg1	3,02	0,79	19,96	0,51
dtg1-	2,97	0,61	19,54	0,46

Tab. 3.2. Absolute T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T0 (K5-Smad7-tg1-Linie)

Gegenüberstellung der absoluten Zellzahlen (Zellen x10⁶) der einzelnen T-Zellpopulationen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg1-Linie zum Zeitpunkt T0. Dabei wurde jeweils der Mittelwert der Gesamtzellzahl mit dem Mittelwert der relativen Anteile der einzelnen T-Zellpopulationen der einzelnen Gruppe miteinander multipliziert, um so die absolute T-Zellverteilung zu erhalten.

b) Zeitpunkt Ti+8

Zum Zeitpunkt Ti+8 wiesen Wildtypen und einfachtransgenen Tiere der K5-Smad7-tg1-Linie keine Unterschiede hinsichtlich der relativen Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen auf. Bei den uninduzierten doppeltransgenen Tiere dieser Linie war im Vergleich zu den Wildtypen und den einfachtransgenen Tieren nur der relative Anteil der CD8⁺-T-Zellpopulation erhöht (+33%), dies allerdings nicht signifikant. Die induzierten doppeltransgenen Tiere dieser Linie hingegen zeigten, daß im Vergleich zu wildtyp und einfachtransgenen Tieren, der relative Anteil der CD4⁺-T-Zellpopulation erhöht (+104%) und der der CD4⁺CD8⁺-T-Zellpopulation verringert (-20%) war, wobei sich beide Abweichungen als hochsignifikant darstellten. Der relative Anteil der CD8⁺-T-Zellpopulation war im Vergleich zu den Wildtypen und den einfachtransgenen Tieren ebenfalls signifikant erhöht (+79%). Bei der CD4⁻CD8⁻-T-Zellpopulation zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung (+37%) des relativen Anteils dieser T-Zellpopulation (Abb.3.23.).

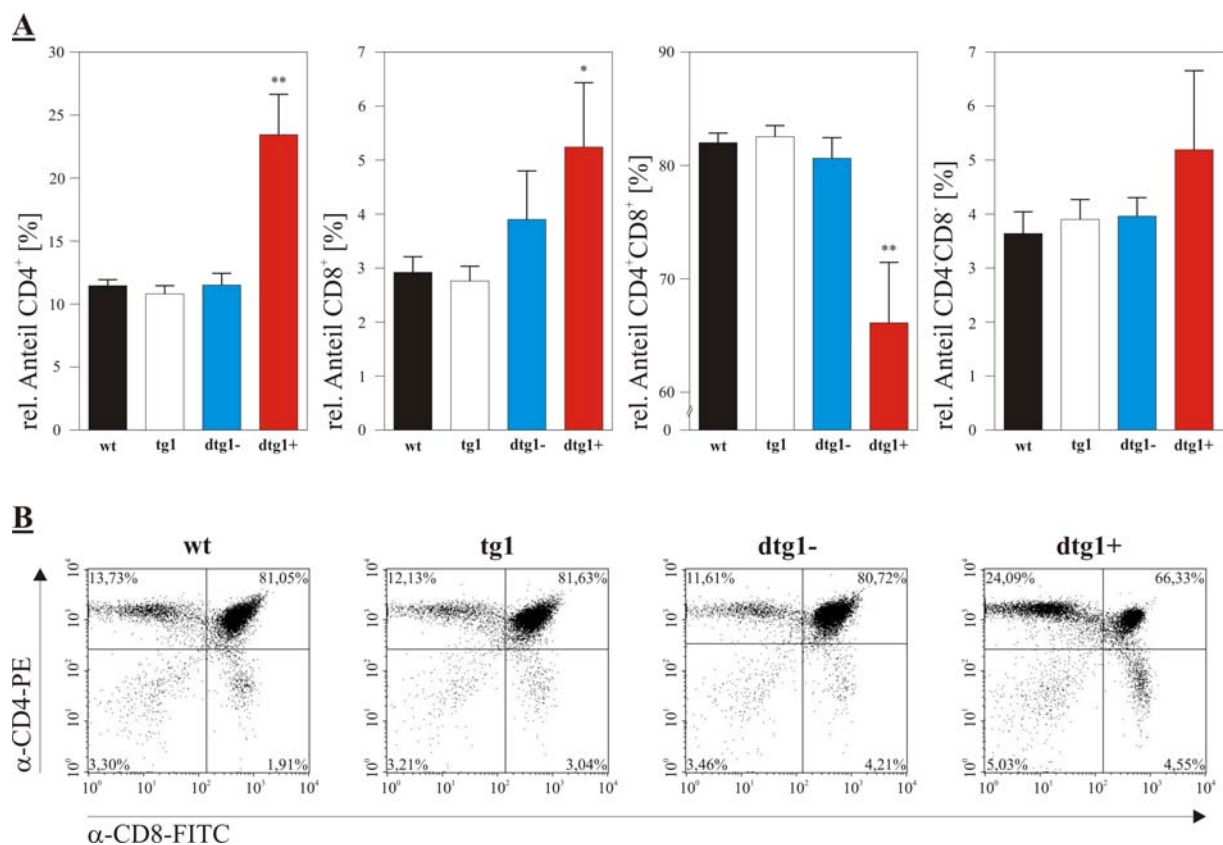


Abb. 3.23. Relative T-Zellverteilung zum Zeitpunkt Ti+8 (K5-Smad7-tg1-Linie)

In (A) sind die relativen Anteile der CD4⁺-, CD8⁺-, CD4⁺CD8⁺- und CD4⁻CD8⁻-T-Zellpopulationen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg1-Linie dargestellt (MW±SEM). Signifikante Abweichungen (* = p<0,005 ; ** = p<0,001) wurden markiert, wenn sie gegenüber der wt- und der tg1-Kontrollgruppe bestanden. In (B) sind Dot-Plots der einzelnen Gruppen gezeigt. Die relativen Anteile [%] der einzelnen T-Zellpopulationen wurden angegeben. Anzahl der untersuchten Tiere (n): n ≥ 7.

Die Gesamtzahl der lebenden T-Zellen der uninduzierten doppeltransgenen Tiere der K5-Smad7-tg1-Linie stellte sich reduziert (-17%) dar. Bei den induzierten doppeltransgenen Tiere dieser Linie hingegen zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion (-51%) der lebenden T-Zellen (Abb. 3.24.).

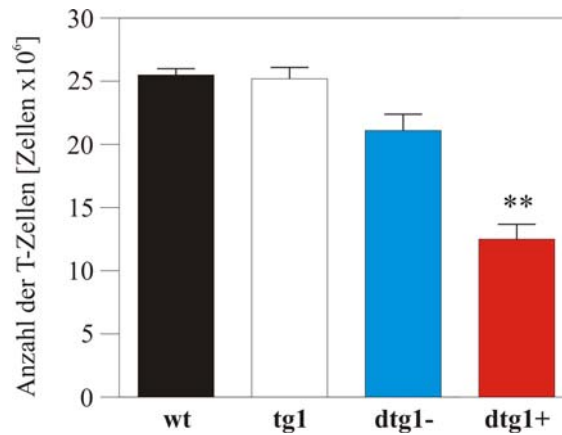


Abb. 3.24. Gesamtzahl der T-Zellen zum Zeitpunkt Ti+8 (K5-Smad7-tg1-Linie)

Gegenüberstellung der Gesamtzahlen (Zellen x10⁶) der lebenden T-Zellen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg1-Linie zum Zeitpunkt Ti+8 (MW±SEM). Signifikante Abweichungen (* = p<0,005 ; ** = p<0,001) wurden markiert, wenn sie gegenüber der wt- und der tg1-Kontrollgruppe bestanden.

Die Verbindung der Ergebnisse von Gesamtzellzahlen und der relativen Verteilungen der einzelnen T-Zellpopulationen der verschiedenen Tiere dieser Linie zeigt, daß bei den induzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 der absolute Anteil der CD4⁺-T-Zellpopulation im Vergleich zu den Wildtypen und den einfachtransgenen Tieren unverändert blieb. Die absoluten Anteile der CD8⁺-, und CD4⁻CD8⁻-T-Zellpopulationen hingegen waren reduziert, die der CD4⁺CD8⁺-T-Zellpopulation sogar signifikant (Tab. 3.4.).

Gruppe	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
wt	2,92	0,74	20,90	0,93
tg1	2,73	0,70	20,82	0,98
dtg1-	2,44	0,82	17,05	0,84
dtg1+	2,92	0,65	8,23*	0,65

Tab. 3.4. Absolute T-Zellverteilung zum Zeitpunkt Ti+8 (K5-Smad7-tg1-Linie)

Gegenüberstellung der absoluten Zellzahlen (Zellen x10⁶) der einzelnen T-Zellpopulationen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg1-Linie. Dabei wurde jeweils der Mittelwert der Gesamtzellzahl mit dem Mittelwert der relativen Anteile der einzelnen T-Zellpopulationen der einzelnen Gruppe miteinander multipliziert, um so die absolute T-Zellverteilung zu erhalten. Signifikante Abweichungen (* = p<0,005 ; ** = p<0,001) wurden markiert, wenn sie gegenüber der wt- und der tg1-Kontrollgruppe bestanden.

3.6.1.2. Analyse der T-Zellen des Thymus der Linie K5-Smad7-tg2

a) Zeitpunkt T0

Bei der Linie K5-Smad7-tg2 zeigten sich zum Zeitpunkt T0 keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Tieren hinsichtlich der relativen Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen (Abb. 3.25.).

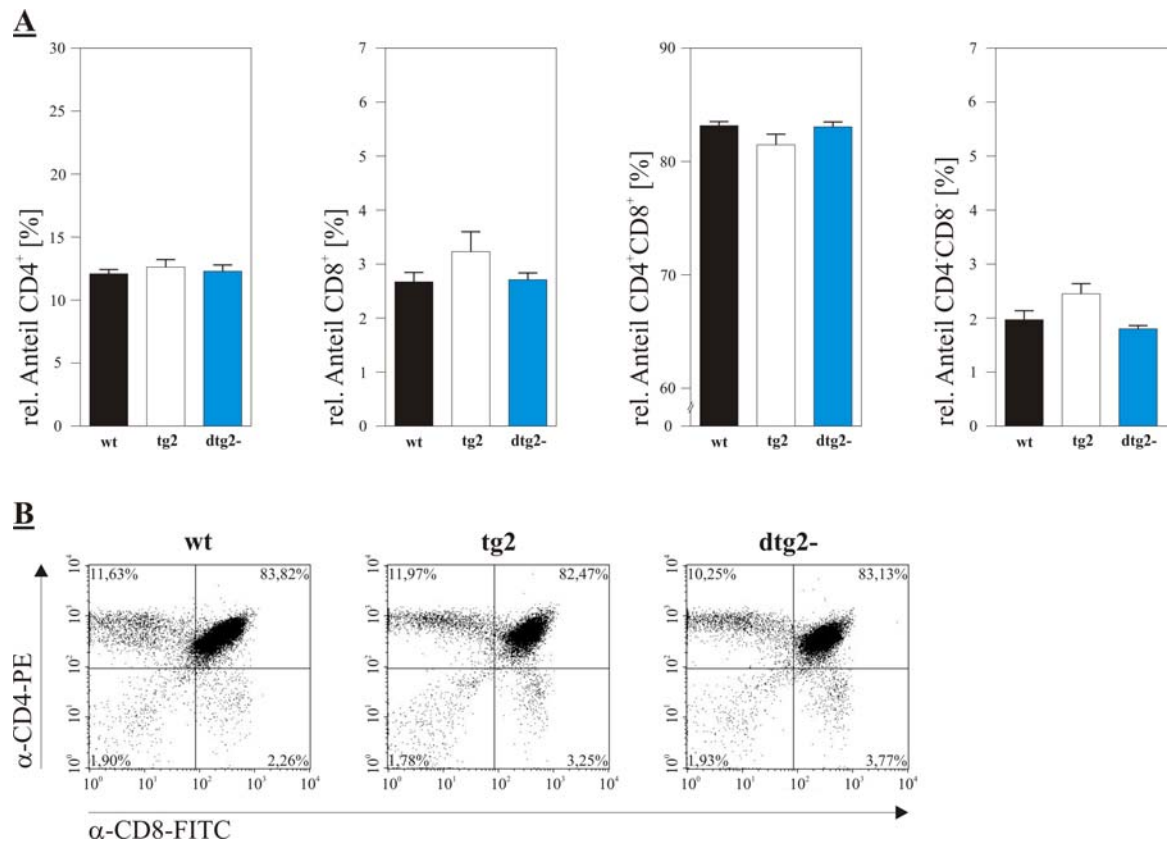


Abb. 3.25. Relative T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T0 (K5-Smad7-tg2-Linie)

In (A) sind die relativen Anteile der CD4⁺-, CD8⁺-, CD4⁺CD8⁺- und CD4⁻CD8⁻-T-Zellpopulationen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg2-Linie dargestellt (MW±SEM). In (B) sind Dot-Plots der einzelnen Gruppen gezeigt. Die relativen Anteile [%] der einzelnen T-Zellpopulationen wurden angegeben. Anzahl der untersuchten Tiere (n): n ≥ 7.

Zu diesem Zeitpunkt wiesen auch die Gesamtzahlen der lebenden T-Zellen zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 keine Unterschiede auf (Abb.3.26.).

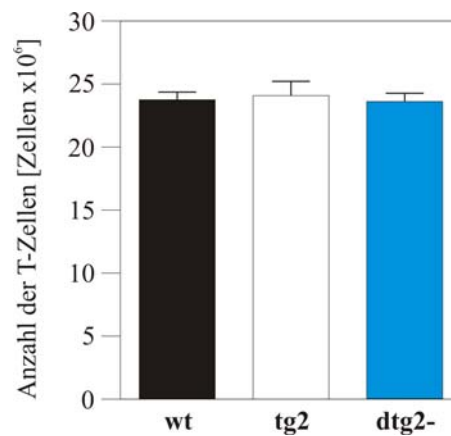


Abb. 3.26. Gesamtzahl der T-Zellen zum Zeitpunkt T0 (K5-Smad7-tg2-Linie)

Gegenüberstellung der Gesamtzahlen (Zellen x10⁶) der lebenden T-Zellen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg2-Linie zum Zeitpunkt T0 (MW±SEM). Anzahl der untersuchten Tiere (n): n ≥ 7.

Die Verbindung der Ergebnisse von Gesamtzellzahlen und der relativen Verteilungen der einzelnen T-Zellpopulationen innerhalb der einzelnen Gruppen dieser Linie zeigte ebenfalls, daß es zum Zeitpunkt T0 keine Unterschiede bezüglich der absoluten Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen gab (Tab. 3.3.).

Gruppe	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
wt	2,88	0,64	19,81	0,46
tg2	3,05	0,78	19,69	0,59
dtg2-	2,93	0,65	19,78	0,43

Tab. 3.3. Absolute T-Zellverteilung zum Zeitpunkt T0 (K5-Smad7-tg2-Linie)

Gegenüberstellung der absoluten Zellzahlen (Zellen x10⁶) der einzelnen T-Zellpopulationen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg2-Linie zum Zeitpunkt T0. Dabei wurde jeweils der Mittelwert der Gesamtzellzahl mit dem Mittelwert der relativen Anteile der einzelnen T-Zellpopulationen der einzelnen Gruppe miteinander multipliziert, um so die absolute T-Zellverteilung zu erhalten.

b) Zeitpunkt Ti+8

Zum Zeitpunkt Ti+8 waren zwischen den verschiedenen Tieren der K5-Smad7-tg2-Linie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der relativen Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen auszumachen (Abb. 3.27.)

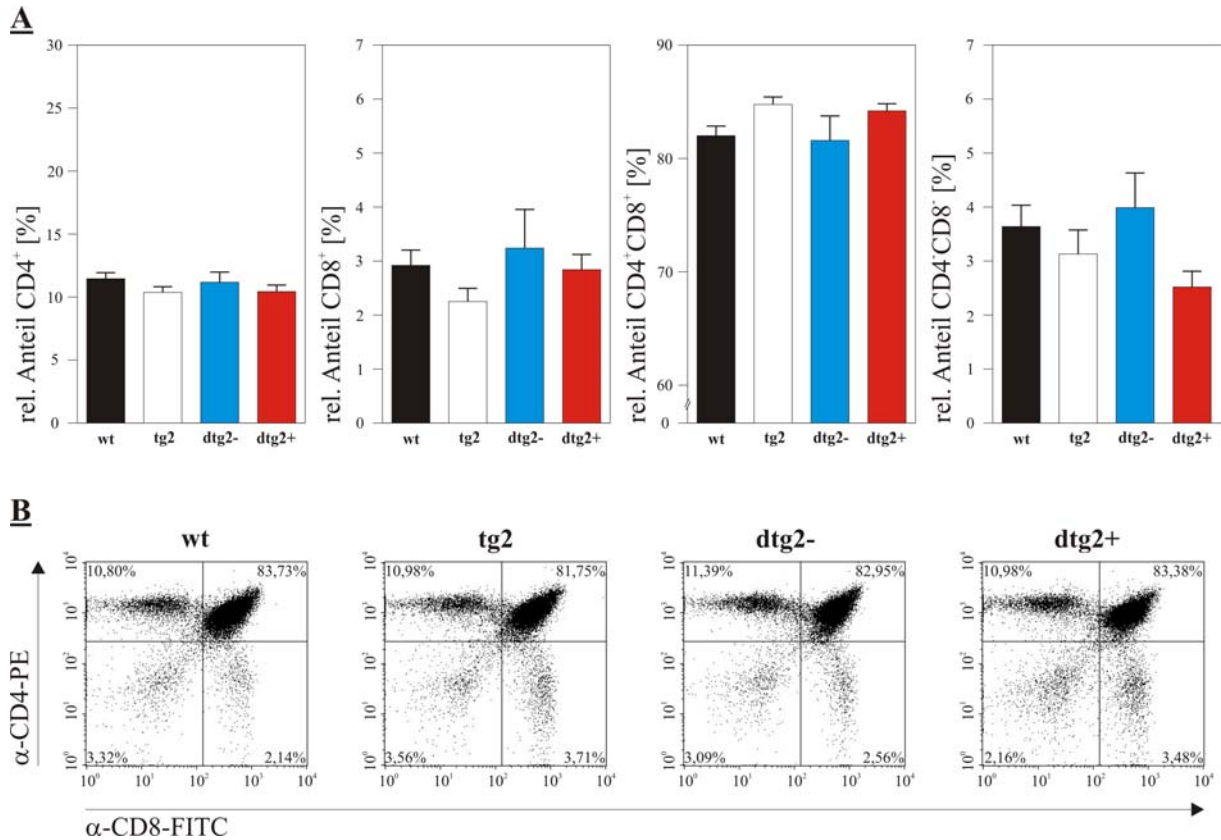


Abb. 3.27. Relative T-Zellverteilung zum Zeitpunkt Ti+8 (K5-Smad7-tg2-Linie)

In (A) sind die relativen Anteile der CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻-T-Zellpopulationen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg2-Linie dargestellt (MW±SEM). In (B) sind Dot-Plots der einzelnen Gruppen gezeigt. Die relativen Anteile [%] der einzelnen T-Zellpopulationen wurden angegeben. Anzahl der untersuchten Tiere (n): n ≥ 7.

Zwischen den verschiedenen Tieren dieser Linie zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede die Gesamtzahlen der lebenden T-Zellen betreffend (Abb.3.28.).

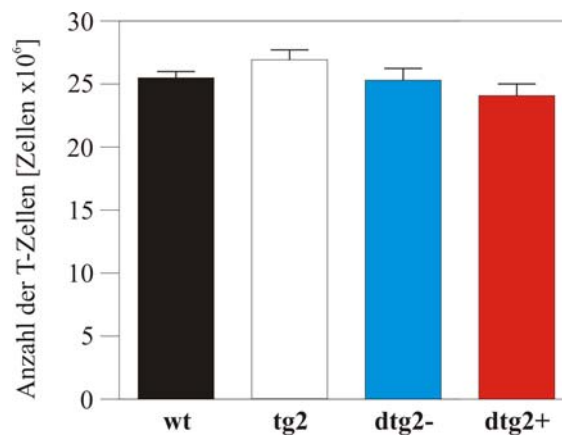


Abb. 3.28. Gesamtzahl der T-Zellen zum Zeitpunkt Ti+8 (K5-Smad7-tg2-Linie)

Gegenüberstellung der Gesamtzahlen (Zellen x 10⁶) der lebenden T-Zellen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg1-Linie zum Zeitpunkt Ti+8 (MW±SEM). Anzahl der untersuchten Tiere (n): n ≥ 7.

Auch bei der Verbindung der Ergebnisse von Gesamtzellzahlen und der relativen Verteilungen der einzelnen T-Zellpopulationen zeigte, daß es zum Zeitpunkt Ti+8 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der absoluten Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen zwischen den verschiedenen Tieren dieser Linie gab (Tab. 3.5.).

Gruppe	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
wt	2,92	0,74	20,90	0,93
tg2	2,80	0,87	22,03	0,85
dtg2-	2,84	0,83	20,72	1,01
dtg2+	2,52	0,69	20,36	0,61

Tab. 3.5. Absolute T-Zellverteilung zum Zeitpunkt Ti+8 (K5-Smad7-tg2-Linie)

Gegenüberstellung der absoluten Zellzahlen (Zellen x 10⁶) der einzelnen T-Zellpopulationen innerhalb der Thymi der einzelnen Gruppen der K5-Smad7-tg2-Linie. Dabei wurde jeweils der Mittelwert der Gesamtzellzahl mit dem Mittelwert der relativen Anteile der einzelnen T-Zellpopulationen der einzelnen Gruppe miteinander multipliziert, um so die absolute T-Zellverteilung zu erhalten.

3.5.1.3. Analyse der Milz zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8

Bei der Analyse der Milz wurde die relative Verteilung der CD4⁺-, CD8⁺- und CD4⁻CD8⁻-T-Zellpopulationen durchflußzytometrisch, und die Gesamtzahl der lebenden T-Zellen bei den verschiedenen Tieren der beiden K5-Smad7-Linien durch auszählen bestimmt. Die absoluten Verteilungen der einzelnen T-Zellpopulationen wurde durch die Verrechnung dieser beiden Ergebnisse erhalten.

Hierbei zeigte es sich, daß es zum Zeitpunkt T0 sowohl zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1, als auch zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 keine Unterschiede hinsichtlich der relativen Verteilungen der untersuchten T-Zellpopulationen, der Gesamtzahlen der lebenden T-Zellen und der absoluten T-Zellverteilungen gab. Dieses Ergebnis wiederholte sich bei der Untersuchung des Zeitpunktes Ti+8, bei dem sich ebenfalls zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 bzw. K5-Smad7-tg2 keine Unterschiede bezüglich der relativen T-Zellverteilungen, Gesamtzahlen der lebenden T-Zellen und der absoluten T-Zellverteilungen beobachten ließen (Daten nicht gezeigt).

3.6.2. histologische Untersuchungen der Haut

Wie in 1.3.1. beschrieben führt die embryonale Überexpression von Smad7 unter Kontrolle des K5-Promoters auch zu Veränderungen in der Haut. Da in dem hier verwendeten System auch für die Haut gezeigt werden konnte, daß die beiden verwendeten K5-Smad7-Linien sowohl das Reporter-gen, als auch nach erfolgter Induktion der Rekombination transgenspezifisches Smad7 überexprimierten, wurde zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 die Haut der verschiedenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien histologisch untersucht, um festzustellen welche Auswirkungen die transgenspezifische Überexpression von Smad7 hat. Hierzu wurden von Kryoschnitten der Rücken-haut HE-Färbungen (vgl. 2.2.2.3.) und BrdU-Färbungen (vgl. 2.2.2.4.) angefertigt und analysiert. Mittels den HE-Färbungen sollten allgemeine Veränderungen im Aufbau der Haut und durch die Proliferationsfärbungen Veränderungen der Proliferationsrate der epidermalen Zellen der Haut verifiziert werden.

3.6.2.1. HE-Färbungen

Zum Zeitpunkt T0 zeigten sich bezüglich des Erscheinungsbildes der Haut sowohl bei den Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 als auch bei den Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 keine Unterschiede zwischen Wildtypen, einfachtransgenen und uninduzierten doppeltransgenen Tieren. Bei allen Tieren konnte ein normaler Aufbau der Haut gesehen werden, der keine Veränderungen hinsichtlich dem Erscheinungsbild der epidermalen Zellen, der Dicke der Epidermis und der Ausprägung der Hornschicht aufwies (Abb. 3.29.).

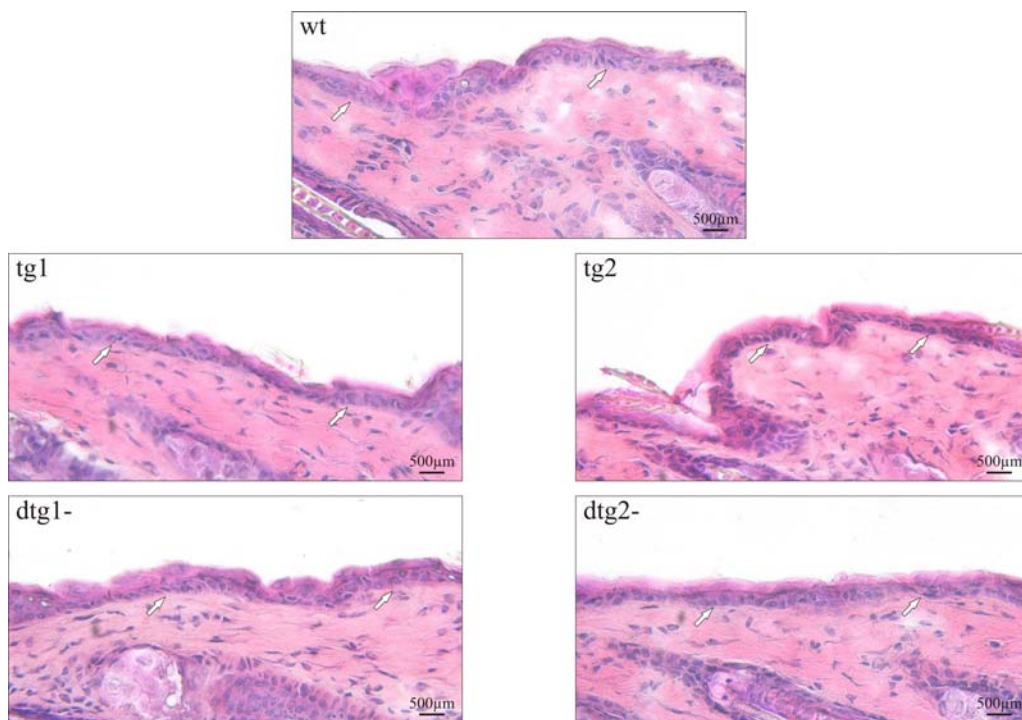


Abb. 3.29. HE-Färbung der Rückenhaut zum Zeitpunkt T0

HE-Färbung der Rückenhaut der verschiedenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien (wt, tg1/tg2, dtg1-/dtg2-) zum Zeitpunkt T0. Pfeile markieren Zellen der Basalschicht. Anzahl der untersuchten Tiere (n): $n \geq 3$.

Zum Zeitpunkt Ti+8 zeigten Wildtypen, einfachtransgene und uninduzierten doppeltransgene Tiere der Linie K5-Smad7-tg1 keine Veränderung der Hautstruktur im Vergleich untereinander als auch im Vergleich zum Zeitpunkt T0. Bei den induzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie konnten dagegen deutliche Unterschiede in der Hautstruktur im Vergleich zu den anderen Tieren dieser Linie gesehen werden. So war bei diesen Tieren die Dicke der Epidermis reduziert und die epidermalen Zellen wiesen nicht das normale Erscheinungsbild auf, sondern stellten sich als stark abgeflacht und weniger gut differenziert dar. Auch war die Ausprägung der Hornschicht bei diesen Tieren von einer Veränderung betroffen. So stellte sich die Hornschicht bei den induzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 im Vergleich zu den Tieren der anderen Gruppen dieser Linie im Verhältnis zur Epidermis verdickt (+ 70%) dar.

Dagegen konnten zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 keine Veränderungen der Hautstruktur zum Zeitpunkt Ti+8 im Vergleich untereinander bzw. im Vergleich zum Zeitpunkt T0 festgestellt werden (Abb. 3.30.).

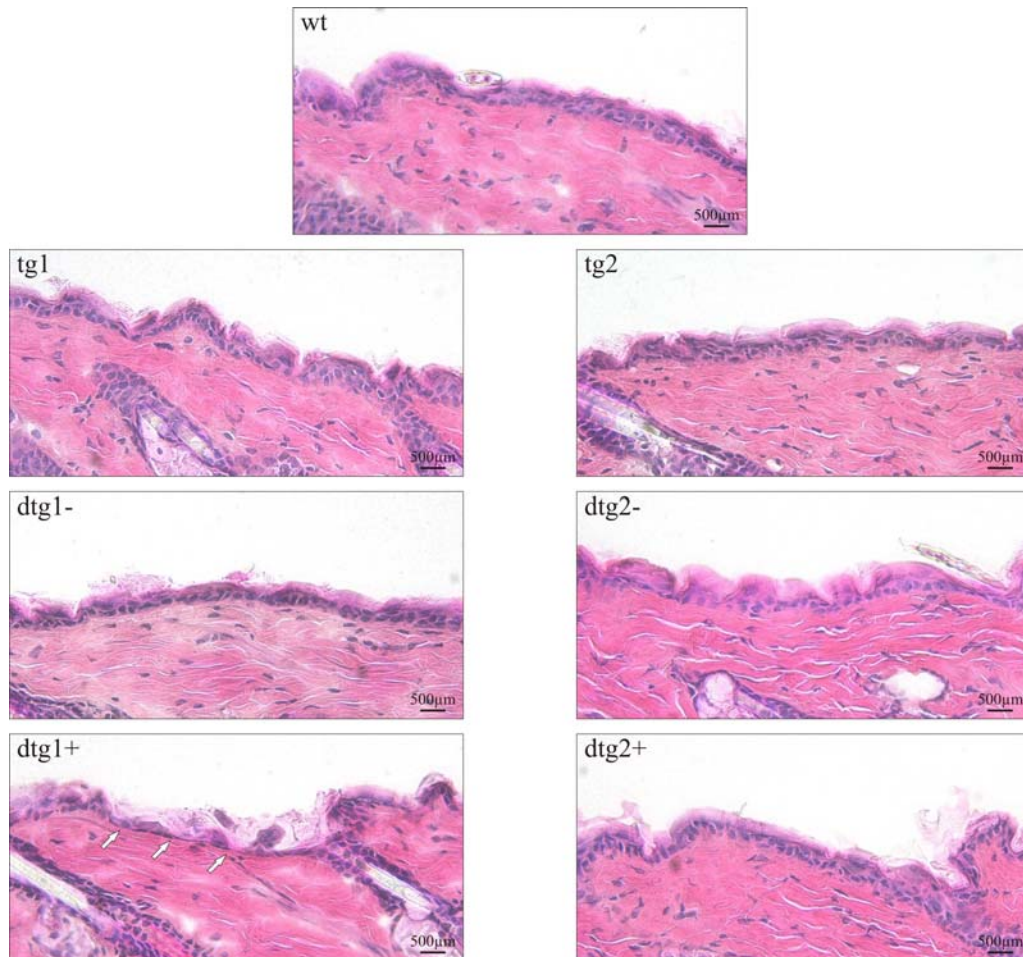


Abb. 3.30. HE-Färbung der Rückenhaut zum Zeitpunkt Ti+8

HE-Färbung der Rückenhaut der verschiedenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien (wt, tg1/tg2, dtg1-/dtg2-, dtg1+/dtg2+) zum Zeitpunkt Ti+8. Pfeile markieren die veränderten Zellen der Epidermis bei den induzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1. Anzahl der untersuchten Tiere (n): $n \geq 5$.

3.6.2.2. BrdU-Färbungen

Um zu überprüfen, ob in diesem System die Proliferationsrate der Zellen der Epidermis verändert war, wurden bei allen Schnitten die proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen aller interfollikulären Bereiche ausgezählt und aus den erhaltenen Werten der Prozentsatz der proliferierenden Zellen berechnet.

Hierbei konnte gesehen werden, daß zum Zeitpunkt T0 die Proliferationsrate der uninduzierten doppeltransgenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg1 gegenüber den Wildtypen und einfachtransgenen Tieren dieser Linie um 20% erhöht war.

Zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsrate. (Abb. 3.31.)

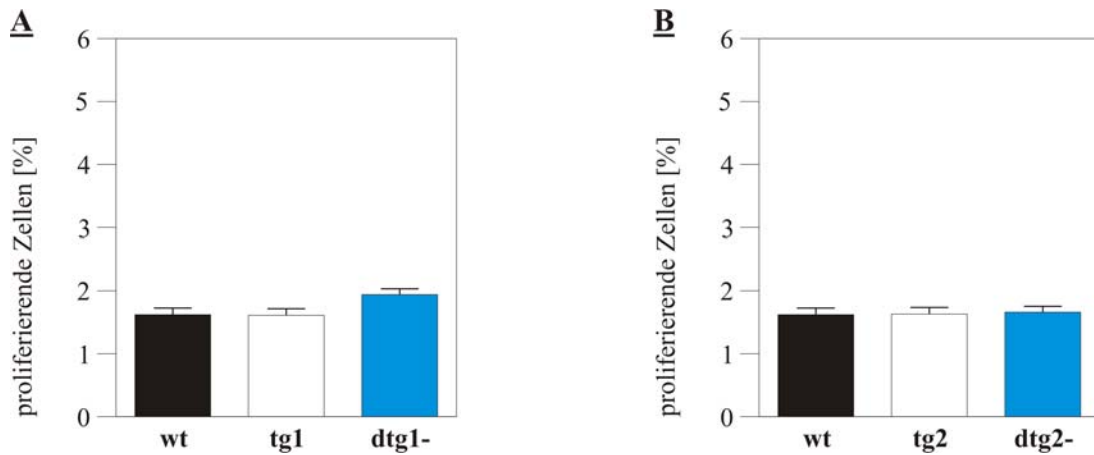


Abb. 3.31. Proliferationsrate zum Zeitpunkt T0

Gegenüberstellung der Proliferationsrate der Epidermis (MW±SEM) bei den verschiedenen Tiere der Linien K5-Smad7-tg1 (A) und K5-Smad7-tg2 (B) zum Zeitpunkt T0. Anzahl der untersuchten Tiere (n): n = 3.

Auch zum Zeitpunkt Ti+8 zeigte sich bei den uninduzierten doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 eine Erhöhung der Proliferationsrate gegenüber den Wildtypen und einfachtransgenen Tieren dieser Linie (+18%). Die induzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie wiesen eine signifikant erhöhte Proliferationsrate (+270%) gegenüber Wildtypen und einfachtransgenen Tieren auf.

Zwischen den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 zeigten sich auch zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsrate (Abb. 3.32.)

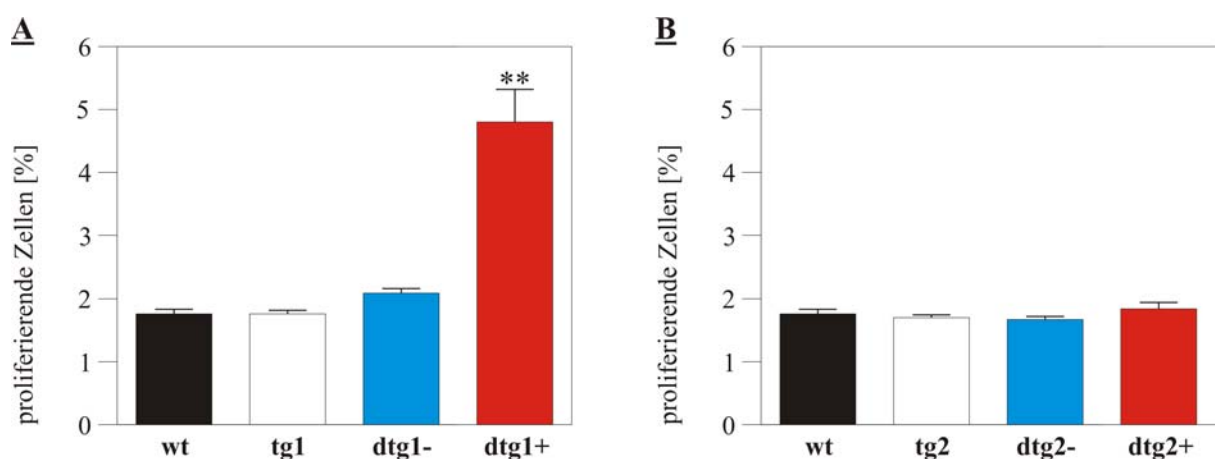


Abb. 3.32. Proliferationsrate zum Zeitpunkt Ti+8

Gegenüberstellung der Proliferationsrate der Epidermis (MW±SEM), bei den verschiedenen Tiere der Linien K5-Smad7-tg1 (A) und K5-Smad7-tg2 (B) zum Zeitpunkt T0. Signifikante Abweichungen (* = p<0,005 ; ** = p<0,001) wurden markiert, wenn sie gegenüber der wt- und der tg1-Kontrollgruppe bestanden. Anzahl der untersuchten Tiere (n): n = 5.

3.6.3. Regulation der Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade in der Haut

Neben den in 1.2.2.3. beschriebenen Regulationsmöglichkeiten der TGF- β -Signaltransduktion, kann die veränderte Expression einer Komponente innerhalb einer Signalkaskade zur Expressionsänderung anderer Komponenten dieser Signalkaskade führen (Kraus, 1997). Daher wurden die verschiedenen Tiere der beiden K5-Smad7-Linien zu den Zeitpunkten T0 und Ti+8 auf Unterschiede in der die Expression weiterer Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade hin untersucht. Hierzu wurde die Gesamt-RNA der Haut isoliert und mittels RT-PCR (vgl. 2.2.1.5.) die Expression von Smad1-7 und des TGF- β -Rezeptors Typ II, unter der Verwendung der in 2.1.4.2. beschriebenen Primer bestimmt. Als Kontrolle und Standard diente endogenes β -Actin. Um eine Aussage über die Expressionsstärke der untersuchten Gene treffen zu können, wurde die Intensität der RT-PCR-Produkte von Smad1-7 und des TGF- β -Rezeptors Typ II mit der Intensität des RT-PCR-Produktes von β -Actin verglichen (vgl. 2.2.1.5.). Die Intensität des RT-PCR-Produktes von β -Actin wurde hierbei als 100% definiert.

Zum Zeitpunkt T0 konnten bei den verschiedenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 bzw. -tg2 keine Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene festgestellt werden (Abb. 3.35.).

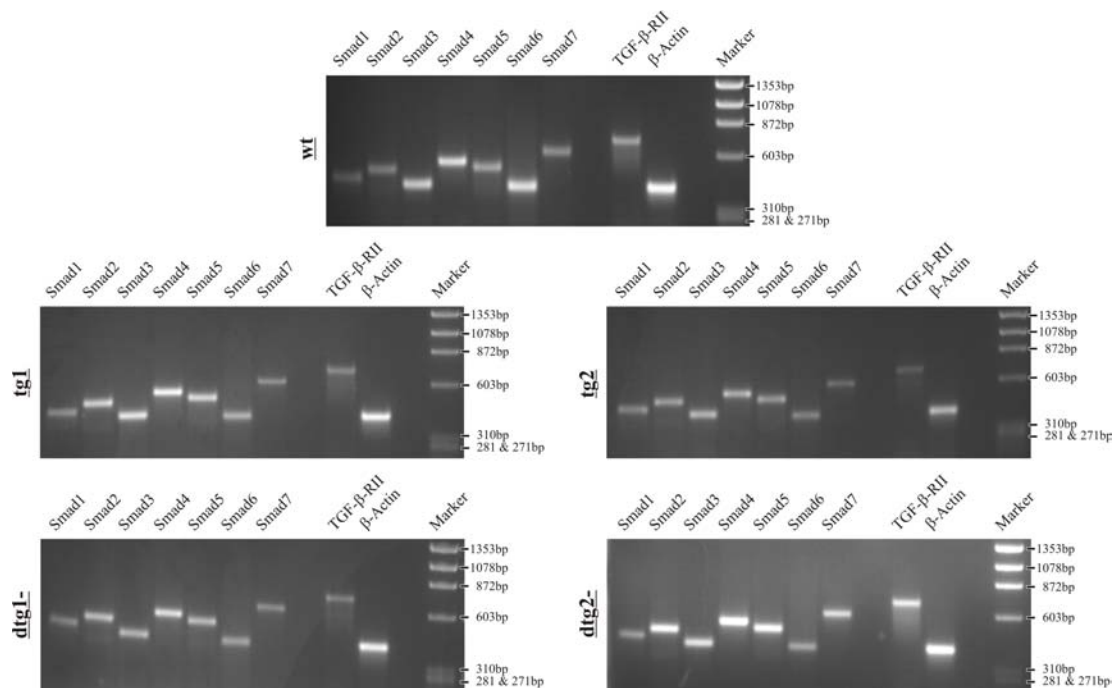


Abb. 3.35. Expression der Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade zum Zeitpunkt T0

Nachweis der Expression der Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade mittels RT-PCR unter Verwendung der verschiedenen in 2.1.4.2. beschriebenen Primerpaare. Als Kontrolle und Standard diente endogenes β -Actin. Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174 x BsuR I verwendet. Anzahl der untersuchten Tiere (n): $n \geq 3$

Zum Zeitpunkt Ti+8 zeigte sich, daß es zwischen Wildtypen, einfachtransgenen und uninduzierten doppeltransgenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg1 keine Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke der untersuchten Gene gab. Bei den induzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie hingegen war jedoch die Expression von Smad3 im Vergleich zu den anderen Tieren um 80% reduziert. Bei allen anderen untersuchten Gene konnten keine Unterschiede bezüglich deren Expressionsstärke im Vergleich von induzierten doppeltransgenen Tieren zu Wildtypen, einfachtransgenen bzw. uninduzierten doppeltransgenen Tieren dieser Linie festgestellt werden. Die verschiedenen Tiere der Linie K5-Smad7-tg2 zeigten auch zu diesem Zeitpunkt keine Veränderungen in der Expressionsstärke der untersuchten Gene (Abb. 3.36.)

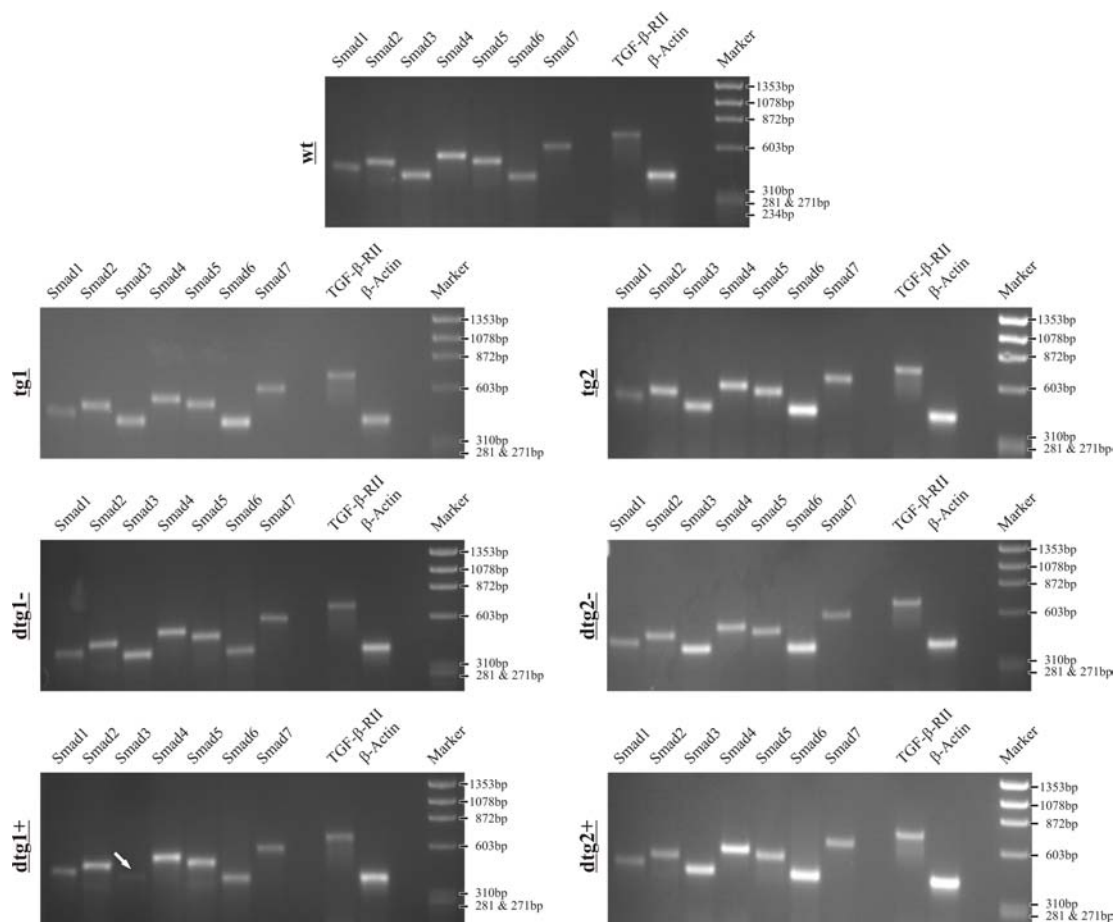


Abb. 3.36. Expression der Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade zum Zeitpunkt Ti+8

Nachweis der Expression der Komponenten der TGF- β -Signaltransduktionskaskade mittels RT-PCR unter Verwendung der verschiedenen in 2.1.4.2. beschriebenen Primerpaare. Kontrolle und als Standard diente endogenes β -Actin. Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174 x BsuR I verwendet. Anzahl der untersuchten Tiere (n): $n \geq 3$

4. Diskussion

4.1. Konditionell-induzierbares Expressionssystem für die adulte Maus

Für die Analyse physiologischer und pathologischer Funktionen einzelner Gene stehen Methoden zur Verfügung, die es erlauben die Expression dieser Gene selektiv und konstitutiv zu verändern (Jaenisch, 1989 ; Capecchi, 1989 ; Orban *et al.*, 1992 ;). Bei diesen Methoden treten oft verschiedene limitierende Effekte auf, die weitergehende Untersuchungen, speziell in adulten Tieren, verhindern. Um nun die Funktion von einzelnen Genen in der adulten Maus untersuchen zu können, muß daher die Problematik von auftretender Letalität, Auswirkungen auf Entwicklungsvorgänge und etwaige weitere pleiotrope Effekte einer konstitutiven Expressionsänderung des Gens umgangen werden. Dieses kann man durch die Verwendung konditionell-induzierbarer Expressionssysteme erreichen, die es erlauben, daß sich die Expression eines Gens erst in der adulten Maus ändert (Sauer *et al.*, 1989 ; Gossen *et al.*, 1993 ; Metzger *et al.*, 1995 ; Rajewsky *et al.*, 1996).

Für die konstitutive Überexpression von Smad7 in epithelialen Geweben konnte gezeigt werden, daß diese zu embryonaler bzw. perinataler Letalität und zum Auftreten verschiedenster Phänotypen führt (He *et al.*, 2002). Um in der vorliegenden Arbeit nun die Auswirkungen einer Überexpression von Smad7 in epithelialen Geweben der adulten Maus untersuchen zu können, wurde eine Kombination von zwei Transgensystemen verwendet, die eine konditionell-induzierbare Überexpression von Smad7 in Basalzellen epithelialer Gewebe ermöglicht.

4.1.1. Verwendete Expressionssysteme

Das Effektorsystem, K5-Smad7 (Klopcic, 2002), ist ein Expressionssystem, welches eine konditionelle Überexpression von Smad7 in mitotisch aktiven Basalzellen mehrschichtiger Plattenepithelien ermöglicht (Casatorres *et al.*, 1994). Die Zelltypspezifität wird dabei durch den verwendeten *bovinen* Keratin 5-Promoter gewährleistet (Ramirez *et al.*, 1994). Ebenfalls ist beschrieben, daß die Expression eines lacZ-Reportergen unter Kontrolle des *bovinen* K5-Promoters zu keinem Auftreten eines Phänotyps führt (Byrne *et al.*, 1994 ; Ramirez *et al.*, 1994). Das lacZ-Reportegen in dem hier verwendeten System verfügt zusätzlich über eine Kernlokalisationssequenz, doch bewirkte diese Modifikation ebenfalls keine phänotypischen Veränderungen (Fire *et al.*, 1990). Das Expressionsprofil der verwendeten transgene Tiere zeigte eine Reporterexpression in den Basalzellen der Epidermis und der Zunge, in Zellen der äußeren Haarwurzelscheide, des oralen Epithels und in epithelialen Zellen des Thymus. Dieses Expressionsmuster deckt sich im wesentlichen mit den für diesen Promoter bereits beschriebenen Expressionsmustern (Byrne *et al.*, 1994 ; Ramirez *et al.*, 1994 & 2001 ; Robles *et al.*, 1996). Un-

stern (Byrne *et al.*, 1994 ; Ramirez *et al.*, 1994 & 2001 ; Robles *et al.*, 1996). Unterschiede zu beschriebenen Expressionsmustern von anderen adulten transgenen Tieren, bei denen der gleiche Keratin 5-Promoter verwendet wurde (Amendt *et al.*, 1998 ; Breuhahn *et al.*, 2000), lassen sich darauf zurückführen, das der Integrationsort in das Genom des jeweiligen Expressionsvektors für das Expressionsprofil von wichtiger Bedeutung ist (Ramirez *et al.*, 2001). Die Funktionalität des hier verwendeten Transgensystems hinsichtlich Rekombination und anschließender Überexpression von Smad7 konnte bereits gezeigt werden (Klopčič, 2002).

Als Induktorsystem, K14-creER^{T2} (Li *et al.*, 2000), wurde ein Expressionssystem verwendet, welches konstitutiv eine induzierbare, chimäre cre-Rekombinase, bestehend aus der cre-Rekombinase und einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors (^{G400V}, ^{M543A}, ^{L544A}) unter Kontrolle des humanen Keratin 14-Promoters exprimiert. Für den verwendeten Promoter konnte gezeigt werden, daß dieser selektiv in den Basalzellen mehrschichtiger Plattenepithelien aktiv ist (Vassar *et al.*, 1989). Bei den verwendeten transgenen Tieren war dieser Promoter zusätzlich in weiteren epithelialen Geweben aktiv (Wang *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2000). Die verwendete chimäre cre-Rekombinase (creER^{T2}) bietet im Vergleich zu anderen ähnlichen Rekombinasen die keine bzw. andere Mutationen innerhalb der Ligandenbindungsdomäne aufweisen (creER bzw. creER^{T1}) die Vorteile, daß die Aktivität der creER^{T2}-Rekombinase nicht durch endogenes Östradiol induziert wird, und die Aktivität der creER^{T2}-Rekombinase im Vergleich zu der creER^{T1}-Rekombinase bereits mit geringen Dosen von 4-OHT induziert werden kann (Feil *et al.*, 1996 ; Indra *et al.*, 1999). Die Rekombinationseffizienz dieses Systems ist sehr hoch, und die Rekombination der loxP-sites hat 8 Wochen nach Induktion der Rekombination nahezu in allen Zellen stattgefunden. Allerdings konnte daneben auch eine gewisse 'Hintergrundaktivität' im uninduzierten Zustand der creER^{T2}-Rekombinase gezeigt werden (Li *et al.*, 2000 ; Indra *et al.*, 2000), die sich in der vorliegenden Arbeit bestätigte.

4.1.2. Genetischer Hintergrund

Da die Tiere, welche transgen für das Effektorsystem bzw. das Induktorsystem waren, zwei verschiedene genetische Hintergründe aufwiesen (FVB/NHSD bzw. C57BL/6 x SJL), wurden die verwendeten einfachtransgenen Tiere auf einen einheitlichen FVB/NHSD Hintergrund gezüchtet um Variationen der Phänotypen aufgrund der genetischen Varianz, wie z.B. für TGF- β 1 deletierte Mäuse gezeigt (Kulkarni *et al.*, 1993), ausschließen zu können.

4.1.3. Züchtung doppeltransgener Tiere

Die Züchtung von Tieren die doppeltransgen für das Effektor- (K5-Smad7-tg1/2) und Induktorsystem (K14-creER^{T2}) waren, zeigte eine Verteilung gemäß den Mendelschen Regeln (Seyffert *et al.*, 1998) und somit keine letalen Auswirkungen dieser Transgenkombination auf die Embryonalentwicklung von doppeltransgenen Tieren, im Gegensatz zu Tieren die Smad7 konstitutiv überexprimieren und bei denen eine embryonale bzw. perinatale Letalität zu beobachten ist (He *et al.*, 2002 ; Klopčič, 2002). Somit erlaubt es die Verwendung eines konditionell-induzierbaren Expressionssystems, die Auswirkungen einer veränderten Expression eines Genes im adulten Tiere zu untersuchen. Speziell konnte gezeigt werden, daß das in dieser Arbeit verwendete konditionell-induzierbare Expressionssystem es im uninduzierten Zustand erlaubt, den Einfluß einer Smad7-Überexpression auf die embryonale bzw. juvenile Entwicklung zu umgehen.

4.1.4. Induktion der Rekombination und Expression von transgenspezifischem Smad7

Die als sehr hoch beschriebene Effektivität der Induktion der Rekombination der loxP-sites durch die K14-creER^{T2}-Expressionskassette bei doppeltransgenen Tieren (Li *et al.*, 2000 ; Indra *et al.*, 2000), konnte durch Betrachtung der reduzierten Reportergenexpression bestätigt werden werden (80-90%). Die induzierte Rekombination des K5-Smad7-Konstruktes führte parallel dazu auch zu einer signifikanten Erhöhung der transgenspezifischen Überexpression von Smad7. Innerhalb der Haut beschränkten sich die induzierte Rekombination der loxP-sites weitgehend auf Zellen der Basalschicht. In Zellen der äußeren Haarwurzelscheide konnte nach induzierter Rekombination der loxP-sites des K5-Smad7-Konstruktes nur vereinzelt eine Reduktion der Reportergenexpression beobachtet werden. Dies könnte sich auf den veränderten genetischen Hintergrund der verwendeten Tiere zurückführen lassen, da die bisher publizierten Daten bezüglich der Funktion der K14-creER^{T2}-Expressionskassette auf Tieren mit einem C57BL/6 x SJL Hintergrund basieren und die in dieser Arbeit verwendeten Tiere einen FVB/NHSD Hintergrund besaßen. Aus anderen Arbeiten ist bereits bekannt, daß der genetische Hintergrund einen zum Teil erheblichen Einfluß auf die Funktion und Auswirkungen bei Veränderungen der Expression von Genen hat, wie sich z.B. bei der Tumorzinzidenz Smad3-defizienter Tiere zeigt. So zeigten diese Tiere auf einem 129SV-Hintergrund eine 100%ige, auf einem 129SV x C57Bl6-Hintergrund nur eine 30%ige Tumorzinzidenz (Zhu *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1999 ; Datto *et al.*, 1999).

4.2. Auftretende phänotypische Veränderungen

Das erste Auftreten von veränderten Phänotypen konnte 4 Wochen nach Induktion der Rekombination beobachtet werden. 6 Wochen nach Induktion der Rekombination waren die Unterschiede im Phänotyp bereits gut erkennbar, für die Analysen der veränderten Phänotypen wurden jedoch Tiere zum Zeitpunkt 8 Wochen nach Induktion der Rekombination gewählt. Zwar betrug die Mortalitätsrate dieser Tiere bereits etwa 40%, allerdings waren die beobachteten Phänotypen der Tiere zu diesem Zeitpunkt sehr gut ausgeprägt.

Dieser beobachtete zeitliche Verlauf, ausgehend von der Induktion der Rekombination bis zum ersten Auftreten veränderter Phänotypen, deckte sich mit den Erwartungen die sich von der Regenerationsdauer der Haut (Bogovski, 1997) bzw. der Zähne (Zegarelli, 1944) her ableiten lassen. Li *et al.* machten ähnliche Beobachtungen bei Untersuchungen mit einem verwandten Induktionssystem, welches zu einer Deletion des Retenoid-X-Rezeptors in der Haut adulter Mäuse führte (Li *et al.*, 2000).

4.2.1. Makroskopisch sichtbare phänotypische Veränderungen

Mit dem zu beobachtende Körpergewichtsverlust geht parallel dazu eine Zunahme der Mortalitätsrate einher. Dabei kann angenommen werden, daß der Verlust an Körpergewicht und die Zunahme der Mortalität auf eine etwaige Mangelernährung zurückzuführen sind, bei der die zu beobachtende Mißbildung der Schneidezähne eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Für verschiedene Mitglieder der TGF- β -Superfamilie und Komponenten der entsprechenden Signalwege konnte bislang gezeigt werden, daß diese für die korrekte Ausbildung der Zahnanlagen von Schneide- und Backenzähnen essentiell sind (Thesleff *et al.*, 1997 ; Ferguson *et al.*, 1998 ; Jernvall *et al.*, 1998 & 2000 ; Tabata *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2004). In dieser Arbeit waren nur die Schneidezähne, nicht jedoch die Backenzähne adulter Tiere von Veränderungen des Zahnschmelzes in Folge der induzierten Smad7-Überexpression betroffen. Dies begründet sich aus der Tatsache, daß zwar die verschiedenen Vorgänge bei der Anlage von sowohl Schneide- als auch Backenzähnen während der Embryogenese weitestgehend identisch sind, im adulten Tier allerdings lediglich die Schneidezähne kontinuierlich erneuert werden (Zegarelli, 1944 ; Maronpot, 1999).

Die konstitutive Überexpression von Smad7 unter Verwendung dieser K5-Smad7-Expressions-kassette führte hingegen zu Veränderungen in der Anlage und späteren Ausprägung sowohl der Schneide- als auch der Backenzähne. Dabei konnten auch gezeigt werden, daß die Organisation

der Amelioblasten gestört war (Klopčič, 2002). Auch bei anderen transgenen Tieren mit Veränderungen in den Signalwegen der TGF- β -Superfamilie, konnten Veränderungen im Aufbau des Zahnschmelzes beobachtet werden. So zeigten Tiere die Smad2 unter Kontrolle des Keratin 14-Promotors in epithelialen Geweben überexprimieren ebenfalls Veränderungen im Zahnschmelz, die auf Fehlentwicklungen während der Amelioblastendifferenzierung zurückzuführen sind (Ito *et al.*, 2001). Die Überexpression von Follistatin, einem Inhibitor für Activin bzw. BMPs, führte zu ebenfalls zu einer Veränderung der Amelioblastendifferenzierung. Dieses führte in Tieren die Follistatin überexprimieren zu einem gestörten Aufbau des Zahnschmelzes (Wang *et al.*, 2004). Auch bei TGF- β_1 -defizienten Tieren konnten ähnliche Veränderungen gezeigt werden (D'Souza *et al.*, 1998). Bei Tieren mit deletiertem Smad3-Gen konnten im adulten Tier Zahndefekte beobachtet werden, welche sich mit den hier beobachteten deckten. Neben einer fehlenden Verfärbung der Schneidezähne führte die Deletion von Smad3 zu einer Hypomineralisierung des Zahnschmelzes und einer damit verbundenen Instabilität der Schneidezähne. Dabei zeigte sich, daß die Amelioblasten während der sekretorischen Phase keine Veränderungen hinsichtlich ihres Erscheinungsbildes oder ihrer Anordnung zeigten, sich diese Zellen jedoch während ihrer Ausreifung veränderten (Yokozeki *et al.*, 2003). Die starken Ähnlichkeiten hinsichtlich der Schneidezahndefekte zwischen Smad3-defizienten Tieren und den in dieser Arbeit gesehenen Veränderungen der Schneidezähne lassen den Schluß zu, daß die Erneuerung der Schneidezähne in adulten Tieren durch eine Smad7-induzierte Reduktion der Smad3-Expression beeinflusst wird. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung gestützt, daß in der Haut eine Überexpression von Smad7 zu einer verminderten Expression von Smad3 führt.

4.2.2. Phänotypische Veränderungen der Haut

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie spielen bei der Regulation der Proliferation von Keratinozyten eine wichtige Rolle. Dies konnte unter anderem speziell für TGF- β gezeigt werden (Pittelkow *et al.*, 1988 ; Sellheyer *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1999). Die fötal beginnende Überexpression von Smad7 in Keratinozyten bewirkte eine Hyperplasie der Epidermis, die auf eine Hyperproliferation dieser Zellen zurückzuführen ist. Dabei zeigte sich, daß in diesen Zellen die Expression von c-myc bzw. p21 über die TGF- β seine antiproliferierende Wirkung vermittelt (Pientopol *et al.*, 1990 ; Datto *et al.*, 1995) hoch- bzw. herunterreguliert sind (He *et al.*, 2002). Neben der antiproliferativen Wirkung auf Keratinozyten kann TGF- β auch die Apoptose von epithelialen Zellen induzieren (Chen *et al.*, 1998). Für Smad7 konnte *in vitro* ebenfalls eine proapoptoti-

sche Wirkung gezeigt werden (Landström *et al.*, 2000), allerdings lies die konstitutive *in vivo* Überexpression von Smad7 in der Epidermis keine Veränderung bezüglich der Apoptoseraten erkennen (He *et al.*, 2002). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tieren, die Smad7 in den epidermalen Zellen überexprimieren, konnte in Übereinstimmung mit den bekannten Ergebnissen ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate der Keratinozyten beobachtet werden. Es zeigten sich jedoch keine Hyperplasien. Die zu beobachtende Reduzierung der Epidermisdicke und das veränderte Erscheinungsbild der Keratinozyten läßt darauf schließen, daß die Vorgänge während einer normalen Keratinozytendifferenzierung in der Epidermis beschleunigt sind. Hierbei scheint die durch die Smad7-Überexpression reduzierte Expression von Smad3 in der Epidermis von Bedeutung zu sein. So zeigten Keratinozyten Smad3-defizienter Mäuse eine verringerte Sensibilität gegenüber der antiproliferative Wirkung von TGF- β (Aschcroft *et al.*, 1999). Die Ergebnisse, daß bei Tieren die epidermal Follistatin bzw. einen dominant-negativen Activinrezeptor Typ IB überexprimieren keine Veränderungen der Proliferationsrate oder der Differenzierung interfollikulärer Keratinozyten zu beobachten war (Wankell *et al.*, 2001 ; Bamberger *et al.*, 2005), lassen den Schluß zu, daß in der adulten Haut die Hemmung des Activinsignalweges keinen Einfluß auf die epidermale Homöostase hat. Daher kann angenommen werden, daß die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen bei den interfollikulären Keratinozyten adulter Mäuse auf der Smad7-vermittelten Hemmung des TGF- β -Signalweges beruht.

Bei Smad7 konstitutiv überexprimierenden Tieren konnten auch Fehlentwicklungen der Haaranlage beobachtet werden (He *et al.*, 2002 ; Klopčič, 2002). Diese äußerten sich in einer verzögerten Entwicklung der Haarfollikel und einer Fehlentwicklung der Haare. Dieser veränderte Phänotyp gleicht dem der bei TGF- β_2 - bzw. Activin- βA -defizienten Tieren auftrat (Matzuk *et al.*, 1995 ; Foitzik *et al.*, 1999). Diese Phänotypen können dabei auf den Einfluß von Smad7 während der Haarfollikelentwicklung in der Embryonalentwicklung zurückgeführt werden (Findlay *et al.*, 2002 ; Botchkarev, 2003). Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere zeigten in ersten Betrachtungen keine Veränderungen in der Entwicklung der Haarfollikel. Allerdings konnten bei den doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 zum Zeitpunkt T0 Veränderung des Erscheinungsbildes der Tastaare gesehen werden. Die Ausbildung der Tastaare waren dabei hinsichtlich Form und Länge beeinträchtigt. Bei Tieren defizient für Follistatin zeigte sich, daß deren Tastaare hinsichtlich ihres Erscheinungsbildes ebenfalls in Form und Länge verändert waren (Jhaveri *et al.*, 1998). Aufgrund der Hintergrundaktivität des K14-creER^{T2}-Transgens (Li *et al.*, 2000) kann es daher bereits während der Embryogenese zu einer Expression von trans-

genspezifischem Smad7 kommen, so daß die zu beobachteten Schädigungen der Tasthaare bei diesen Tieren auf eine Beeinflußung der embryonalen Anlage der Tasthaare zurückzuführen ist. Im Verlauf der Experimente hingegen zeigte sich, daß bei uninduzierten doppeltransgenen Tieren die phänotypischen Veränderungen der Schnurrhaare unverändert blieben und auch nur zum Teil eine leichte Veränderung des Fells stattfand, wohingegen induzierte doppeltransgene Tiere eine Verstärkung der Schnurrhaarveränderungen, sowie eine starke Beeinflußung des Fellerscheinungsbildes zeigten. In diesem Zusammenhang, zeigten verschiedene andere Studien, daß Mitglieder der TGF- β -Superfamilie wie z.B. TGF- β_1 und Activin βA , auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Haarzyklus spielen (Foitzik *et al.*, 2000 ; Botchkarev *et al.*, 2003 ; Nakamura *et al.*, 2003). Dies läßt darauf schließen, daß die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen der Tasthaare und des Fells im Wesentlichen auf einen gestörten Haarzyklus im adulten Tier zurückzuführen sind. Da jedoch kaum rekombinierte Zellen in der äußeren Haarwurzelscheide beobachtet werden konnten sind die Veränderungen in der Haarregeneration eher auf systemische Effekte zurückzuführen als auf eine direkte Veränderung der Zellen der äußeren Haarwurzelscheide.

4.2.3. Phänotypische Veränderungen des Thymus

Die T-Zellreifung beginnt mit CD4⁻CD8⁻-doppelnegativen Zellen, und führt über CD4⁺CD8⁺-doppelpositive Zellen zu entweder CD4⁺- oder CD8⁺-einzelpositiven Zellen. (Janeway *et al.*, 1997). Von TGF- β_1 ist bekannt, daß dieses Cytokin eine wichtige Funktion als antiapoptotischer Faktor bei der T-Zellentwicklung im Thymus spielt (Cerwenka *et al.*, 1999). Bei der Reifung von T-Zellen spielen auch die epithelialen Zellen des Thymus, speziell die des Thymuscortex und -stromas eine wichtige Rolle. So konnte für diese Zellen gezeigt werden, daß die Expression von Cytokinen durch diese Zellen einen Einfluß auf die T-Zelldifferenzierung hat, wie z.B. für IL-1 und IL-7 gesehen (Mossalayi *et al.*, 1995 ; Schluns *et al.*, 1997 ; Tang *et al.*, 1997). Daneben spielen diese epithelialen Zellen auch eine Rolle bei der positiven Selektion der reifenden T-Zellen (Cosgrove *et al.*, 1992 ; Fowlkes *et al.*, 1995).

Die konstitutive Überexpression von Smad7 in epithelialen Zellen des Thymus führte zu signifikanten Veränderungen sowohl der Gesamtzahl als auch dem Verhältnis der T-Zell-Populationen (He *et al.*, 2002). Diese Veränderungen im T-Zellprofil des Thymus ähnelten stark denen, bei TGF- β_1 -defizienten Tieren (Christ *et al.*, 1994). In wie weit dies auf Entwicklungsstörungen der T-Zellen bzw. selektive Apoptose einzelner T-Zellpopulationen zurückzuführen ist, ist noch un-

klar. Hiermit decken sich die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen die Gesamtzahl der T-Zellen betreffend. Die Betrachtung der Verteilung der einzelnen T-Zellpopulationen zeigte, daß sich die veränderte Verteilung der untersuchten T-Zellpopulationen, ebenfalls mit den bekannten Ergebnissen deckten. In wie weit die konstitutive Smad7-Überexpression Einfluß auf Entwicklung und Differenzierung der epithelialen Zellen des Thymus hat und welche Auswirkungen auf die T-Zellen damit verbunden sind, ist noch ungeklärt (He *et al.*, 2002). Somit konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, daß auch in adulten Tieren ohne angeborene Thymusatrophie, Mitglieder der TGF- β -Superfamilie eine bedeutende Funktion in der Regulation epithelialer Zellen des Thymus haben und somit auch eine essentielle Rolle bei der Selektion und Differenzierung von T-Zellen spielen.

4.3. Vergleich der beiden verwendeten K5-Smad7-Linien

Verschiedene Analysen einer TGF- β -Überexpression in der Epidermis *in vivo* haben gezeigt, daß dessen Wirkung dosisabhängig zu sein scheint (Wang, 2001). Auch für Activin β A konnte gezeigt werden, daß dessen Wirkung auf die Morphogenese der Haut in einer dosisabhängigen Weise erfolgt (Bamberger *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere der Linien K5-Smad7-tg1 bzw. -tg2 wurden ebenfalls mit Keimbahndeleter-Effektormäusen (Nestin/cre) (Betz *et al.*, 1996) verpaart um die Effekte einer embryonalen Smad7-Überexpression zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß bei Verpaarungen der Nestin/cre-Effektormäusen mit Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 über 97% der doppeltransgenen Tiere *in utero* oder kurz nach der Geburt starben, wohingegen doppeltransgene Tiere aus Verpaarungen mit Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 erst spätestens 6 Wochen nach Geburt starben. Dabei zeigten doppeltransgene Tiere beider K5-Smad7-Linien Abnormalitäten der Tasthaare und des Fells. Dabei konnte bei doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 gezeigt werden, daß die Haarfollikel dieser Tiere unterentwickelt waren. Auch die Zähne waren in ihrer Ausprägung beeinflußt. So zeigten sich bei doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg1 Störungen in der Organisation von Amelioblasten und Odontoblasten der Schneide- und Backenzähne und einer damit verbundenen Störung der jeweiligen Mineralisierungsvorgänge. Auch bei doppeltransgenen Tieren der Linie K5-Smad7-tg2 wurden Veränderungen in der Mineralisierung der Schneidezähnen nachgewiesen (Klopčic, 2002).

Die in dieser Arbeit beschriebenen und diskutierten Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Wirkung von Smad7 dosisabhängig ist. Während bei der Embryonalentwicklung die schwächere

Überexpression von transgenspezifischem Smad7 der Linie K5-Smad7-tg2 zur der Ausbildung von phänotypischen Veränderungen führt, ist im adulten Tier diese schwächere Überexpression nicht in der Lage, phänotypische Veränderungen zu bewirken. Eine stärkere Überexpression von transgenspezifischem Smad7 wie bei der Linie K5-Smad7-tg1 führt hingegen während der Embryonalentwicklung zu einer fast vollständigen Letalität und ist im adulten Tier in der Lage die in dieser Arbeit gezeigten phänotypische Veränderungen zu induzieren.

Die primäre Wirkung von Smad7 liegt in der negativen Regulation des TGF- β -/Activin-Signalweges (Nakao *et al.*, 1997 ; Hayashi *et al.*, 1997), jedoch zeigten andere Untersuchungen auch, daß eine Überexpression von Smad7 auch zu einer Hemmung des BMP-Signalweges führen kann (Souchelnytskyi *et al.*, 1998). In wie weit die aufgetretenen Phänotypen auf der Hemmung des TGF- β -, Activin- bzw. BMP-Signalweges durch Smad7 beruhen, muß noch in weiteren Arbeiten geklärt werden.

4.4. Zukünftige Arbeiten

4.4.1. Weitere Analysen der phänotypischen Veränderungen

Da mit dem beobachteten signifikanter Verlust an Körpergewicht und der massiven Schädigung der Schneidezähne eine Erhöhung der Mortalitätsrate einhergeht, wäre zu untersuchen, ob die Veränderung der Nahrung in Form einer Umstellung von Hartfutter auf Flüssignahrung, auch die Mortalitätsrate der induzierten-doppeltransgenen Tiere beeinflusst. Dies ist zu überlegen, da die Schädigung der Schneidezähne aller Wahrscheinlichkeit nach diesen Tieren keine effektive und ausreichende Aufnahme von Hartfutter erlaubt. In diesem Zusammenhang sind auch noch detailliertere Betrachtungen der Veränderungen der Zähne hinsichtlich deren Zahnarchitektur, chemischen Zusammensetzung und Regeneration durchzuführen. Auch die Ameloblasten müssen noch auf mögliche Veränderungen in ihrer Differenzierung (Yokozeki *et al.*, 2003), der Expression von für den Zahnschmelzaufbau wichtigen Genen wie z.B. MMP-20 und KLK4 (Simmer *et al.*, 2002) und der Wechselwirkung mit anderen Zellen, speziell den Odontoblasten, hin untersucht werden.

Ein Hauptaugenmerk bezüglich weiterer Analysen liegt auf der Haut. Hier müssen die Auswirkungen der Smad7-Überexpression noch weiter untersucht werden. So zeigte diese Arbeit in der Epidermis Veränderungen in der Proliferationsrate und dem Erscheinungsbild der Keratinozyten. Um diese Veränderungen genau definieren zu können, müssen die epidermalen Zellen dieser Tiere hinsichtlich der Expression von Markergenen für die Keratinozytendifferenzierung wie z.B. Keratine 1, 6, 10 und 16 untersucht werden (Fuchs *et al.*, 1980 ; O'Guin *et al.*, 1990 ; Coulombe *et al.*, 2000). Auch die Durchführung struktureller Analysen der Epidermis sind von Interesse, da diese Auskunft über eine mögliche veränderte Zellarchitektur geben könnten (Reichelt *et al.*, 2001). Daneben sollte auch die Expression von weiteren Genen analysiert werden, die entweder durch den TGF- β -Signalweg reguliert werden oder diesen Signalweg regulieren und Einfluß auf Proliferation (Datto *et al.*, 1995 ; Reynisdóttir *et al.*, 1995), Apoptose (Landström *et al.*, 2000 ; Lallemand *et al.*, 2001) und Aufbau (Moustakas *et al.*, 1999 ; Fujimoto *et al.*, 2001) von Keratinozyten haben. Dabei darf nicht nur die Expression dieser Gene auf RNA-Ebene, sondern auch deren Aktivität bzw. vorhandene Menge auf Proteinebene untersucht werden. Denn es konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von Smad7 nicht die Expression von Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie beeinflusst, sondern deren Degradation bewirkt (He *et al.*, 2002).

Bei weiteren Analysen des Thymus muß analog zu den weiteren Untersuchungen in der Epidermis ebenfalls der Einfluß der Smad7-Überexpression auf die Entwicklung und Differenzierung der epithelialen Zellen untersucht werden. Neben dem Cytokinprofil dieser Zellen (Schluns *et*

al., 1997) ist auch die Expression der epithelialen MHC-Klasse I-Rezeptoren zu betrachten, da diese Rezeptoren für die positive Selektion der T-Zellen im Thymus notwendig sind (Cosgrove *et al.*, 1992 ; Fowlkes *et al.*, 1995). So konnte für T-Zellen TGF- β 1-defizienter Mäuse gezeigt werden, daß bei diesen Tieren die Expression dieses Rezeptors signifikant hochreguliert ist (Christ *et al.*, 1994). Tiefergehende Analysen hinsichtlich der Verteilung und der Apoptoserate der verschiedenen T-Zellpopulationen im Thymus wären ebenfalls von Interesse. Des Weiteren differenzieren sich im Thymus aus den untersuchten T-Zellpopulationen noch weitere T-Zellsubpopulationen wie z.B. CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Groux, 2000 ; Shevach, 2002) aus und es stellt sich die Frage in wie weit auch deren Verteilung und Entwicklung verändert ist. Da in der Milz zwar keine Unterschiede hinsichtlich der untersuchten T-Zellpopulationen festgestellt werden konnte, bleibt auch noch die Frage zu klären, ob sich das T-Zellprofil der Peripherie durch die Veränderung der T-Zellentwicklung im Thymus verändert (Huber *et al.*, 2004).

4.4.2. Anwendungsmöglichkeiten für dieses Tiermodell

Nach vollständiger Charakterisierung bietet diese Tiermodell Anwendungsmöglichkeiten bei verschiedenen Fragestellungen, speziell die Haut betreffend, in denen TGF- β eine Rolle spielt.

Eine Anwendungsmöglichkeit wäre in Karzinogenesemodellen der Haut. So haben Veränderungen innerhalb des TGF- β -Signalweges zum Teil signifikante Auswirkungen auf die Krebsentwicklung. Dabei ließe sich nicht nur der generelle Einfluß einer Smad7-Überexpression auf die Krebsentwicklung untersuchen, sondern dieses Modell bietet auch die Möglichkeit eine Überexpression von Smad7 in verschiedenen Stadien der Krebsentwicklung zu induzieren.

Auch bei Fragestellungen zur Wundheilung kann dieses Tiermodell Anwendung. Da bei Smad3-defizienten Mäusen die Wundheilung beschleunigt ist, wären auch die Auswirkungen einer Smad7-Überexpression bei Wundheilungsvorgängen von Interesse und näher zu charakterisieren, da Smad7 zum Einen die TGF- β -Signalweiterleitung hemmt und wie gezeigt zu einer Expressionsreduzierung von Smad3 führt.

5. Zusammenfassung

Smad7 ist eine inhibitorische Komponente der Signaltransduktionskaskaden von TGF- β bzw. Activin und erfüllt eine wichtige Aufgabe bei der Regulation deren Signaltransduktion. So führt eine konstitutive Überexpression von Smad7 in epithelialen Geweben zum Auftreten verschiedener Phänotypen, wie embryonaler bzw. perinataler Letalität, Hyperproliferation der Epidermis und Thymusatrophie. Auch die Entwicklung der T-Zellen im Thymus und epithelialer Anhangsgebilde wie z.B. von Haaren und Zähnen wird dadurch beeinträchtigt.

In dieser Arbeit sollte nun in der adulten Maus der Effekt einer Überexpression von Smad7 in epithelialen Geweben untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein, auf dem Cre/loxP-Prinzip beruhendes Transgensystem verwendet (K5-Smad7-tg und K14-creER^{T2}), welches eine konditionell-induzierte Überexpression von Smad7 in epithelialen Zellen der adulten Maus erlaubte. Die so gezüchteten doppeltransgenen Tiere wiesen keine signifikanten Veränderungen gegenüber ihren wildtyp bzw. einfachtransgenen Geschwistertieren auf.

Nach Induktion des K5-Smad7-Konstruktes führte die Überexpression von Smad7 in epithelialen Geweben der adulten Maus zu einem Auftreten verschiedenster veränderter Phänotypen. Bei diesen Tieren konnte beobachtet werden, daß sich im Verlauf der Wochen nach erfolgter Induktion der Rekombination ein signifikanter Körpergewichtsverlust einstellte, mit dem auch eine Erhöhung der Mortalitätsrate einher ging. Desweiteren war das allgemeine Erscheinungsbild des Fells, der Schnurrhaare und der Schneidezähne verändert. Nähere Analysen zeigten weitere signifikante Veränderungen in Haut und Thymus. So war die Epidermis dieser Tiere dünner, die epidermalen Zellen abgeflacht und weniger differenziert, das *stratum corneum* im Verhältnis zur Epidermis verdickt und es konnte eine Erhöhung der Proliferationsrate epidermaler Zellen beobachtet werden. Bei der Betrachtung der Expressionsstärke weiterer Komponenten der TGF- β -/Activin-Signaltransduktionskaskade in der Haut zeigte sich eine reduzierte Expression von Smad3. Die Analyse des Thymus zeigte, daß die Gesamtzahl der lebenden T-Zellen reduziert und dabei der relative Anteil von CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen erhöht und der von CD4⁺CD8⁺-T-Zellen verringert war.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Signalkaskaden von TGF- β und Activin in epithelialen Geweben essentiell für die Homöostase der Haut, die Entwicklung der T-Zellen im Thymus und die Erneuerung der Schneidezähne sind, und daß diese Prozesse durch die Überexpression von Smad7 beeinflusst werden. Auch läßt ein Vergleich der beiden verwendeten K5-Smad7-Linien und deren verschiedenen Tiere untereinander auf einen dosisabhängigen Effekt der Smad7-Überexpression schließen.

6. Literatur

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1995)

Molekularbiologie der Zelle
[Wiley-VCH ; Weinheim]

Alonso L., Fuchs E. (2003)

Stem cells of the skin epithelium
[Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; Vol.100 ; pp.11830-11835]

Amendt C., Schirmacher P., Weber H., Blessing M. (1998)

Expression of a dominant negative type II TGF-beta receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development
[Oncogene ; Vol.17 ; pp.25-34]

Ashcroft G.S. (1999)

Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta
[Microbes. Infect. ; Vol.1 ; pp.1275-1282]

Ashcroft G.S., Roberts A.B. (2000)

Loss of Smad3 modulates wound healing
[Cytokine Growth Factor Rev. ; Vol.11 ; pp.125-131]

Bai S., Shi X., Yang X., Cao X. (2000)

Smad6 as a transcriptional corepressor
[J. Biol. Chem. ; Vol.275 ; pp.8267-8270]

Baker J.C., Harland R.M. (1996)

A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathway
[Genes Dev. , Vol.10 ; pp.1880-1889]

Baker J.C., Harland R.M. (1997)

From receptor to nucleus: the Smad pathway
[Curr. Opin. Cell Biol. ; Vol.7 ; pp.467-473]

Bamberger C., Schärer A., Antsiferova M., Tychsen B., Pankow S., Müller M., Rüllicke T., Paus R., Werner S. (2005)

Activin controls skin morphogenesis and wound repair predominantly via stromal cells and in a concentration-dependent manner via keratinocytes
[Am. J. Pathol. ; Vol.167 ; pp.733-747]

Baron U., Bujard, H. (2000)

Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances
[Methods Enzymol. ; Vol.327 ; pp.401-421]

Bedossa P., Peltier E., Terris B., Franco D., Poynard T. (1995)

Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers

[*Hepatology* ; Vol.21 ; pp.760-766]

Betz U.A., Voshenrich C.A., Rajewsky K., Müller W. (1996)

Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination

[*Curr. Biol.* ; Vol.6 ; pp.1307-1316]

Bitzer M., von Gersdorff G., Liang D., Dominguez-Rosales A., Beg A.A., Rojkind M., Böttinger E.P. (2000)

A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappaB/RelA

[*Genes Dev.* ; Vol.14 ; pp.187-197]

Blessing M., Nanney L.B., King L.E., Jones C.M., Hogan B.L. (1993)

Transgenic mice as a model to study the role of TGF-beta-related molecules in hair follicles

[*Genes Dev.* ; Vol.7 ; pp.204-215]

Böttinger E.P., Jakubczak J.L., Haines D.C., Bagnall K., Wakefield, L.M. (1997)

Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor beta receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene

[*Cancer Res.* ; Vol.57 ; pp.5564-5570]

Bogovski P. (1994)

Pathology of Tumors in laboratory animals Vol. II

[*International Agency for Research on Cancer ; Lyon*]

Border W.A., Noble N.A. (1994)

Transforming growth factor beta in tissue fibrosis

[*N. Engl. J. Med.* ; Vol.331 ; pp.1286-1292]

Botchkarev V.A. (2003)

Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology

[*J. Invest. Dermatol.* ; Vol.120 ; pp.36-47]

Botti C., Seregni E., Ferrari L., Martinetti A., Bombadieri E. (1998)

Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression

[*Int. J. Biol. Markers* ; Vol.13 ; pp.51-69]

Breier G., Blum S., Peli J., Groot M., Wild C., Risau W., Reichmann E. (2002)

Transforming growth factor-beta and ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis

[*Int. J. Cancer* ; Vol.97 ; pp.142-148]

Breuhahn K., Mann A., Müller K., wilhelmi a., Schirmacher P., Enk A., Blessing M. (2000)
Overexpression of GM-CSF in the epidermis of transgenic mice induces both keratinocyte proliferation and apoptosis
[Cell Growth Differ. ; Vol.11 ; pp.111-112]

Brocard J., Feil R., Chambon P., Metzger D. (1998)
A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor.
[Nucleic Acids Res. ; Vol.26 ; pp.4086-4090]

Brodin G., Åhgren A., ten Dijke P., Heldin C.H., Heuchel R. (2000)
Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter
[J. Biol. Chem. ; Vol.275 ; pp.29023-29030]

Burt D.W., Paton I.R. (1992)
Evolutionary origins in the transforming growth factor-beta gene family DNA
[Cell. Biol. ; Vol.11 ; pp.497-510]

Byrne C., Tainsky M., Fuchs E. (1994)
Programming gene expression in developing epidermis
[Development ; Vol.120 ; pp.2369-2383]

Campbell N.A. (1996)
Biologie
[Spektrum Akademischer Verlag ; Heidelberg]

Capecchi M.R. (1989)
The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting
[Trends Genet. ; Vol.5 ; pp.70-76]

Casatorres J., Navarro J.M., Blessing M., Jorcano J.L. (1994)
Analysis of the control of expression and tissue specificity of the keratin 5 gene, characteristic of basal keratinocytes. Fundamental role of an AP-1 element
[J. Biol. Chem. ; Vol.269 ; pp.20489-20496]

Cerwenka A., Swain S.L. (1999)
TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes
[Microbes. Infect. ; Vol.1 ; pp.1291-1296]

Chan T., Ghahary A., Demare J., Yang L., Iwashina T., Scott P.G., Tredget E.E. (2002)
Development, characterization, and wound healing of the keratin 14 promoted transforming growth factor-beta1 transgenic mouse
[Wound Rep. Reg. ; Vol.10 ; pp.177-187]

Chang H., Brown C.W., Matzuk M.M. (2002)

Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily
[*Endocrine Rev.* ; Vol.23 ; pp.787-823]

Chen R.H., Su Y.H., Chuang R.L., Chang T.Y. (1998)

Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway
[*Oncogene* ; Vol.17 ; pp.1959-1968]

Chen W., Wahl S.M. (1999)

Manipulation of TGF-beta to control autoimmune and chronic inflammatory diseases
[*Microbes. Infect.* ; Vol.1 ; pp.1367-1380]

Chen Y., Lebrun J.J., Vale W. (1996)

Regulation of transforming Growth Factor-beta- and Activin-induced transcription by mammalian MAD proteins
[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.93 ; pp.12992-12997]

Chen Y.G., Bhushan A., Vale W. (1997)

Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 [corrected] receptor serine kinase
[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.94 ; pp.12938-12943]

Chomczynski P., Sacchi N. (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction
[*Anal. Biochem.* ; Vol.162 ; pp.156-159]

Christ M., McCartney-Francis N.L., Kulkarni A.B., Ward J.M., Mizel D.E., Mackall C.L., Gress R.E., Hines K.L., Tian H., Karlsson S., Wahl S.M. (1994)

Immune dysregulation in TGF-beta1-deficient mice
[*J. Immunol.* ; Vol.153 ; pp.1936-1946]

Cosgrove D., Chan S.H., Waltzinger C., Benoist C., Mathis D. (1992)

The thymic compartment responsible for positive selection of CD4+ T-cells
[*Int. Immunol.* ; Vol.4 ; pp.707-710]

Coulombe P.A., McGowan K.M. (2000)

Cell Polarity: Frontiers in Molecular Biology
[*Oxford University Press* ; Oxford]

Cui W., Fowles D.J., Cousins F.M., Duffie E., Bryson S., Balmain A., Akhurst R.J. (1995)

Concerted action of TGF-beta 1 and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice
[*Genes Dev.* ; Vol.9 ; pp.945-955]

Daopin S., Piez K.A., Ogawa Y., Davies D.R. (1992)

Crystal structure of TGF-beta 2: an unusual fold for the superfamily
[*Science* ; Vol.257 ; pp.369-373]

Datto M.B., Frederick J.P., Pan L., Borton A.J., Zhuang Y., Wang X.F. (1999)

Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction.
[*Mol. Cell. Biol.* ; Vol.19 ; pp.2495-2504]

Datto M.B., Li Y., Panus J.F., Howe D.J., Xiong Y., Wang X.F. (1995)

Transforming growth factor beta induces the cyclindependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism
[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.92 ; pp.5545-5549]

Datto M.B., Yu Y., Wang X.F. (1995)

Functional analysis of the transforming growth factor responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter
[*J. Biol. Chem.* ; Vol.270 ; pp.28623-28628]

Derynck R., Feng X.H. (1997)

TGF-beta receptor signaling
[*Biochim. Biophys. Acta* ; Vol.1333 ; pp.105-150]

Derynck R., Gelbart W.M., Harland R.M., Heldin C.H., Kern S.E., Massagué J., Melton D.A., Mlodzik M., Padgett R.W., Roberts A.B., Smith J., Thomsen G.H., Vogelstein B., Wang X.F. (1996)

Nomenclature: vertebrate mediators of TGF-beta family signals
[*Cell* ; Vol.87 ; pp.173]

Derynck R., Zhang Y., Feng X.H. (1998)

Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses
[*Cell* ; Vol.95 ; pp.737-740]

de Winter J.P., ten Dijke P., de Vries C.J.M., van Acterberg T.A.E., de Waele P., Huylebroeck D., Verschueren K., van den Eijnden-van Raaij A.J.M. (1996)

Follistatins neutralise activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors
[*Mol. Cell. Endocrinol.* ; Vol.116 ; pp.105-114]

D'Souza R.N., Cavender A., Dickinson D., Roberts A., Letterio J.J. (1998)

TGF-beta1 is essential for the homeostasis of the dentin-pulp complex
[*Eur. J. Oral. Sci.* ; Vol.106 ; pp.185-191]

Ebisawa T., Fukuchi M., Murakami G., Chiba T., Tanaka K., Imamura T., Miyazono K. (2001)

Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation

[*J. Biol. Chem.* ; Vol.276 ; pp.12477-12480]

Eppert K., Scherer S.W., Ozcelik H., Pirone R., Hoodless P., Kim H., Tsui L.C., Bapat B., Gallinger S., Andrusis I.L., Thomsen G.H., Wrana J.L., Attisano L. (1996)

MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF-beta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma

[*Cell* ; Vol.86 ; pp.543-552]

Feil R., Brocard J., Mascrez B., LeMeur M., Metzger D., Chambon P. (1996)

Ligand-activated sitespecific recombination in mice

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.93 ; pp.10887-10890]

Ferguson C.A., Tucker A.S., Christensen L., Lau A.L., Matzuk M.M., Sharpe P.T. (1998)

Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition

[*Genes Dev.* ; Vol.12 ; pp.2636-2649]

Findlay J.K., Drummond A.E., Dyson M.L., Baillie A.J., Robertson D.M., Ethier J.F. (2002)

Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily

[*Mol. Cell. Endocrinol.* ; Vol.191 ; pp.35-43]

Fire A., Harrison S.W., Dixon D. (1990)

A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*

[*Gene.* ; Vol.93 ; pp.189-198]

Foitzki K., Lindner G., Müller-Röver S., Maurer M., Botchkareva N., Botchkarev V., Handjiski B., Metz M., Hibino T., Soma T., Dotto G.P., Paus R. (2000)

Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo

[*FASEB J.* ; Vol.14 ; pp.752-760]

Foitzik K., Paus R., Doetschman T., Dotto G.P. (1999)

The TGF-beta2 isoform is both a required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis

[*Dev. Biol.* ; Vol.212 ; pp.278-289]

Fowles D.J., Cui W., Johnson S.A., Balmain A., Akhurst R.J. (1996)

Altered epidermal cell growth control in vivo by inducible expression of transforming growth factor beta 1 in the skin of transgenic mice

[*Cell Growth Differ.* ; Vol.7 ; pp.679-687]

Fowlkes B.J., Schweighoffer E. (1995)

Positive selection of T cells

*[Curr. Opin. Immunol. ; Vol.7 ; pp.188-195]***Fuchs E., Green H. (1980)**

Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte

*[Cell ; Vol.19 ; pp.1033-1042]***Fujimoto K., Sheng H., Shao J., Beauchamp R.D. (2001)**

Transforming growth factor-beta1 promotes invasiveness after cellular transformation with activated ras in intestinal epithelial cells

*[Exp. Cell Res. ; Vol.266 ; pp.239-249]***Funaba M., Zimmerman C.M., Mathews L.S. (2002)**

Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase

*[J. Biol. Chem. ; Vol.277 ; pp.41361-41368]***Glick A.B., Kulkarni A.B., Tennenbaum T., Hennings H., Flanders K., O'Reilly M., Sporn M.B., Karlsson S., Yuspa S.H. (1993)**

Loss of expression of transforming growth factor beta in skin and skin tumors is associated with hyperproliferation and a high risk for malignant conversion

*[Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; Vol.90 ; pp.6076-6080]***Gossen M., Bonin A.L., Bujard H. (1993)**

Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements

*[Trends Biochem. Sci. ; Vol.18 ; pp.471-475]***Graff J.M., Bansal A., Melton D.A. (1996)**

Xenopus MAD proteins transduce distinct subsets of signals for TGF-beta superfamily

*[Cell ; Vol.85 ; pp.479-487]***Groux H. (2001)**

An overview of regulatory T cells

*[Microbes. Infect. ; Vol.3 ; pp.883-889]***Gu Z., Nomura M., Simpson B.B., Lei H., Feijen A., van den Eijnden-van Raaij J., Donahoe P.K., Li E. (1998)**

The type I activin receptor ActRIIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse

*[Genes Dev. ; Vol.12 ; pp.844-857]***Gu Z., Reynolds E.M., Song J., Lei H., Feijen A., Yu L., He W., MacLaughlin D.T., van den Eijnden-van Raaij J., Donahoe P.K., Li E. (1999)**

The type I serine/threonine kinase receptor ActRIA (ALK2) is required for gastrulation of the mouse embryo

[Development ; Vol.126 ; pp.2551-2561]

- Guha U., Mecklenburg L., Cowin P., Kan L., O'Guin W.M., D'Vizio D., Pestell R.G., Paus R., Kessler J.A. (2004)**
Bone morphogenetic protein signaling regulates postnatal hair follicle differentiation and cycling
[Am. J. Pathol. ; Vol.165 ; pp.729-740]
- Guo Y., Kyprianou N. (1999)**
Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-I-mediated apoptosis
[Cancer Res. ; Vol.59 ; pp.1366-1371]
- Halder S.K., Beauchamp R.D., Datta P.K. (2005)**
Smad7 induces tumorigenicity by blocking TGF-beta-induced growth inhibition and apoptosis
[Exp. Cell Res. ; Vol.307 ; pp.231-246]
- Hannon G.J., Beach D. (1994)**
p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest
[Nature ; Vol.371 ; pp.257-261]
- Hata A., Lagna G., Massagué J., Hemmati-Brivanlou A. (1998)**
Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor
[Genes Dev. ; Vol.12 ; pp.186-197]
- Hata A., Shi Y., Massagué J. (1998)**
TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads
[Mol. Med Today ; Vol.4 ; pp.257-262]
- Hata A., Seoane J., Lagna G., Montalvo E., Hemmati-Brivanlou A., Massagué J. (2000)**
OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-smad and Olf signaling pathways
[Cell ; Vol.100 ; pp.229-240]
- Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y.Y., Grinnell B.W., Richardson M.A., Topper J.N., Gimbrone M.A. Jr., Wrana J.L., Falb D. (1997)**
The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling
[Cell ; Vol.89 ; pp.1165-1173]
- He W., Li A.G., Wang D., Han S., Zheng B., Goumans M.J., ten Dijke P., Wang X.J. (2002)**
Overexpression of Smad7 results in severe pathological alterations in multiple epithelial tissues
[EMBO J. ; Vol.21 ; pp.2580-2590]
- Heid H.W., Werner E., Franke W.W. (1986)**
The complement of native alpha-keratin polypeptides of hair-forming cells: a subset of eight polypeptides that differ from epithelial cytokeratins
[Differentiation ; Vol.32 ; pp.101-119]

Hesse M., Magin T.M., Weber K. (2001)

Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18
[*J. Cell. Sci.* ; Vol.114 ; pp.2569-2575]

Heuckeroth R.O., Enomoto H., Grider J.R., Golden J.P., Hanke J.A., Jackman A., Molliver D.C., Bardgett M.E., Snider W.D., Johnson Jr. E.M., Milbrandt J. (1999)

Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons
[*Neuron* ; Vol.22 ; pp.253-263]

Hogan B.L. (1996)

Bone morphogenetic proteins in development.
[*Curr. Opin. Genet. Dev.* ; Vol.6 ; pp.432-438]

Honma Y., Araki T., Gianino S., Bruce A., Heuckeroth R., Johnson E., Milbrandt J. (2002)

Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons
[*Neuron* ; Vol.35 ; pp.267-282]

Hoodless P.A., Haerry T., Abdollah S., Stapleton M., O'Connor M.B., Attisano L., Wrana J.L. (1996)

MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways
[*Cell* ; Vol. 85 ; pp.489-500]

Horwitz D.A., Gray J.D., Ohtsuka K. (1999)

Role of NK cells and TGF-beta in the regulation of T-cell-dependent antibody production in health and autoimmune disease
[*Microbes. Infect.* ; Vol.1 ; pp.1305-1311]

Huber S., Schramm C., Lehr A.H., Mann A., Schmitt S., Becker C., Protschka M., Galle P.R., Neurath M.F., Blessing M. (2004)

TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory cd4+cd25+ t cells
[*J. Immunol.* ; Vol.173 ; pp.6526-6531]

Hübner G., Hu Q., Smola H., Werner S. (1996)

Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair
[*Dev. Biol.* ; Vol.173 ; pp.490-498]

Huyseune A., Thesleff I. (2004)

Continuous tooth replacement: the possible involvement of epithelial stem cells
[*Bioessays* ; Vol.26 ; pp.665-671]

Imamura T., Takase M., Nishihara A., Oeda E., Hanai J.I., Kawabata M., Miyazono K. (1997)

Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily

[*Nature* ; Vol.389 ; pp.622-626]

Indra A.K., Li M., Brocard J., Warot X., Bornert J.M., Gerard C., Messaddeq N., Chambon P., Metzger D. (2000)

Targeted somatic mutagenesis in mouse epidermis

[*Horm. Res.* ; Vol.54 ; pp.296-300]

Indra A.K., Warot X., Brocard J., Bornert J.M., Xiao J.H., Chambon P., Metzger D. (1999)

Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ERT and Cre-ERT2 recombinases

[*Nucleic Acids Res.* , Vol.27 ; pp.4324-4327]

Ishida W., Hamamoto T., Kusanagi K., Yagi K., Kawabata M., Takehara K., Sampath T.K., Kato M., Miyazono K. (1999)

Smad6 Is a Smad1/5-induced Smad inhibitor

[*J. Biol. Chem.* ; Vol.275 ; pp.6075-6079]

Ishisaki A., Yamato K., Hashimoto S., Nakao A., Tamaki K., Nonaka K., ten Dijke P., Sugino H., Nishihara T. (1999)

Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells

[*J. Biol. Chem.* ; Vol.274 ; pp.13637-13642]

Ito Y., Zhao J., Mogharei A., Shuler C.F., Weinstein M., Deng C, Chai Y. (2001)

Antagonistic effects of Smad2 versus Smad7 are sensitive to their expression level during tooth development

[*J. Biol. Chem.* ; Vol.276 ; pp.44163-44172]

Itoh S., Itoh F., Goumans M.J., ten Dijke P. (2000)

Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins

[*Eur. J. Biochem.* ; Vol.267 ; pp.6954-6967]

Itoh S., Landström M., Hermansson A., Itoh F., Heldin C.H., Heldin N.E., ten Dijke P. (1998)

Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7

[*J. Biol. Chem.* ; Vol.273 ; pp.29195-29201]

Jacobson A.G., Sater A.K. (1988)

Features of embryonic induction

[*Development* ; Vol.104 ; pp.341-359]

Jaenisch R. (1988)

Transgenic animals

*[Science ; Vol.240 ; pp.1468-1474]***Janeway C.A., Travers P. (1997)**

Immunologie

*[Spektrum Akademischer Verlag ; Heidelberg]***Jernvall J., Aberg T., Kettunen P., Keranen S., Thesleff I. (1998)**

The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot

*[Development ; Vol.125 ; pp.161-169]***Jernvall J., Thesleff I. (2000)**

Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis

*[Mech. Dev. ; Vol.92 ; pp.19-29]***Jessell T.M., Melton D.A. (1992)**

Diffusible factors in vertebrate embryonic induction

*[Cell ; Vol.68 ; pp.257-270]***Jhaveri S., Erzurumlu R.S., Chiaia N., Kumar T.R., Matzuk M.M. (1998)**

Defective whisker follicles and altered brainstem patterns in activin and follistatin knockout mice

*[Mol. Cell. Neurosci. ; Vol.12 ; pp.206-219]***Kavsak P., Rasmussen R.K., Causing C.G., Bonni S., Zhu H., Thomsen G.H., Wrana J.L. (2000)**

Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation

*[Mol Cell. ; Vol.6 ; pp.1365-1375]***Kawabata M., Imamura T., Miyazono K. (1998)**

Signal transduction by bone morphogenetic proteins

*[Cytokine Growth Factor Rev. ; Vol.9 ; pp.49-61]***Kawabata M., Inoue H., Hanyu A., Imamura T., Miyazono K. (1998)**

Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors

*[EMBO J. ; Vol.17 ; pp.4056-4065]***Khalil N. (1999)**

TGF-beta: from latent to active

[Microbes. Infect. ; Vol.1 ; pp.1255-1263]

Kingsley D.M. (1994)

The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms

[*Genes Dev.* ; Vol.8 ; pp.133-146]

Klopčič B. (2002)

Untersuchungen zur Funktion des TGF-beta-Signaltransduktionsweges bei der Bildung von Haaren und Zähnen

[*Dissertation ; Johannes Gutenberg-Universität Mainz*]

Knaus P.I., Lindemann D., DeCoteau J.F., Perlman R., Yankelev H., Hille M., Kadin M.E., Lodish H.F. (1996)

A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma

[*Mol. Cell. Biol.* ; Vol.16 ; pp.3480-3489]

Kondaiah P., Sands M.J., Smith J.M., Fields A., Roberts A.B., Sporn M.B., Melton D.A. (1990)

Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta5) mRNA in *Xenopus laevis*

[*J. Biol. Chem.* ; Vol. 265 ; pp.1089-1093]

Krauss G. (1997)

Biochemie der Regulation und Signaltransduktion

[*Wiley-VCH ; Weinheim*]

Kretschmar M., Doody J., Massagué J. (1997)

Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1

[*Nature* ; Vol.389 ; pp.618-622]

Kretschmar M., Doody J., Timokhina I., Massagué J. (1999)

A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic ras

[*Genes Dev.* ; Vol.13 ; pp.804-816]

Kühn R., Schwenk F. (1997)

Advances in gene targeting methods

[*Curr. Opin. Immunol.* ; Vol. 9 ; pp.183-188]

Kulkarni A.B., Huh C.G., Becker D., Geiser A., Lyght M., Flanders K.C., Roberts A.B., Sporn M.B., Ward J.M., Karlsson S. (1993)

Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.90 ; pp.770-774]

Lagna G., Hata A., Hemmati-Brivanlou A., Massagué J. (1996)

Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways

[*Nature* ; Vol.383 ; pp.832-836]

Lallemand F., Mazars A., Prunier C., Bertrand F., Kornprost M., Gallea S., Roman-Roman S., Cherqui G., Atfi A. (2001)

Smad7 inhibits the survival nuclear factor kappaB and potentiates apoptosis in epithelial cells
[Oncogene ; Vol.20 ; pp.879-884]

Landström M., Heldin N.E., Bu S., Hermansson A., Itoh S., ten Dijke P., Heldin C.H. (2000)

Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor beta in prostatic carcinoma cells
[Curr. Biol. ; Vol.10 ; pp.535-538]

Lee H.M., Rich S. (1991)

Co-stimulation of T cell proliferation by transforming growth factor-beta 1
[J. Immunol. ; Vol.147 ; pp.1127-1133]

Lee H.M., Rich S. (1993)

Differential activation of CD8+ T cells by transforming growth factor-beta 1.
[J. Immunol. ; Vol.151 ; pp.668-677]

Letterio J.J., Roberts A.B. (1998)

Regulation of immune responses by TGF-beta
[Anun. Rev. Immunol. ; Vol.16 ; pp.137-161]

Li M., Indra A.K., Warot X., Brocard J., Messaddeq N., Kato S., Metzger D., Chambon P. (2000)

Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR α mutations in mouse epidermis
[Nature ; Vol.407 ; pp.633-636]

Li A.G., Koster M.I., Wang X.J. (2003)

Roles of TGFbeta signaling in epidermal/appendage development
[Cytokine Growth Factor Rev. ; Vol.14 ; pp.99-111]

Li A.G., Wang D., Feng X.H., Wang X.J. (2004)

Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder
[EMBO J. ; Vol.23 ; pp.1-12]

Lin L.F., Doherty D.H., Lile J.D., Bektesh S., Collins F. (1993)

GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons
[Science ; Vol.260 ; pp.1130-1132]

Liu F., Hata A., Baker J.C., Doody J., Carcamp J., Harland R.M., Massagué J. (1996)

A human MAD protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator
[Nature ; Vol.381 ; pp.620-623]

Liu F., Pouponnot C., Massagué J. (1997)

Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF-beta-inducible transcriptional complexes

[*Genes Dev.* ; Vol.11 ; pp.3157-3167]

Liu F., Ventura F., Doody J., Massagué J. (1995)

Human type II receptor for Bone Morphogenetic Proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs

[*Mol. Cell. Biol.* ; Vol.15 ; pp.3479-3486]

Lo R.S., Chen Y.G., Shi Y., Pavletich N.P., Massagué J. (1998)

The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGFbeta receptors

[*EMBO J.* ; Vol.17 ; pp.996-1005]

Lottspeich F., Zorbas H. (1998)

Bioanalytik

[*Spektrum Akademischer Verlag ; Heidelberg*]

Luo K., Stroschein S.L., Wang W., Chen D., Martens E., Zhou S., Zhou Q. (1999)

The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling

[*Genes Dev.* ; Vol.13 ; pp.2196-2206]

Lynch M.H., O'Guin W.M., Hardy C.M.L., Sun T.T. (1986)

Acidic and basic hair/nail keratins: their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to 'soft' keratins

[*J. Cell. Biol.* ; Vol.103 ; pp.2593-2606]

Lyons K.M., Jones C.M., Hogan B.L. (1991)

The DVR gene family in embryonic development

[*Trends Genet.* ; Vol.7 ; pp.408-412]

Macias-Silva M., Abdollah S., Hoodless P.A., Pirone R., Attisano L., Wrana J.L. (1996)

MADR2 is a substrate of the TGF-beta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling

[*Cell* ; Vol.87 ; pp.1215-1224]

Mackenzie I.C. (1997)

Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure

[*J. Invest. Dermatol.* ; Vol.109 ; pp.377-383]

Maronpot R.R. (1999)

Pathology of the Mouse

[*Cache River Press ; Vienna*]

Masanobu O., Oshima H., Taketo M.M. (1996)

TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac haematopoiesis and Vasculogenesis

[*Dev. Biol.* ; Vol.179 ; pp.297-302]

Massagué J. (1998)

TGF-beta signal transduction

[*Annu. Rev. Biochem.* ; Vol.67 ; pp.753-791]

Matzuk M.M., Kumar T.R., Vassalli A., Bickenbach J.R., Roop D.R., Jaenisch R., Bradley A. (1995)

Functional analysis of activins during mammalian development

[*Nature* ; Vol.374 ; pp.354-356]

McCaffrey T.A. (2000)

TGF-betas and TGF-beta receptors in atherosclerosis

[*Cytokine Growth Factor Rev.* ; Vol.11 ; pp.103-114]

Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P. (1995)

Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.92 ; pp.6992-6995]

Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R. (1982)

The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells

[*Cell* ; Vol.31 ; pp.11-24]

Mossalayi M.D., Mentz F., Ouaz F., Dalloul A.H., Blanc C., Debre P., Ruscetti F.W. (1995)

Early human thymocyte proliferation is regulated by an externally controlled autocrine transforming growth factor-beta 1 mechanism

[*Blood* ; Vol.85 ; pp.3594-3601]

Motyl T., Grzelkowska K., Zimowska W., Skierski J., Wereski P., Ploszaj T., Trzeciak L. (1998)

Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells

[*Eur. J. Cell. Biol.* ; Vol.75 ; pp.367-374]

Moustakas A., Stournaras C. (1999)

Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts

[*J. Cell Sci.* ; Vol.112 ; pp.1169-1179]

Munz B., Smola H., Engelhardt F., Bleuel K., Brauchle M., Lein I., Evans L.W., Huylebroeck D., Balling R., Werner S. (1999)

Overexpression of activin a in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair
[*EMBO J.*, Vol.18 ; pp.5205-5215]

Nagarajan R.P., Zhang J., Li W., Chen Y. (1999)

Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4
[*J. Biol. Chem.* ; Vol.274 ; pp.33412-33418]

Nakamura M., Matzuk M.M., Gerstmayr B., Bosio A., Lauster R., Miyachi Y., Werner S., Paus R. (2003)

Control of pelage hair follicle development and cycling by complex interactions between follistatin and activin
[*FASEB J.* ; Vol.17 ; pp.517-528]

Nakao A., Afrakhte M., Morén A., Nakayama T., Christian J.L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N.E., Heldin C.H., ten Dijke P. (1997)

Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling
[*Nature* ; Vol.389 ; pp.631-635]

Nakao A., Imamura T., Souchelnytskyi S., Kawabata M., Ishisaki A., Oeda E., Tamaki K., Hanai J.I., Heldin C.H., Miyazono K., ten Dijke P. (1997)

TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4
[*EMBO J.* ; Vol.16 ; pp.5353-5362]

Nohno T., Ishikawa T., Saito T., Hosokawa K., Noji S., Wolsing D.H., Rosenbaum J.S. (1995)

Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors
[*J. Biol. Chem.* ; Vol. 270 ; pp.22522-22526]

Oft M., Heider K.H., Beug,H. (1998)

TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis
[*Curr. Biol.* ; Vol.8 ; pp.1243-1252]

O'Guin W.M., Schermer A., Lynch M., Sun T.T. (1990)

Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments
[*Plenum*]

Orban P.C., Chui D., Marth J.D. (1992)

Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice
[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.89 ; pp.6861-6865]

Pietenpol J.A., Holt J.T., Stein R.W., Moses H.L. (1990)

Transforming growth factor beta1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.87 ; pp.3758-3762]

Pittelkow M.R., Coffey R.J.J., Moses H.J. (1988)

Keratinocytes produce and are regulated by transforming growth factors

[*Ann. N.Y. Acad. Sci.* ; Vol.548 ; pp.211-224]

Rafferty L.A., Twombly V., Wharton K., Gelbart W.M. (1995)

Genetic screens to identify elements of the Decapentaplagic signaling pathway in Drosophila

[*Genetics* , Vol.139 ; pp.241-254]

Rajewsky K., Gu H., Kühn R., Betz U.A.K., Müller W., Roes J., Schwenk F. (1996)

Conditional gene targeting

[*J. Clin. Invest.* ; Vol.98 ; pp.600-603]

Ramírez A., Bravo A., Jorcano J.L., Vidal M. (1994)

Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development

[*Differentiation* ; Vol.58 ; pp.53-64]

Ramírez A., Milot E., Ponsa I., Marcos-Gutierrez C., Page A., Santos M., Jorcano J., Vidal M. (2001)

Sequence and chromosomal context effects on variegated expression of keratin 5/lacZ constructs in stratified epithelia of transgenic mice

[*Genetics* ; Vol.158 ; pp.341-350]

Reichelt J., Büssow H., Grund C., Magin T.M. (2001)

Formation of a normal epidermis supported by increased stability of keratins 5 and 14 in keratin 10 null mice

[*Mol. Biol. Cell* ; Vol.12 ; pp.1557-1568]

Reynisdóttir I., Polyak K., Iavarone A., Massagué J.J. (1995)

Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta

[*Genes Dev.* ; Vol.9 ; pp.1831-1845]

Roberts A.B., Anzano M.A., Lamb L.C., Smith J.M., Sporn M.B. (1982)

New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.78 , pp.5339-5343]

Roberts A.B., Sporn M.B. (1996)

The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair

[*Plenum ; New York*]

Robles A.I., Larcher F., Whalin R.B., Murillas R., Richie E., Gimenez-Conti I.B., Jorcano J.L., Cinti C.J. (1996)

Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.93 ; pp.7634-7638]

Rothe M., Falanga V. (1989)

Growth factors. Their biology and promise in dermatologic diseases and tissue repair

[*Arch. Dermatol.* ; Vol.125 ; pp.1390-1398]

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985)

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia

[*Science* ; Vol.230 ; pp.1350-1354]

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1998)

Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition

[*Cold Spring Harbor Laboratory Press* ; New York]

Sauer B., Henderson N. (1989)

Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome

[*Nucleic Acids Res.* ; Vol.17 ; pp.147-161]

Savage C., Das P., Finelli A.L., Townsend S.R., Sun C.Y., Bairde S.E., Padgett R.W. (1996)

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. USA* ; Vol.93 ; pp.790-794]

Schlunegger M.P., Grutter M.G. (1992)

An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2Å resolution of human transforming growth factor-beta 2

[*Nature* ; Vol.358 ; pp.430-434]

Schluns K.S., Cook J.E., Le P.T. (1997)

TGF-beta differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL1alpha and IL-1beta in human thymic epithelial cells

[*J. Immunol.* ; Vol.158 ; pp.2704-2712]

Seishimi M., Nojiri M., Esaki C., Yoneda K., Eto Y., Kitajima Y. (1999)

Activin A induces terminal differentiation of cultured human keratinocytes

[*J. Invest. Dermatol.* ; Vol.112 ; pp.432-436]

Sellheyer K., Bickenbach J.R., Rothnagel J.A., Bundman D., Longley M.A., Roche N.S., Roberts A.B., Roop D.R. (1993)

Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.90 ; pp.5237-5241]

Seyffert W., Gassen H.G., Hess O., Jäckle H., Fischbach K.F. (1998)

Lehrbuch der Genetik

[*Gustav Fischer ; Stuttgart*]

Shen W.H., Moore C.C., Ikeda Y., Perker K.L., Ingraham H.A. (1994)

Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the esx determination cascade

[*Cell* ; Vol.77 ; pp.651-661]

Shevach E. M. (2002)

CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers

[*Nat. Rev. Immunol.* ; Vol.2 ; pp.389-400]

Shi Y., Wang Y.F., Jayaraman L., Yang H., Massagué J., Pavletich N.P. (1998)

Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling

[*Cell* ; Vol.94 ; pp.585-594]

Shimizu A., Kato M., Nakao A., Imamura T., ten Dijke P., Heldin C.H., Kawabata M., Shimada S., Miyazono K. (1998)

Identification of receptors and Smad proteins involved in activin signalling in a human epidermal keratinocyte cell line

[*Genes Cells* ; Vol.3 ; pp.125-134]

Simmer J.P., Hu J.C. (2002)

Expression, structure, and function of enamel proteinases

[*Connect. Tissue Res.* ; Vol.43 ; pp.441-449]

Sirard C., de la Pompa J.L., Elia A., Itie A., Mirtsos C., Cheung A., Hahn S., Wakeham A., Schwartz L., Kern S.E., Rossant J., Mak T.W. (1998)

The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo

[*Genes Dev.* ; Vol.12 ; pp.107-119]

Souchelnytskyi S., Nakayama T., Nakao A., Moren A., Heldin C.H., Christian J.L., ten Dijke P. (1998)

Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors

[*J. Biol. Chem.* ; Vol.273 ; pp.25364-25370]

Stopa M., Anhof D., Terstegen L., Gatsios P., Gressner A.M., Dooley S. (2000)
Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7

[*J. Biol. Chem.* ; Vol.275 ; pp.29308-29317]

Sundberg J.P. (1994)

Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities: animal models and biomedical tools

[*Boca Raton, CRC Press*]

Suzuki A., Chang C., Yingling J.M., Wang X.F., Hemmati-Brivanlou A. (1996)

Smad5 induces ventral fates in *Xenopus* embryo

[*Dev. Biol.* ; Vol.184 ; pp.402-405]

Tabata M.J., Fujii T., Liu J.G., Ohmori T., Abe M., Wakisaka S., Iwamoto M., Kurisu K. (2002)

Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice

[*Eur. J. Oral. Sci.* ; Vol.110 , pp.114-120]

Tang J., Nuccie B.L., Ritterman I., Liesveld J.L., Abboud C.N., Ryan D.H. (1997)

TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors

[*J. Immunol.* ; Vol.159 ; pp.117-125]

Thesleff I., Sharpe P. (1997)

Signalling networks regulating dental development

[*Mech. Dev.* ; Vol.67 ; pp.111-123]

Thesleff I., Vaahtokari A., Partanen A.M. (1995)

Regulation of organogenesis: common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs

[*Int. J. Dev. Biol.* ; Vol 39 ; pp.35-50]

Thomsen G.H. (1996)

Xenopus mothers against decapentaplegic is an embryonic ventralizing agent that acts downstream of the BMP-2/4 receptor

[*Development* ; Vol.122 ; pp.2359-2366]

Tsakazaki T., Chiang T.A., Davison A.f., Attisano L., Wrana J.L. (1998)

SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor

[*Cell* ; Vol.95 ; pp.779-791]

Tummers M., Thesleff I. (2003)

Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species

[*Development* ; Vol.130 ; pp.1049-1057]

Ulloa L., Doody J., Massagué J. (1999)

Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway

[*Nature* ; Vol.397 ; pp.710-713]

Vale W., Rivier J., Vaughan J., McClintock R., Corrigan A., Woo W., Karr D., Spiess J. (1986)

Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid

[*Nature* ; Vol.321 ; pp.776-779]

Vassar R., Rosenberg M., Ross S., Tyner A., Fuchs E. (1989)

Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.86 ; pp.1563-1567]

Wang X.J. (2001)

Role of TGFbeta signaling in skin carcinogenesis

[*Microsc. Res. Tech.* ; Vol.52 ; pp-420-429]

Wang X.J., Liefer K.M., Tsai S.Y., O'Malley B.W., Roop D.R. (1999)

Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor beta1 in the epidermis

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.96 ; pp.8483-8488]

Wang X.P., Suomalainen M., Jorgez C.J., Matzuk M.M., Wankell M., Werner S., Thesleff I. (2004)

Modulation of activin/bone morphogenetic protein signaling by follistatin is required for the morphogenesis of mouse molar teeth

[*Dev. Dyn.* ; Vol.231 ; pp98-108]

Wang X.P., Suomalainen M., Jorgez C.J., Matzuk M.M., Werner S., Thesleff I. (2004)

Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast Differentiation

[*Dev. Cell* ; Vol.7 ; pp.719-730]

Wang X., Zinkel S., Polonsky K., Fuchs E. (1997)

Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.94 ; pp.219-226]

Wankell M., Munz B., Hubner G., Hans W., Wolf E., Goppelt A., Werner S. (2001)

Impaired wound healing in transgenic mice overexpressing the activin antagonist follistatin in the epidermis

[*EMBO J.* ; Vol.20 ; pp.5361-5372]

Weinstein M., Yang X., Li C., Xu X., Gotay J., Deng C.X. (1998)

Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2.

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.95 ; pp.9378-9383]

Werner S., Beer H.D., Mauch C., Lüscher B., Werner S. (2001)

The Mad1 transcription factor is a novel target of activin and TGF-beta action in keratinocytes: possible role of Mad1 in wound repair and psoriasis

[*Oncogene* ; Vol.20 ; pp.7494-7504]

Werner S., Weinberg W., Liao X., Peters K.G., Blessing M., Yuspa S.H., Weiner R.L., Williams L.T. (1993)

Targeted expression of a dominant-negative FGF receptor mutant in the epidermis of transgenic mice reveals a role of FGF in keratinocyte organization and differentiation

[*EMBO J.* ; Vol.12 ; pp.2635-2643]

Wikstrom P., Stattin P., Franck-Lissbrant I., Damber J.E., Bergh, A. (1998)

Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer

[*Prostate* ; Vol.37 ; pp.19-29]

Werner S., Beer H.D., Mauch C., Lüscher B., Werner S. (2001)

The Mad1 transcription factor is a novel target of activin and TGF-beta action in keratinocytes: possible role of Mad1 in wound repair and psoriasis

[*Oncogene* ; Vol.20 ; pp.7494-7504]

Wotton D., Massagué J. (1999)

Smad transcriptional corepressors in TGFbeta family signaling

[*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* ; Vol.254 ; pp.145-164]

Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mirsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A. (1998)

Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities

[*Science* ; Vol.242 ; pp.1528-1534]

Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F., Massagué J. (1994)

Mechanism of activation of the TGF-beta receptor

[*Nature* , Vol.370 ; pp.341-347]

Wu G., Chen Y.G., Ozdamar B., Gyuricza C.A., Chong P.A., Wrana J.L., Massagué J., Shi Y. (2000)

Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation

[*Science* ; Vol.287 ; pp.92-97]

Yang X., Letterio J.J., Lechleider R.J., Chen L., Hayman R., Gu H., Roberts A.B., Deng C. (1999)

Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta

[*EMBO J.* ; Vol.18 ; pp.1280-1291]

Ying S.Y., Zhang Z., Furst B., Batres Y., Huang G., Li G. (1997)

Activins and activin receptors in cell growth

[*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* ; pp.114-122]

Yingling J.M., Das P., Savage C., Zhang M., Padgett R.W., Wang X.F. (1996)

Mammalian Dwarfins are phosphorylated in response to TGF-beta and are implicated in control of cell growth

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.93 ; pp.8940-8944]

Yingling J.M., Datto M.B., Wong C., Frederick J.P., Liberati N.T., Wang X.F. (1997)

Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-Inducible DNA binding protein

[*Mol. Cell. Biol.* ; Vol.17 ; pp.7019-7028]

Yokozeiki M., Afanador E., Nishi M., Kaneko K., Shimokawa H., Yokote K., Deng C., Tsuchida K., Sugino H., Moriyama K. (2003)

Smad3 is required for enamel biomineralization

[*Biochem. Biophys. Res. Comm.* ; Vol.305 ; pp.684-690]

Zegarelli E.V. (1944)

Admantoblastomas in Slye stock mice

[*Am. J. Path.* ; Vol.20 ; pp.23-30]

Zhang Y., Chang C., Gehling D.J., Hemmati-Brivanlou A., Derynck R. (2000)

Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase

[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; Vol.98 ; pp.974-979]

Zhang Y., Derynck R. (1999)

Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk

[*Trends Cell Biol.* ; Vol.9 ; pp.274-279]

Zhang Y., Feng X., We R., Derynck R. (1996)

Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response

[*Nature* , Vol.383 ; pp.168-172]

Zhou X., Sasaki H., Lowe L., Hogan B.L., Kuehn M.R. (1993)

Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation

[*Nature* ; Vol.361 ; pp.543-547]

Zhu H., Kavsak, Abdollah S., Wrana J.L., Thomsen G.H. (1999)

A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation
[Nature ; Vol.400 ; pp.687-693]

Zhu Y., Richardson J.A., Parada L.F., Graff J.M. (1998)

Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer
[Cell ; Vol.94 ; pp.703-714]

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm	GDF	<i>growth and differentiation factor</i>
µl	Mikroliter	GDNF	<i>glial-derived-neurotropic-growth-factor</i>
°C	Grad Celsius	H ₂ O _{dd}	destilliertes Wasser
µM	Mikromolar	HE	Hämatoxylin/Eosin
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen	i.p.	intra peritoneal
Abb.	Abbildung	IFN	Interferon
ActR	Activin-Rezeptor	IL	Interleukin
AP	alkalische Phosphatase	I-Smad	inhibitorisches Smad
AS	Aminosäure	K14	Keratin14
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	K5	Keratin5
BMPR	<i>bone morphogenetic protein-receptor</i>	M	Molar
bp	Basenpaare	MΩ	Megaohm
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin	Mad	<i>mothers against decapentaplegic</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	mg	Milligramm
CD	<i>cluster of differentiation</i>	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	min	Minute
Co-Smad	<i>common partner-Smad</i>	MIS	<i>müllerian inhibiting substance</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ml	Milliliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mM	Millimolar
Dpp	<i>decapentaplegic</i>	MMP	Matrixmetalloproteinase
DVR	<i>decapentaplegic-vegetal related</i>	mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	MW	Mittelwert
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	p.c.	<i>post coitum</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanate	PCR	Polymerasekettenreaktion
g	Gramm, Erdbeschleunigung		

PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
PE	Phycoerythrin	tg	transgene Linie
pH	pH-Wert	TGF	<i>transforming growth factor</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop	TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
R-Smad	rezeptor-reguliertes Smad	U	Enzymeinheiten (Units)
RT	Reverse Transkriptase ; Raumtemperatur	ü.N.	über Nacht
s	Sekunde	U/min	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat	UTR	untranslatierter Bereich
sec	Sekunde	UV	Ultraviolett
SEM	Standardabweichung des Mittels	v/v	Volumenprozent
Sma	<i>small body size</i>	Vol.	Volumen
Smad	<i>Sma/Mad-related</i>	w/v	Gewichtsprozent
TβR	TGF-β-Rezeptor	wt	Wildtyp
Tab.	Tabelle	ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung