

BMP/TGF-β-Signalwege

BMP-Signaltransduktion – begleitet von *control freaks* und *gate keepers*

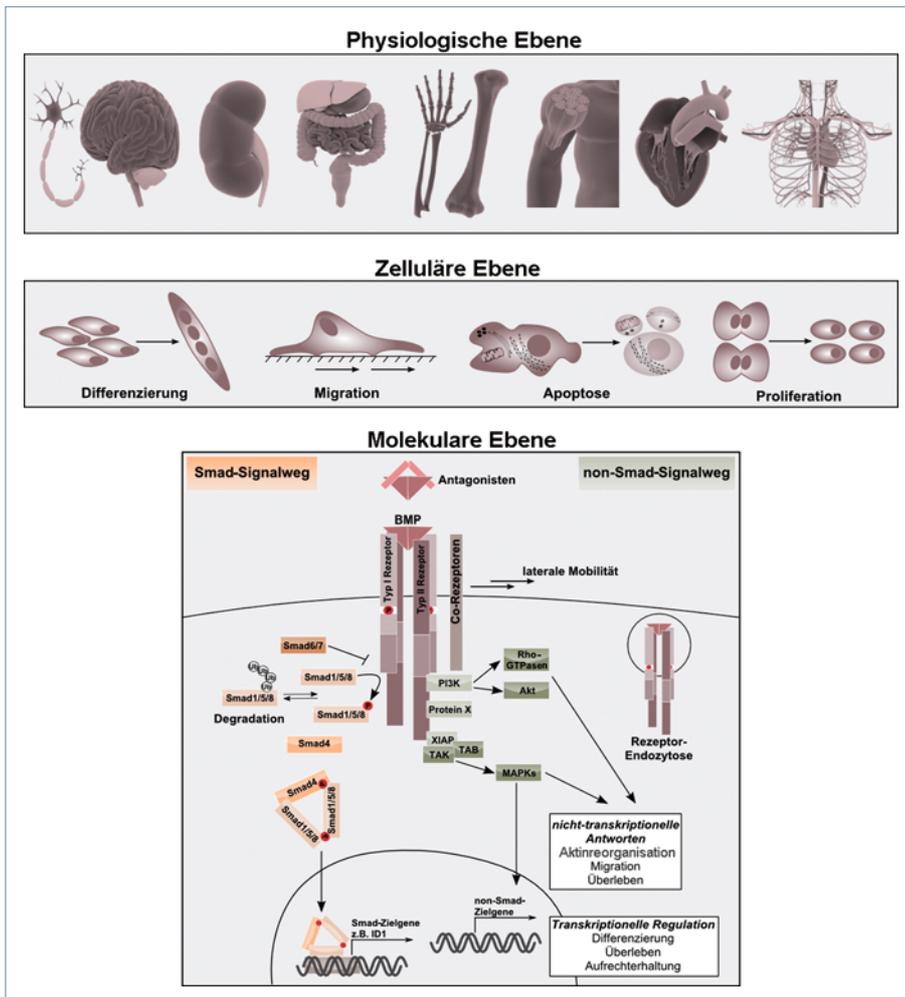
GINA DÖRPHOLZ, PATRIZIA WEIGELL, PETRA KNAUS
 INSTITUT FÜR CHEMIE UND BIOCHEMIE, FU BERLIN

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are crucial growth factors from embryonic development up to adult organ/tissue homeostasis since they regulate versatile processes such as stem cell maintenance, differentiation and migration. Aberrant signalling leads to pathologies including cancer or musculoskeletal and vascular diseases. Here, we provide an overview of the BMP signalling cascade and its complex regulation and show how we investigate this tightly controlled protein network in physiological and pathological model systems.

DOI: 10.1007/s12268-016-0743-7
 © Springer-Verlag 2016

■ Wachstumsfaktoren und Zytokine sind für die Signal- und Informationsweiterleitung in Zellen von fundamentaler Bedeutung und bei der Regulation mannigfaltiger zellulärer Prozesse unentbehrlich. Mit der Entwicklung multizellulärer Organismen waren es sezernierte Wachstumsfaktoren, die die Generierung und Aufrechterhaltung von Zellverbänden und Organen ermöglichten und steuerten.

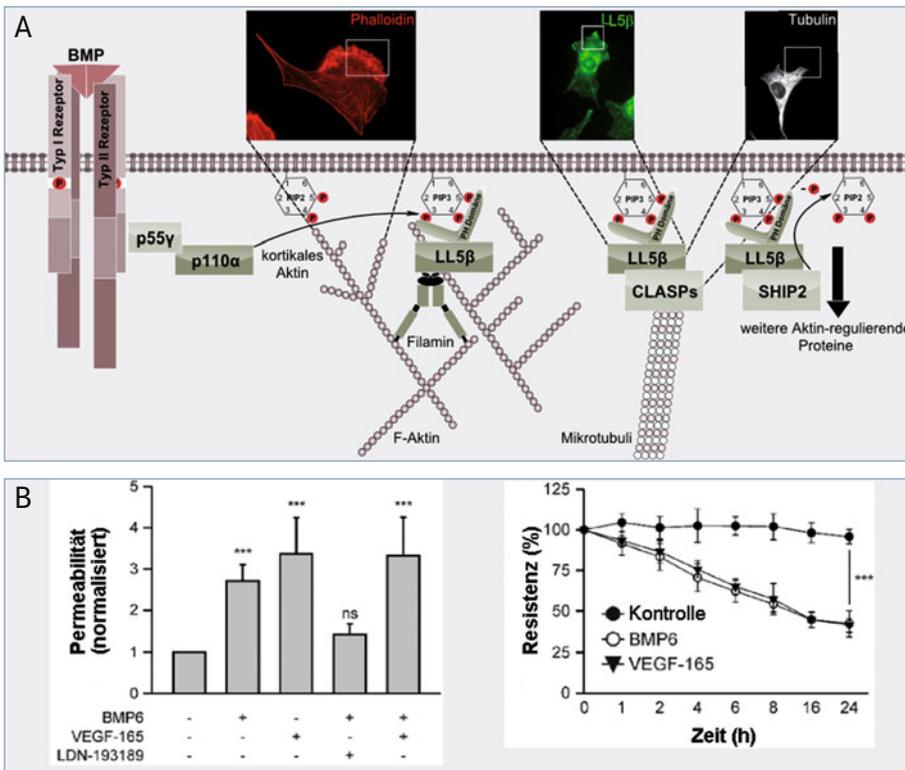
Die Signalkaskade der Bone/Body Morphogenetic Proteins (BMPs) ist evolutionär eine der ältesten und mit ihrer Vernetzung zu anderen Signalwegen auch eine der komplexesten. Sie unterliegt Regulationsmechanismen, welche sich über verschiedene Stufen entlang der Signalkaskade erstrecken. So werden Signalantworten fein balanciert und streng koordiniert und damit die pleiotropen Funktionen der BMP-Liganden auf eine Kontext-abhängige Art gewährleistet. BMPs stellen die größte Untergruppe der Transforming Growth Factor β(TGF-β)-Superfamilie sezernierter Wachstumsfaktoren dar, deren 33 Mitglieder strukturell verwandt sind und ähnlichen Aktivierungsmodi folgen [1].



◀ **Abb. 1:** Komplexität und Diversität des Bone Morphogenetic Proteins(BMP)-Signalweges. Die BMP-Signaltransduktion ist essenziell für die Embryonalentwicklung und Organ/Gewebe-Homöostase im adulten Organismus. Dies basiert auf verschiedenen grundlegenden zellulären Prozessen, welche durch BMPs gesteuert werden. Diese Diversität wird durch einen streng regulierten und konservierten molekularen Weg bedingt. Nach Ligandenbindung von BMP an transmembrane Rezeptoren führt die Aktivierung der Smads durch den Typ-I-Rezeptor zu deren nukleären Translokation und der transkriptionellen Regulation von Zielgenen wie *ID1*. Der non-Smad-Signalweg umfasst die Aktivierung von verschiedenen MAP-Kinasen via TAK/TAB/XIAP sowie Rho-GTPasen und Akt via PI3K. Das komplette Netzwerk wird auf allen Ebenen streng reguliert, wie z. B. durch Antagonisten oder Rezeptor-Endozytose.

Hier steht eine Anzeige.





▲ Abb. 2: Untersuchung der BMP-Kaskade im physiologischen und pathologischen Kontext. **A,** Molekularer Mechanismus der BMP-induzierten Chemotaxis von mesenchymalen Vorläuferzellen (adaptiert aus [10]). Die BMP2-Signalgebung ermöglicht die Assoziation von p55y an den BMPRII-Rezeptor, was zur Aktivierung der PI3K-Kaskade und schließlich zur Rekrutierung von LL5β an die Membran führt. Dadurch wird die Polymerisation von kortikalem Aktin und die Induktion von Lamellipodien ausgelöst. Exemplarische Immunfluoreszenzbilder zeigen die jeweiligen relevanten Proteine für die BMP2-induzierte Zellmigration in C2C12-Zellen. **B,** Beispiel des BMP-Signalweges in vaskulärer Permeabilität (adaptiert aus [12]). In einem Transwell-Assay (FITC-Dextran-Assay, links) und einer transendothelialen Resistenzmessung (rechts) wird die BMP6-induzierte Permeabilität in *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) *in vitro* gezeigt. Hierbei wurden die Zellen entweder mit BMP6 oder VEGF-165 als Positivkontrolle stimuliert. LDN-193189 ist ein BMP-spezifischer Inhibitor. Der FITC-Dextran-Fluss wird als zur Kontrolle normalisierte *fold induction* nach 24 Stunden (links) und die elektrische Resistenz prozentual zur Kontrolle über 24 Stunden (rechts) gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (links) oder Standardabweichung (rechts). *** $p \leq 0,001$, ns = nicht signifikant.

Physiologische Relevanz der BMP-Signalkaskade

Während Marshall Urist BMPs 1965 erstmals als Faktoren beschrieb, die effizient die Knorpel- und Knochenbildung induzieren, ist man sich heute ihrer vielfältigen Funktionen bewusst und bezeichnet sie auch als Body Morphogenetic Proteins [2, 3]. BMPs regulieren physiologische und zelluläre Prozesse während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus in unterschiedlichsten Organen und Geweben, welche unter anderem Knochen, Gehirn, Herz, Leber, Niere, Nerven- und Fettgewebe, Vaskulatur, Gastrointestinaltrakt und Muskulatur umfassen. Hier steuern sie ein breites Spektrum biologischer Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Migration, aber auch Deposition der extrazellulären Matrix (EZM)

und sind so maßgeblich an der embryonalen Symmetrieausbildung, Organogenese, Angiogenese, dem Metabolismus, der Adipogenese, Knochenbildung und Myogenese beteiligt (Abb. 1). Darüber hinaus agieren BMPs als essenzielle Mediatoren im Kontext von Wundheilung, Geweberegeneration und -homöostase.

In Anbetracht ihrer Relevanz für fast alle Körperfunktionen und -strukturen ist es offensichtlich, dass jegliche Abweichungen in der Signalgebung und aberrante Signalantworten häufig schwerwiegende Erkrankungen zur Folge haben. So sind durch Mutationen in Genen, die für Komponenten der Kaskade codieren, Erkrankungen beschrieben, die z. B. das Blutgefäßsystem sowie muskuloskeletale und neuronale Funktionen betreffen. Eine heterozygote Mutation führt z. B. im BMP-

Typ-I-Rezeptor Alk2 zu dessen Hyperaktivität, welche wiederum zu Verknöcherung von Binde- und Stützgewebe und somit zur Pathogenese von Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) beiträgt [4]. Die verminderte Aktivität von Liganden und/oder Rezeptoren hingegen kann in Fehlbildungen der Gliedmaßen (Brachydaktylie) resultieren. Zahlreiche andere Erkrankungen wie Fibrose, kardiovaskuläre Störungen, Muskeldystrophien und Krebs können durch Fehlfunktionen des BMP-Signalweges bedingt werden [5].

Spezifische intrazelluläre BMP-Signalkaskaden

Um die Komplexität der Signalgebung, die diversen BMP-vermittelten Signalantworten und ferner den Umfang der pleiotropen Funktionen von BMPs zu verstehen, ist es zunächst wichtig, die konservierten Mechanismen molekular zu betrachten (Abb. 1).

Hier stellen die präzise Regulation der Expression und Sekretion der BMP-Liganden sowie deren biologische Verfügbarkeit den ersten Schritt der Signalgebung dar. Sobald BMPs in den extrazellulären Raum sezerniert werden, können sie entweder an der EZM gebunden, von löslichen Antagonisten inhibiert oder über Proteasen aktiviert werden. Ein klassisches Beispiel für extrazelluläre Antagonisten ist Noggin, das hochaffin an BMP2/4 bindet und dadurch dessen Rezeptorbindungsepitope maskiert, sodass keine Aktivierung der Rezeptoren erfolgt. Binden BMPs hingegen an ihre spezifischen Rezeptoren, wird eine auto- oder parakrine Signalübertragung in der rezeptiven Zelle ausgelöst. Hierbei wird die Liganden-Rezeptor-Interaktion durch biochemische und physikalische Proteineigenschaften bestimmt, sodass hochspezifische Affinitäten erzielt werden [6]. Es existieren sieben BMP-Rezeptoren. Dabei handelt es sich um Transmembran-Serin/Threonin-Kinasen, die sich in zwei Subfamilien unterteilen. BMP-Typ-I-Rezeptoren werden nach Ligandenbindung durch die konstitutiv aktiven Typ-II-Rezeptoren in ihrer zytoplasmatischen GS-Box phosphoryliert und aktiviert. Die Zusammensetzung des heterotetrameren Rezeptorkomplexes aus zwei Typ-I- und zwei Typ-II-Rezeptoren und deren Interaktion mit Ko-Rezeptoren bestimmt die Intensität der Aktivierung der Signalkaskade. Letztere können periphere oder integrale Membranproteine sein, die wie z. B. BAMBI als Pseudorezeptoren die Bildung von aktiven Rezeptorkomplexen und so die Signalweiterleitung inhibieren [7]. Für einige BMPs ist

beschrieben, dass sie entweder hochaffin an ihren präferierten Typ-I-Rezeptor binden, was zur Rekrutierung von Typ-II-Rezeptoren führt, oder einen präassemblierten Rezeptorkomplex bestehend aus Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren binden und aktivieren. Stabilität und Aktivität der Rezeptoren werden vor allem durch deren Endozytose, ihre laterale Membranmobilität und assoziierte Proteine reguliert [8]. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor phosphoryliert nachgeschaltete Signalproteine. Für den kanonischen Signalweg sind dabei die Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads 1/5/8) die zentralen Mediatoren, welche nach Phosphorylierung heterotrimere Komplexe mit *common mediator*(Co)-Smad4 bilden und in den Nukleus translozieren (**Abb. 1**). Dort aktivieren sie zusammen mit Ko-Aktivatoren die Transkription von BMP-Zielgenen, wie z. B. *inhibitors of differentiation* (IDs). ID-Proteine binden und inhibieren *basic helix-loop-helix*(bHLH)-Transkriptionsfaktoren und spielen so vor allem in der Embryogenese und Differenzierung von Stamm- und Gewebeerläuferzellen eine Schlüsselrolle. Die BMP-induzierte Regulation von Transkriptionsfaktoren führt zu vielfältigen Signalantworten, welche in physiologischen Prozessen wie der Osteogenese relativ gut, im pathologischen Kontext aber weitaus weniger verstanden sind.

Die Aktivität der Smad-Proteine selbst wird ebenfalls streng kontrolliert. So wird deren Stabilität durch spezifische Ubiquitinligasen, Kinasen, Phosphatasen und Gerüstproteine moduliert, sodass die Signalkaskade spezifisch verstärkt oder abgeschaltet werden kann [7]. Die Signaltermination erfolgt dabei über deren Export ins Zytosol und/oder proteasomalen Abbau. Außerdem wird BMP-abhängig ein negatives Feedback induziert, bei welchem zeitversetzt exprimierte inhibitorische Smads (I-Smads 6/7) mit den R-Smads um Rezeptor- und Smad4-Bindung konkurrieren und die Signalweiterleitung inhibiert wird (**Abb. 1**). Diese hochkomplexe Regulation durch Kontrollproteine (*control freaks*), negatives Feedback und *gate keepers*, welche Knotenpunkte im Signalweg darstellen, ist nötig, um die pleiotrope Kaskade zu steuern.

Neben dem Smad-Signalweg werden verschiedene non-Smad-Signalkaskaden von aktivierten BMP-Rezeptoren initiiert. Die Entscheidung, welche Wege den Rezeptoren nachgeschaltet eingeschlagen werden, hängt von der Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes zum Zeitpunkt der Ligandenbindung, dessen subzellulärer Lokalisation und den entsprechenden assoziierten Proteinen ab. Zu den non-Smad-Signalwegen gehören die Aktivierung von *mitogen-activated protein*(MAP)-Kinasen (p38, JNK, ERK1/2), PI3K/Akt und RhoGTPasen (**Abb. 1**). Beispielsweise interagiert XIAP mit den BMP-Rezeptoren und assoziiert so die TAK1-Kinase an den Rezeptorkomplex, welche BMP-abhängig MAP-Kinasen aktiviert [9]. Non-Smad-Signalwege führen sowohl zu transkriptionellen Veränderungen als auch zu direkten zellulären Antworten wie Migration und Reorganisation des Zytoskeletts (**Abb. 2A**, [10]). Hier ist die subzelluläre Verteilung der entsprechenden non-Smad-Effektoren und die daraus resultierende lokale Interaktion mit den BMP-Rezeptoren wichtig, um eine gerichtete Antwort als Reaktion auf chemotaktische sowie biomechanische Signale in Zellen auszulösen [10, 11].

Vom molekularen Detail zum physiologischen Kontext

Im Fokus unserer Forschung steht, molekulare Prozesse der BMP-Signaltransduktion zu verstehen, um so zugrunde liegende gemeinsame, aber auch andersartige mechanistische Konzepte innerhalb des Organismus identifizieren zu können. Dazu analysieren wir die physiologischen und pathophysiologischen Auswirkungen der BMP-Signalgebung in unterschiedlichen Zellsystemen.

In diesem Zusammenhang konnten wir z. B. den molekularen Mechanismus der BMP2-induzierten Chemotaxis mesenchymaler Vorläuferzellen aufklären. Dieser wird über die BMPRII-assoziierte regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), p55y, vermittelt (**Abb. 2A**, [10]). Durch *scratch-wound healing*- und Chemotaxis-Assays sowie diverse proteinbiochemische Methoden konnten wir zeigen, dass BMP2 über p55y und die daran gebundene katalytische Untereinheit p110 α die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) induziert, was zur Rekrutierung des PH-Domänenproteins LL5 β an die Membran führt. Dies resultiert in der Quervernetzung von cortikalem Aktin, der Bildung von Lamellipodien und löst gerichtete Zellmigration aus [10]. Zelluläre Chemotaxis zu einem BMP2-Gradienten ist vor allem im Kontext der Differenzierung von Vorläuferzellen relevant. Die Ausbildung von Mikrotubuli an der *leading edge* migrierender Zellen sowie die Untersuchung anderer Aktin-regulierender Proteine ist Gegenstand aktueller Forschung in unserer Gruppe (**Abb. 2A**, Immunfluoreszenz).

Im Hinblick auf Pathologien, die mit dem BMP-Signalweg assoziiert sind, untersuchen wir derzeit molekulare Details verschiedener muskuloskeletaler und vaskulärer Erkrankungen. Die signifikante Rolle von BMPs in der Regulation dynamischer Prozesse im Blutgefäßsystem wird in aktuellen Forschungsergebnissen deutlich. In der Arbeit von A. Benn *et al.* [12] konnten wir zeigen, dass BMP6 die Permeabilität des Endothels durch Auflockerung der Zell-Zell-Kontakte induziert, was für Prozesse wie Endotheliale-mesenchymale-Transition (EndMT), Angiogenese, aber auch Transzytose von Zellen aus den Blutgefäßen zu Organen von großer Bedeutung ist. Unter Verwendung zweier komplementärer Assays (FITC-Dextran-Assay, transendotheliale elektrische Resistenzmessungen, **Abb. 2B**) konnten wir nachweisen, dass BMP6 mit ähnlicher Effizienz wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) die Zellver-

bindungen des Endothels auflöst. Hierbei wurde der Fluss von fluoreszierendem Dextran oder die elektrische Resistenz durch einen *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC)-*monolayer* gemessen und beides positiv mit der Permeabilität der Zellen korreliert. Die Verwendung des BMP-spezifischen Inhibitors LDN193189 hebt den BMP6-induzierten Effekt auf (**Abb. 2B**, links) und bestätigt dadurch eine VEGF-unabhängige Regulierung der Permeabilität durch die BMP-Kaskade. Dieser neue Mechanismus, der durch die Aktivierung der Tyrosinkinase Src und die Phosphorylierung und daraus resultierende Endozytose von vaskulär-endotheliale (VE)-Cadherin wirkt, wurde in der gleichen Publikation gezeigt [12].

Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, dass die molekulare Untersuchung neuartiger Regulationsmechanismen notwendig ist, um Feinabstimmungen und die Spezifität der BMP-Kaskade zu verstehen. Ferner ist es bedeutsam, neue Erkenntnisse über komplexe Signalnetzwerke zu erlangen, um sich diese zukünftig im Kontext von physiologischen, aber besonders pathologischen Prozessen für neue therapeutische Ansätze zur gezielten Intervention und Prävention zunutze zu machen.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der *Berlin School of Integrative Oncology* (BSIO), der *Berlin Brandenburg School for Regenerative Therapies* (BSRT), dem BMBF und der Sonnenfeld Stiftung für finanzielle Unterstützung unserer Arbeit. Weiterhin danken wir allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere C. Hiepen für Abbildung 2A und A. Benn für Abbildung 2B. Abbildung 2B wurde mit Genehmigung vom

Journal of Cell Science adaptiert [12]. Dank gilt auch dem *somersault18:24*-Team für die Bereitstellung ihrer *Library of Science & Medical Illustrations*. ■

Literatur

- [1] Horbelt D, Denkis A, Knaus P (2012) A portrait of transforming growth factor β superfamily signalling: background matters. *Int J Biochem Cell Biol* 44:469–474
- [2] Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893–899
- [3] Wagner DO, Sieber C, Bhushan R et al. (2010) BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal* 3:mr1
- [4] Shore EM, Xu M, Feldman GJ et al. (2006) A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet* 38:525–527
- [5] Gordon KJ, Blobe GC (2008) Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1782:197–228
- [6] Yadin D, Knaus P, Mueller TD (2016) Structural insights into BMP receptors: specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 27:13–34
- [7] Sieber C, Kopf J, Hiepen C et al. (2009) Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:343–355
- [8] Guzman A, Zelman-Femiak M, Boergemann JH et al. (2012) SMAD versus non-SMAD signaling is determined by lateral mobility of bone morphogenetic protein (BMP) receptors. *J Biol Chem* 287:39492–39504
- [9] Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J et al. (1999) XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J* 18:179–187
- [10] Hiepen C, Benn A, Denkis A et al. (2014) BMP2-induced chemotaxis requires PI3K p55y/p110 α -dependent phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate production and LL5 β recruitment at the cytocortex. *BMC Biol* 12:43
- [11] Kopf J, Petersen A, Duda GN et al. (2012) BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signalling events in the BMP pathway. *BMC Biol* 10:37
- [12] Benn A, Bredow C, Casanova I et al. (2016) VE-Cadherin facilitates BMP-induced endothelial cell permeability and signaling. *J Cell Sci* 129:206–218

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Petra Knaus
Institut für Chemie und Biochemie – Biochemie
Freie Universität Berlin
Thielallee 63
D-14195 Berlin
Tel.: 030-838-52935
Fax: 030-838-452936
knaus@chemie.fu-berlin.de

AUTORINNEN



Gina Dörpholz

2005–2011 Studium der Biowissenschaften und Biochemie, Universität Potsdam. 2012–2016 Promotion am Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin; dort seit 2016 Postdoc.



Patrizia Weigell

2009–2014 Studium der Biologie und Neurowissenschaften, Universität Regensburg. Seit 2014 Promotion am Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin.



Petra Knaus

1980–1986 Biologiestudium, Universität Heidelberg. 1986–1991 Promotion am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH). 1991–1996 Postdoc am Whitehead Institute for Biomedical Research, MIT, Cambridge, USA. 1996–2002 Arbeitsgruppenleiterin und Habilitation am Institut für Physiologische Chemie II, Universität Würzburg, dort 2002–2004 Assistenzprofessor. Seit 2004 C3-Professur für Biochemie, FU Berlin. Seit 2007 W3-Professur für Biochemie und Molekulare Grundlagen der Regeneration, FU Berlin und Charité Berlin.