

# Struktur- und Funktionsanalysen an BMP Ligand-Rezeptor Komplexen

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**SASCHA KELLER**

aus Dresden

Dezember 2004

Eingereicht am: .....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....  
2. Gutachter: .....  
der Dissertation

1. Prüfer: .....  
2. Prüfer: .....  
3. Prüfer: .....  
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: .....  
Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

*meinen Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
I.1	Die Bone Morphogenetic Proteins . . . . .	1
I.2	Strukturelle Grundlagen der molekularen Erkennung . . . . .	10
I.3	Zielstellung der Arbeit . . . . .	14
<b>II</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>15</b>
II.1	Abkürzungen (außer SI-Einheiten) . . . . .	15
II.2	Chemikalien und Enzyme . . . . .	16
II.3	Bakterienstämme . . . . .	17
II.4	Zelllinien . . . . .	17
II.5	Vektoren . . . . .	17
II.6	Sterilisieren . . . . .	17
II.7	Kulturmedien . . . . .	17
II.8	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i> . . . . .	18
II.8.1	Kulturbedingungen . . . . .	18
II.8.2	Stammhaltung . . . . .	18
II.8.3	Transformation von <i>E.coli</i> . . . . .	19
II.8.4	Expression von Proteinen als Thioredoxin-Fusionsprotein in <i>E.coli</i> . . . . .	19
II.9	Expression rekombinanter Proteine in <i>Sf-9</i> Zellen . . . . .	21
II.9.1	Kultivieren von <i>Sf-9</i> Insektenzellen . . . . .	21
II.9.2	Vitalitätsfärbung und Zelldichtebestimmung . . . . .	21
II.9.3	Co-Transfektion von <i>Sf-9</i> Zellen mit dem BaculoGold <sup>TM</sup> System . . . . .	22

---

II.9.4	Plaque-Assay . . . . .	22
II.9.5	Virusamplifikation (VA) . . . . .	23
II.9.6	Expression rekombinanter Proteine in <i>Sf</i> -9 Zellen . . . . .	23
II.10	Chromatographische Trennmethoden . . . . .	24
II.10.1	Metallchelat Affinitäts-Chromatographie . . . . .	24
II.10.2	BMP-2 Affinitäts-Chromatographie . . . . .	25
II.10.3	Affinitäts-Chromatographie an ConA-Sepharose 4B . . . . .	26
II.10.4	Ionenaustausch-Chromatographie . . . . .	27
II.10.5	Gelfiltrations-Chromatographie . . . . .	28
II.10.6	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) . . . . .	30
II.11	Proteinchemische Methoden . . . . .	31
II.11.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	31
II.11.2	Protein-Molekulargewichts-Standard für die SDS-PAGE . . . . .	31
II.11.3	Färbung von Proteingelen . . . . .	32
II.11.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen . . . . .	32
II.11.5	Deglycosylierungen von Glycoproteinen . . . . .	34
II.11.6	Spaltung von Proteinen mit Proteasen . . . . .	36
II.11.7	Automatisierte Peptidsequenzierung . . . . .	37
II.11.8	Massenspektrometrie von Proteinen . . . . .	37
II.12	Analyse von Protein-Protein Interaktionen mit der BIAcore-Technik . . . . .	37
II.12.1	Biotinylierung der Rezeptoren . . . . .	38
II.13	Präparation von Ligand-Rezeptor Komplexen . . . . .	39
II.13.1	Präparation von binären Ligand-Rezeptor Komplexen . . . . .	39
II.13.2	Präparation von ternären Ligand- Typ I und Typ II Rezeptor Komplexen . . . . .	40
II.14	Kristallisation von Proteinen . . . . .	41
II.14.1	Kristallisation von Ligand-Rezeptor Komplexen . . . . .	43
II.14.2	„Seeding“ von Proteinkristallen . . . . .	44
II.14.3	„Soaking“ von Proteinkristallen . . . . .	45
II.15	Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten . . . . .	45

II.16 Analyse von Röntgenbeugungsdaten . . . . .	47
II.16.1 Bestimmung der „Reflexphasen“ mit der Methode des Molekularen Ersatzes . .	51
II.17 Kristallographische Auswertung . . . . .	53
II.17.1 Verfeinerung mit dem Programm REFMAC . . . . .	55
II.17.2 Manuelles Bauen der Koordinaten . . . . .	55
II.17.3 Strukturelle Analyse des BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Ligand Rezeptor Komplexes . . . .	56
<b>III Ergebnisse</b>	<b>57</b>
III.1 Präparation der extrazellulären Domänen der Typ I Rezeptoren . . . . .	57
III.1.1 Präparation von BR-IA <sub>ec</sub> aus <i>E. coli</i> . . . . .	57
III.1.2 Präparation von BR-IB <sub>ec</sub> aus <i>E. coli</i> . . . . .	62
III.1.3 Präparation von BR-IB <sub>ec</sub> aus <i>Sf-9</i> Insektenzellen . . . . .	70
III.2 Präparation der extrazellulären Domänen der Typ II Rezeptoren . . . . .	81
III.2.1 Präparation von ActR-II <sub>ec</sub> aus <i>Sf-9</i> Insektenzellen . . . . .	81
III.2.2 Präparation von BR-II <sub>ec</sub> aus <i>E. coli</i> . . . . .	90
III.3 BIAcore Interaktionsanalysen der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung . . . . .	94
III.4 Präparation der Ligand-Rezeptor Komplexe . . . . .	97
III.4.1 Präparation der binären Ligand-Typ I Rezeptor Komplexe . . . . .	98
III.4.2 Präparation der binären Ligand-Typ II Rezeptor Komplexe . . . . .	104
III.4.3 Präparation der ternären Ligand-Typ I und Typ II Rezeptor Komplexe . . . .	106
III.5 Kristallisation und kristallographische Charakterisierung . . . . .	109
III.5.1 Kristallisation des BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes . . . . .	109
III.5.2 Kristallisation des BMP-2 : BR-IB <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes . . . . .	110
III.5.3 Kristallisation des BMP-6 : BR-IB <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes . . . . .	122
III.5.4 Kristallisation des GDF-5 : BR-IB <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes . . . . .	124
III.5.5 Kristallisation des GDF-5 : BR-IA <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes . . . . .	127
III.5.6 Kristallisation des BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> : ActR-II <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes .	128
III.6 Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten . . . . .	131
III.6.1 Datensatz des BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes . . . . .	131

---

III.6.2 Datensatz des BMP-2 : BR-IB <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes . . . . .	132
III.7 Verfeinerung der Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes .	136
III.7.1 Die Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bei einer Auflösung von 1,9Å . . . . .	136
III.7.2 Strukturlösung unter Anwendung der Methode des Molekularen Ersatzes . . . .	137
III.7.3 Das Ligand-Typ I Rezeptor Bindungsepitop . . . . .	142
<b>IV Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>146</b>
IV.1 Im Vergleich: Die Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes in 1,9Å und 2,9Å Auflösung . . . . .	146
IV.2 Der „Hot Spot“ der BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion . . . . .	148
IV.2.1 Die strukturelle und funktionelle Analyse des Netzwerkes von Wasserstoff-Brückenbindungen . . . . .	148
IV.2.2 Die Bedeutung der Prä-Helix Schleife L2 von BMP-2 für die Ligand-Rezeptor Interaktion . . . . .	150
IV.2.3 Die Bedeutung von Wassermolekülen in der BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Interaktionsfläche . . . . .	152
IV.3 Die Präparation und Kristallisation weiterer binärer Ligand-Rezeptor Komplexe . . . .	153
IV.4 Die Kristallisation ternärer Ligand-Rezeptor Komplexe . . . . .	159
<b>V Zusammenfassung</b>	<b>162</b>
<b>VI Summary</b>	<b>163</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>164</b>

# I Einleitung

## I.1 Die Bone Morphogenetic Proteins

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) wie auch die Growth and Differentiation Factors (GDFs) gehören der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie multifunktionaler Wachstumsfaktoren an [MASSAGUE, 1998]. Innerhalb dieser Superfamilie strukturell verwandter Proteine bilden sie neben den namensgebenden TGF- $\beta$ s, den Activinen und Inhibinen, der Müllerian Inhibiting Substance (MIS) und dem am entferntesten verwandten Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF) die gemeinsame Gruppe der BMPs und steuern als sekretierte Wachstumsfaktoren die Entwicklung und Homöostase nahezu aller Organe und Gewebe [HOGAN, 1996].

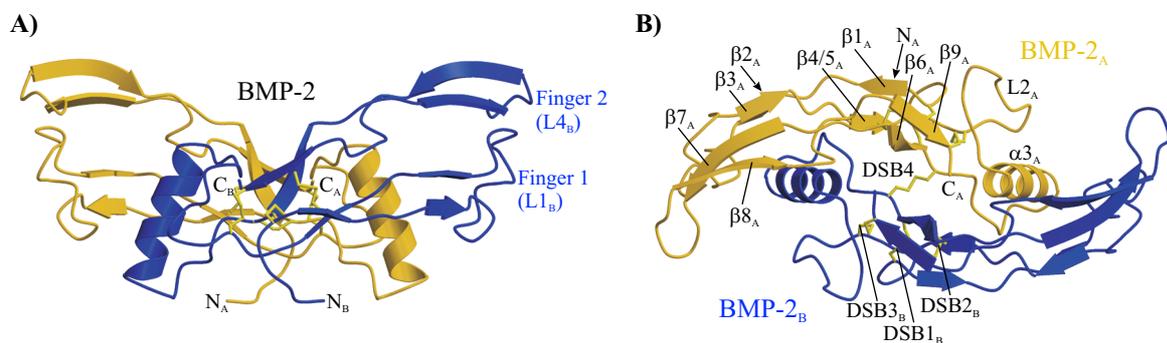
Die BMPs wurden ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit zur ektopen Knochen- und Knorpelbildung identifiziert [URIST, 1965; WOZNEY *et al.*, 1988]. In der Folge konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Proteine über ein weitaus umfangreicheres Spektrum an Funktionen verfügen, und sich ihre biologische Aktivität auf eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, wie Monozyten, Epithelzellen, Mesenchymalzellen sowie Neuronalzellen auswirkt [BALEMANS and VAN HUL, 2002]. Die BMPs steuern dabei die Proliferation, Differentiation, Apoptose, Neurogenese, die Bildung des Mesoderms, die Links-Rechts-Asymmetrie, aber auch die Entwicklung verschiedener Organe, wie zum Beispiel der Niere, der Lunge, des Herzens, des Gehirns, des Darms, der Zähne, der Gliedmaßen und der Geschlechtsorgane [KINGSLLEY, 1994; HOGAN, 1996; GRAFF, 1997; EBENDAL *et al.*, 1998; WOZNEY, 1998].

Die Mehrzahl der heute bekannten BMPs wurden in Vertebraten identifiziert. Darüber hinaus konnten BMP-ähnliche Proteine aber auch in *Drosophila melongaster* (Decapentaplegic (DPP), 60A und Screw) sowie in *Xenopus leavis* (Vg1) nachgewiesen werden. Zudem verfügt *Caenorhabditis elegans* ebenfalls über drei BMP-abhängige Signalwege. Die Aminosäuresequenzen dieser BMPs und BMP-ähnlichen Proteine sind dabei zwischen den Spezies hoch konserviert, womit sie gemeinsam, entsprechend ihrer strukturellen Übereinstimmung weiteren Untergruppen innerhalb der BMP-Familie zugeordnet werden können. So bilden BMP-2 und BMP-4, sowie DPP die Untergruppe der BMP-2s; BMP-6, BMP-7, BMP-8, 60A und Vg1 bilden die Untergruppe der BMP-7s und GDF-5, GDF-6 sowie GDF-7 werden zu den GDF-5s zusammengefasst [KAWABATA *et al.*, 1998].

Die BMPs werden wie alle TGF- $\beta$ -ähnlichen Faktoren aus größeren Vorläuferproteinen mit einer N-terminalen Signalsequenz sowie einer Pro-Domäne synthetisiert. Nach enzymatischer Spaltung dieser Vorläuferproteine am RXXR-Spaltmotiv durch Furin-ähnliche Proteasen [CONSTAM and ROBERTSON, 1999] wird das biologisch aktive Protein durch Dimerisierung des C-terminalen, zwischen 110 und 140 Aminosäure langen reifen Teils [SOWDHAMINI *et al.*, 1998] erhalten. Alle TGF- $\beta$ -ähnlichen Faktoren sind Homodimere, abgesehen von den heterodimeren Inhibinen. Sie zeichnen sich durch das „Cystin-Knoten“-Motiv aus [MURRY-RUST *et al.*, 1993; SUN and DAVIES, 1995], welches aus einer

charakteristischen Anordnung von drei Disulfidbrücken innerhalb der reifen Monomere besteht. Der siebte Cysteinrest formt die intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den Monomeren in nahezu allen Proteinen (außer GDF-3 und BMP-15). Eine zusätzliche intramolekulare Disulfidbrücke existiert bei den Activinen, GDF-8s, GDF-15s und TGF- $\beta$ s und fixiert das N-terminale Segment am „Cystin-Knoten“ [NICKEL *et al.*, 2002]

Das „Cystin-Knoten“-Motiv ist gleichzeitig die Grundlage für eine bemerkenswerte Übereinstimmung in der räumlichen Gesamtstruktur dieser zum Teil nur über geringe Sequenzhomologie verwandten Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie. So konnten bisher die dreidimensionalen Strukturen für BMP-2 [SCHEUFLER *et al.*, 1999], BMP-7 [GRIFFITH *et al.*, 1996], TGF- $\beta$ 1 [DAOPIN *et al.*, 1992; SCHLUNEGGER and GRUTTER, 1993], TGF- $\beta$ 3 [MITTL *et al.*, 1996] und GDNF [EIGENBROT and GERBER, 1997] mittels Röntgenkristallstrukturanalyse ermittelt und die des TGF- $\beta$ 2 [HINCK *et al.*, 1996] aus NMR-Daten erhalten werden. Sie alle zeigen eine sehr ähnliche schmale, längliche und gewölbte Anordnung der Monomere, deren Form mit einer offenen linken Hand beschrieben werden kann („open left hand“-Modell [SCHEUFLER *et al.*, 1999; DAOPIN *et al.*, 1992]). Hierbei symbolisiert der N-Terminus den Daumen und die zwei, jeweils aus zwei unterbrochenen  $\beta$ -Strängen aufgebauten  $\beta$ -Faltblätter die Finger 1 und 2. An der Spitze des Fingers 1 befindet sich die Schleife L1. In Finger 2 kreuzen sich die  $\beta$ -Stränge. Die zentrale  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ 3 repräsentiert die Handfläche und ist von den  $\beta$ -Strängen  $\beta$ 5 und  $\beta$ 6 eingeschlossen (siehe Abbildung I.1). Die Anordnung der Monomere im Dimer ergibt sich durch die Rotation um eine zweifache Drehachse in der Fingerebene, sodass beide N-Termini in die gleiche Richtung zeigen (siehe auch Abbildung I.3, sowie Abbildung III.72 in Kapitel III.7.1).



**Abbildung I.1:** Kristallstruktur von BMP-2 nach SCHEUFLER *et al.* [1999].

**A)** Seitenansicht, die Monomere BMP-2<sub>A</sub> und BMP-2<sub>B</sub> sind in gelb bzw. blau dargestellt. **B)** Draufsicht (90° um die *x*-Achse gedreht abgebildet), die Sekundärstrukturmerkmale sind für das Monomer BMP-2<sub>A</sub> angegeben. DSB1, DSB2 und DSB3 kennzeichnen die Disulfidbrücken des „Cystin-Knoten“-Motivs für das Monomer BMP-2<sub>B</sub> und DSB4 markiert die intermolekulare Disulfidbrücke.

Die BMPs und GDFs, wie auch die anderen Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie vermitteln ihr Signal durch die Bindung an zwei Typen transmembranärer Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, die als Typ I und Typ II bezeichnet werden [HELDIN *et al.*, 1997; MASSAGUE, 1998] und auf der Zelloberfläche einzeln oder in homo- und heterodimern Rezeptor-Rezeptor Komplexen vorliegen können [GILBOA *et al.*, 2000]. Beide Rezeptortypen bestehen dabei aus einer relativ kurzen extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einem einzelnen Transmembransegment und der zytoplasmatischen Domäne welche die Kinase enthält. Im Fall des Typ II Rezeptors ist diese Serin/Threonin-Kinase konstitutiv aktiv,

wohingegen die Kinaseaktivität des Typ I Rezeptors von einer Ligandenbindung und Aktivierung durch den Typ II Rezeptor abhängig ist.

Im Gegensatz zur großen Anzahl an Liganden konnten im humanen Genom bisher nur sieben Typ I und fünf Typ II Rezeptoren identifiziert werden [MANNING *et al.*, 2002]. Ihre Einteilung erfolgt entsprechend struktureller und funktioneller Eigenschaften. Zur Gruppe der Typ I Rezeptoren zählen der TGF- $\beta$  Typ I Rezeptor (T $\beta$ R-I), der Activin Typ IB Rezeptor (ActR-IB) und die Activin receptor-like kinase (Alk7), die beiden BMP Typ I Rezeptoren BR-IA und BR-IB, sowie als dritte Untergruppe der Alk1 und der ActR-I. Die Typ II Rezeptoren sind der TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor (T $\beta$ R-II), der BMP Typ II Rezeptor (BR-II), die beiden Activin Typ II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB sowie der Müllerian Inhibiting Substance Rezeptor (MISR) [DE CAESTECKER, 2004].

Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Rezeptoren mit unterschiedlichen Liganden, aber auch die Liganden mit unterschiedlichen Rezeptoren wechselwirken können. Dabei unterscheiden sie sich nicht nur in der Spezifität, sondern auch in der Affinität ihrer Ligand-Rezeptor Wechselwirkung. In Tabelle I.1 sind die bisher nachgewiesenen Interaktionen der einzelnen Ligandengruppen zusammengefasst.

**Tabelle I.1:** Promiskuität der Liganden-Rezeptor Interaktion nach MIYAZONO *et al.* [2001].

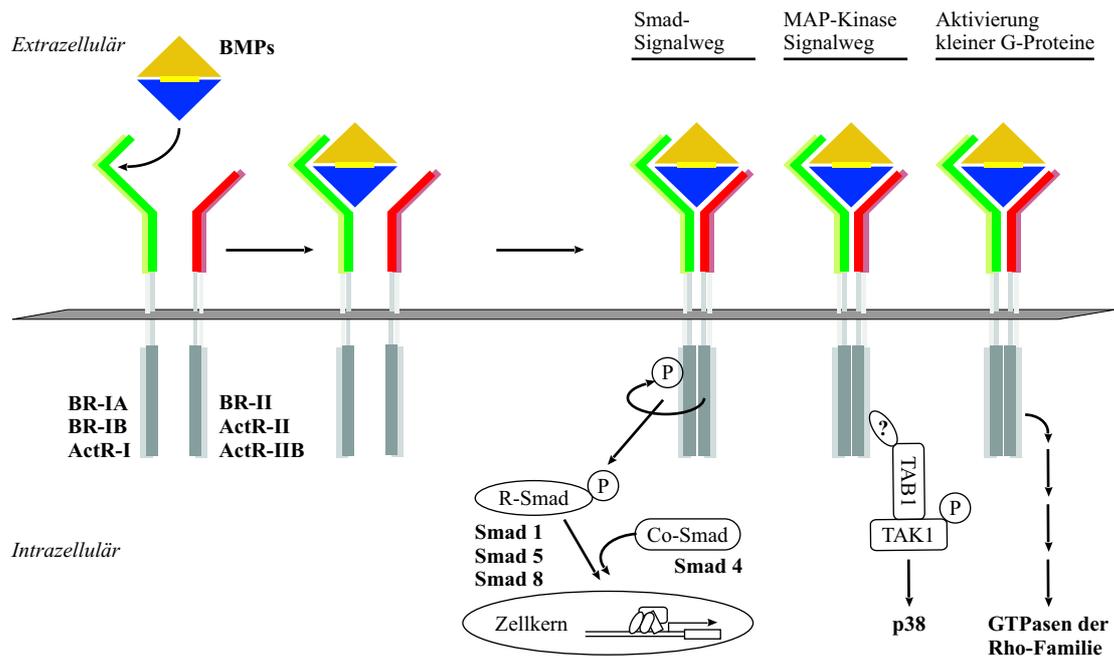
Liganden	Typ II Rezeptor	Typ I Rezeptor	R-Smad	Co-Smad
TGF- $\beta$ s	T $\beta$ R-II	T $\beta$ R-I Alk1*	Smad 2 Smad 3	Smad 4
Activine	ActR-II ActR-IIB	ActR-IB Alk7?	Smad 3	
BMP-2s	BR-II	BR-IA		
BMP-7s	ActR-II	BR-IB	Smad 1	Smad 4
GDF-5s	ActR-IIB	ActR-I	Smad 5	
MIS	MISR	BR-IB BR-IA <sup>†</sup> ActR-I <sup>†</sup>	Smad 8	

\* Alk1 aktiviert Smad 1, Smad 5 und Smad 8, <sup>†</sup> VISSER [2003]; DI CLEMENTE *et al.* [2003]

Die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Rezeptordomänen startet den Signalweg in dessen Folge ein heterooligomerer Signalkomplex gebildet wird an dem jeweils zwei Typ I und Typ II Rezeptoren an der Ligandenbindung beteiligt sind.

Die Ligand-Rezeptor Interaktionen wurden von MASSAGUE [1998] auf der Grundlage von Quervernetzungs- („Crosslink-“) Experimenten in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe zu denen die TGF- $\beta$ s und die Activine gehören folgen in ihrer Rezeptoraktivierung dem „sequenziellen Bindungsmodus“. Sie binden zunächst mit hoher Affinität an den Typ II Rezeptor und anschließend wird der Typ I Rezeptor in den Signalkomplex rekrutiert. Beleg für diese Reihenfolge in der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung ist die Tatsache, dass bisher keine Interaktion des freien Liganden mit seinem Typ I Rezeptor in Abwesenheit der Typ II Rezeptoren nachgewiesen werden konnte.

Im Gegensatz dazu konnte für die Gruppe der BMPs die Interaktion der freien Liganden unabhängig sowohl mit dem Typ I, als auch mit den Typ II Rezeptoren durch „Crosslink“-Experimente bestätigt werden. Dabei binden die Liganden in Abwesenheit des Typ I Rezeptors mit geringer Affinität an den Typ II Rezeptor. Eine erhöhte Affinität der Ligand-Typ II Rezeptor Wechselwirkung wurde hingegen in Anwesenheit des Typ I Rezeptors erzielt. Der Wechselwirkung wird daher mit einem „kooperativen Bindungsmodus“ beschrieben.



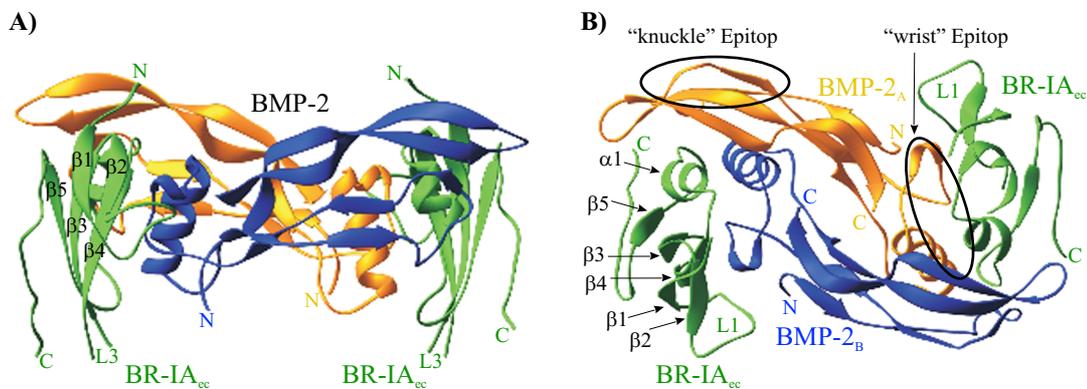
**Abbildung I.2:** Schematische Darstellung der BMP Signalwege.

Die homodimeren Liganden sind gelb und blau dargestellt. Die Typ I Rezeptoren sind durch grüne und die Typ II Rezeptoren durch rote extrazelluläre Domänen gekennzeichnet.

In Abbildung I.2 sind in schematischer Darstellung die BMP Signalwege gezeigt. Nach Ligandenbindung an den Typ I Rezeptor (BR-IA oder BR-IB) mit hoher Affinität erfolgt die Rekrutierung des niederaffin bindenden Typ II Rezeptors (BR-II, ActR-II oder ActR-IIB) in den Signalkomplex [KIRSCH *et al.*, 2000a]. Intrazellulär aktiviert die konstitutiv aktive Kinase des Typ II Rezeptors den Typ I Rezeptor durch Transphosphorylierung am charakteristischen SGSGSG-Sequenzmotiv, der so genannten GS-Box [WRANA *et al.*, 1994]. Die so aktivierte BMP Typ I Rezeptor Kinase phosphoryliert ihrerseits die intrazellulären Mediatorproteine, die R-Smads (rezeptor-assoziierte Smads). Von den BMP Typ I Rezeptoren werden dabei, im Gegensatz zu den TGF- $\beta$ /Activin Typ I Rezeptoren (R-Smads: Smad 2 und Smad 3) die R-Smads Smad 1, Smad 5 und Smad 8 erkannt (siehe auch Tabelle I.1). Nach Assoziation mit einem Co-Smad (Smad 4) erfolgt deren Translokation in den Zellkern, wo nach Anlagerung dieses Komplexes an Transkriptionsfaktoren die Aktivierung der Zielgene erfolgt [VON BUBNOFF and CHO, 2001]. Zusätzlich zum Smad-Signalweg können durch die BMPs aber auch der MAP-Kinase Signalweg [NOHE *et al.*, 2004] oder kleine G-Proteine [LIU and JESSEL, 1998; LEE-HOEFLICH *et al.*, 2004] aktiviert werden.

Speziell für die Gruppe der BMPs und GDFs konnte gezeigt werden, dass die BMP-2s bevorzugt an die BMP Typ I Rezeptoren BR-IA und BR-IB, möglicherweise aber auch an den ActR-I [CHUVA DE SOUSA LOPES *et al.*, 2004] binden und nachfolgend den BR-II, ActR-II oder ActR-IIB als mögliche Typ II Rezeptoren in den Signalkomplex rekrutieren [MASSAGUE, 1998; LIU *et al.*, 1995; KOENIG *et al.*, 1994; TEN DIJKE *et al.*, 1994b]. Für das BMP-6 gelten der BR-IA, BR-IB aber auch der ActR-IA als potentielle Typ I Rezeptoren und der ActR-II oder ActR-IIB werden als Typ II Rezeptor verwendet [EBISAWA *et al.*, 1999]. Lediglich das GDF-5 verfügt nach NISHITOH *et al.* [1996] über einen einzigen Typ I Rezeptor, den BR-IB, wohingegen wie beim BMP-2 sowohl BR-II, ActR-II als auch ActR-IIB als Typ II Rezeptoren mit diesem Liganden zur Signalvermittlung interagieren.

Der erste Schritt hin zu einem detaillierteren Verständnis der molekularen Grundlagen der BMP Ligand-Rezeptor Interaktion konnte durch die röntgenkristallographische Beschreibung der von KIRSCH *et al.* [2000c] mit einer Auflösung von 2,9Å ermittelten dreidimensionalen Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes erreicht werden. Dieser ist in Abbildung I.3 dargestellt und zeigt die Bindung von zwei extrazellulären Domänen des BR-IA (in grün) an den homodimeren Liganden BMP-2 (Monomere in blau und gelb) in der Seitenansicht in Bildteil A) und in der Draufsicht in Bildteil B). Die beiden Rezeptorketten binden dabei jeweils in den Finger-Helix Vertiefungen am BMP-2 und haben Kontakt zu beiden Monomeren. Aufgrund des „open left hand“-Modells des freien Liganden wird der Bindungsbereich daher als das „wrist“-Epitop (Handgelenk-Epitop) bezeichnet. Die zweifache Symmetrie des freien BMP-2 bleibt auch im Komplex erhalten. Die N-Termini der beiden Rezeptorketten deuten von der Membran weg, wohingegen die um 65Å voneinander entfernten C-Termini zur Membran hin zeigen.



**Abbildung I.3:** Die Röntgenkristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes nach KIRSCH *et al.* [2000c].

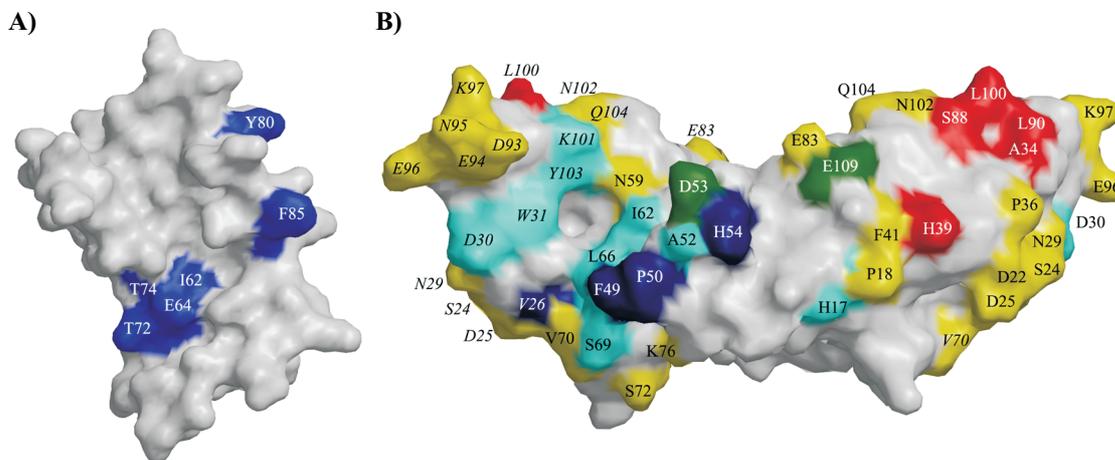
**A)** Seitenansicht mit der membranständigen Seite an der Bildunterkante. **B)** Draufsicht annähernd entlang der zwei-zähligen Symmetrieachse. Die Monomere des BMP-2 (BMP-2<sub>A</sub> und BMP-2<sub>B</sub>) sind in gelb bzw. blau und die extrazellulären Domänen des BR-IA (BR-IA<sub>ec</sub>) in grün dargestellt. Sekundärstrukturmerkmale, die N- und C-Termini sowie die Rezeptor-Schleifen L1 und L3 sind gekennzeichnet. Das „wrist“-Epitop und das postulierte „knuckle“-Epitop sind besonders hervorgehoben.

Die strukturelle Charakterisierung des „wrist“-Epitops ergab eine Bindungsfläche mit einer Größe von jeweils 1130Å<sup>2</sup> und wird zu 67% von Monomer A (BMP-2<sub>A</sub>) und zu 33% von Monomer B (BMP-2<sub>B</sub>) des BMP-2 gebildet. Insgesamt 24 Reste des BMP-2 sind an der Bindung des BR-IA<sub>ec</sub> beteiligt und befinden sich in der Prä-Helix Schleife L2 und auf der Helix α3 von Monomer A, sowie in Schleife L1 und im β-Strang 8 des zweiten Monomers (BMP-2<sub>B</sub>). Es lassen sich drei Bereiche innerhalb des Bindungsepitops unterscheiden; (1) die „hydrophobe Vertiefung“ (übereinstimmend mit der Finger-Helix Vertiefung [KIRSCH *et al.*, 2000c]), (2) der „Rand“ und (3) die „Prä-Helix Schleife L2“ [NICKEL *et al.*, 2002]. Dabei wird im BMP-2 der Boden der „hydrophoben Vertiefung“ von den Resten Met89<sub>B</sub> (β7), Met106<sub>B</sub> (β8) und Val63<sub>A</sub> (α3) gebildet und an den Seiten durch die Reste Trp28<sub>B</sub> und Trp31<sub>B</sub> aus Schleife L1, Lys101<sub>B</sub> und Tyr103<sub>B</sub> aus β8, sowie Asn59<sub>A</sub>, Ile62<sub>A</sub> und Leu66<sub>A</sub> aus Helix α3 begrenzt. Die Reste der Prä-Helix Schleife L2 Pro48<sub>A</sub> bis His54<sub>A</sub> und Asn56<sub>A</sub> füllen die Vertiefung. Kontakte vom Liganden zum Rezeptor erfolgen ebenfalls durch die Reste Val26<sub>B</sub> und Gly27<sub>B</sub> aus der Schleife L1, sowie Ser69<sub>A</sub> und Val70<sub>A</sub> aus der Schleife L3 am unteren „Rand“ des BMP-2.

Als zentraler Kontakt zwischen BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub> wurde das so genannte „knob-into-hole“ Motiv von KIRSCH *et al.* [2000c] herausgestellt. Es beschreibt die Interaktion der aus dem Rezeptor-Helix  $\alpha 1$  herausstehende Seitenkette des Phe85, welche in die „hydrophobe Vertiefung“ auf dem BMP-2 ragt und von den Resten Ile62<sub>A</sub>, Val63<sub>A</sub>, Leu66<sub>A</sub>, sowie Trp28<sub>B</sub>, Trp31<sub>B</sub>, Met89<sub>B</sub>, Tyr103<sub>B</sub> und Met106<sub>B</sub> umbettet wird. Dieser große hydrophobe Rest ist spezifisch für alle Typ I Rezeptoren (außer Alk1). Unter zusätzlicher Berücksichtigung der hohen Konservierung der Reste im „wrist“-Epitop für die Liganden der TGF- $\beta$ -Superfamilie wurde der „knob-into-hole“ Interaktion eine Spezifität bestimmende Bedeutung in der Ligand-Typ I Rezeptor Wechselwirkung zugeschrieben.

Neben der offensichtlichen Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen für die Ligand-Rezeptor Interaktionen konnten gleichzeitig auch 11 Wasserstoff-Brückenbindungen im Kontakt zwischen BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub> ermittelt werden [NICKEL *et al.*, 2002]. Ihr Einfluss auf die Komplexbildung ließ sich strukturell, aufgrund der relativ geringen Auflösung nicht eindeutig belegen. Bemerkenswert erschien jedoch, dass mehrerer Hauptkettenatome sowohl auf dem BMP-2 als auch auf dem BR-IA<sub>ec</sub> an der Ausbildung dieser Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligt sind und zumindest zwei Hauptketten-Hauptketten H-Brücken gebildet werden.

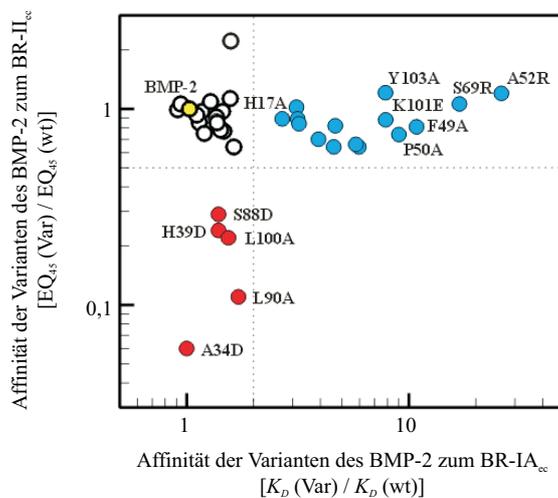
Die funktionelle Bestätigung des Bindungsepitops für die BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion erfolgte parallel durch Mutationsanalyse in dem einzelne Reste sowohl gegen Alanin, als auch gegen geladene Aminosäuren ausgetauscht wurden, um so deren einzelnen Beitrag an der Bindungsenergie zu bestimmen. Hierfür wurden sowohl BIAcore Interaktionsanalysen von der Varianten des BMP-2 am BR-IA<sub>ec</sub> sowie den Typ II Rezeptoren BR-II<sub>ec</sub> und ActR-II<sub>ec</sub>, als auch biologische Assays



**Abbildung I.4:** Mutationsanalyse der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Wechselwirkung. Oberflächendarstellung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Bindungsepitops in der „open book“ Ansicht (BR-IA<sub>ec</sub> ist um 180° um die *y*-Achse gedreht abgebildet)

**A)** BR-IA<sub>ec</sub>: Reste mit verminderter Ligandenbindung sind blau hervorgehoben [HATTA *et al.*, 2000].  
**B)** BMP-2: Reste mit verminderter BR-IA<sub>ec</sub> Rezeptorbindung sind in blau (hellblau - erhöhte Dissoziationsrate ( $k_{off}$ ), dunkelblau - verringerte Assoziationsrate ( $k_{on}$ )), sowie diejenigen Reste mit Beteiligung an der Typ II Rezeptor Interaktion sind in rot dargestellt. Des Weiteren sind die Reste mit einer erhöhten Bindung zum BR-IA<sub>ec</sub> in grün und die Reste ohne Einfluss auf die Bindungsenergie zum Typ IA oder Typ II Rezeptor gelb unterlegt [KIRSCH *et al.*, 2000a].

in C2C12 Zellen durchgeführt [KIRSCH *et al.*, 2000a]. Abbildung I.4 Bildteil B) zeigt zusammenfassend die von KIRSCH *et al.* [2000a] publizierten Ergebnisse dieser Analyse. Für die in hellblau bzw. dunkelblau dargestellten Reste auf der Oberfläche des BMP-2 konnte eine verminderte Affinität nach Substitution der Seitenketten ermittelt werden. Die Lage dieses funktionellen Bindungsepitops stimmt mit dem aus der Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand- Rezeptor Komplexes bestimmten „wrist“-Epitops überein. Mit der quantitativen Auswertung wie sie in Abbildung I.5 wiedergegeben ist, konnte jedoch keiner der an der Ligand-Rezeptor Bindung beteiligten Reste als die Hauptbindungs determinante der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Interaktion ermittelt werden. So reduzierten Alanin-Substitutionen die Affinität nur maximal um das 10fache (F49A) und bei Einführung geladener Seitenketten nur bis zu 30fach (A52R).



**Abbildung I.5:** Diagramm der relativen Bindungsenergien für die Interaktion der Varianten des BMP-2 zum BR-IA<sub>ec</sub> (in blau) bzw. zum BR-II<sub>ec</sub> (in rot) [KIRSCH *et al.*, 2000a].

Übereinstimmende Ergebnisse wurden auch mit Alanin-Substitutionen von Resten im Bindungsepitop von BR-IA<sub>ec</sub> erhalten [HATTA *et al.*, 2000]. In Abbildung I.4 Bildteil A) sind die Reste deren Seitenketten mit einem Beitrag zur Bindungsenergie des BMP-4 an den BR-IA<sub>ec</sub> ermittelt wurden in blau auf das Oberflächenmodell der extrazellulären Domäne des Rezeptors eingetragen. F85A und I62A zeigten mit 15fach reduzierter Affinität gegenüber wild-typischen (wt) BMP-4 den größten Effekt. Für die weiteren Substitution (E64A, T72A und T67A) konnten nur noch geringe Beiträge zur Bindungsenergie nachgewiesen werden (drei- bis fünffach verminderte Affinität nach Alanin-Substitution). Die Frage nach der Hauptbindungs determinante der BMP-Typ I Rezeptor Wechselwirkung erscheint daher nach wie vor ungeklärt, wenngleich der Aufbau des Bindungsepitops auch ein Modell der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung ohne derartige Determinante zulässt. In diesem Fall wäre die Bindungsenergie eine Summe geringerer Beiträge einzelner Reste der entsprechenden Epitope auf dem Liganden sowie dem BR-IA<sub>ec</sub>.

Darüber hinaus konnte auch die besondere funktionelle Bedeutung von Phe85 als Spezifität und Affinität der BMP-Typ I Rezeptor Wechselwirkung bestimmender Rest, wie aus der strukturellen Interpretation des Bindungsepitops ermittelt, nicht bestätigt werden. Auch ist die generelle Bedeutung des „knob-into-hole“ Motivs für die Ligand-Typ I Rezeptor Wechselwirkung in der TGF- $\beta$ -Superfamilie, wie sie von KIRSCH *et al.* [2000c] postuliert wurde, erst kürzlich wieder in Frage gestellt worden. So konnte HARRISON *et al.* [2003] durch Alanin-Substitution des dem Phe85 (BR-IA) entsprechenden Restes im ActR-IB (F82A) zeigen, dass die Bindungsaffinität zum Liganden unverändert bleibt.



schließen. Umso bemerkenswerter erscheint daher das Ergebnis der von [HART *et al.*, 2002] publizierten röntgenkristallographischen Analyse des TGF- $\beta$ 3 : T $\beta$ R-II $_{ec}$  Ligand-Rezeptor Komplexes. Wie in Abbildung I.6 Bildteil B) gezeigt, binden die zwei T $\beta$ R-II $_{ec}$  an jeweils identischen Fingersegmenten an der äußersten Spitze beider Monomere des TGF- $\beta$ 3. Der entsprechende Bindungsbereich unterscheidet sich dabei deutlich vom bisher beschriebenen „knuckle“-Epitop und wird als das „finger tip“-Epitop (Fingerspitzen-Epitop) bezeichnet.

Aufgrund dieses Unterschieds resultieren zwei voneinander verschiedene Modelle des ternären Ligand-Rezeptor Komplexes [GREENWALD *et al.*, 2003; HART *et al.*, 2002; SUN, 2003] mit weitreichenden Konsequenzen für eine mechanistische Beschreibung des kooperativen Effekts bei der Bildung des heterooligomeren Ligand-Typ I und Typ II Rezeptor Komplexes.

Bisherige Untersuchungen zur Liganden-induzierten Aktivierung von Rezeptoren mit einfacher Transmembrandomäne deuten dabei auf drei wesentliche Oligomerisierungs-Mechanismen von Signalkomplexen hin [SEBALD and MUELLER, 2003]. So verweist SCHLESSINGER [1988] auf einen allosterischen Mechanismus bei der Signalvermittlung des Epidermal Growth Factor (EGF) - Rezeptor Systems. Dabei wird mit der Bindung des Liganden EGF eine Konformationsänderung in der extrazellulären EGF-Rezeptordomäne erzeugt, welche eine Dimerisierung der EGF-Rezeptorketten über direkte Rezeptor-Rezeptor Interaktion und die nachfolgende Aktivierung der Signalkaskade ermöglicht [SCHLESSINGER, 2002].

Im Zytokin-Rezeptor System verfügen die Liganden dagegen über multiple Rezeptor-Bindungs epitope. Die Bindung des zweiten Rezeptor an den Signalkomplex wird dabei durch Kooperativität zwischen der niederaffinen Ligand-Rezeptor und einer direkten Rezeptor-Rezeptor Interaktion erreicht [BERNAT *et al.*, 2003].

Die Aktivierung Liganden-unabhängiger Rezeptorkomplexe gilt als dritter Oligomerisierungs-Modus, wobei mit der Bindung des Liganden eine Reorganisation des zuvor inaktiven Rezeptorkomplexes zu einem aktiven Signalkomplex erfolgt [LIVNAH *et al.*, 1999; HE and GARCIA, 2004]. Zur Beschreibung der Signalvermittlung durch die Zellmembran wird dabei das so genannte „piston“-Modell [OTTEMANN *et al.*, 1999] favorisiert, wonach die Konformationsänderung über einen Komplex der transmembranen Rezeptorsegmente weitergeleitet wird.

Das Modell des ternären BMP-7 : BR-IA $_{ec}$  : ActR-II $_{ec}$  Ligand-Rezeptor Komplexes, welches aus der Überlagerung der Kristallstrukturen des BMP-2 : BR-IA $_{ec}$  [KIRSCH *et al.*, 2000c] und des BMP-7 : ActR-II $_{ec}$  Ligand Rezeptor Komplexes erhalten wurde (siehe auch Abbildung IV.6 in Kapitel IV.4), weist hingegen auf keinen direkten Kontakt zwischen den Rezeptoren hin [GREENWALD *et al.*, 2003]. Darüber hinaus konnte auch der Einfluss der zytoplasmatischen Domäne auf die Liganden-induzierte Oligomerisierung der Rezeptoren ausgeschlossen werden [GREENWALD *et al.*, 2003].

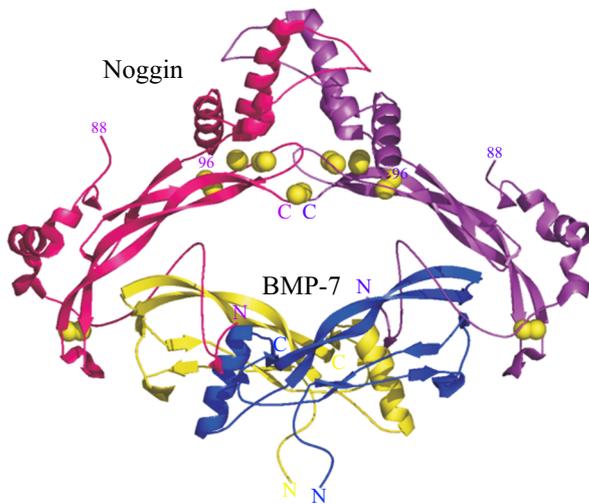
Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass es sich hier um einen neuen Modus der Liganden-induzierten kooperativen Rezeptoroligomerisierung handelt und die zweidimensionale Restriktion der Rezeptorketten in der Membran die Ursache für die Modulation der Affinität des niederaffinen Rezeptors darstellt [GREENWALD *et al.*, 2003, 2004; SEBALD and MUELLER, 2003].

Neben der Rezeptorbindung interagieren die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie mit einer Vielzahl weiterer Modulator-Proteinen. Diese kontrollieren den Zugang der Liganden zu den Rezeptoren und können aufgrund ihrer Funktion zwei generellen Klassen zugeordnet werden [SHI and MASSAGUE, 2003]. Die Erste umfasst die löslichen extrazellulären Faktoren, welche durch direkte Bindung zu den Liganden deren Interaktion mit den Signalrezeptoren verhindern und somit die biologische Funktion

inhibieren [MASSAGUE and CHEN, 2000; BALEMANS and VAN HUL, 2002]. Zu ihnen zählen unter anderem die drei Proteinfamilien der BMP-Antagonisten Noggin, Chordin/SOG und Dan/Cerberus. Der zweiten Klasse gehören die membran-verankerten Proteine an. Sie dienen als Co-Rezeptoren für verschiedene Signalkomplexe, wobei einige verstärkend (z.B. TGF- $\beta$  Typ III Rezeptor, [BROWN *et al.*, 1999]) und andere als Inhibitoren der Rezeptoraktivierung (z.B. BMP and Activin Receptor Membrane Bound Inhibitor - BAMBI, [ONICHTCHOUK *et al.*, 1999]) wirken.

Mit der Röntgenkristallstruktur des BMP-7 gebunden an Noggin gelang erstmals auch die strukturelle Charakterisierung der Ligand-Inhibitor Interaktion [GROPPE *et al.*, 2002]. Sie gewährt dabei wertvolle Einblicke in den Mechanismus über den diese löslichen extrazellulären Faktoren die Wechselwirkung der BMP-Liganden zu ihren Rezeptoren verhindern.

---



**Abbildung I.7:** Röntgenkristallstruktur des BMP-7 : Noggin Ligand-Inhibitor Komplexes nach GROPPE *et al.* [2002]. Seitenansicht des Komplexes mit dem homodimeren BMP-7 in gelb und blau und dem homodimeren Noggin in lila und magenta. Die Disulfidbrücken im Noggin sind entsprechend als gelbe cpk-Modelle dargestellt.

---

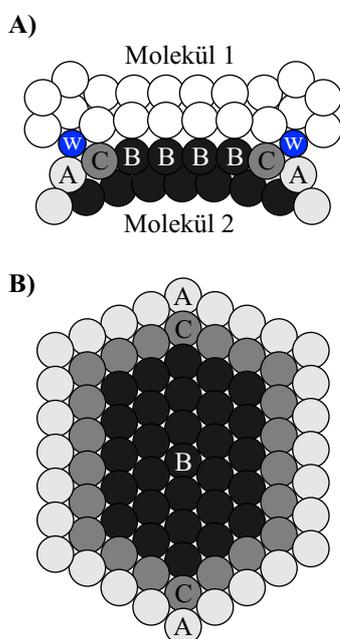
Wie in Abbildung I.7 dargestellt, umschließt das homodimere Noggin den Liganden, wodurch sowohl beide Typ I, als auch beide Typ II Rezeptor Bindungsflächen abgeschirmt werden. Der Hauptkontakt befindet sich dabei im Bereich des „knuckle“-Epitops von BMP-7, wohingegen das „wrist“-Epitop lediglich von einem kurzen N-terminalen Segment bedeckt wird. Diese Überlagerung der Bindungs-epitope der Ligand-Inhibitor und der Ligand-Rezeptor Interaktion lässt daher eine Konkurrenz um gemeinsame Bindungsdeterminanten vermuten.

## I.2 Strukturelle Grundlagen der molekularen Erkennung

Protein-Protein Interaktionen, wie sie auch in der Signalvermittlung der TGF- $\beta$ -Superfamilie gezeigt werden konnten, bilden den fundamentalen Mechanismus nahezu aller zellulärer Prozesse [VESELOVSKY *et al.*, 2002]. Die molekulare Erkennung der unterschiedlichen Bindungspartner wird dabei von physikalischen und chemischen Eigenschaften der Interaktionsfläche bestimmt, welche mittels strukturelle Methoden wie der Röntgenkristallstrukturanalyse oder NMR charakterisiert werden können. Über die vergleichende Analyse verschiedenster Komplexstrukturen hinsichtlich Größe [JONES and THORNTON, 1997], Form [LARSEN *et al.*, 1998; NOREL *et al.*, 1999] und Zusammensetzung [CHAKRABARTI and JANIN, 2002; LO CONTE *et al.*, 1999], sowie der hydrophoben [TSAI *et al.*, 1997;

YOUNG *et al.*, 1994], elektrostatischen Wechselwirkungen [SHEINERMAN and HONIG, 2002] und der Wasserstoff-Brückenbindungen [XU *et al.*, 1997] der Interaktionsfläche ließen sich Gemeinsamkeiten herausstellen, welche die Grundlagen für das Verständnis der molekularen Erkennung bilden [CHOTHIA and JANIN, 1975; JANIN and CHOTHIA, 1990; JANIN, 1996; JONES and THORNTON, 1996].

Der allgemeine Aufbau einer Interaktionsflächen ist über die Analyse der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche des Komplexes („solvent-accessible surface area“) zugänglich. Jeder Bindungsregion kann dabei eine so genannte Kernregion („core“) und ein Rand („rim“) zugeordnet werden [LO CONTE *et al.*, 1999; CHAKRABARTI and JANIN, 2002]. Wie in Abbildung I.8 modellhaft dargestellt, sind die Reste innerhalb des Kerns einer Interaktionsfläche dabei vollständig mit der Bindung durch den Komplexpartner abgedeckt, wohingegen die Reste des Randes noch teilweise für das Lösungsmittel zugänglich bleiben. Die durchschnittliche Größe einer so bestimmten Bindungsfläche beträgt  $800\text{\AA}^2$  und wird als Standardgröße bezeichnet [LO CONTE *et al.*, 1999], wenngleich Werte zwischen  $550\text{\AA}^2$  und  $4900\text{\AA}^2$  gemessen werden konnten [JONES and THORNTON, 1996; STITES, 1997].



**Abbildung I.8:** Einteilung der Atome einer Interaktionsfläche nach LO CONTE *et al.* [1999].

**A)** Seitenansicht: Alle Atome des Moleküls 2 welche mit der Bindung des Moleküls 1 ihre Zugänglichkeit zum Lösungsmittel (W) verlieren werden als Atome in der Interaktionsfläche betrachtet. Atome des Typs B sind vollständig bedeckt, wohingegen die des Typs A und C eine teilweise Zugänglichkeit behalten.

**B)** Draufsicht: Die 29 Atome des Typs B werden von 22 Atomen des Typs C und 28 Atome des Typs A umschlossen. Alle 79 Atome bilden die Interaktionsfläche, wobei die entsprechende Anzahl der Atome des Typs B und C ungefähr der Atomzahl aus einer Seite einer durchschnittlich großen Kontaktfläche entspricht.

Im Gegensatz zu den geometrischen Parametern wurden hingegen für die chemische Zusammensetzung der Bindungsflächen nur geringe Übereinstimmungen gefunden. Die Anreicherung bestimmter Aminosäuren im Kontakt ist hier in großen Maße von der Art des Komplexes abhängig [ TSAI *et al.*, 1996, 1997]. So setzen sich die Interaktionsflächen permanenter Komplexe vermehrt durch hydrophobe Aminosäuren zusammen. Dahin gegen werden die der temporären Komplexe, aufgrund des möglichen Kontakts der Bindungspartner zur wässrigen Umgebung eher von hydrophilen Aminosäuren dominiert [JONES and THORNTON, 1996].

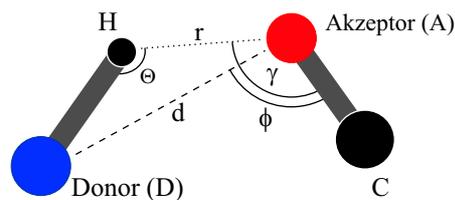
Nach CHAKRABARTI and JANIN [2002] bietet das „core-and-rim“-Modell [LO CONTE *et al.*, 1999] dennoch die Möglichkeit Bindungsflächen über ihre Aminosäure-Zusammensetzung von der restlichen Proteinoberfläche zu unterscheiden. Demnach entspricht der Rand der Interaktionsfläche in seiner Zusammensetzung dem der restlichen Proteinoberfläche. Die „core“-Region hingegen ist durch eine erhöhte Zahl an Tryptophan und Tyrosin und verminderte Häufigkeit von Serin und Threonin zu unterscheiden.

Hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, sowie die Wasserstoff-Brückenbindung bilden die wesentlichen intermolekularen Kräfte bei der Ausbildung aller Protein-Protein Interaktionen.

Eine besondere Bedeutung für die Stabilisierung von Proteinkomplexen wird dabei der hydrophoben Wechselwirkung zugeschrieben. Ihr Anteil zur Bindungsenergie steht offenbar in direkten Zusammenhang mit der bei der Komplexbildung abgedeckten hydrophoben Oberfläche [JONES and THORNTON, 1996]. Im Gegensatz dazu wird die Spezifität in der Protein-Protein Interaktion mehrheitlich über elektrostatische Wechselwirkungen und die Wasserstoff-Brückenbindungen vermittelt [FERSHT *et al.*, 1985; FERSHT, 1987].

Die Häufigkeit von Wasserstoff-Brückenbindungen in Proteinkomplexen ist proportional zur Bindungsfläche, wobei durchschnittlich eine Wasserstoff-Brückenbindung pro  $100\text{\AA}^2$  bzw. zehn H-Brücken innerhalb eines Standard Protein-Protein Kontaktes auftreten [JANIN and CHOTHIA, 1990; XU *et al.*, 1997]. Hierbei werden bevorzugt Wasserstoff-Brückenbindungen vom Sauerstoff-Stickstoff-Typ gebildet.

Der energetische Gehalt einer H-Brücke kann aus ihren geometrischen Parametern abgeleitet werden [XU *et al.*, 1997]. Zu diesen zählen, wie in Abbildung I.9 gezeigt neben dem Abstand ( $d$  bzw.  $r$ ) auch die verschiedenen Winkel zwischen Donor- und Akzeptor-Atomen ( $\Theta$ ,  $\phi$  und  $\gamma$ ) [BAKER and HUBBARD, 1984].



**Abbildung I.9:** Geometrische Variablen einer Wasserstoff-Brückenbindung nach XU *et al.* [1997]:

Mit  $d$ , Abstand zwischen Donor und Akzeptor;  $r$ , Abstand zwischen Akzeptor und Wasserstoff;  $\Theta$ , Donor-Wasserstoff-Akzeptor Winkel (D-H-A);  $\phi$ , Donor-Akzeptor-Kohlenstoff Winkel (D-A-C) und  $\gamma$ , Wasserstoff-Akzeptor-Kohlenstoff Winkel (H-A-C).

Im Vergleich zum inneren Aufbau von Proteinen [JEFFREY and SAENGER, 1994; XU *et al.*, 1997] weisen Wasserstoff-Brückenbindungen in Protein-Protein Interaktionsflächen eine deutlich größere Streuung der Werte für Abstand und Winkel auf. Dies lässt XU *et al.* [1997] darauf schließen, dass es sich bei Wasserstoff-Brückenbindungen in Bindungsflächen von Proteinkomplexen generell um schwache Brückenbindungen [JEFFREY and SAENGER, 1994] handelt, wobei der niedrigere Beitrag durch einen vergleichsweise hohen Anteil an Seitenketten-Hauptketten bzw. Seitenketten-Seitenketten Wasserstoff-Brückenbindungen in der Interaktionsfläche verursacht wird.

Neben direkten Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Bindungspartnern ermöglichen H-Brücken zudem die Bildung von H-Brücken-Netzwerken über die in der Interaktionsfläche eingeschlossenen Wassermoleküle. Diesen Netzwerken wird ein stabilisierender Effekt auf die Komplexbildung zugeschrieben, welcher sich neben der erhöhten Anzahl an Wasserstoff-Brückenbindung auch mit der Bindung von Wassermolekülen zur Verbesserung der Oberflächen-Komplementarität begründen lässt [JANIN, 1999; LARSEN *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000; XU *et al.*, 1997]. Die geometrischen Parameter der H-Brücken zu Wassermolekülen repräsentieren hierbei eine „gute“ Wasserstoff-Brückenbindung was hauptsächlich auf die relative Beweglichkeit der Wassermoleküle zurückzuführen ist [XU *et al.*, 1997].

Die allgemeine Beschreibung von Interaktionsflächen und ihrer Wechselwirkung gibt jedoch nur einen unzureichenden Einblick in den Mechanismus der molekularen Erkennung. Für eine verlässliche Vorhersage von Struktur- und Funktions-Beziehungen ist vielmehr die Charakterisierung der Wechselwirkungen auf der Ebene einzelner Aminosäuren notwendig, insbesondere da gezeigt werden konnte, dass trotz großer Kontaktflächen ein Großteil der Bindungsenergie von nur wenigen Resten aufgebracht werden kann [CLACKSON and WELLS, 1995; BOGAN and THORN, 1998; THORN and BOGAN, 2001]. Diese als „Hot Spots“ der Bindungsenergie bezeichneten Reste sind dabei meist nur über individuelle funktionelle Analysen entsprechender Proteinkomplexe zu ermitteln und wenig ist über deren allgemeinen strukturellen Aufbau bekannt.

Im einzigen bisher publizierten Vergleich funktioneller und struktureller Charakterisierung von unterschiedlichen heterodimeren Protein-Protein Komplexen konnte gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Eigenschaft als „Hot Spot“ der Bindungsenergie und der Position im „core“ der Interaktionsfläche besteht [BOGAN and THORN, 1998]. Darüber hinaus stimmen die präferenziell in „Hot Spots“ auftretenden Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Arginin, sowie die hier weniger favorisierten Reste Serin und Threonin mit der von CHAKRABARTI and JANIN [2002] ermittelten besonderen Aminosäure-Zusammensetzung der „core“-Region überein.

Die besondere Bedeutung dieser Aminosäuren als Hauptbindungs determinanten der Wechselwirkung gründet sich hierbei, bedingt durch die Methode ihrer funktionellen Charakterisierung durch Alanin-Substitution, auf den Beitrag ihrer Seitenketten zur Bindungsenergie. Mögliche weitere Interaktionen, wie etwa die mit gleicher Häufigkeit in Bindungsflächen auftretenden Wechselwirkungen von Hauptkettenatomen [LO CONTE *et al.*, 1999], blieben dagegen bisher unbeachtet. Ihre individuelle strukturelle und funktionelle Charakterisierung bedarf daher weiterer Untersuchungen, um das Verständnis über die Prozesse bei der molekularen Erkennung in Protein-Protein Interaktionen zu vervollständigen.

## I.3 Zielstellung der Arbeit

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) wie auch die Growth and Differentiation Factors (GDFs) gehören der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie multifunktionaler Zytokine an. Für ihre Signalvermittlung in die Zielzelle benötigen sie die Bindung zweier, als Typ I und Typ II Rezeptor bezeichneter transmembranärer Serin/Threonin Kinase Rezeptoren. Diese, durch individuelle Affinität und Spezifität gekennzeichneten Ligand-Rezeptor Interaktionen bilden wahrscheinlich die Grundlage für das weite Spektrum ihrer biologischen Funktionen.

Die Zielstellung dieser Arbeit ist es über die strukturelle Charakterisierung von BMP Ligand-Rezeptor Interaktion zu einem detaillierten Verständnis der Mechanismen der Rezeptoraktivierung beizutragen. Hierfür sollen mittels Röntgenkristallstrukturanalyse weiterer BMP-Typ I Rezeptor Komplexe das existierende Modell, welches die strukturelle Grundlage für die Beschreibung der Promiskuität in der BMP Ligand-Rezeptor Interaktion bildet, durch neue experimentelle Daten erweitern werden.

Darüber hinaus soll mit der Kristallisation ternäre BMP-Typ I und Typ II Rezeptor Komplexes die strukturelle Bestätigung des postulierten Bindungsmodus erzielt werden.

Als Voraussetzung für die Durchführung der Kristallisationsexperimente sind Expressions- und Reinigungsstrategien für die extrazellulären Domänen des BR-IA, BR-IB, BR-II und des ActR-II zu etablieren und diese biochemisch sowie funktionell zu charakterisieren. Im Anschluss daran sollen mit BMP-2, BMP-6 oder GDF-5 sowohl verschiedene binäre Typ I und Typ II Rezeptor Komplexe, als auch der ternäre BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex in Lösung präpariert werden.

## II Materialien und Methoden

### II.1 Abkürzungen (außer SI-Einheiten)

ActR-II <sub>ec</sub>	extrazelluläre Domäne des Activin Typ II Rezeptors
ActR-IIB <sub>ec</sub>	extrazelluläre Domäne des Activin Typ IIB Rezeptors
AcNVP	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhydrosis virus
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BR-IA <sub>ec</sub>	extrazelluläre Domäne des BMP Typ IA Rezeptors
BR-IB <sub>ec</sub>	extrazelluläre Domäne des BMP Typ IB Rezeptors
BR-II <sub>ec</sub>	extrazelluläre Domäne des BMP Typ II Rezeptors
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
cDNA	kodierende DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser (Millipore Qualität)
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
FPLC	Protein-Flüssigkeits-Chromatographie („Fast Protein Liquid Chromatography“)
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamin
GDF-5	Growth and Differentiation Factor-5
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GuHCl	Guanidinium-hydrochlorid
h	human
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
$k_{off}$	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
$k_{on}$	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
LB	Luria Broth
m	murin
$M_W$	Molekulargewicht
n.b.	nicht bestimmt
n.e.	nicht errechnet

MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure Natriumsalz
MeOH	Methanol
MOI	Multiplizität der Infektion („multiplicity of infection“)
MTT	3-(4,5-Dimethyldiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid-tetrazolium
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
pfu	Plaque bildende Einheiten „plaque-forming units“
PL	Proteinlösung
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RL	Reservoirlösung
r.m.s.d.	Quadratwurzel der mittleren Abweichung („root mean square deviation“)
rpm	Umdrehung pro Minute („rotation per minute“)
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz Einheit „resonance unit“
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sf-9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> , Klon 9
SV	Säulenvolumen
TB	Terrific Broth
T $\beta$ R-I <sub>ec</sub>	extrazelluläre Domäne des TGF- $\beta$ Typ I Rezeptors
T $\beta$ R-II <sub>ec</sub>	extrazelluläre Domäne des TGF- $\beta$ Typ II Rezeptors
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
Tris	Tris(-hydroxylmethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
TSP	Thrombin-Spaltpuffer
ÜN	Über Nacht
VA	Virusamplifikation
VT	Volumenteil
wt	wildtypisch

Die Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen der Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur (*Eur.J.Biochem.*, (1984) **138**, 9). Zur Beschreibung der Varianten von Wildtyp Proteinen wird für Aminosäuren der Ein-Buchstaben-Code verwendet. Die Abkürzung rhBMP-2 L51P definiert somit das rekombinante Protein einer Variante von humanem BMP-2, bei der die Aminosäure Leucin an der Position 51 durch die Aminosäure Prolin ersetzt wurde.

## II.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen in höchster Reinheitsstufe bezogen: Amersham-Pharmacia, Bio-Rad, Biolabs, Boehringer Mannheim, Difco, Calbiochem, Fermentas, Fluka, Gibco-BRL, Merck, NEB, Pharmingen, Pierce, Roth, Serva, Sigma und Stratagene. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser in Millipore-Qualität angesetzt.

## II.3 Bakterienstämme

*Escherichia coli* JM109 (ATCC 53323), [YANISCH-PERON *et al.*, 1985]

- Genotyp: F'*traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Δ(pro-lacA) supE44 hsdR17 recA gyrA96 thi endA1 relA1λ<sup>-</sup>*

*Escherichia coli* AD494(DE3) (Novagen), [DERMAN *et al.*, 1993]

- Genotype:  $\Delta ara^- leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII phoR \Delta malF3$  F'[*lac+(lacI<sup>q</sup>) pro*] *trxB::kan*(DE3)

## II.4 Zelllinien

*Spodoptera frugiperda* (Klon 9) (Pharmingen), [SMITH *et al.*, 1985]

## II.5 Vektoren

modifizierter pET32a (Novagen), [STUDIER *et al.*, 1990; KIRSCH *et al.*, 2000b]

Vektor zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* unter dem T7*lac* Promoter in *E. coli* AD494 (DE3). Der Vektor trägt die Gene für die Ampicillin-Resistenz, das Thioredoxin A (N-terminal) und den 6x His-Tag (intern oder C-terminal). Mit der Deletion der Basenpaare 223 bis 297 aus dem originalen Vektor ist die Position der Thrombin-Schnittstelle (intern) unmittelbar vor das Zielgen verschoben.

pAcGP67B (Pharmingen), [BAIXERAS *et al.*, 1990]

Vektor zur Expression rekombinanter Proteine in *Sf-9* Insektenzellen. Der Vektor enthält das Gen für die gp67 Signalsequenz, welche eine Sekretion des exprimierten Proteins in das Medium ermöglicht. Die Expression steht unter der Kontrolle des baculoviralen Polyhedrin Promoters.

## II.6 Sterilisieren

Glasgeräte wie Kulturkolben und Pipetten werden für 6h bei 180° im Heißluftschrank (Heraeus Trockenschrank Typ ST5060) sterilisiert. Puffer, Medien und Kunststoffgefäße werden für 20min bei 120° und 1,1bar autoklaviert (Sterico Vapoklav Dampfsterilisator). Lösungen thermolabiler Substanzen werden über sterile Spritzenfilter mit einem Porendurchmesser von 0,22μm sterilfiltriert. Zellkulturmaterial aus Plastik wie Rollerflaschen, Kulturflaschen, Platten und 15ml bzw. 50ml Röhrchen werden steril von der Firma Greiner bezogen.

## II.7 Kulturmedien

LB-Medium\*: 10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Yeast Extract, 10g/l Natriumchlorid (NaCl), mit 0,1M Natronlauge (NaOH) auf pH7,5 eingestellt.

TB-Medium\*: 13,3g/l Bacto-Trypton, 26,6g/l Bacto-Yeast Extract, 4,4ml/l Glycerin, zu 720ml sterilem TB-Medium werden 80ml 10x Phosphatlösung zugegeben.

---

\*SAMBROOK *et al.* [1989]

- 10x Phosphatlösung\*: 0,17M Kalium-di-hydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,72M di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).
- ENB-Platten\*: 15g Agar werden in 800ml Wasser für 20min autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 40°C erfolgt die Zugabe von 200ml 5x ENB-Medium, 2,5ml 40%iger Glucoselösung (steril) und 0,5ml Thiaminlösung (10mg/ml, sterilfiltriert) sowie ggf. Antibiotikum. Die Lösung wird in Petrischalen gegossen und nach Erstarren können diese bis zu einem Monat bei 4°C gelagert werden.
- IPL-41 Medium: 27,2g/l IPL-41 Pulver (HyClone) in Wasser (steril) lösen, 0,35g/l Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), 2,6g/l NaCl zugeben und pH-Wert mit 2M NaOH auf pH6,2 ( $\pm 0,05$ ) einstellen. Anschließend 20ml/l 50x Yeastolat und 10ml/l 100x Lipid Mix zusetzen. Sterilfiltriert bei 4°C lagern und vor Gebrauch bei RT mit 5% FCS versetzen.

Zu den Medien werden gegebenenfalls die Antibiotika Ampicillin und/oder Kanamycin zugegeben. Die hierfür verwendeten Stammlösungen haben eine Konzentration von 50mg/ml für Ampicillin und 30mg/ml für Kanamycin und werden vor der Verwendung in sterilem Wasser jeweils immer frisch angesetzt.

## II.8 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

### II.8.1 Kulturbedingungen

Zur Kultivierung von *E.coli* Kulturen wird aus einer Glycerin-Stammkultur ein Ausstrich auf einer Agarplatte angelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2 bis 50ml Medium werden mit einer von diesen Platten gepickten Einzelkolonie angeimpft und bei 30°C bzw. 37°C unter Schütteln (B.Braun; Ceromat® RM) inkubiert.

Diese Bakterienkultur kann nach 6 bis 8 Stunden als Vorkultur zum Beimpfen einer größeren Kultur verwendet werden. Dabei sollte für nährstoffreiche Medien die Verdünnung beim Animpfen 1:50 nicht unterschritten und die optische Dichte der verwendeten Vorkultur  $\text{OD}_{600}$  1,5 (LKB Novaspec) nicht überschritten werden.

### II.8.2 Stammhaltung

*E.coli*-Kulturen können bis zu drei Wochen bei 4°C auf Platte gelagert werden. Für eine dauerhafte Konservierung ist eine Glycerin-Stammkultur anzulegen.

Für *E.coli*-Stammkulturen impft man hierfür 40ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie an und läßt diese bis zu einer optischen Dichte von  $\text{OD}_{600} = 1,5$  heranwachsen. Die Kultur wird für 15min bei 3000rpm abzentrifugiert, das Zellpellet in 2ml LB-Medium resuspendiert und 1ml dieser Suspension zu 1ml Glycerin [87%] (steril) in ein verschließbares Glasröhrchen gegeben. Diese Stammkultur wird bei -20°C gelagert.

---

\*SAMBROOK *et al.* [1989]

### II.8.3 Transformation von *E.coli* [HANAHAN, 1983]

TFB: 10mM Kalium-MES pH6,3; 100mM Rubidiumchlorid (RbCl), 45mM Manganchlorid (MnCl<sub>2</sub>), 10mM Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), 3mM Hexamin-cobald(III)-chlorid (CoCl<sub>3</sub>·6NH<sub>3</sub>)

DTT-Lösung: 40mM Kaliumazetat (KOAc) pH6,0; 2,25mM DTT

Im 2l Kulturkolben werden 100ml TB-Medium (siehe Zusammensetzung II.7) mit einer ÜN-Kultur des zu transformierenden Bakterienstammes angeimpft. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C unter Schütteln mit 200rpm bis zu einer optischen Dichte OD<sub>550</sub> von 0,5. Nach 10min Inkubation auf Eis wird die Zellsuspension in zwei sterile 50ml Röhrchen überführt und 12min bei 3000rpm und 4°C (Heraeus Bactifuge) zentrifugiert. Die Pellets werden in 15ml eiskaltem TFB resuspendiert und vereinigt. Nach weiteren 10min Inkubation auf Eis wird erneut für 10min bei 2500rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 2ml TFB resuspendiert, mit 70µl DMSO versetzt und 5min auf Eis belassen. Nach Zugabe von 70µl DTT-Lösung folgt ein weiterer Inkubationsschritt auf Eis, bevor nochmals 70µl DMSO zugegeben werden. Nach weiteren 5min auf Eis werden die nun kompetenten Zellen in Aliquots zu 210µl aufgeteilt.

Zu Transformation werden 210µl frisch kompetenter Zellen mit 10-100ng Plasmid-DNA versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzschock für 90s bei 42°C, die Zellen werden daraufhin für 1-2min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800µl LB-Medium (Zusammensetzung siehe II.7) wird die Suspension in ein Kulturröhrchen überführt und für 1h bei 37°C und 180rpm auf dem Schüttler belassen. Die transformierten Zellen werden abschließend in verschiedenen Volumina auf ENB-Platten (siehe II.7) ausgestrichen. Als Positiv-Kontrolle der Transformation werden 20ng leerer Vektor und als Negativ-Kontrolle kompetente Zellen ohne Zugabe von Plasmid-DNA nach gleichem Protokoll bearbeitet.

### II.8.4 Expression von Proteinen als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E.coli*

#### II.8.4.1 Präparative Proteininduktion

TBS-Puffer: 20mM Tris pH7,5; 150mM NaCl, 1mM PMSF  
(0,5M PMSF in absolutem EtOH lösen, vor Gebrauch frisch zusetzen.)

Zur präparativen Proteininduktion in *E.coli* AD494(DE3)/pET32a werden in einem 2l Kulturkolben mit Schikane 800ml TB-Medium (Zusammensetzung siehe II.7), sowie 50µg/ml Ampicillin, 30µg/ml Kanamycin und 200µl Antifoam [3%] (Sigma), mit einer ÜN-Kultur im Verhältnis 1:40 angeimpft und bei 30°C und 150rpm (B.Braun; Ceromat® RM) geschüttelt. Zur Kontrolle des Wachstums werden jede Stunde Proben entnommen und die optische Dichte OD<sub>600</sub> bestimmt.

Bei einer 30°C-Proteinexpression erfolgt die Induktion durch Zugabe von 1mM IPTG wenn die optischen Dichte OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 und 1,0 liegt. Anschließend werden die Kulturen für weitere 4h bei 30°C und 150rpm inkubiert.

Für eine RT(21°)-Proteinexpression werden die Kulturen sobald sie eine optische Dichte OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 erreicht haben auf eine Temperatur von 21°C abgekühlt. Nach Induktion mit 1mM IPTG erfolgt die Inkubation bei 21°C und 150rpm für weitere 16-18h.

Die Expression wird beendet indem die Zellen für 10min bei 7000rpm und 4°C abzentrifugiert (Beckmann J2-21, JA-10 Rotor) werden. Im Anschluss wird das Zellpellet in TBS-Puffer resuspendiert und nochmals für 10min bei 7000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -80°C in Portionen zu 8g bis 10g Feuchtgewicht an Zellen.

#### II.8.4.2 Herstellung des Rohextrakts

Aufschluss-Puffer: 20mM Tris pH7,9; 500mM NaCl, 5mM Imidazol, 1mM PMSF

Mit der Expression rekombinanter Proteine als Thioredoxin-Fusionsprotein werden diese löslich in der Zelle gebildet. Durch den Zellaufschluss und die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile kann die Aufreinigung dieses Expressionsprodukts aus dem Zellüberstand erfolgen.

Für den Zellaufschluss werden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen zunächst 1h bei  $4^{\circ}\text{C}$  in 5VT(v/w) Aufschluss-Puffer aufgetaut und resuspendiert. Der Aufschluss erfolgt unter Eiskühlung mit Ultraschall (KLN System 585, 300W, Ultraschallkopf Typ 512/1204) in acht Intervallen zu 30s (dazwischen je 30s Abkühlintervalle). Anschließend werden die Zelltrümmer durch Ultrazentrifugation für 30min bei 40.000rpm und  $18^{\circ}\text{C}$  (Beckmann, L8-70M Ultrazentrifuge, 45Ti-Rotor) abgetrennt. Aus dem Rohextrakt kann das exprimierte Fusionsprotein durch Bindung des 6x His-Tags an Ni-Chelat Sepharose chromatographisch (II.10.1.1) abgetrennt werden.

#### II.8.4.3 De- und Renaturierung von BR-IB<sub>ec</sub> [BOESEN *et al.*, 2000]

GuHCl-Lösung: 6M GuHCl, 10mM DTT, 0,1M Hepes pH7,5

Renaturierungs-Puffer: 0,5M Arginin, 2mM EDTA, 0,1M Tris pH8,0; 0,5mM Cystamin (ox.),  
5mM Cysteamin (red.) (frisch vor Gebrauch zusetzen)

Durch De- und Renaturierung von BR-IB<sub>ec</sub> Multimeren aus Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie an TMAE-Sepharose (II.10.4.1) kann die Ausbeute an monomerem, bindungsaktiven BR-IB<sub>ec</sub> deutlich gesteigert werden. Hierfür werden die entsprechenden TMAE-Fractionen zu einem Pool zusammengefasst und in einer Amicon-Rührzelle (Amicon, YM-3 Membran) auf 50mg/ml BR-IB<sub>ec</sub> eingengt. Der Proteinlösung werden in der Folge die Einwaagen an GuHCl, DTT und 1/10VT 1M Hepes pH7,5 zugegeben und mit ddH<sub>2</sub>O auf die Endkonzentration von 5mg/ml BR-IB<sub>ec</sub> aufgefüllt. Der Denaturierungsansatz wird für 1h bei RT gerührt und kann anschließend in Aliquots zu 10ml bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder sofort zur Renaturierung eingesetzt werden.

Zur Renaturierung wird der Denaturierungsansatz tropfenweise im Verhältnis 1/100 dem auf  $4^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten Renaturierungs-Puffer zugesetzt und für mindestens 16h bei  $4^{\circ}\text{C}$  mäßig gerührt. Anschließend wird der Ansatz bei RT in einer Amicon-Rührzelle (Amicon, YM-3 Membran) eingengt und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gegen mindestens 100VT Auftrags-Puffer für TMAE-Sepharose (II.10.4.1) dialysiert (Roth, ZelluTrans 46mm). Die Dialyse wird mit frischem Dialyse-Puffer nochmals für 3-4h bei  $4^{\circ}\text{C}$  wiederholt.

#### II.8.4.4 Renaturierung des BR-II<sub>ec</sub> [HATTA *et al.*, 2000]

Dialyse-Puffer A: 50mM Tris pH7,4; 2mM EDTA

Dialyse-Puffer B: 50mM Tris pH7,4; 1mM EDTA; 100mM DTT

Dialyse-Puffer C: 100mM Ammoniumazetat ((NH<sub>4</sub>)OAc) pH9,5

Die Renaturierung des Fusionsproteins basiert auf der Dialyse des Rohextrakts unmittelbar nach dem Zellaufschluss (siehe II.8.4.2). Die Zusammensetzung des Dialyse-Puffers, der pH-Wert und die Dialyse-Stufen sollen die Ausbildung der Disulfidbrücken und so die Rückfaltung des in *E.coli* exprimierten Proteins in die biologisch aktive Form ermöglichen [HATTA *et al.*, 2000].

Dialyse A: Die Zellen werden in Dialyse-Puffer A aufgeschlossen und der Rohextrakt anschließend über Nacht, mindestens aber 12h, bei 4°C gegen diesen Puffer dialysiert (Roth, Visking 36/32). Die weitere Reinigung erfolgt über Ionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose® FF (II.10.4.2).

Dialyse B: Die Zellen werden entsprechend in Dialyse-Puffer B aufgeschlossen und der Rohextrakt für 12h bei 4°C dialysiert (Roth, Visking 36/32). In der anschließenden weiteren Dialyse über 12h bei 4°C wird die Konzentration an DTT zunächst auf 10mM DTT gesenkt und abschließend der Rohextrakt zur dritten Dialyse (12h, 4°C) nach Dialyse-Puffer B ohne DTT umgehängt. Die weitere Reinigung erfolgt auch hier über Ionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose® FF (II.10.4.2).

Dialyse C: Die Zellen werden wie unter Dialyse A beschrieben behandelt. Aufschluss und Dialyse erfolgen dabei in Dialyse-Puffer C. Für den Auftrag auf die nachfolgende Q-Sepharose® FF wird der Rohextrakt abschließend für 4h bei 4°C gegen 50mM Tris pH7,5 dialysiert (Roth, Visking 36/32).

## II.9 Expression rekombinanter Proteine in *Sf-9* Zellen

### II.9.1 Kultivieren von *Sf-9* Insektenzellen

#### *Kultivierung als Monolayer-Kultur*

Die Kultivierung der *Sf-9* Insektenzellen erfolgt in 175ml Zellkulturflaschen (Greiner) bei 27°C im Brutschrank (Heraeus) ohne zusätzliche Begasung. Die Dopplungsrate gesunder *Sf-9* Zellen ist unter diesen Bedingungen mit 18 bis 24h angegeben. Bei Konfluenz werden die Zellen auf neue Flaschen aufgeteilt. Hierfür wird zunächst das verbrauchte Medium mit den nicht mehr haftenden toten Zellen abgesaugt. Die am Flaschenboden haftenden gesunden Zellen werden daraufhin mit 10ml frischem Medium überspült und durch einige harte Schläge an die Flaschenkante vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wird auf zwei bis fünf neue 175ml Zellkulturflaschen aufgeteilt und diese jeweils mit frischem Medium auf 35ml aufgefüllt.

#### *Kultivierung als Suspensions-Kultur*

Für Expressionen und Virusamplifikationen werden die *Sf-9* Insektenzellen in Rollerflaschen (Greiner) in Suspension gehalten. Dafür werden die Zellen aus drei bis vier konfluent bewachsener 175ml Zellkulturflaschen in eine Rollerflasche gegeben und mit frischem Medium eine Zelldichte von  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Rollerflasche wird bei 27°C in einem Brutschrank mit Rollvorrichtung inkubiert. Die Zelldichte wird alle zwei Tage durch Zugabe von frischem Medium auf  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Jede Rollerflasche sollte maximal mit 250ml Zellsuspension befüllt und nur vier Tage verwendet werden. Sollen die Zellen nach vier Tagen zur Expression oder Virusamplifikation eingesetzt werden, so sind sie auf neue Rollerflaschen aufzuteilen.

### II.9.2 Vitalitätsfärbung und Zelldichtebestimmung

Trypanblau-Lösung: 0,5% Trypanblau in TBS

Zur Bestimmung der Lebendzahl an *Sf-9* Insektenzellen pro ml Medium werden diese mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dafür wird der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 eine Trypanblau-Lösung zugegeben. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran lassen keinen Farbstoff ins Zellinnere, werden somit nicht angefärbt. Diese Zellen werden in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

### II.9.3 Co-Transfektion von *Sf-9* Zellen mit dem BaculoGold<sup>TM</sup> System

Das BaculoGold<sup>TM</sup> System (Pharmingen) dient der Herstellung rekombinanter *Autographa californica* Viren durch homologe Rekombination viraler DNA (BaculoGold<sup>TM</sup> DNA) und eines Baculovirus-Transfer-Vectors (pAcGP67B) entsprechend dem „Baculovirus Expression Vector System Manual“ der Firma Pharmingen.

Lösung A: Grace's Medium mit 10% FCS, pH6,0-6,2

Lösung B: 25mM HEPES pH7,1; 125mM CaCl<sub>2</sub>, 140mM NaCl

Zur Vorbereitung der Co-Transfektion werden 1ml einer *Sf-9* Insektenzell-Suspension der Dichte  $0,8 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 3 Wells einer 6-Well-Platte pipettiert und für 1h bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Nach Absetzen der Zellen wird das Medium aus den Wells abgesaugt und durch 0,5ml Lösung A ersetzt. In einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß werden nun 1,5µg rekombinantes Plasmid (pAcGP67B-...) mit 2,5µl BaculoGold<sup>TM</sup> DNA [10ng/µl] gemischt und 5min bei RT inkubiert. Der DNA-Lösung werden nachfolgend 0,5ml Lösung B zugegeben, sorgfältig gemischt und anschließend vorsichtig zu den Zellen in Well-1 gegeben. Nach 4h Inkubation bei 27°C wird der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1,5ml frischem Medium gewaschen. Abschließend werden die Zellen mit 1,5ml frischem Medium überschichtet. Nach 5 Tagen bei 27°C im Brutschrank kann der, die rekombinanten Viren enthaltende Überstand geerntet werden.

Zur Identifikation der rekombinanten Viren wird im Anschluss ein Plaque-Assay (II.9.4) des Überstands der Co-Transfektion durchgeführt.

Als Negativkontrolle der Co-Transfektion werden Zellen (Well-2) ohne Zugabe von DNA entsprechend dem Protokoll inkubiert. Als Positivkontrolle erfolgt die Co-Transfektion der Zellen in Well-3 mit 25µl Wildtyp-AcNPV (Viren-Titer  $1 \cdot 10^8$  pfu/ml).

### II.9.4 Plaque-Assay

2,7% Agarose-Lösung: 1,35g Seaplaque®-Agarose (Biozym) werden durch Aufkochen in 50ml H<sub>2</sub>O gelöst. Die Agarose-Lösung kann bei 65°C einige Tage gelagert werden.

Medium: 0,7ml FCS, 6,6ml 1,3x Xpress Medium

MTT-Lösung: 1mg/ml MTT in Wasser lösen, steril filtrieren.

Der Plaque-Assay wird zur Isolierung einzelner Viren und zur Bestimmung des Viren-Titers von Virusüberständen der Virusamplifikationen (II.9.5) verwendet.

Zur Vorbereitung des Plaque-Assays werden 1ml einer *Sf-9* Insektenzell-Suspension der Dichte  $1,2 \cdot 10^6$  Zellen/ml in die Wells einer 6-Well-Platte pipettiert. Jedem Well wird 1ml frisches Medium zugegeben und die Platte im Anschluss für 1h bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgesetzt haben wird das Medium aus den Wells abgesaugt und durch 1ml der Virus-Verdünnung ersetzt. Nach einer Co-Transfektion (II.9.3) werden Viruslösungen der Verdünnung  $1:10^{-3}$  bis  $1:10^{-7}$ , für die Bestimmung von Viren-Titern aus Virusamplifikationen (VA) werden Verdünnungen zwischen  $1:10^{-4}$  und  $1:10^{-8}$  eingesetzt. Nach Zugabe der Viruslösung wird die Platte für exakt 1h bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und mit 1,5ml Agarose-Medium überschichtet. Dieses Agarose-Medium wird durch Zugabe von 3,3ml 2,7% Agarose-Lösung (ca 40°C) zu dem auf ca. 40°C vorgewärmtem Medium hergestellt. Nachdem das Agarose-Medium fest geworden ist, wird die Platte mit Parafilm verschlossen und in einer befeuchteten Plastikbox für 5d bei 27°C inkubiert.

Zur Auswertung wird der Plaque-Assay durch Zugabe von 1ml MTT-Lösung pro Well angefärbt. Die Färbung gründet sich auf der enzymatischen Umsetzung des gelben MTTs in ein violettes Produkt durch gesunder Zellen. Virusinfizierte Zellen werden nicht angefärbt und erscheinen als helle Punkte (Plaques). Der Virus-Titer wird durch Auszählen der Plaques in einem Well unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung bestimmt und in pfu/ml angegeben.

Sollen einzelne Viren isoliert werden, so kann der entsprechende Plaque mit einer sterilen 100 $\mu$ l Pipette durch die Agarose hindurch von der Platte ausgestochen (gepickt) werden. Der Plaque wird in 1ml frischem Medium resuspendiert und zur ersten Virusamplifikation (II.9.5) eingesetzt.

### II.9.5 Virusamplifikation (VA)

#### *Virusamplifikation in Monolayer-Kultur*

Die erste und zweite Virusamplifikation wird mit 1ml Virenüberstand in einer 6-Well-Platte durchgeführt. Hierfür werden  $1,6 \cdot 10^6$  Zellen pro Well ausgesät und für 1h bei 27°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen gesetzt haben wird das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 1ml Virenüberstand ersetzt. Die Virusamplifikation wird für 3d bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wird mit einer sterilen 1ml Pipette abgenommen und 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Bis zur weiteren Amplifikation wird der Virenüberstand in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 4°C gelagert.

Die dritte Virusamplifikation wird entsprechend in einer 175ml Zellkulturflasche durchgeführt. Dafür werden  $4 \cdot 10^7$  Zellen in 35ml Medium in die Flasche gegeben. Nach Zugabe von 1ml Virenüberstand der zweiten VA wird 3d bei 27°C inkubiert. Anschließend wird der Virenüberstand 5min bei 1500rpm zentrifugiert und in einem sterilen 50ml Röhrchen bei 4°C gelagert.

Nach der dritten VA wird die Viren-Konzentration mit einem Plaque-Assay (II.9.4) bestimmt.

#### *Virusamplifikation in Suspensionskultur-Kultur*

Ab der vierten Virusamplifikation wird diese in Rollerflaschen angesetzt. Hierfür werden maximal 200ml einer *Sf-9* Insektenzell-Suspension ( $1,6 \cdot 10^6$  Zellen/ml) mit 0,3 MOI der vorangegangenen Virusamplifikation infiziert. Nach 3d Inkubation bei 27°C wird die Zellsuspension in sterile 50ml Röhrchen gefüllt und 7min bei 1500rpm (Heraeus Minifuge T) zentrifugiert. Der den Virus enthaltende Überstand wird in sterile 50ml Röhrchen überführt und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Bei ausreichender Virus-Konzentration können die so erzeugten Virenüberstände zur Expression eingesetzt werden (Durchführung siehe Kapitel II.9.6).

### II.9.6 Expression rekombinanter Proteine in *Sf-9* Zellen

Die *Sf-9* Zellen aus drei konfluent bewachsenen 175ml Kulturflaschen werden vereinigt und zu einer Zelldichte von  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in eine 2l Rollerflasche gegeben. Nach 2d Inkubation bei 27°C im Brutschrank mit Rollvorrichtung werden die Zellen erneut gezählt und die Zelldichte wieder auf  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml durch Zugabe von frischem IPL-41 Medium (Zusammensetzung siehe II.7) eingestellt. Ist die Menge an Zellen für eine Infektion noch nicht ausreichend, kann eine weitere Inkubation für 2d im Brutschrank bei 27°C erfolgen. Die Zellen sind anschließend erneut zu zählen und entsprechend zu verdünnen.

Zur Expression rekombinanter Proteine in *Sf-9* Insektenzellen werden pro Rollerflasche 250ml bis 300ml so vorbereiteter Zellen mit 3 MOI aus Virenlösungen einer Konzentration von mindestens  $5 \cdot 10^7$  pfu/ml infiziert. Die Zelldichte zu Beginn der Expression sollte dabei  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml betragen,

wobei die durch die Zugabe der Virenlösung bedingte Verdünnung der Zellen zu berücksichtigen ist. Nach Expression über 4d bei 27°C im Brutschrank werden die *Sf*-9 Zellen durch 20min Zentrifugation bei 12.000rpm und 4°C (Sorvall RC5C, GSA Rotor) abgetrennt. Der Überstand wird zur Vorbereitung der nachfolgenden Aufarbeitung sofort dialysiert (Roth, Visking 36/32).

## II.10 Chromatographische Trennmethode

### II.10.1 Metallchelate Affinitäts-Chromatographie

Das Trennprinzip der Metallchelate Affinitäts-Chromatographie beruht allgemein auf der spezifischen Bindung von Aminosäuren an Säulenmatrix gebundene Metallionen.

Bei der verwendeten Ni-Chelating Sepharose® FF (Pharmacia), sowie die Ni-NTA Agarose (Qiagen) wechselwirken die Ni-Ionen mit Histidinen aus dem, der rekombinanten Proteinen über die entsprechenden Expressionssysteme angehängt 6x His-Tag. Beide Säulenmaterialien unterscheiden sich in der Anzahl der Ni-Koordinationsstellen welche für die Bindung an das Säulenmaterial benötigt werden und daher nicht zur Bindung der His-Tags zur Verfügung stehen.

#### II.10.1.1 Chromatographie an Ni-Chelate Sepharose

Auftrags-Puffer:	20mM Tris pH7,9; 500mM NaCl, 5mM Imidazol
Wasch-Puffer:	20mM Tris pH7,9; 500mM NaCl, 60mM Imidazol
Elutions-Puffer:	20mM Tris pH7,9; 500mM NaCl, 0,5M Imidazol
EDTA-Puffer:	50mM Tris pH7,5; 150mM NaCl, 1mM EDTA
Vorsäule:	ø 0,5cm, l = 10cm, Econo-Column® Glassäule (Bio-Rad)
Hauptsäule:	ø 1cm, l = 10cm, Econo-Column® Glassäule (Bio-Rad)
Pumpe:	Peristaltik-Pumpe, Miniplus 3 (Gilson)
Detektor:	2238 UVICORD SII (LKB), 2210 Recorder 2-Channel (LKB)
Fraktionssammler:	Retriever II (ISCO)

Die Chromatographie an Ni-Chelate Sepharose ist der erste Reinigungsschritt für alle in *E.coli* AD494 (DE3)/pET32a exprimierten Thioredoxin-Fusionsproteine. Die Trennung erfolgt bei 4°C im Kühlraum.

Zur Vorbereitung des Auftrags werden 10ml Chelating-Sepharose® FF (Pharmacia) zunächst mit 10SV ddH<sub>2</sub>O gespült und anschließend mittels 50ml einer 50mM Nickelchlorid- (NiCl<sub>2</sub>) Lösung mit Ni-Ionen beladen. Nun erfolgt der Einbau der Vorsäule aus 2ml CM-Sepharose® FF (Pharmacia). Der Kationentauscher trennt während des Auftrags Teile der intrazellulären Proteine des *E.coli* im Rohextrakt ab und wirkt zusätzlich als Filter für die Hauptsäule.

Beide Säulen werden mit Auftrags-Puffer equilibriert. Der Auftrag des Rohextrakts erfolgt bei 4°C mit einer Flussrate von ungefähr 1,5ml/min. Die Säulen werden nachfolgend zunächst mit 2SV Auftrags-Puffer nachgespült, anschließend wird die Vorsäule entfernt und die Hauptsäule mit 5SV und einer Flussrate von 2,5ml/min mit Wasch-Puffer gewaschen. Dies führt zur Elution unspezifisch gebundener Proteine. Die Elution erfolgt abschließend unter Beibehaltung der Flussrate im Stufengradient auf 500mM Imidazol (Elutions-Puffer) und wird durchflussphotometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm verfolgt. Es wird in Fraktionen zu 10ml gesammelt und anschließend das Ergebnis der Elution durch Auftragen von 10µl aus jeder Fraktion auf eine SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen

analysiert. Die das entsprechende Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen werden zusammengefasst und zunächst gegen EDTA-Puffer dialysiert (Roth, Visking 20/32).

Zu Lagerung wird die Hauptsäule mit 250mM EDTA pH8,0 gespült, das Material der Vorsäule wird verworfen.

### II.10.1.2 Chromatographie an Ni-NTA Agarose

Ni-NTA Puffer: 50mM Natriumphosphat-Puffer pH8,3; 300mM NaCl, 10mM Imidazol  
Wasch-Puffer: 50mM Natriumphosphat-Puffer pH8,3; 300mM NaCl, 50mM Imidazol  
Elutions-Puffer: 50mM Natriumphosphat-Puffer pH8,3; 300mM NaCl, 300mM Imidazol

Die Chromatographie an Ni-NTA Agarose wird verwendet, um die in *Sf-9* Insektenzellen exprimierten und ins Zellmedium sezernierten rekombinanten Proteine von denen des Mediumüberstands abzutrennen. Das Protokoll der Durchführung entspricht weitgehend den Vorgaben der Firma Qiagen.

Zu 1l des nach Ni-NTA Puffer dialysierten Expressionsmediums (Roth, Visking 36/32) werden 5ml in Ni-NTA Puffer pre-equilibrierte Ni-NTA Agarose gegeben und bei 4°C für mindestens 4h gerührt. Anschließend wird die Suspension in eine Säule ( $\varnothing$  2,5cm, l = 10cm, Econo-Column® Glassäule, (Bio-Rad)) geladen, wobei die Agarose in der Säule verbleibt. Nach dem Auftrag wird die Agarose zunächst mit 4SV Ni-NTA Puffer, gefolgt von 4SV Wasch-Puffer gespült. Die Elution erfolgt abschließend in Fraktionen zu 4ml. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen wird mittels SDS-PAGE aus 10 $\mu$ l jeder Fraktion analysiert.

Der Ni-NTA Agarose wird in 20% EtOH gelagert und kann, nach Regeneration entsprechend den Herstellerangaben, mehrfach verwendet werden.

### II.10.2 BMP-2 Affinitäts-Chromatographie

Für die chromatographische Reinigung der extrazellulären Domänen der BMP Typ I Rezeptoren wird deren Bindung an den Liganden BMP-2 genutzt. Hierfür wird das BMP-2 an CNBr-aktivierte Sepharose® 4B gekoppelt.

#### II.10.2.1 Kopplung von BMP-2 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Kopplungs-Puffer: 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH8,3; 0,5M NaCl  
Wasch-Puffer: 0,1M Tris pH8,0; 0,5M NaCl

Das Protokoll zur Kopplung von BMP-2 an das Säulenmaterial basiert auf der Vorschrift „Affinity Chromatography: Principles and Methods“ der Firma Pharmacia Biotech.

Zunächst wird die CNBr-aktivierte Sepharose® 4B in 1mM HCl suspendiert und für 15min gequollen, wobei 3g gefriergetrocknete CNBr-aktivierte Sepharose® 4B 10ml Gel ergeben. Das gequollene Material wird zuerst mit 600ml 1mM HCl (200ml pro g Trockenmasse) und nachfolgend mit 200ml Kopplungs-Puffer über eine G3-Glasfritte gewaschen. Das Gel wird in 25ml Kopplungs-Puffer aufgenommen und in einem 50ml Röhrchen über Nacht bei 4°C auf einer Rundschtüttelmaschine inaktiviert. Nach 24h Inkubation werden dem Material 13,5mg BMP-2 in 2ml ddH<sub>2</sub>O zugegeben und für weitere 2h bei 4°C auf der Rundschtüttelmaschine belassen. Die Kopplung wird stündlich durch Konzentrationsbestimmung von BMP-2 aus dem Überstand verfolgt und beendet, sobald keine Konzentrationsabnahme mehr nachgewiesen werden kann. Der Kopplungsansatz wird daraufhin 5min bei 1000rpm (Heraeus) zentrifugiert und das Säulenmaterial in 3VT Wasch-Puffer resuspendiert. Dieser Wasch-Schritt wird

noch zweimal wiederholt, bevor das Gel in 25ml Wasch-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C auf der Rundschüttelmaschine inkubiert wird.

Das Säulenmaterial wird abschließend in eine Säule ( $\varnothing$  1,5cm, Econo-Column® Glassäule, (Bio-Rad)) geladen und in Lagerungs-Puffer equilibriert.

### II.10.2.2 Chromatographie an BMP-2 Affinitäts-Sepharose

Auftrags-Puffer:	10mM Hepes pH7,4; 0,5M NaCl, 3,4mM EDTA
Elutions-Puffer:	4M Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )
Lagerungs-Puffer:	10mM Hepes pH7,4; 150mM NaCl, 3,4mM EDTA, 5mM Natriumazid
Säule:	$\varnothing$ 1cm, l = 10cm, Econo-Column® Glassäule (Bio-Rad)
Pumpe:	Peristaltik-Pumpe, Miniplus 3 (Gilson)
Detektor:	2238 UVICORD SII (LKB), 2210 Recorder 2-Channel (LKB)
Fraktionssammler:	Retriever II (ISCO)

Die unter Lagerungs-Puffer stehende Säule wird erst unmittelbar vor dem Auftrag mit einem Fluss von 0,9ml/min nach Auftrags-Puffer equilibriert. Der Auftrag erfolgt in möglichst hoher Konzentration der Probe mit einer Pipette direkt auf des Gelbett. Somit wird eine Verdünnung der Probe beim Auftrag verhindert. Nachdem die Probe vollständig in das Gelbett eingelaufen ist, wird noch je zweimal mit 1ml Auftrags-Puffer nachgespült und danach die Pumpe wieder angeschlossen. Nicht an der Affinitäts-Matrix bindender Rezeptor wird mit einem Fluss von 0,3ml/min im Auftrags-Puffer ausgewaschen. Nach Erreichen einer stabilen Baseline-Absorption erfolgt die Elution mit einer Flussrate von nicht mehr als 0,3ml/min in Elutions-Puffer. Es wird in Fraktionen zu 3ml gesammelt. Diese Fraktionen werden spektralphotometrisch auf Protein analysiert und die entsprechenden Fraktionen anschließend zur Dialyse vereinigt.

Aufgrund der limitierten Bindungskapazität von 2mg (für BR-IA<sub>ec</sub>) wird der Durchlauf aus jedem Auftrag gesammelt, eingengt und nachfolgend die Chromatographie wie beschrieben wiederholt, bis kein Protein mehr eluiert werden kann.

### II.10.3 Affinitäts-Chromatographie an ConA-Sepharose 4B

ConA Sepharose® FF (Pharmacia) wird zur chromatographischen Trennung von Glycoproteinen verwendet. Die Wechselwirkung dieser Proteine mit der Säulenmatrix beruht dabei auf der spezifischen Bindung von  $\alpha$ -D-Mannose,  $\alpha$ -D-Glucose und sterisch verwandten Resten, die am C-3, C-4 oder C-5 eine Hydroxylgruppe tragen, an das Concanavalin A (ConA).

ConA-Puffer:	20mM Tris pH7,4; 0,5M NaCl, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM MnCl <sub>2</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub>
Elutions-Puffer:	100mM Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid
Säule:	$\varnothing$ 0,5cm, l = 10cm, Econo-Column® Glassäule (Bio-Rad)

Der in ConA-Puffer dialysierte Spaltansatz (Roth, ZelluTrans 19mm) einer N-Deglycosylierung mit Endo H/F<sub>3</sub> wird auf 1ml pre-equilibrierte ConA-Sepharose® 4B (Pharmacia) mit einer Pipette aufgetragen. Anschließend wird mit Auftrags-Puffer gespült und der Durchlauf in Fraktionen zu 0,5ml gesammelt. Diese enthalten das vollständig N-deglycosylierte Protein. Die Analyse auf proteinhaltige Fraktionen aus dem Durchlauf erfolgt mittels SDS-PAGE; sie werden abschließend zu einem Pool vereinigt und auf die HPLC (siehe II.10.6) aufgetragen.

Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgt durch Elution mit 100mM Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid-Lösung im Stufen-Gradient. Die Säule wird bei 4°C unter 20% EtOH gelagert.

## II.10.4 Ionenaustausch-Chromatographie

Die chromatographische Trennung von Proteingemischen im Salzgradienten der Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf der spezifischen Wechselwirkung der Proteine mit dem Säulenmaterial entsprechend ihrer Oberflächenladung.

### II.10.4.1 Chromatographie an Fractogel EMD TMAE

Auftrags-Puffer:	20mM Tris pH7,5; 35mM NaCl
Lauf-Puffer:	20mM Tris pH7,5; 5mM Natriumazid
Elutions-Puffer:	20mM Tris pH7,5; 1M NaCl, 5mM Natriumazid
Säule:	Superformance 10 (Merck), SV = 10ml
Pumpe:	L6210 intelligent pump (Merck/Hitachi)
Detektor:	GAT-PHD 601 (Gamma Analysen-Technik GmbH), GAT-Linear (Gamma Analysen-Technik GmbH)
Fraktionssammler:	Model 203 (Gilson)

Zur weiteren Reinigung von Proteinen nach der Thrombin-Spaltung (II.11.6.1) wird eine Anionenaustausch-Chromatographie an TMAE (Trimethylaminoethyl)-Material (Fractogel® EMD TMAE 650(S) der Firma Merck) am FPLC-System verwendet.

Hierfür wird der Thrombin-Spaltansatz gegen Auftrags-Puffer dialysiert (Roth, ZelluTrans 49mm) und auf die in Lauf-Puffer pre-equilibrierte TMAE-Säule über den 50ml Superloop (Pharmacia) mit einer Flussrate von 1ml/min aufgetragen. Mit der Erhöhung der Ionenstärke, durch Zusatz von 35mM NaCl in den Auftrags-Puffer, wird die Wechselwirkung des Thioredoxins mit dem Säulematerial vermindert und so ein Großteil des Proteins bereits im Durchlauf abgetrennt. Die beladene Säule wird anschließend mit 10SV Lauf-Puffer gespült bis die Absorption bei 280nm stabil auf den Ausgangswert zurückgekehrt ist. Die Elution erfolgt mit 1ml/min im 1M NaCl Gradienten nach dem in Tabelle II.1 beschriebenen Programm und wird photometrisch bei 280nm detektiert.

**Tabelle II.1:** Gradient der TMAE Superformance 10.

Laufzeit [min]	Anteil an 1M NaCl [%]
0	0
60	35
70	100
80	100
90	0

Es werden Fraktionen zu 1,5ml gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Fraktionen mit monomerem Rezeptor werden zu einem Pool, die mit den Multimeren zu einem weiteren Pool zusammengefasst und getrennt weiter aufgearbeitet.

### II.10.4.2 Chromatographie an Q-Sepharose FF

Auftrags-Puffer:	50mM Tris pH7,5; (2mM EDTA) 5mM Natriumazid
Elutions-Puffer:	50mM Tris pH7,5; 1M NaCl, (2mM EDTA), 5mM Natriumazid

Säule: XK 26/20 (Pharmacia), SV = 80ml  
 Pumpe: L6210 intelligent pump, (Merck/Hitachi)  
 Detektor: GAT-PHD 601 (Gamma Analysen-Technik GmbH),  
 GAT-Linear (Gamma Analysen-Technik GmbH)  
 Fraktionssammler: Model 203 (Gilson)

Für die Ionenaustausch-Chromatographie an quarternären Ammoniumgruppen wird das Säulenmaterial Q-Sepharose® FF (Pharmacia), ein starker Anionentauscher, am FPLC-System verwendet.

Die Chromatographie an Q-Sepharose® FF wird zur Aufreinigung des mittels Dialyse renaturierten BR-II<sub>ec</sub> Fusionsproteins (siehe II.8.4.4) aus dem Rohextrakt durchgeführt. Hierfür wird die Säule entsprechend der Renaturierungs-Protokolle (Dialyse A oder B) in Auftrags-Puffer mit EDTA (Dialyse A) oder ohne EDTA (Dialyse B) equilibriert. Der Auftrag erfolgt über den 50ml Superloop (Pharmacia) mit 1ml/min. Anschließend wird mit 5SV bei einer Flussrate von 2ml/min auf Baseline-Absorption gespült und die Elution im 1M NaCl Gradienten nach dem in Tabelle II.2 gezeigten Programm gestartet. Die Elution wird durchflussphotometrisch verfolgt und in Fraktionen zu 2ml gesammelt.

**Tabelle II.2:** Gradient der Q-Sepharose FF.

Laufzeit [min]	Anteil an 1M NaCl [%]
0	0
100	50
120	100
160	100
200	0

Die Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert und diejenigen, welche das BR-II<sub>ec</sub> Fusionsprotein enthalten für die nachfolgenden Thrombin-Spaltung vereinigt.

## II.10.5 Gelfiltrations-Chromatographie

### II.10.5.1 Chromatographie an Superdex200 HR10/30

Die Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex200 Material (Pharmacia) wird zur Reinigung von Ligand-Rezeptor Komplexen der Komplexpräparationen (II.13) verwendet.

Säule: Superdex200® HR10/30, (Pharmacia), SV = 24ml  
 Pumpe: L6210 intelligent pump, (Merck/Hitachi)  
 Detector: GAT-PHD 601 (Gamma Analysen-Technik GmbH),  
 GAT-Linear (Gamma Analysen-Technik GmbH)  
 Fraktionssammler: Model 203 (Gilson)

Die Gelfiltrations-Chromatographie wird am FPLC-System mit der Säule Superdex200 HR10/30 (Pharmacia) durchgeführt. Das Superdex200® Material hat einen Trennbereich ( $M_r$ ) von 10.000-600.000 und besteht aus sphärischen Kompositen quervernetzter Agarose und Dextran.

Zur Vorbereitung der Chromatographie wird die Säule mit Gelfiltrations-Puffers equilibriert. Der Gelfiltrations-Puffer ist von der entsprechenden Komplex-Präparation (siehe II.13) abhängig und somit dem dort beschriebenen Komplex-Präparations-Puffer identisch. Die auf 100µl eingengte Probe wird über die Injektionsschleife auf die Säule aufgetragen. Es ist, um eine gute Auftrennung zu erhalten, sinnvoll für Auftrag und Elution einen Fluss von 0,5ml/min nicht zu überschreiten und nicht

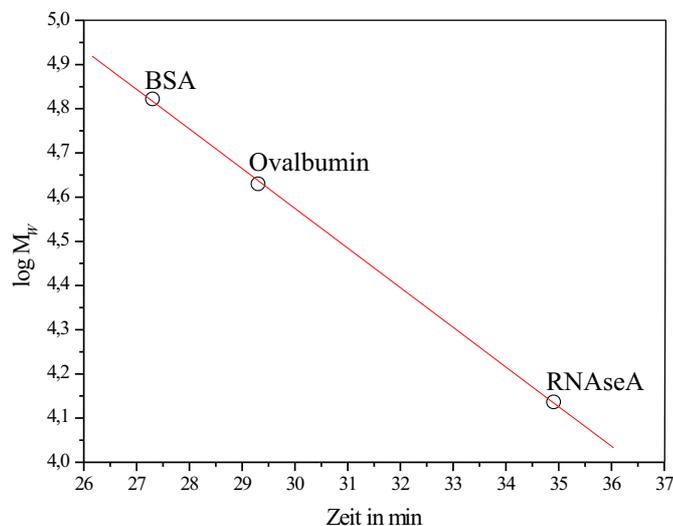
mehr als 0,5ml Proteinlösung pro Lauf aufzugeben. Es wird in Fraktionen zu 0,5ml gesammelt. Die Fraktionen mit Komplex und die der Einzelkomponenten werden mittels SDS-PAGE ermittelt. Zu Durchführung eines Kristallisationsexperiments sind mehrere Gelfiltrationsläufe pro Komplex-Präparation notwendig. Die entsprechenden Fraktionen aller Gelfiltrationsläufe einer Komplex-Präparation werden daher abschließend vereinigt und eingengt.

### II.10.5.2 Kalibrierung der Superdex200 HR10/30 (Pharmacia)

Die Bestimmung des Molekulargewichts der in der Komplexpräparation (II.13) gebildeten Ligand-Rezeptor Komplexe ist mit der Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex200 möglich. Hierfür wird die Superdex200 HR10/30 (Pharmacia) im entsprechenden Gelfiltrations-Puffer mittels eines Molekulargewichts-Standards kalibriert.

Standard-Lösungen:  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA (Sigma),  $M_W$  66.400;  $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Ovalbumin (Sigma),  $M_W$  42.700;  $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNaseA (Roth),  $M_W$  13.700; in Gelfiltrations-Puffer lösen.

Zur Bestimmung der Kalibrierkurve werden  $60\mu\text{l}$  der BSA-Lösung,  $10\mu\text{l}$  der Ovalbumin-Lösung und  $30\mu\text{l}$  der RNaseA-Lösung auf die Superdex200 HR10/30 (Pharmacia) aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5ml eluiert. Die den Molekulargewichts-Standards zugeordneten Elutionszeiten ergeben die in Abbildung II.1 dargestellte Kalibrierkurve.



**Abbildung II.1:** Kalibrierkurve der Superdex200 HR10/30 (Pharmacia) am FPLC-System.

---

Aus der Kalibrierkurve berechnet sich das Molekulargewicht  $M_W$  der Ligand-Rezeptor Komplex aus deren Elutionszeiten  $t_E$  nach folgender Gleichung.

$$\log M_W = 0,097 t_E + 7,46 \quad (\text{II.1})$$

Da die Elutionszeit sowohl von der Säulengeometrie als auch der Flussrate abhängig ist, gilt die Gleichung (II.1) nur für die unter Abschnitt II.10.5.1 beschriebene Versuchsanordnung und für alle in dieser Arbeit beschriebenen Komplex-Präparationen.

### II.10.6 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die „reversed phase“ HPLC wird insbesondere wegen der hohen Trennschärfe zur Analyse der Reinheit von Proteinlösungen verwendet. Die hierfür genutzte analytische Säule verfügt über eine Bindekapazität von 2mg.

Sollen größere Mengen an Protein mittels „reversed phase“ HPLC aufgereinigt werden, ist eine semi-präparative Säule mit einer Kapazität von bis zu 30mg zu verwenden.

TFA-Lösung:	0,1%(v/v) TFA in ddH <sub>2</sub> O
Elution:	Acetonitril
Säule (analytisch):	250mm x 4,6mm, Vydac-214TP, C4, 10 $\mu$ m Porengröße (MZ Analysentechnik)
Säule (semi-präparativ):	250mm x 8mm, Vydac-214TP, C4, 10 $\mu$ m Porengröße (MZ Analysentechnik)
Pumpe:	2150 HPLC-pump (LKB)
Detektor:	655A Variable Wavelength UV Monitor (Merck/Hitachi), 2210 Recorder 2-Channel (LKB)
Fraktionssammler:	2211 Superrac, ractype A (LKB)

Die in ddH<sub>2</sub>O mit 0,1%(v/v) TFA aufgenommene Probe wird über eine Injektionsschleife mit einem Fluss von 0,7ml/min auf die mit TFA-Lösung equilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wird die Säule mit 3SV TFA-Lösung gewaschen. Die Elution erfolgt im Acetonitril-Gradienten entsprechend Tabelle II.3.

**Tabelle II.3:** Acetonitril-Gradient der HPLC.

Laufzeit [min]	Anteil an Acetonitril [%]
0	0
5	20
45	40
55	100

Die Elution wird an einem Durchfluss-Photometer bei einer Wellenlänge von 280nm verfolgt und in Fraktionen zu 1,4ml gesammelt. Anhand des Chromatogramms werden die Peakfraktionen ermittelt und mit der SDS-PAGE analysiert. Hierfür werden den entsprechenden Fraktionen 20 $\mu$ l entnommen und 15min in der SpeedVac (Bachofer) getrocknet. Der Rückstand wird in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf die SDS-PAGE (II.11.1) aufgetragen. Fraktionen die das entsprechende Protein enthalten werden lyophilisiert (Christ ALPHA 1-4).

Die Durchführung der HPLC mit einer semi-präparativen Säule erfolgt entsprechend bei erhöhter Flussrate von 2ml/min. Die Fraktionsgröße beträgt 4ml.

## II.11 Proteinchemische Methoden

### II.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [LAEMMLI, 1970]

AA/BAA-Lösung:	29,2% Accrylamid, 0,8% N,N-Methylenbisacrylamid, Lösung nach dem Filtrieren bei 4°C lagern.
4x Upper Tris:	0,5M Tris pH6,8; 0,4% SDS
4x Lower Tris:	1,5M Tris pH8,8; 0,4% SDS
5x SDS-Laufpuffer:	125mM Tris pH8,6; 0,95M Glycin, 0,75% SDS
SDS-Probenpuffer:	63mM Tris pH8,6; 2% SDS, 20% Glycerin [87%], 2% Bromphenolblau (BPB), für reduzierende Bedingungen wird 2% $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) zugesetzt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird in der „Vertikal Gel Electrophorese System Mini-V 8.10“ der Firma Gibco-BRL durchgeführt.

Das Polyacrylamidgel wird aus den Stammlösungen entsprechend der in Tabelle II.4 angegebenen Zusammensetzung hergestellt. Die Vorschrift gilt für zwei 12%ige Gele mit 0,7mm Schichtdicke. Es wird zunächst das Trenngel zwischen die durch Spacer auf Abstand gehaltene Glasplatten gegossen und zur Polymerisation mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Anschließend wird das Sammelgel darauf gegossen und der Kamm für die Proben-Taschen hineingesteckt. Das vollständig polymerisierte Gel wird in die mit SDS-Laufpuffer (1:5 verdünnt) gefüllte Gelkammer eingesetzt.

**Tabelle II.4:** Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels.

	Sammelgel	Trenngel [12%]
AA/BAA-Lösung:	0,5ml	4ml
4x Upper Tris:	1,25ml	
4x Lower Tris:		2,5ml
H <sub>2</sub> O:	3,2ml	1,5ml
Glycerin [87%]:		2ml
TEMED:	12 $\mu$ l	14 $\mu$ l
40%(w/v) APS:	12 $\mu$ l	14 $\mu$ l

Die Proteinproben werden mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Das Auftragsvolumen wird so gewählt, dass pro Geltasche 0,5 $\mu$ g bis 2 $\mu$ g Protein (je Bande) aufgetragen werden. Dabei ist das maximale Volumen der Probenaschen von 20 $\mu$ l zu berücksichtigen. Die Proteine werden bei 150V im Sammelgel fokussiert, die anschließende Auftrennung erfolgt bei 175V. Die Elektrophorese kann beendet werden, sobald die BPB-Markierung das Trenngel durchlaufen hat.

### II.11.2 Protein-Molekulargewichts-Standard für die SDS-PAGE

Die Bestimmung der Molekulargewichte der untersuchten Proteine erfolgt durch Vergleich mit denen des SDS-PAGE Protein-Molekulargewichts-Standards. Die Zusammensetzung des Markers und die Konzentration der einzelnen Komponenten sind in Tabelle II.5 angegeben. Auf eine SDS-PAGE werden je nach Empfindlichkeit der Färbung 2-5 $\mu$ l des Standards aufgetragen.

**Tabelle II.5:** Protein-Molekulargewichts-Standard für SDS-PAGE.

Protein	$M_W$	Konzentration [ $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ ]
Phosphorylase b	97.000	0,67
Albumin	66.000	0,83
Ovalbumin	45.000	1,47
Carbon anhydrase	30.000	0,83
Trypsin inhibitor	21.100	0,80
Lactalbumin	14.400	1.16

## II.11.3 Färbung von Proteingelen

### II.11.3.1 Coomassie-Färbung

Färber: 10g Coomassie Brillant Blue R250, 1,6l Methanol, 400ml Eisessig, 2l Wasser

Entfärber: Eisessig, 2-Propanol und Wasser im Verhältnis 1:1:8

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 20min im Färber gefärbt und anschließend über Nacht in Entfärber gelegt. Das entfärbte Gel wird, nachdem es 1h in 30% Methanol inkubiert hat, zwischen zwei Cellophanfolien im Rahmen aufgespannt getrocknet.

### II.11.3.2 Silberfärbung

Lösung 1: 30ml 50%(v/v) Aceton in Wasser, 750 $\mu\text{l}$  50%(w/v) Trichloressigsäure (TCA) in Wasser, 12,5 $\mu\text{l}$  Formaldehyd

Lösung 2: 30ml 50%(v/v) Aceton in  $\text{H}_2\text{O}$

Lösung 3: 50 $\mu\text{l}$  10%(w/v) Natriumthiosulfat-pentahydrat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) in 30ml Wasser

Lösung 4: 400 $\mu\text{l}$  20%(w/v) Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), 300 $\mu\text{l}$  Formaldehyd, in 30ml Wasser

Lösung 5: 0,4g Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 22,5 $\mu\text{l}$  Formaldehyd, 12,5 $\mu\text{l}$  10%(w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , in 30ml Wasser

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 5min in Lösung 1 inkubiert. Anschließend wird es mit Wasser gewaschen und in Wasser für weitere 5min geschüttelt. Nach erneutem Spülen mit Wasser erfolgt die Inkubation in Lösung 2 für 5min, gefolgt von der Inkubation in Lösung 3 für 1min; anschließend wird wieder in Wasser gewaschen. Das Gel wird nun für 8min in Lösung 4 gebracht und nach intensivem Spülen mit Wasser zur Entwicklung in Lösung 5 gelegt. Während die Färbeschale leicht geschwenkt wird, um eine gleichmäßige Färbung zu gewährleisten, ist die Intensität der Färbung zu beobachten. Ist diese ausreichend kann sie durch Zugabe von zweimal 250ml 1%ige Essigsäure abgestoppt werden. Die Gele werden nach 1h Inkubation in 30% Methanol im Trockenrahmen zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

## II.11.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgt photometrisch durch Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrums im Bereich von 250nm bis 320nm (Varion CARY 50 Bio UV-visible Spectrometer). Die Konzentration  $c$  [mol/l] wird entsprechend dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz

$$A_{280} = d \cdot \varepsilon_{280} \cdot c \tag{II.2}$$

aus der Absorption bei 280nm  $A_{280}$ , dem Extinktionskoeffizienten bei 280nm  $\varepsilon_{280}$  [ $M^{-1}cm^{-1}$ ] und konstanter Schichtdicke  $d = 1cm$  annäherungsweise berechnet. Der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_{280}$  [ $M^{-1}cm^{-1}$ ] wird dafür nach [GILL and VON HIPPEL, 1989] aus den molaren Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystin und deren Anzahl im Molekül ermittelt.

Die molaren Massen  $M$  [Da], wie auch die Extinktionskoeffizienten der in der Arbeit verwendeten Proteine sind in Tabelle II.6 angegeben.

**Tabelle II.6:** Molare Massen  $M$  [Da] und Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280nm  $\varepsilon_{280}$  [ $M^{-1}cm^{-1}$ ].

Protein	Molare Masse	Extinktionskoeffizient
	$M$ [Da]	$\varepsilon_{280}$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
Trx-hBR-IA <sub>ec</sub> ( <i>E. coli</i> )	28.582	18.500
hBR-IA <sub>ec</sub> ( <i>E. coli</i> )	14.660	4.440
Trx-mBR-IB <sub>ec</sub> ( <i>E. coli</i> )	27.116	15.940
mBR-IB <sub>ec</sub> ( <i>E. coli</i> )	13.194	1.880
mBR-IB <sub>ec</sub> -His ( <i>Sf-9</i> )	14.868	1.880
mBR-IB <sub>ec</sub> ( <i>Sf-9</i> )	13.772	1.880
Trx-hBR-II <sub>ec</sub> ( <i>E. coli</i> )	28.292	31.160
hBR-II <sub>ec</sub> ( <i>E. coli</i> )	14.370	17.100
hBR-II <sub>ec</sub> -His ( <i>Sf-9</i> )	16.044	17.100
hActR-II <sub>ec</sub> -His ( <i>Sf-9</i> )	15.556	22.790
hActR-II <sub>ec</sub> ( <i>Sf-9</i> )	12.551	22.790
hBMP-2 (Dimer)	25.810	40.510
hBMP-6 (Dimer)	29.734	41.400
hGDF-5 (Dimer)	25.400	32.690
Thrombin	35.437	65.770

Die molaren Massen  $M$  [Da], sowie die Extinktionskoeffizienten der in der Arbeit hergestellten Ligand-Rezeptor Komplexe sind in Tabelle II.7 angegeben.

**Tabelle II.7:** Molare Massen  $M$  [Da] und Extinktionskoeffizienten der Ligand-Rezeptor Komplexe bei 280nm  $\varepsilon_{280}$  [ $M^{-1}cm^{-1}$ ].

Ligand-Rezeptor Komplex	Molare Masse	Extinktionskoeffizient
	$M$ [Da]	$\varepsilon_{280}$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub>	55.130	49.390
BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> : ActR-II <sub>ec</sub>	80.232	94.970
BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> : BR-II <sub>ec</sub>	83.870	83.590
GDF-5 : BR-IA <sub>ec</sub>	54.720	41.570
BMP-2 : BR-IB <sub>ec</sub> ( <i>Sf-9</i> )	53.354	44.270
BMP-2 : BR-IB <sub>ec</sub> ( <i>E. coli</i> )	52.198	44.270
BMP-6 : BR-IB <sub>ec</sub>	57.278	45.160
GDF-5 : BR-IB <sub>ec</sub>	52.944	36.450
BMP-2 : ActR-II <sub>ec</sub>	54.662	86.090
BMP-6 : ActR-II <sub>ec</sub>	54.836	86.980

## II.11.5 Deglycosylierungen von Glycoproteinen

### II.11.5.1 Enzymatische N-Deglycosylierung von Glycoproteinen

Bei N-Glycosylierungen ist das Oligosaccharid durch N-glycosidische Bindung an das Seitenketten N-Atom der Aminosäure Asparagin (Asn) gebunden. Das Asparagin muß dabei Teil der Sequenzfolge Asn-X-Ser/Thr sein, wobei X eine beliebige Aminosäure außer Prolin (Pro) darstellt.

**Endo H:** Katalysiert die Hydrolyse von Asparagin gebundenen Oligomannose- und Hybrid-Oligosacchariden von Glycoproteinen. Endo H spaltet dabei zwischen den zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten des  $\beta(1\rightarrow4)$  gebundenen Diacetylchitobiose-Stamms eines Oligosaccharids, sodass ein N-Acetyl-Glucosamin-Rest am Asparagin verbleibt. Endo H zeigt keine enzymatische Aktivität gegenüber verzweigten Komplex-Oligosacchariden [TRIMBLE *et al.*, 1987; ARAKAWA and MURAMATSU, 1974; TARENTINO and MALEY, 1974; TARENTINO *et al.*, 1974].

**Endo F<sub>2</sub>:** Spaltet Asparagin gebundene oder freie Oligomannose- und doppelt verzweigte Komplex-Oligosaccharide von Glycoproteinen ab. Endo F<sub>2</sub> hat keine enzymatische Aktivität gegenüber Hybrid-Oligosacchariden, sowie dreifach oder vierfach verzweigten Komplex-Oligosacchariden [TARENTINO and PLUMMER JR., 1994].

**Endo F<sub>3</sub>:** Spaltet zwei- oder dreifach verzweigte Komplex-Oligosaccharide von Glycoproteinen ab. Stamm-Fucosylierung steigert die enzymatische Aktivität. Endo F<sub>3</sub> hat keine enzymatische Aktivität gegenüber Oligomannose- und Hybrid-Oligosacchariden [TARENTINO and PLUMMER JR., 1994].

**PNGase F:** Spaltet alle N-gebundenen Oligomannose, Hybrid- und Komplex-Oligosaccharide von Glycoproteinen ab. PNGase F hydrolysiert die Glycosylamin-Bindung unter Bildung von Aspartat (Asp). PNGase F hat keine enzymatische Aktivität gegenüber  $\alpha(1\rightarrow3)$  am Stamm fucosylierte Oligosaccharide [MURAMATSU, 1971; CHU, 1986; PLUMMER *et al.*, 1984].

N-Spaltpuffer:	50mM NaOAc, pH5,0
Endo H:	endo- $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase H, [5mU/ $\mu$ l] <i>Streptomyces plicatus</i> , recombinant <i>E.coli</i> (Calbiochem)
Endo H-Spaltpuffer:	50mM Natriumphosphat-Puffer pH5,5; bei 37°C
Endo F:	endo- $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase F <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> , rekombinant <i>E.coli</i> (Boehringer Mannheim)
Endo F-Spaltpuffer:	0,5M Natriumazetat-Puffer pH4,7; bei 37°C
Endo F <sub>2</sub> :	endo- $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase F <sub>2</sub> , <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> , rekombinant <i>E.coli</i> (Calbiochem, PROzyme)
Endo F <sub>2</sub> -Spaltpuffer:	50mM Natriumphosphat-Puffer pH4,5; bei 37°C
Endo F <sub>3</sub> :	endo- $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase F <sub>3</sub> , [5mU/ $\mu$ l] <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> , rekombinant <i>E.coli</i> (Calbiochem)
Endo F <sub>3</sub> -Spaltpuffer:	50mM Natriumphosphat-Puffer pH4,5; bei 37°C
PNGase F:	N-Glycosidase F, <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> , rekombinant <i>E.coli</i> (Calbiochem)
PNGase F-Spaltpuffer:	50mM Natriumphosphat-Puffer pH7,5; bei 37°C

#### Analytische N-Deglycosylierungen

Für analytische N-Deglycosylierungen werden 20 $\mu$ g Glycoprotein in 20 $\mu$ l des entsprechenden Spalt-puffers eingesetzt. Das Ergebnis der Spaltung wird durch eine SDS-PAGE (II.11.1) dokumentiert.

*Präparative N-Deglycosylierung*

Für die in *Sf-9* Insektenzellen exprimierte Proteine erfolgt die präparative N-Deglycosylierung bei einer Proteinkonzentration von 3,5mg/ml in N-Spaltpuffer. Dem Spaltansatz werden gleichzeitig 100µU pro µg Glycoprotein Endo H und 150µU pro µg Glycoprotein Endo F<sub>3</sub> zugesetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert und die Spaltung mittels SDS-PAGE (II.11.1) kontrolliert.

**II.11.5.2 Chemische N-Deglycosylierung von Glycoproteinen**

Die chemische N-Deglycosylierung von Glycoproteinen mit Trifluormethansulfonsäure (TFMS) nach [EDGE, 1981] wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. S. Levitskaya durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Spaltung werden 1ml Anisol (Aldrich) mit 2ml TFMS (Aldrich) in einem Glas Kolben mit Teflonrührstab bei 0°C auf Eis gemischt. Bis zu 10mg des lyophilisierten Glycoproteins, welches zuvor über Nacht im Exsikkator über Phosphor(V)-oxid (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) getrocknet ist, werden in 1ml dieser TFMS/Anisol-Mischung gelöst und in ein 2ml Reactivial (Pierce) überführt. Anschließend wird für 30s Stickstoff (N<sub>2</sub>) durch die Reaktionslösung geleitet und der Ansatz für 1h bei 0°C gerührt. Die Reaktionszeit kann bis auf 3h verlängert werden, um eine vollständigere Deglycosylierung zu erreichen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass mit längerer Reaktionszeit der Anteil an denaturiertem Protein zunimmt.

Nach Beendigung der Reaktion erfolgt die Abtrennung der Reaktionsbestandteile vom deglycosylierten Protein mittels Ether-Extraktion. Hierfür werden dem Reaktionsansatz zunächst 2VT auf -40°C vorgekühlter Diethylether, gefolgt von 1VT eiskalter 50%(v/v) wässriger Pyridin-Lösung zugesetzt und gevortext. Die wässrige Phase wird anschließend abgenommen und nochmals extrahiert. Abschließend wird die wässrige Phase gegen 2mM Pyridiniumacetat-Puffer pH5,5 dialysiert (Roth, ZelluTrans 19mm) und dann lyophilisiert.

Die De-Glycosylierung des Proteins wird durch Auftrag einer Probe auf die SDS-PAGE (II.11.1) überprüft.

**II.11.5.3 Enzymatische O-Deglycosylierung von Glycoproteinen**

Als O-Glycosylierung bezeichnet man die glycosidische Bindung eines Oligosaccharids an das Seitenketten O-Atom der Aminosäuren Serin (Ser) und Threonin (Thr) eines Proteins.

Endo-α-N-Acetyl-Galactosaminidase: Spaltet ausschließlich an Serin oder Threonin gebundene unsubstituierte Galβ(1→3)GalNAc Disaccharide von Glycoproteinen ab [IWASE and HOTTA, 1993]. Substitutionen durch Sialsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure), Galactose (Gal), Fucose (Fuc) oder N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) müssen mittels geeigneter Exoglycosidasen vorher entfernt werden.

β1,4-Galactosidase: Trennt β(1→4) gebundene Galactose-Reste von N-Acetyl-Glucosaminen (GlcNAc) ab. Sie wird durch Fucosylierung am vorletzten Zucker der Kette inhibiert [DANIEL *et al.*, 1987; GLASGOW *et al.*, 1977].

O-Spaltpuffer:	50mM Natriumphosphat-Puffer pH5,0; bei 37°C
O-Glycosidase:	Endo-α-N-Acetyl-Galactosaminidase, [1,25mU/µl] <i>Streptococcus pneumoniae</i> rekombinant <i>E.coli</i>
β1,4-Galactosidase:	β1,4-D-Galactosid-galactohydrolase, [1,5mU/µl] <i>Streptococcus pneumoniae</i> rekombinant <i>E.coli</i>
β1,4-Galactosidase-Puffer:	50mM Natriumphosphat-Puffer pH6,0; bei 37°C

### *Analytische O-Deglycosylierung*

Zur analytischen O-Deglycosylierung werden 20 $\mu$ g Glycoprotein in 20 $\mu$ l des entsprechenden Spaltpuffers eingesetzt.

### *Präparative O-Deglycosylierung*

Zur präparativen O-Deglycosylierung erfolgt die Spaltung bei einer Proteinkonzentration von 5mg/ml in O-Spaltpuffer. Die O-Glycosidase wird mit 30 $\mu$ U pro  $\mu$ g Glycoprotein eingesetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert und die Spaltung mittels SDS-PAGE (II.11.1) kontrolliert.

## II.11.6 Spaltung von Proteinen mit Proteasen

### II.11.6.1 Thrombin-Spaltung

Die Protease Thrombin spaltet am spezifischen Thrombin-Spaltmotiv –Leu Val Pro Arg ↓ Gly Ser– und ermöglicht, in Abhängigkeit vom Expressionssystem, die Abspaltung des 6x His-Tags (*Sf-9*), oder des Thioredoxins und des 6x His-Tags (*E.coli*) von rekombinanten Proteinen.

Thrombin-Spaltpuffer (TSP): 50mM Tris pH7,5; 150mM NaCl, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>; bei 30°C  
Thrombin-Lösung: 8-10mg Thrombin (Sigma T4648; 22 NIH units/mg (Lyophilisat)) in 1ml TSP mit 50%(v/v) Glycerin [87%] lösen, bei -20°C für 4 Wochen stabil.

Das nach TSP dialysierte Protein (Roth, Visking 20/32) wird mit TSP auf eine Konzentration von 100 $\mu$ M eingestellt. Nach Zugabe von Thrombin entsprechend

$$m_{Thrombin} = 1/500 \cdot m_{Protein}$$

und 1mM CaCl<sub>2</sub> erfolgt die Spaltung für 4-5h bei 30°C und wird mittels SDS-PAGE (II.11.1) kontrolliert. Das Massenverhältnis von Thrombin zu Protein kann auf 1/300 erhöht werden, falls die Spaltung innerhalb 5h nicht vollständig ist.

### II.11.6.2 Endoproteinase GluC-Spaltung

Die Endoproteinase GluC ist eine Serin-Protease, die Peptidbindungen C-terminal zu Glutamat und mit einer 3000-fach geringeren Umsatzrate an Aspartat spaltet [SORENSEN *et al.*, 1991].

GluC-Spaltpuffer: 25mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) pH7,8; bei 25°C  
GluC: Endoproteinase GluC sequencing grade (Boehringer Mannheim),  
50 $\mu$ g Lyophilisat, *Staphylococcus aureus V8*

Zur Vorbereitung der Spaltung werden die 50 $\mu$ g GluC in 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen. Diese Lösung kann bei -20°C gelagert werden.

### *Analytische Spaltung mit GluC*

Die analytische Spaltung erfolgt bei einer Proteinkonzentration von 1 $\mu$ g/ $\mu$ l in GluC-Spaltpuffer durch Zugabe von 1/10 $\mu$ g, 1/20 $\mu$ g, 1/50 $\mu$ g und 1/100 $\mu$ g GluC pro  $\mu$ g Protein im Reaktionsvolumen von

100 $\mu$ l. Der Ansatz wird anschließend 24h bei 25°C inkubiert und die Spaltung durch SDS-PAGE (II.11.1) dokumentiert.

### *Präparative Spaltung mit GluC*

Die präparative Spaltung mit GluC wird bei einer Konzentration des zu spaltenden Proteins von 1 $\mu$ g/ $\mu$ l in einem Reaktionsvolumen von 500 $\mu$ l durchgeführt. Dem Ansatz werden 10 $\mu$ g GluC [1 $\mu$ g/ $\mu$ l] zugesetzt und für 24h bei 25°C inkubiert. Die Spaltung wird mittels SDS-PAGE (II.11.1) kontrolliert.

### II.11.7 Automatisierte Peptidsequenzierung

Die automatisierte Peptidsequenzierung wurde von Frau Dr. V. Hoppe an einem Gasphasen-Aminosäure-Sequenzierer (Applied Biosystems 473 A) durchgeführt.

Die Methode der Sequenzierung ist der Edman-Abbau, ein zyklisches 3-stufiges Verfahren welches automatisiert durchgeführt wird. Im ersten Schritt reagiert der aminoternale Rest mit Phenylisothiocyanat; im zweiten Schritt wird das Reaktionsprodukt mittels einer Zyklisierungsreaktion vom Peptid abgespalten; und schließlich wird dieses Produkt, ein Thioazolinoderivat, in das stabilere Phenylthiohydantoin umgewandelt. Die Identifizierung des Restes erfolgt durch „reversed phase“ HPLC. Die Aminosäurekette wird nachfolgend dem nächsten Abbau-Zyklus unterzogen.

### II.11.8 Massenspektrometrie von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse der Proteine wurde von Herrn Dr. W. Schmitz an einem Fourier-Transformations-Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) mit Elektrospray-Ionisations- (ESI) Quelle der Firma Bruker durchgeführt.

## II.12 Analyse von Protein-Protein Interaktionen mit der BIAcore-Technik

Die Messungen am BIAcore<sup>TM</sup> 2000 System wurden von Herrn Dr. J. Nickel, Herrn Prof. Dr. W. Sebald und Herrn Dr. T. Kirsch durchgeführt.

Mit der BIAcore-Technik können durch die Anwendung der Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR, „surface plasmon resonance“) Protein-Protein Interaktionen an einer Sensor-Oberfläche in Echtzeit gemessen werden.

Ein über Biotin-Streptavidin-Bindung an die Dextranmatrix eines Sensorchips gekoppelter Rezeptor (oder Ligand) wird mit einer Lösung des Liganden (oder des Rezeptors) überspült. Kommt es zur Bindung, wird die resultierende Massenzunahme an der Chipoberfläche mittels Änderung des Brechungsindex detektiert. Das Sensogramm wird als zeitabhängige Änderung der Resonanz-Einheiten (RU, resonance units) dargestellt, wobei die Änderung um 1RU einer Massenzunahme von ungefähr 1pg/mm<sup>2</sup> entspricht. Der Messzyklus lässt sich dabei in drei Phasen unterteilen: (1) die Assoziation, (2) das Plateau der konzentrationsabhängigen Bindung im Gleichgewicht der Assoziation und Dissoziation (Equilibrium-Bindung) und (3) der Dissoziation. Die Assoziations- und Dissoziationsphase geben Aufschluss über die Bindungskinetik. Die Affinität kann sowohl durch diese Parameter, als auch über die konzentrationsabhängige Plateau-Phase ermittelt werden.

Der Auswertung der Sensogramme zur Bestimmung der Affinität liegen die Berechnungen anhand folgender mathematischer Gleichungen zugrunde.

Die Dissoziationskonstante  $K_D$ , als Maß der Affinität errechnet sich entsprechend

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (\text{II.3})$$

Zur notwendigen Bestimmung der Konstante der Assoziation  $k_{on}$  werden die Daten nach Gleichung II.2 ausgewertet.

$$R = \frac{k_{on}CR_{max}}{k_{on}Cn + k_{off}} \left( 1 - e^{-(k_{on}Cn+k_{off})(t-t_0)} \right) \quad (\text{II.4})$$

Hierbei stellt  $R$  den gemessenen Wert der Massenzunahme bei einer bestimmten Konzentration  $C$  des Analyten dar. Dieser Wert erreicht bei Sättigung der Bindungskapazität den maximalen Wert, der mit  $R_{max}$  angegeben wird. Eine weitere Messgröße ist die Zeit  $t$ . Durch den Wert des so genannten „steric interference factor“  $n$  kann die Auswertung an möglich Einflüsse durch sterische Behinderung der Wechselwirkung angepasst werden. Er ist jedoch für alle Messungen auf den Wert von 1 gesetzt. Die Konstante der Dissoziation  $k_{off}$  berechnet sich nach:

$$R = R_0 e^{-k_{off}(t-t_0)} \quad (\text{II.5})$$

Bei besonders schnellen Assoziationen mit  $k_{on} > 5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw. Dissoziationen mit  $k_{off} > 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ist eine Bestimmung der Affinität aus den kinetischen Daten nicht mehr möglich. Dies ist insbesondere durch die verringerte Anzahl an Messpunkten, bedingt durch die technischen Limitationen des Messgerätes innerhalb der jeweiligen Phasen begründet.

Die Bestimmung von  $K_D$  kann dann aus dem Auftrag der konzentrationsabhängigen Messwerten der Bindung im Gleichgewicht  $R_{eq}$  über die entsprechende Konzentration  $C$  gemäß Gleichung II.6 erfolgen.

$$R_{eq} = \frac{K_D CR_{max}}{K_D Cn + 1} \quad (\text{II.6})$$

### II.12.1 Biotinylierung der Rezeptoren

Kopplungs-Puffer: 0,5M NaHCO<sub>3</sub> pH8; frisch verwenden.

Biotin-Lösung: 4mM Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) in DMSO lösen.

HBS<sub>150</sub>: 10mM HEPES pH7,4; 150mM NaCl, 3,4mM EDTA

Für die Biotinylierung werden 100µg lyophilisierter Rezeptor in 800µl PBS aufgenommen und mit 200µl Kopplungs-Puffer versetzt. Der Proteinlösung wird Biotin-Lösung im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zugegeben und 3h auf Eis inkubiert. Der Kopplungsansatz wird in einen Dialyseschlauch (Roth, Viskin 8/32) überführt und bei 4°C dreimal für 12h gegen je 500VT HBS<sub>150</sub> dialysiert (Roth, Visking 8/32).

Die Proteinlösung wird 5min bei 14000rpm (Eppendorf Zentrifuge 5451C) zentrifugiert. Die Konzentration des biotinylierten Rezeptors wird photometrisch aus dem Überstand bestimmt und dieser anschließend in Aliquots zu 100µl bei -80°C gelagert.

## II.13 Präparation von Ligand-Rezeptor Komplexen

Zur Präparation der Ligand-Rezeptor Komplexe werden die Einzelkomponenten in großer Verdünnung in den entsprechenden Komplex-Puffer gegeben und in einer Ultrafree4 Zentrifugen-Filtereinheit (Amicon) auf hohe Konzentration eingeeengt. Eine niedrige Liganden-Konzentration zu Beginn der Präparation ist aufgrund der allgemein schlechten Löslichkeit dieser Proteine notwendig, um deren Präzipitation im Komplex-Puffer zu minimieren. Der Komplex-Puffer hingegen ist auf die Stabilisierung des gebildeten Komplexes optimiert.

### II.13.1 Präparation von binären Ligand-Rezeptor Komplexen

Unter der Voraussetzung der von KIRSCH *et al.* [2000b] gezeigten 1:2 Stöchiometrie zwischen dimerem Ligand und monomerem Rezeptor werden zur Präparation eines binären Ligand-Rezeptor Komplexes 1-4nmol (analytisch) oder 15nmol (präparativ) des Liganden mit 2,2-8,8nmol (analytisch) oder 33nmol (präparativ) Rezeptor versetzt. Der Rezeptor wird zur vollständigen Komplexierung des Liganden in einem Überschuss von 10% eingesetzt. Ungebundener Rezeptor wird anschließend durch Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex200 (II.10.5.1) abgetrennt.

Wenn nicht anders angegeben, wird der Ligand zu 1-2 $\mu$ M in Wasser gelöst und mit dem im gleichen Volumen an Komplex-Puffer gelösten Rezeptor versetzt und gut gemischt. Allgemein gilt, das Gesamtvolumen des Ansatzes sollte so gewählt sein, dass die Konzentration des Liganden nicht mehr als 1 $\mu$ M beträgt. Die Komplex-Lösung wird in die Ultrafree4 Zentrifugen-Filtereinheit (Amicon) gegeben und in Intervallen zu 15min bei 4000rpm zentrifugiert bis der gesamte Ansatz auf 100 $\mu$ l eingeeengt ist. Die Temperatur während der Zentrifugation ist von der Stabilität des Komplexes abhängig; wenn nicht anders angegeben wurde bei 4°C eingeeengt. Der Komplex wird anschließend auf die Gelfiltrations-Säule aufgetragen.

MES <sub>700</sub> -Puffer:	20mM MES pH6,0; 0,7M NaCl
Tris <sub>500</sub> -Puffer pH7,5:	10mM Tris pH7,5; 0,5M NaCl
Tris <sub>500</sub> -Puffer pH8,0:	20mM Tris pH8,0; 0,5M NaCl
Tris <sub>500</sub> -Puffer pH8,5:	20mM Tris pH8,5; 0,5M NaCl
HBS <sub>500</sub> -Puffer:	10mM Hepes pH7,4; 0,5M NaCl, 3,4mM EDTA
NaOAc-Puffer:	20mM NaOAc pH4,5; 500mM NaCl

#### II.13.1.1 Ligand-Typ I Rezeptor Komplexe

##### *BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex*

Der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex wird in MES<sub>700</sub>-Puffer [KIRSCH *et al.*, 2000b] entsprechend obiger Vorschrift (II.13.1) präpariert. Aufgrund der guten Löslichkeit des Komplexes können Ansätze bis zu 25nmol Ligand komplexiert und auf 100 $\mu$ l eingeeengt werden.

##### *BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex*

Der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex wird in MES<sub>700</sub>-Puffer präpariert. Alternativ zur allgemeinen Komplex-Präparationsvorschrift (II.13.1) werden die 15nmol BMP-2 in Aliquots zu 5 $\mu$ l einer 100 $\mu$ M Stammlösung dem Rezeptor in 4ml MES<sub>700</sub>-Puffer zupipettiert. Dafür wird die Rezeptor-Lösung in einem 15ml Röhrchen vorgelegt und der 5 $\mu$ l Tropfen des BMP-2 an die Innenwand gesetzt. Anschließend wird kurz gemischt, was eine schnelle Verdünnung des BMP-2 und eine gute Durchmischung der Lösung ermöglicht.

### *BMP-6 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex*

Die analytischen BMP-6 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex-Präparationen werden entsprechend der allgemeinen Vorschrift bei RT in MES<sub>700</sub>- und Tris<sub>500</sub>-Puffer pH8,5 durchgeführt.

### *BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex*

Für die Präparation des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex werden 15nmol BMP-6 in 10ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit 33nmol BR-IB<sub>ec</sub> in 5ml MES<sub>700</sub>-Puffer versetzt. Es wird bei RT auf 100 $\mu$ l eingengt und zur Gelfiltrations-Chromatographie auf die Superdex200 wie unter II.10.5.1 beschrieben aufgetragen.

### *GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex*

Die analytischen GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex-Präparationen erfolgten in MES<sub>700</sub>-, NaOAc-, HBS<sub>500</sub>- und Tris<sub>500</sub>-Puffer pH8,0 und pH8,5.

Der GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex wird zur Kristallisation im präparativen Maßstab bei RT in Tris<sub>500</sub>-Puffer pH8,5 hergestellt. Dafür werden 1mg lyophilisiertes GDF-5 in 100 $\mu$ l 1mM HCl aufgenommen und 15nmol aus dieser Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O zur Komplex-Präparation eingesetzt. Die Komplexbildung erfolgt in Gegenwart von 75nmol BR-IA<sub>ec</sub>.

### *GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex*

Die GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex-Präparation erfolgt aus einer GDF-5 Stammlösung in 1mM HCl. Der präparative Ansatz sollte 10nmol GDF-5 nicht überschreiten oder nicht bis auf 100 $\mu$ l für den Auftrag auf die Gelfiltration eingengt werden. Die Zentrifugation wird bei RT durchgeführt.

### **II.13.1.2 Ligand-Typ II Rezeptor Komplexe**

#### *BMP-2 : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex*

Für die analytische BMP-2 : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex-Präparation wurden 3,5nmol BMP-2 zu 7,7nmol Rezeptor in 4ml MES<sub>700</sub>-Puffer oder Tris<sub>500</sub>-Puffer pH7,5 gegeben und der Ansatz auf 100 $\mu$ l konzentriert. Die Komplex-Bildung wird mittels Gelfiltrations-Chromatographie (II.10.5.1) analysiert.

#### *BMP-6 : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex*

In Modifikation der allgemeinen Vorschrift (II.13.1) wird zur Präparation des BMP-6 : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:5 verwendet. Die 50nmol Rezeptor werden hierfür in 10ml MES<sub>700</sub>-Puffer vorgelegt und 10nmol BMP-6 in 2ml ddH<sub>2</sub>O dazugegeben. Der Ansatz wird auf 60 $\mu$ l eingengt und die Bildung des Komplexes mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie (II.10.5.1) überprüft.

## **II.13.2 Präparation von ternären Ligand- Typ I und Typ II Rezeptor Komplexen**

Zur Bildung ternärer Komplexe aus Ligand und extrazellulären Domänen der Typ I und Typ II Rezeptoren werden der binäre Ligand-Rezeptor Komplex (II.13.1.1) im stöchiometrischen Verhältnis von 1:2,2 mit dem Typ II Rezeptor vereinigt. Der Überschuss von 10% Typ II Rezeptor wird während der Komplexpräparation mittels Gelfiltrations-Chromatographie (II.10.5.1) abgetrennt.

Die Präparation erfolgt dabei wie bereits beschrieben (II.13.1). Ausgehend von einem Volumen von

4ml Komplex-Puffer wird der Ansatz auf 100 $\mu$ l eingengt und auf die Gelfiltrations-Chromatographie aufgetragen.

Tris<sub>500</sub>-Puffer pH7,5: 10mM Tris pH7,5; 0,5M NaCl  
 MES<sub>700</sub>-Puffer: 20mM MES pH6,0; 0,7M NaCl  
 HBS<sub>500</sub>-Puffer: 10mM Hepes pH7,4; 0,5M NaCl, 3,4mM EDTA

*BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex*

Für die analytische Bildung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplexes wird von 3nmol binärem BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex ausgegangen. Diesen werden im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:3 oder 1:4 ActR-II<sub>ec</sub> zugesetzt und zur Analyse auf die Gelfiltrations-Chromatographie (II.10.5.1) in einem Volumen von 50 $\mu$ l aufgetragen.

Für die Präparation des ternären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplexes werden bis zu 25nmol binärer BR-IA<sub>ec</sub> : BMP-2 Komplex (aus II.13.1.1) zu entsprechenden 55nmol ActR-II<sub>ec</sub> in 4ml Tris<sub>500</sub>-Puffer pH7,5 pipettiert. Dieser Ansatz wird in einer Ultrafree 4 Zentrifugen-Filtereinheit (Amicon) auf 200 $\mu$ l eingengt. Anschließend erfolgt die Reinigung des Komplexes mittels Gelfiltrations-Chromatographie (II.10.5.1).

*BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> Komplex*

Die analytische BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> Komplex-Bildung erfolgt durch Vereinigen von BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex mit dem BR-II<sub>ec</sub> in stöchiometrischen Verhältnissen von 1:2,2 bis 1:20. Der Einsatz von BR-IA<sub>ec</sub> : BMP-2 Komplex (aus II.13.1.1) beträgt 5nmol. Die Präparationen werden in 4ml Tris<sub>500</sub>-Puffer pH7,5, MES<sub>700</sub>-Puffer und HBS<sub>500</sub>-Puffer durchgeführt. Die Bildung des Komplexes wird mittels Gelfiltrations-Chromatographie (II.10.5.1) analysiert.

## II.14 Kristallisation von Proteinen

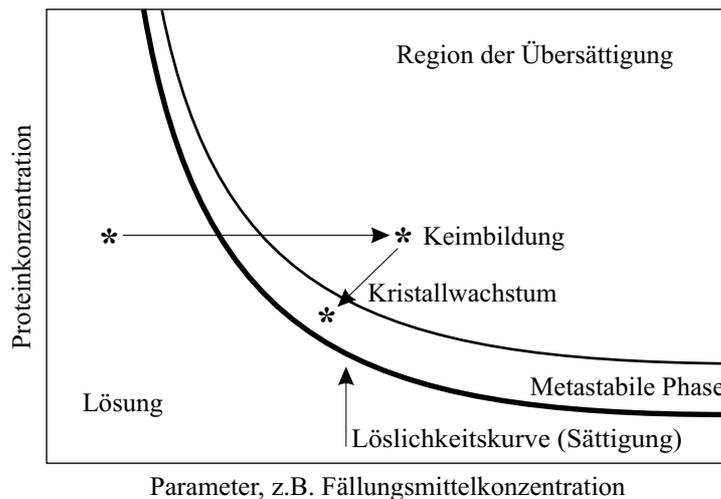
*Grundlagen der Kristallisation von Proteinen*

Das Erzeugen von Proteinkristallen hinreichender Qualität und Größe ist die Voraussetzung für eine Strukturanalyse mittels Röntgenbeugung.

Der Kristallisationsprozess lässt sich anhand der Löslichkeitskurve eines Proteins im Phasendiagramm (Abbildung II.2) erklären. In einer gesättigten Lösung stehen gelöste Proteinmoleküle in der flüssigen Phase mit denen in der festen oder kristallinen Phase in einem Gleichgewicht. Aus diesem Gleichgewicht heraus ist keine Kristallisation möglich. Dafür muss das System zunächst aus dem Gleichgewicht heraus in den Zustand der Übersättigung überführt werden, welche die freie Enthalpie und somit die thermodynamische Triebkraft für den Kristallisationsprozess liefert.

In der übersättigten Lösung kommt es spontan zur Bildung kleiner Aggregate, welche die Keime des Kristallwachstums darstellen. Das eigentliche Wachstum dieser Kristalle erfolgt dann in der metastabilen Phase, wobei sich die Konzentration des Proteins in Lösung weiter erniedrigt und das System in das Gleichgewicht der Sättigung zurückkehrt.

Da die Zahl der Nukleationen mit steigender Übersättigung zunimmt, führt die Kristallisation ausgehend von zu hoher Übersättigung zur Bildung sehr vieler, meist unregelmäßig wachsender Kristalle. Ein optimales Kristallwachstum kann hingegen erzielt werden, wenn der Kristallisationsprozess möglichst nah an der metastabilen Phase in der Übersättigung startet. Dies führt zu einer geringen Anzahl an Kristallisationskeimen, welche langsam und regelmäßig zu großen Kristallen heranwachsen können.



**Abbildung II.2:** Typische Löslichkeitskurve eines Proteins als Funktion der Fällungsmittelkonzentration oder eines anderen Parameters.

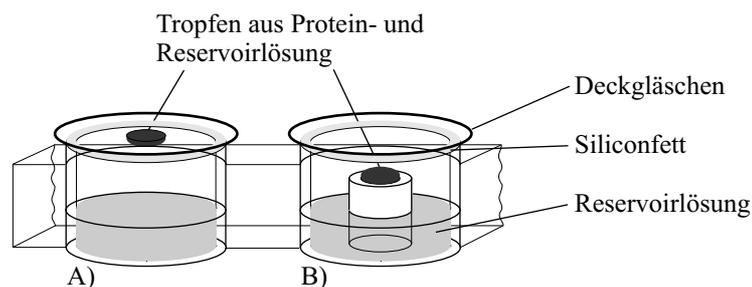
Die entsprechenden Bedingungen können dabei neben der bereits beschriebenen Fällungsmittelkonzentration durch eine Vielzahl an Parametern beeinflusst werden. Zu diesen zählen die chemische Natur des Fällungsmittels, die Temperatur, der pH-Wert der Lösung, sowie der Zusatz von verschiedenen Additiven (Metallionen und Detergenzien). Auch Erschütterung, Konvektion und die Beschaffenheit der Proteinlösung haben Einfluss auf die Kristallisation. Zudem behindern Inhomogenität und Kontaminationen den Kristallisationsprozess und führen zu qualitativ schlechten Kristallen. Aufgrund der Vielzahl der möglichen Parameter die Einfluss auf die Kristallisation von Proteinen nehmen, ist die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen ein experimenteller Vorgang nach der „trial and error,“ Methode. Ausgehend von einem „*Sparse Matrix*“- [JANCARIK and KIM, 1991; CUDNEY *et al.*, 1994] oder „Grid-Screen“ [GILLILAND and LADNER, 1996] werden systematisch einzelne Parameter wie pH-Wert, Fällungsmittel-Konzentration, aber auch Temperatur und Zusatz von verschiedenen Additiven variiert, um aus dem Ergebnis dieser Änderungen auf die optimale Kristallisationsbedingung zu schließen.

#### *Proteinkristallisation nach der Dampfdiffusions-Methode*

Bei der Kristallisation unterscheidet man verschiedene Techniken. Neben der für diese Arbeit relevanten Dampfdiffusions-Methode „vapor diffusion method“ werden auch die „Batch“-Kristallisation, die Flüssig-Flüssig Diffusion (mit Gegendiffusions-Methoden „counter diffusion method“) und die Dialyse zur Erzeugung von Proteinkristallen verwendet.

Die Dampfdiffusion ist die am häufigsten verwendete Methode, um in Mikrotropfen von Proteinlösungen die notwendige Übersättigung einzustellen. Sie beruht auf dem Transport von Wasser oder leicht flüchtigem Lösungsmittel über die Dampfphase zwischen einem Mikrotropfen einer Mischung aus Proteinlösung und Reserviorlösung und der Reserviorlösung größeren Volumens. Nach Verschließen der Kristallisationskammer steigt die Fällungsmittelkonzentration im Proteintropfen kontinuierlich an und erreicht im Equilibrium annähernd die der Reserviorlösung.

In der experimentellen Durchführung kann zwischen der Methode im hängenden „*hanging drop*“ und sitzenden Tropfen „*sitting drop*“ unterschieden werden. Die Abbildung II.3 zeigt eine schematische Darstellung der beiden Methoden.



**Abbildung II.3:** Kristallisation im A) „*hanging drop*“; B) „*sitting drop*“. Schematische Darstellung eines Ausschnittes einer 24fach Linbro-Platte.

Im Fall des hängenden Tropfens (Abbildung II.3 A)) wird der Microliter-Tropfen der Proteinlösung auf einem silanisierten Deckgläschen (Hampton Research) vorgelegt und  $(1-x)VT$  an Reservoirlösung zupipettiert. Anschließend werden diese Gläschen auf die mit 1ml der entsprechenden Reservoirlösung gefüllten Kammern einer Linbro-Platte (Hampton) mit dem Tropfen nach Innen aufgelegt. Um ein Verdampfen der Lösungen aus den Kristallisationskammern zu vermeiden sind diese mit Siliconfett (Bayer, hochviskos) abgedichtet.

Zur Durchführung der „*sitting drop*“ Methode werden entsprechende Platten (Hampton Research) verwendet. Der Tropfen aus Protein- und Reservoirlösung wird auf die eine Art Sockel (siehe auch Abbildung II.3 B)) aufgesetzt und die Kammer mit Folie verschlossen.

### II.14.1 Kristallisation von Ligand-Rezeptor Komplexen

„Sparse Matrix-Screens“:	Crystal Screen I (Hampton Research) Crystal Screen II (Hampton Research) Structure Screen I (Molecular Dimensions Ltd.) Structure Screen II (Molecular Dimensions Ltd.)
„Grid-Screens“:	PEG/Ion Screen (Hampton Research) Malonat-Screen (Hampton Research) JBScreen Nummer 5 (Jena BioScience)
Mes-Puffer:	1M Mes mit 1N HCl auf pH6,0 einstellen; sterilfiltriert bei 4°C lagern.
Hepes-Puffer:	1M Hepes Natrium-Salz, mit 1N HCl im entsprechenden Verhältnis mischen ergibt eine Pufferreihe von pH6,6 bis 8,5. Die PufferstammLösung wird über einen Spritzenfilter sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.
Tris-Puffer:	1M Tris-HCl, mit 1N NaOH im entsprechenden Verhältnis mischen ergibt eine Pufferreihe von pH7,0 bis pH9,0; sterilfiltriert bei 4°C lagern.
Cacodylat-Puffer:	1M Natrium-Cacodylat, mit 1N HCl im entsprechenden Verhältnis mischen ergibt eine Pufferreihe von pH5,0 bis pH7,4; sterilfiltriert bei 4°C lagern.
Imidazol-Puffer:	1M Imidazol, mit 1N HCl im entsprechenden Verhältnis mischen ergibt eine Pufferreihe von pH6,2 bis pH7,8; sterilfiltriert bei 4°C maximal 1Monat lagern.
Acetat-Puffer:	1M NaOAc, mit 1N HCl im entsprechenden Verhältnis mischen ergibt eine Pufferreihe von pH3,6 bis pH5,6; sterilfiltriert bei 4°C lagern.
Geräte:	Linbro-Platte (24fach) (Hampton Research), Deckgläschen ( $\varnothing$ 22mm, silanisiert) (Hampton Research)

Der pH-Wert der in den Reservoirlösungen verwendeten Pufferlösungen wird durch Mischen von 1N Säure oder Base zur 1M Stammlösung des Puffers eingestellt. Das eingesetzte Volumen richtet sich nach der von Hampton Research angegebenen Tritrationskurve für eine Endkonzentration von 100mM an Puffer in der Reservoirlösung. Der so eingestellte pH-Wert kann mit einem pH-Meter überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

Zur Kristallisation werden Proteinlösungen aus Komplexpräparation und Reinigung durch die Gelfiltrations-Chromatographie (II.10.5.1) eingesetzt. Hierfür werden die Proteinlösungen je nach Löslichkeit des Komplexes auf eine Konzentration von 2,6mg/ml bis 10mg/ml eingengt. Um zusätzliche Kristallisationskeime aufgrund von kleinen Partikeln in der Proteinlösung zu entfernen, werden diese zunächst durch Zentrifugation für 10min bei 4°C 14.000rpm (Eppendorf Zentrifuge 5415C) abgetrennt. Für das initiale Testen auf Kristallisationsbedingungen mit einem „Sparse Matrix-Screen“ wird auf diese Zentrifugation verzichtet.

Die Kristallisationen erfolgen durch Dampfdiffusion im hängenden Tropfen. Wenn nicht anders angegeben werden hierfür Mischungen aus 2µl Proteinlösung und 1µl Reservoirlösung verwendet. Die Kammern der Linbro-Platte werden entweder mit 500µl Reservoir im „Sparse Matrix-“ und „Grid-Screen“ oder 1ml Reservoirlösung im „Fine-Screen“ befüllt. Die im „Fine-Screen“ eingesetzten Kristallisationslösungen werden aus den Stammlösungen für Puffer, Fällungsmittel und eventuellen Additiven zu dem Volumen von 1ml in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend 10min bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert.

Die Kristallisation erfolgt in der Regel bei RT. Für die Kristallisation bei 10°C bzw. 4°C werden die Kristallisationsplatten bei RT gesetzt und anschließend auf die entsprechende Temperatur abgekühlt. Zur Einstellung einer Kristallisationstemperatur von 10°C wird ein Klimaschrank mit Wasserkühlung verwendet. Für die Kristallisation bei 4°C werden die Platten in Isolierboxen mit Schaumstoffauslage eingepackt und in den Kühlraum gestellt.

### II.14.2 „Seeding“ von Proteinkristallen

Mit Hilfe des „seeding“ kann die Keimbildung in Kristallisationsansätzen gesteuert werden. Man unterscheidet dabei zwischen dem „micro-seeding“ und dem „macro-seeding“.

Beim „micro-seeding“ werden Kristallisationskeime aus einem sog. „Seed“-Ansatz in einen frischen klaren Proteintropfen übertragen. Als „Seed“-Ansatz können Tropfen mit Mikro-Kristallen eines kristallinen Präzipitats oder Kristallfragmente eines zerstörten größeren Kristalls verwendet werden.

Dafür wird der entsprechende Kristallisationsansatz wie in II.14.1 beschrieben gesetzt und zunächst über Nacht pre-equilibriert. Anschließend wird mit einem Katzen-Schnurrhaar einmal zunächst durch den „Seed“-Ansatz und danach einmal durch den Proteintropfen gezogen, die Kristallisationskammer wieder verschlossen und die Platte zurück in den Klimaschrank gestellt. Sinnvoll ist es eine Verdünnungsreihe des „Seed“-Ansatzes von 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 zu erstellen und aus diesen Lösungen zu übertragen. Dadurch wird die Anzahl der eingebrachten Keime reduziert und so das Wachstum einzelner großer Kristalle ermöglicht. Allgemein gilt, dass die Proteinkonzentration immer konstant gehalten wird, wenn dann sollte die Fällungsmittelkonzentration oder die Verdünnung des „Seed“-Ansatzes geändert werden.

Beim „macro-seeding“ werden große Kristalle in neue Kristallisationsbedingungen übertragen. Hierfür wird der Kristall mit einer Schlaufe aus dem Tropfen gefischt und mehrfach in seiner Reservoirlösung gebadet. Anschließend wird er in den pre-equilibrierten Tropfen einer Kristallisationsbedingung übertragen die so gewählt sein sollte, dass sich der Kristall langsam auflöst und somit frische Wachstumsflächen an der Oberfläche gebildet werden können. Außerdem werden damit auch alle Mikro-

Kristalle aufgelöst. Sobald sich die Ecken des Kristalls abrunden und sich Rillen und Beschädigungen auf der Oberfläche glätten wird der Kristall erneut mit einer Schlaufe entnommen und eine frische Kristallisationsbedingung übertragen.

### II.14.3 „Soaking“ von Proteinkristallen

Während der Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten werden Proteinkristalle aufgrund von Radikalbildungsprozessen, ausgelöst durch die Röntgenstrahlung, beschädigt. Diese Beschädigung kann durch das Einfrieren des Kristalls bei 100K größtenteils unterbunden werden [GARMAN and SCHNEIDER, 1997]. Während des Einfrierens darf jedoch das Kristallwasser nicht gefrieren, da die Eiskristalle ihrerseits die strukturelle Integrität des Proteinkristalls zerstören. Sollen Proteinkristalle eingefroren werden muss daher der Bildung von Eiskristallen durch den Einsatz von Gefrierschutzmitteln wie zum Beispiel Zuckern, Ethylenglykol oder niedermolekulen Polyethylenglykolen aber auch Alkoholen wie MPD entgegengewirkt werden. Oftmals ist jedoch die Kristallisation in Gegenwart dieser Zusätze nicht möglich, weshalb diese im Nachhinein in den Kristall eindiffundiert werden müssen. Die Technik dieses Einbringens von Lösungen in einen intakten Kristall wird als „soaking“ bezeichnet.

Für das „soaking“ wird zunächst das Volumen des Kristallisationstropfens in welchem sich der Kristall befindet mit Reservoirlösung auf  $10\mu\text{l}$  gebracht. Anschließend wird durch Zugabe von zum Beispiel Glucose-Puffer die Glucosekonzentration im Kristallisationstropfen stufenweise bis zu einer Konzentration größer als 25%(w/v) erhöht. Insbesondere die ersten Schritte sind dabei möglichst klein zu wählen um den osmotischen Stress auf den Kristall zu minimieren. Als Glucose-Puffer wird der Kristallisationspuffer unter Zusatz von 40%(w/v) Glucose verwendet. Wenn nicht anders angegeben wird in Stufen von 0,5%, 1%, 2%, 4%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25% und 30% zugegeben und der Kristall abschließend kurz vor dem Einfrieren nochmals mittels einer Schlaufe durch den 40% Glucose-Puffer gezogen. Zwischen den einzelnen Stufen der Glucosezugabe wird 2min gewartet.

## II.15 Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten

Messeinrichtungen: Rigaku RU200 BH Drehanode (Rigaku), Graphitmonochromator (Rigaku), Dreikreisdiffraktometer (Siemens), Flächenproportionalzähler (Siemens), Tiefkühl-System (Oxford CryoSystems)

Rigaku RU300 Drehanode (Rigaku), „Osmic Confocal Blue“ Optik (Rigaku), inverses  $\phi$ -Einkreisdiffraktometer (Rigaku), R-AXIS 4<sup>++</sup>Image Plate (Rigaku), Tiefkühl-System (Oxford CryoSystems), Gesellschaft für Biologische Forschung (GBF), Braunschweig, Deutschland

Synchrotron-Strahllinie PX06SA, Swiss Light Source (SLS), Villigen, Schweiz  $\phi$ -Einkreisdiffraktometer, Mar-CCD Kamera (Mar-Research), Tiefkühl-System (Oxford CryoSystems)

Synchrotron-Strahllinie ID13, European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Frankreich;  $\kappa$ -Mikrogoniometer, Mar-CCD Kamera (Mar-Research), Tiefkühl-System (Oxford CryoSystems)

Synchrotron-Strahllinie ID14-4, European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Frankreich;  $\phi$ -Einkreisdiffraktometer, ADSC-Quantum 4R (ADSC), Tiefkühl-System (Oxford CryoSystems)

- Programme: XDS [KABSCH, 1993], MOSFLM [LESLIE, 1992], CrystalClear (Rigaku), (Softwarepakete zur Verarbeitung und Prozessierung der Reflexdaten)  
 CCP4 [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994], (Softwarepaket zur Prozessierung von Reflexdaten)
- Geräte: Quarzglaskapillaren (Mark),  $\phi = 0,1\text{mm}, 0,3\text{mm}, 0,5\text{mm}, 0,7\text{mm}, 1\text{mm}, 1,5\text{mm}$  und  $2\text{mm}$   
 Montage-Stifte mit  $20\mu\text{m}$  Nylon-Schlaufen,  $\phi = 0,1\text{-}0,2\text{mm}, 0,2\text{-}0,3\text{mm}, 0,3\text{-}0,4\text{mm}, 0,4\text{-}0,5\text{mm}, 0,5\text{-}0,7\text{mm}, 0,7\text{-}1\text{mm}$  (Hampton-Research), magnetischen Sockel (Hampton-Research)

*Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten bei Raumtemperatur*

Zur Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten bei RT wird ein Kristall geeigneter Größe in einem Kapillarröhrchen aufgenommen und am Goniometerkopf des Diffraktometers der Röntgenanlage montiert. Das Überführen des in die Kapillare ist notwendig, um ein Austrocknen des Kristalls während der Messung zu verhindern.

Ein einzelner Kristall wird hierfür aus dem Kristallisationstropfen in das Kapillarröhrchen mit Hilfe einer  $500\mu\text{l}$  Hamilton-Spritze aufgezogen. Der Durchmesser der Kapillare sollte dabei mindestens  $100\mu\text{m}$  größer als die längste Seitenkante des Kristalls sein, um Beschädigungen des Kristalls beim Aufziehen zu vermeiden. Die Spitze der Kapillare wird mit flüssigem Bienenwachs verschlossen und die Kapillare daraufhin aufgestellt, sodaß der Kristall in der Pufferlösung nach unten sinkt. Anschließend wird der Kristall in der Kapillare trockengelegt. Dies wird durch das Absaugen der Kristallisationslösung mittels einer  $100\mu\text{m}$  Kapillare erreicht, indem diese von der offenen Seite der liegenden Kapillare langsam bis zum Kristall vorgeschoben wird. Ist der gesamte Puffer abgesaugt wird in 5-8mm Entfernung vom Kristall wieder etwas Pufferlösung zugegeben und daraufhin die Kapillare auch am unteren Ende mit Bienenwachs verschlossen.

Die Kapillare wird anschließend auf dem Goniometerkopf des Diffraktometers befestigt und im Drehachsenzentrum optisch feinjustiert.

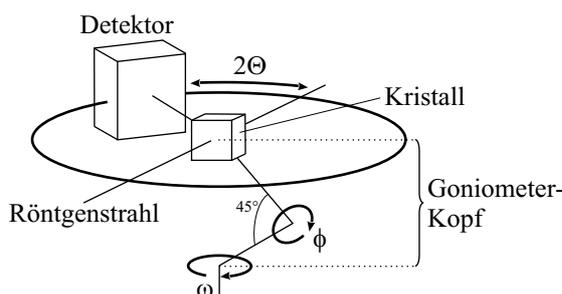
*Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten bei 100K*

Der Vorteil der Aufnahme von Beugungsdaten von gefrorenen Kristallen ist im Abschnitt II.14.3 beschrieben. Der Kristall wird hierfür aus dem Kristallisationstropfen mit Gefrierschutzmittel in einer Nylon-Schleife geeigneten Durchmessers aufgenommen. Die Schleife ist an einem Montage-Stift befestigt, welcher in einem magnetischen Sockel eingeklebt wird. Das Einfrieren auf 100K sollte möglichst schnell entweder durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff oder durch schnelles Einbringen der Schleife in den Stickstoffstrom des Kühlsystems der Röntgenanlage geschehen.

In beiden Fällen wird der magnetische Sockel auf dem Goniometerkopf befestigt und der Kristall im Drehachsenzentrum zentriert.

Zur Aufnahme der Beugungsdaten wird der Kristall im Röntgenstahl gedreht. Die Rotation erfolgt hierbei um ein definiertes Winkelement pro Zeit. Bei einem Dreikreisdiffraktometer (siehe auch Abbildung II.4) kann der Kristall hierfür um die Winkel  $\omega$  ( $\omega$ -Scan) und  $\phi$  ( $\phi$ -Scan) gedreht werden. Die Auslenkung des Detektors erfolgt um  $2\Theta$ , sodass der gesamte Auflösungsbereich genutzt werden kann. Die Schrittweite der Aufnahmen wird allgemein so gewählt, dass möglichst vollständige Reflexe pro Beugungsbild aufgenommen werden können. Sie beträgt, sofern nicht anders angegeben, für Aufnahmen an der Drehanoden-Messeinrichtung  $0,5^\circ$  ( $\omega$ -Scan) und für Aufnahmen am Synchrotron  $1^\circ$  ( $\phi$ -Scan). Die Belichtungsdauer richtet sich nach dem Beugungsvermögen des Kristalls und der Intensität der eingesetzten Strahlungsquelle.

Die am Drehanoden-Messsystem erhaltenen Beugungsdaten werden mit dem Programm XDS



**Abbildung II.4:** Schematische Darstellung eines Dreikreisdiffraktometers. Der Kristall im Zentrum des Diffraktometers ist an einem Goniometerkopf befestigt; die Drehwinkel  $2\Theta$ ,  $\phi$  und  $\omega$  sind entsprechend angegeben.

[KABSCH, 1993], die am Synchrotron aufgenommenen Daten mit *MOSFLM* [LESLIE, 1992] und *CCP4* [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994] prozessiert. Die Datenprozessierung umfasst die Indizierung der Reflexe, die Bestimmung und Verfeinerung der Kristallparameter, die Datenreduktion (Reduktion symmetrieäquivalenter Reflexe) sowie die abschließende Integration der Amplituden der Beugungsreflexe und Skalierung der Datensätze.

## II.16 Analyse von Röntgenbeugungsdaten

### *Grundlagen der Strukturanalyse durch Röntgenbeugung*

Kristalle bestehen aus einer symmetrischen Anordnung kleiner Bausteine, die sich dreidimensional periodisch wiederholt. Die kleinste sich wiederholende Einheit aus der sich ein kristallines System zusammensetzt wird dabei als Elementarzelle bezeichnet. Sie wird durch die drei Basisvektoren  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$ , und  $\mathbf{c}$  aufgespannt. Die Beträge dieser Vektoren werden mit den von ihnen eingeschlossenen Winkeln  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zu den Zellkonstanten zusammengefasst.

Die Streuung von Röntgenstrahlen führt an Kristallen zu charakteristischen Beugungsphänomenen die 1912 erstmals von LAUE, FRIEDRICH und KNIPPING beschrieben wurden. Die Notwendigkeit der Verwendung von Röntgenlicht für die Auflösung atomarer Strukturen dieser Kristalle, deren Details im Angström-Bereich ( $1\text{\AA} = 0,1\text{nm}$ ) liegen, wird durch die ABBÉsche Beziehung verdeutlicht:

$$s \geq \frac{\lambda}{n \sin \alpha} \quad (\text{II.7})$$

Sie beschreibt die maximale optische Auflösung der Abbildung eines Objektes in Abhängigkeit von der Wellenlänge der Illuminationsquelle.

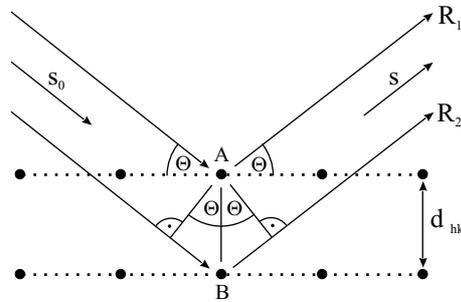
### *Röntgenbeugung und reziprokes Gitter*

Die Röntgenbeugung an Proteinkristallen beruht auf der kohärenten Streuung (Thomson-Streuung) des einfallenden Primärstrahl an den Elektronen-Orbitalen der einzelnen Atome im Raumgitter. Die ebenfalls auftretende Compton-Streuung bildet bei der Messung nur den Strahlungshintergrund. Der gebeugte Strahl wird über destruktive Interferenz sich überlagernder Elementarwellen ausgelöscht oder durch konstruktive Interferenz verstärkt und kann als Reflex messbarer Intensität detektiert werden. Die Interferenzbedingung wird durch die BRAGGSche Gleichung wiedergegeben:

$$n \cdot \lambda = 2d_{hkl} \sin \Theta \quad (\text{II.8})$$

Entspricht die Weglängendifferenz zweier Wellenzüge, die an aufeinander folgenden Gitterpunkten gestreut werden einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge  $\lambda$  der einfallenden Röntgenstrahlung, so kommt es zur konstruktiven Interferenz, die Bragg als dessen Reflexion an einer Netzebene des Kristalls beschreibt. Diese Netzebenen haben eine relative Orientierung zum Kristallgitter und werden durch die *Millerschen Indizes* mit den Werten  $hkl$  definiert.

---



**Abbildung II.5:** Röntgenbeugung an einem Raumgitter.  $A$  und  $B$  markieren zwei Gitterpunkte einer Netzebene mit dem Abstand  $d$ .  $s_0$  ist der Wellenvektor des Primärstrahls,  $s$  ist der Wellenvektor des reflektierten Strahls. Ist die Wellenlängendifferenz ( $2d_{hkl}\sin\Theta$ ) zum tiefer in der Schicht liegenden Punkt  $B$  für den Strahl  $R_2$  ein ganzzahliges Vielfaches von  $\lambda$  so kommt es zwischen  $R_1$  und  $R_2$  zu konstruktiver Interferenz.

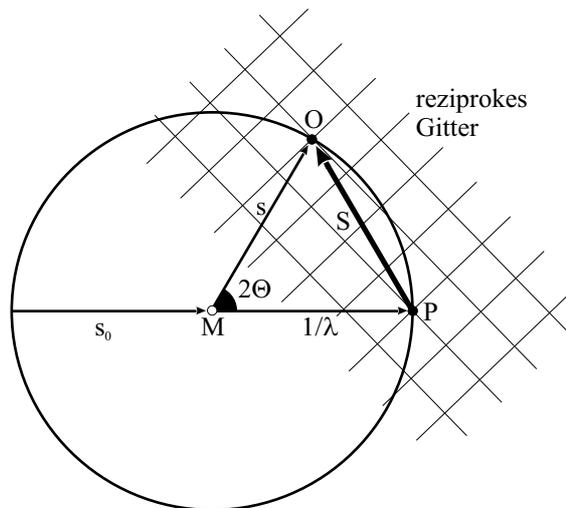
---

Für den Streuvektor  $S$  des reflektierten Strahls gilt:

$$S = s - s_0 \tag{II.9}$$

Das reziproke Gitter stellt eine mathematische Umformung des realen Kristallgitters dar und dient der Beschreibung des Beugungsbildes eines Kristalls. Die entsprechende Konstruktion ist in Abbildung II.6 wiedergegeben.

---



**Abbildung II.6:** Die Ewaldkugel als Konstruktion der Richtung der gestreuten Strahlung. Die Kugel hat einen Radius von  $1/\lambda$ . Der Ursprung des reziproken Gitters ist  $O$ ,  $s_0$  zeigt die Richtung des einfallenden Strahls,  $s$  zeigt die Richtung des gebeugten Strahls.

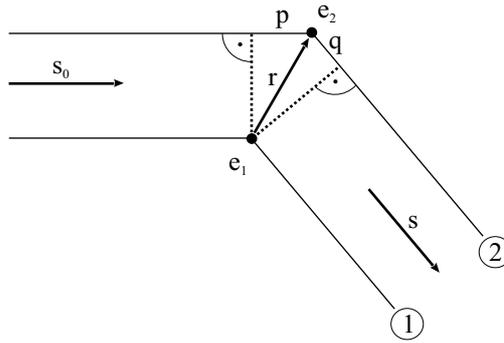
---

Der einfallende Primärstrahl  $s_0$  weist in dieser Anordnung auf den Ursprung des reziproken Gitters O, welcher sich auf der Oberfläche einer Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$  befindet. Diese so genannte Ewald-Kugel hat ihr Zentrum M am Ende des Vektors von  $s_0$ .

Richtet man das reziproke Gitter nun so aus, das ein Gitterpunkt  $P_{hkl}$  auf der Oberfläche der Ewald-Kugel zu liegen kommt, so befindet er sich in Reflexstellung, Die BRAGGSche Gleichung (II.7) ist erfüllt und es entsteht ein gestreuter Strahl  $s$ , welcher den Winkel mit dem Primärstrahl einschließt. Der Streuvektor  $S$  wird durch die Distanz  $OP_{hkl}$  wiedergegeben.

### Strukturfaktoren, Elektronendichte und Phasenproblem

Das Beugungsbild eines Proteinkristalls trägt sowohl die Gitterinformation (Zellkonstanten, Raumgruppe) als auch die molekulare Information der Proteinstruktur. Dabei liefert, wie bereits gezeigt, die Lage der Reflexe entsprechend dem BRAGGSchen Gesetz die Information über die Symmetrie (Raumgruppe) und Geometrie der regelmäßigen Anordnung im Kristall. Die molekulare Information, d.h. die Molekülstruktur wird hingegen durch die Intensitätsverteilung des Beugungsmusters wiedergegeben. Die Reflexintensitäten werden dabei durch den so genannten Strukturfaktor  $F(S)$  bestimmt. Er ist von der Art und Verteilung der Atome in der Elementarzelle abhängig. Für eine Herleitung der Berechnung dieser Strukturfaktoren ist folgende vereinfachte Betrachtungsweise hilfreich.



**Abbildung II.7:** Das Zwei-Elektronen-System:  $e_1$  und  $e_2$ . Die Wegdifferenz zwischen der gestreuten Welle 1 und 2 beträgt  $q + p$ .

In Abbildung II.7 ist die Streuung einer Röntgenwelle an zwei Elektronen  $e_1$  und  $e_2$  gezeigt, deren Position zueinander durch den Vektor  $r$  wiedergegeben wird. Der einfallende Röntgenstrahl, beschrieben durch den Vektor  $s_0$  der Länge  $\lambda/2$  wird an diesen Elektronen in Richtung des Vektors  $s$  gebeugt. Da für die Vektorlänge  $s_0 = s = \lambda/2$  gilt, ergibt sich die Wegdifferenz mit  $p + q = \lambda \cdot r \cdot (s_0 - s)$ . Die Welle an Elektron  $e_2$  liegt in Phase gegenüber der Welle an Elektron  $e_1$  zurück. Unter Berücksichtigung von Welle 1 beträgt die Phase der Welle 2 somit:

$$-\frac{2\pi \cdot (s_0 - s) \cdot \lambda}{\lambda} = 2\pi r \cdot S \quad (\text{II.10})$$

Wie bereits beschrieben erfolgt die Streuung des einfallenden Röntgenstrahls an der Elektronenhülle der Atome des Raumgitters. Damit lässt sich das Zwei-Elektronen-Modell auf die Elektronenhülle eines einzelnen Atoms anwenden. Die Streuung ist dabei von der Anzahl der Elektronen sowie ihrer Position in der Hülle abhängig und wird durch den Atomstreuvektor  $f$  beschrieben.

$$f = \int_r \rho(r) e^{2\pi i r \cdot S} dr \quad (\text{II.11})$$

Die Summation der Streubeiträge aller Atome  $n$  an den Positionen  $r_j$  der Elementarzelle wird durch den Strukturfaktor  $F(S)$  wiedergegeben.

$$F(S) = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i r_j \cdot S} \quad (\text{II.12})$$

Unter Berücksichtigung der Laue-Bedingungen welche besagt, dass ein Kristall nur dann Röntgenstrahlen streut, wenn gilt  $a \cdot S$  ist ein ganzzahliges Vielfaches von  $h$ ,  $b \cdot S$  ist ein ganzzahliges Vielfaches von  $k$  und  $c \cdot S$  ist ein ganzzahliges Vielfaches von  $l$  kann der Strukturfaktor für den gesamten Kristall formuliert werden. Mit  $r_j = x_j a + y_j b + z_j c$  ergibt sich:

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (\text{II.13})$$

Die Intensität des gebeugten Strahl  $hkl$  ist proportional dem Quadrat der Amplitude des Strukturfaktors  $F(hkl)$ . Da der Strukturfaktor eine Funktion der Elektronendichteverteilung in der Elementarzelle darstellt, kann die Elektronendichte  $\rho$  daher aus den Strukturfaktoren durch Fouriertransformation erhalten werden:

$$\rho(hkl) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{-2\pi i (hx + ky + lz)} \quad (\text{II.14})$$

$$\text{mit } F(hkl) = |F(hkl)| e^{i\phi_{hkl}}$$

$$\rho(hkl) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i (hx + ky + lz)} \quad (\text{II.15})$$

Die Elektronendichte  $\rho$  kann somit für jeden Punkt  $x, y, z$  der Elementarzelle berechnet werden, wenn die Strukturfaktoren  $F(hkl)$  für alle gemessenen Reflexe  $hkl$  bekannt sind. Der Vektor Strukturfaktor setzt sich aus der Amplitude  $|F(hkl)|$  und Phase  $\phi_{hkl}$  des Reflexes zusammen und spiegelt damit das Grundproblem der Röntgenbeugung, das so genannte „Phasenproblem“ wieder. Das Beugungsexperiment erlaubt lediglich die Messung der Amplitude  $|F(hkl)|$ , die Information der Phase geht verloren. Zur vollständigen Bestimmung der Strukturfaktoren und der Berechnung der Elektronendichte sind somit indirekte Methoden zur Phasenbestimmung notwendig.

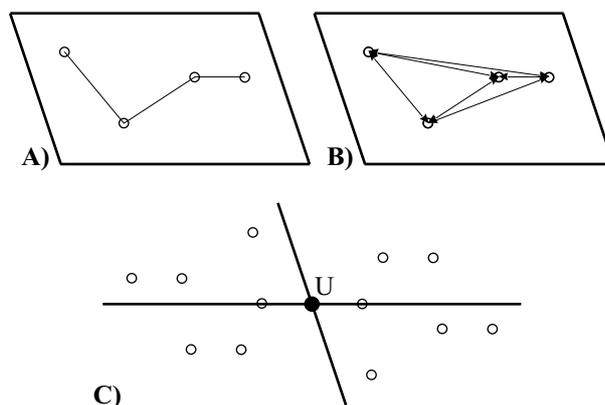
#### *Methoden zur Lösung des Phasenproblems*

Wie gezeigt werden konnte, enthält das messbare Beugungsbild nicht alle zur Berechnung des Abbildes notwendige Daten, die Phasen sind durch die Beugungsmessung nicht zugänglich. Für die Ermittlung dieser Phasen  $\phi_{hkl}$  müssen daher indirekte Verfahren angewendet werden, die sich ja nach Anwendungsbereich für organische bzw. anorganische Moleküle (bis etwa 100 Atome pro Elementarzelle) und biologische Makromoleküle stark unterscheiden. Bedingt durch die geringere Anzahl an Atomen können die Strukturen kleinerer anorganischer und organischer Substanzen mit so genannten „direkten“ Methoden routinemäßig aufgeklärt werden. Die Bezeichnung „direkte“ Methode ist in der direkten Ableitung der Phasenwerte aus den gemessenen Werten begründet. Hierzu werden mittels statistischer Verfahren [HARKER and KASPER, 1948; SAYRE, 1952] aus einzelnen Reflexen zunächst Startphasen bestimmt, welche schließlich zu einem kompletten Satz an Phasen erweitert werden können. Beide Verfahren sind aufgrund systematischer und mathematischer Limitationen auf biologische Makromoleküle nicht mehr anwendbar. Mathematische Grundlage der in der Proteinkristallographie heute üblichen

Methoden zur Bestimmung der Phasen wie isomorpher Ersatzes („*isomorphous replacement*“, anormalen Streuung „*anomalous scattering*“ und molekularer Ersatz („*molecular replacement*“ bildet die so genannte Patterson-Funktion  $P(uvw)$ .

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad (\text{II.16})$$

Bereits 1935 konnte durch A.L. Patterson gezeigt werden, dass eine mit den phasenlosen Amplitudenquadraten  $|F(hkl)|^2$  durchgeführte Fouriertransformation analog zu Gleichung II.15 eine Vektorkarte mit allen interatomaren Abständen ergibt. Damit ist aus den experimentell zugänglichen Amplituden der Reflexe allein eine Aussage über den atomaren Aufbau des Moleküls möglich. Ein Maximum in der Patterson-Karte am Punkt  $uvw$  zeigt die Anwesenheit zweier Atome im Kristall, deren Positionen um den Vektor  $uvw$  auseinander liegen. Die tatsächlichen Positionen  $x_1, y_1, z_1$  und  $x_2, y_2, z_2$  sind allerdings nicht ableitbar. Die Patterson-Karte stellt somit eine Abbildung aller Abstände im Molekül dar, wobei die Vektoren, deren Winkel zueinander erhalten bleiben, an den Ursprung translatiert werden. Aufgrund der unbestimmten Richtung der Abstandsvektoren ist die Anzahl der Vektoren verdoppelt und zentrosymmetrisch um den Ursprung angeordnet (siehe auch Abbildung II.8).



**Abbildung II.8:** Erstellung einer Patterson-Karte. **A)** zeigt ein einfaches Molekül aus vier Atomen in einer Elementarzelle. **B)** zeigt die intermolekularen Vektoren und in **C)** ist die daraus resultierende Patterson-Karte dargestellt;  $U$ , Ursprungsmaximum

Nahezu alle Verfahren zur Ermittlung der Phasen verwenden die Patterson-Funktion als Startpunkt, da sie eine Korrelation der zu bestimmenden Struktur mit den gemessenen Daten ermöglicht.

### II.16.1 Bestimmung der „Reflexphasen“ mit der Methode des Molekularen Ersatzes

Die Methode des Molekularen Ersatzes wurde von HOPPE [1957] und ROSSMANN and BLOW [1962] entwickelt und findet mit der Verfügbarkeit von Modellstrukturen aus den Datenbanken vermehrt Einsatz in der Analyse von makromolekularen Kristallstrukturen. Das Prinzip des molekularen Ersatzes ist dabei die Anwendung der Phaseninformation eines Modells auf Messdaten eines Beugungsexperiments durch Positionierung eines Modells in die Einheitszelle der neuen Struktur. Diese Positionierung ist eine sechs-dimensionale Suche. Die sechs Freiheitsgrade sind die Rotation um die Winkel  $\alpha, \beta$  und  $\gamma$  und die Translation entlang der Basisvektoren  $a, b$  und  $c$ . Durch ROSSMANN and BLOW [1962] konnte

gezeigt werden, dass sich dieses sechs-dimensionale Problem in zwei dreidimensionale, die Rotations- und die Translationsuche zerlegen lässt. Eine derartige Vereinfachung hat vor allem technische Vorteile, da eine sechs-dimensionale Lösung mit den heutigen Computerressourcen nach wie vor einen zu großen Zeitraum in Anspruch nehmen würde.

Für die Rotationsuche, sowie für die Translationsuche wird von der aus der bereits erläuterten Patterson-Funktion erhaltenen Patterson-Karte ausgegangen. Der Vergleich der Patterson-Karten aus Beugungsdaten und Modellstruktur erlaubt bei hoher Ähnlichkeit sowohl die Orientierung als auch die Position des Moleküls in Analogie zum Modell zu bestimmen.

### II.16.1.1 Molekularer Ersatz: Rotationsfunktion

Programme: CNS [BRÜNGER *et al.*, 1998], Protokoll `cross_rotation.inp`.

Geräte: PC, Betriebssystem SuSE 8.2 Linux

Im Programm CNS [BRÜNGER *et al.*, 1998] sind zwei Typen der Rotationsuche implementiert, die „traditionelle Rotationsuche“ und die „direkte Rotationsuche“. Zwischen diesen Beiden besteht ein konzeptioneller Unterschied. Während in der traditionellen Rotationsuche zwei Patterson-Karten gegeneinander gedreht und überlagert werden, erfolgt in der direkten Rotationsuche die Drehung des molekularen Modells.

Die traditionelle Rotationsfunktion  $Rot(\Omega)$  für eine gegebene Winkelorientierung  $\Omega$  wird im realen Raum (im Gegensatz zum möglichen reziproken Raum) nach [BRÜNGER, 1990] gemäß Gleichung (II.16) berechnet.

$$Rot(\Omega) = \int_U P_{obs}(u)P_{modell}(\Omega u)du \quad (\text{II.17})$$

$P_{obs}$  und  $P_{modell}$  stellen dabei die Patterson-Funktionen der Zielstruktur und des Modells dar und  $u$  ist ein Positionsvektor im Patterson-Raum  $U$ . Bei optimaler Überlagerung von  $P_{obs}$  und  $P_{modell}$ , d.h. bei korrekter Orientierung des Suchmodells zeigt die Rotationsfunktion ein Maximum. Grundlage dieser Methode ist, dass die intramolekularen Abstandsvektoren nur von der Orientierung, nicht aber von der exakten Position des Moleküls in der Elementarzelle abhängen. Durch geeignete Wahl des Integrationsvolumens  $U$  werden die intramolekularen Abstandsvektoren zwischen direkt verbundenen Atomen von der Suche ausgeschlossen.

### II.16.1.2 Molekularer Ersatz: Translationsfunktion

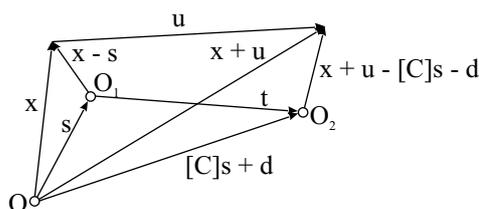
Programme: CNS [BRÜNGER *et al.*, 1998], Protokoll `translation.inp`

Geräte: PC, Betriebssystem SuSE 8.2 Linux

Nachdem die Orientierung des Moleküls ermittelt wurde, erfolgt die Suche nach der Position in der Elementarzelle durch Berechnung der Translationsfunktion nach [CROWTHER and BLOW, 1967]. Hierfür wird ein Satz intermolekularer Abstandsvektoren zweier symmetrie-verwandter Moleküle 1 und 2 benutzt. Diese so genannten Kreuz-Patterson-Vektoren kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$P_{1,2}(u) = \int_V \rho_1(x)\rho_2(x+u)dx \quad (\text{II.18})$$

Abbildung II.9 zeigt ein Paar symmetrie-verwandter Moleküle in einer Elementarzelle mit Ursprung in  $O$ . Die Position des lokalen Ursprungs von Moleküls 1 wird hierbei durch den Vektor  $s$  und die des



**Abbildung II.9:** Die Positionen von Molekül 1 und Molekül 2 sind durch  $x$  und  $x + u$  wiedergegeben.  $O_1$  und  $O_2$  bezeichnen deren lokale Ursprünge und  $[C]$  beschreibt die Matrix über die Molekül 1 in Molekül 2 überführt werden kann.

lokalen Ursprungs von Molekül 2 über  $[C]s + d$  beschrieben. Wenn für den intermolekularen Vektor  $t$  zwischen  $O_1$  und  $O_2$  nun  $t = -s + [C]s + d$  gilt, ergibt sich mit der Entwicklung der Elektronendichte  $\rho$  als Fourier-Serien von Struktur Faktoren  $F_M$ :

$$P_{1,2}(u, t) = \sum_h F_{M1}(h) \cdot F_{M2}(h[C]) e^{-2\pi h \cdot t} e^{2\pi i h \cdot u} \quad (\text{II.19})$$

Diese Kreuz-Patterson-Funktion einer Modellstruktur, in der zwei Moleküle aufgrund ihrer kristallographischen Symmetrie in Beziehung gestellt sind, wird mit der beobachteten Patterson-Funktion  $P_{obs}(u)$  verglichen und ermöglicht letztendlich die Berechnung der Translationsfunktion.

$$T(t) = \int_V P_{1,2}(u, t) P_{obs}(u) du \quad (\text{II.20})$$

Wenn der intermolekulare Vektor des Modells  $t$  gleich dem echten intermolekularen Vektor  $t_0$  ist, erreicht die Translationsfunktion  $T(t)$  einen Maximum, da dann die berechnete Patterson-Funktion  $P_{1,2}(u, t)$  korrekt auf die gesuchte Patterson-Funktion  $P_{obs}$  passt. Mit der Verknüpfung der Gleichungen II.19 und II.20 ergibt sich die Translationsfunktion  $T(t)$  als Summation der Form:

$$T(t) = \sum_h |F_{obs}(h)|^2 \cdot F_{M1}(h) \cdot F_{M2}(h \cdot [C]) e^{-2\pi i h \cdot t} \quad (\text{II.21})$$

Die experimentell bestimmten Intensitäten werden durch  $|F_{obs}(h)|^2$  wiedergegeben,  $F_{M1}(h)$  und  $F_{M2}(h \cdot [C])$  entsprechen den aus dem Modell berechnete Struktur Faktoren. Hiermit ist eine einfache Verknüpfung zwischen einem Satz von Kreuzvektoren einer Modellstruktur und der Patterson-Funktion der Zielstruktur als Fourier-Serie hergestellt.

Mit der erfolgreichen Positionierung des Modells in die Elementarzelle der zu bestimmenden Struktur kann aus der Phaseninformation des Modells und den gemessenen Struktur Faktoren das erste molekulare Modell der neuen Struktur ermittelt werden. Da die Phaseninformation jedoch einen Näherungswert darstellt, weisen die aus dem molekularen Modell errechneten Struktur Faktoren  $F_{calc}$  nur eine geringe Übereinstimmung mit den gemessenen Struktur Faktoren  $F_{obs}$  auf und bedürfen daher weiterer Verfeinerung.

## II.17 Kristallographische Auswertung

Die kristallographische Verfeinerung stellt einen iterativen Prozess zur Verbesserung der Übereinstimmung von Struktur Faktoren des Modells und der Zielstruktur dar. Die Anpassung des molekularen

Modells hin zu den experimentellen Struktur Faktoren erfolgt dabei durch die Änderung der Position der Atomkoordinaten und deren Temperaturfaktoren. Der Wert des Temperaturfaktors beschreibt dabei wie stark das jeweilige Atom um seine Position oszilliert. Aufgrund der hohen Anzahl von Atomen in makromolekularen Strukturen resultiert eine Vielzahl möglicher Verfeinerungs-Parameter, wobei das Verhältnis dieser zu den experimentellen Daten (Beugungsreflexen) nur eine unzureichende Überbestimmung zulässt. Daher werden in den Strukturverfeinerung so viele wie mögliche weitere Daten einbezogen. Zu diesen zählen stereochemischen Informationen aus Kleinmolekülstrukturen, wie Bindungslängen und -winkel [ENGH and HUBER, 1991], aber auch Wassermoleküle in den Zwischenräumen der Proteinketten sowie, falls vorhanden, die nichtkristallographische Symmetrie.

Nichtkristallographische Symmetrie liegt dann vor, wenn identische Moleküle innerhalb der Elementarzelle in unterschiedlicher Orientierung auftreten. Die Symmetrieoperation über die sie ineinander überführbar sind, ist dabei kein Symmetrieelement der Elementarzelle.

Die stereochemischen Daten können auf zwei verschiedene Arten in der Verfeinerung angewendet werden. Im „constrained refinement“ wird der Wert eines bestimmten Parameters festgeschrieben, wohingegen beim „restrained refinement“ für alle stereochemischen Parameter die Variation um einen Standardwert erlaubt ist welche von einem Energieterm kontrolliert werden. Die Atomkoordinaten sind dabei die Variablen, die Bindungslängen und -winkel, sowie die Torsionswinkel und die van der Waals Kontakte stellen die „restraints“ dar.

Die Übereinstimmung der Struktur Faktoren  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  wird durch den  $R$ -Wert wiedergegeben.

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \cdot 100\% \quad (\text{II.22})$$

Hierbei beschreibt  $F_{obs}$  den Strukturfaktor, welcher aus den gemessenen Intensitäten bestimmt wurde und  $F_{calc}$  den entsprechenden, aus dem aktuellen molekularen Modell errechneten Strukturfaktor. Der Skalierungsfaktor  $k$  ist aus dem Wilson-Plot [WILSON, 1942] zugänglich und berücksichtigt die Atomstreuungsfaktoren, sowie die Anzahl der Atome in der Elementarzelle.

Wieviele Parameter in die Verfeinerung hinzugezogen werden hängt von der Anzahl der gemessenen Reflexe und somit von der Auflösung des Datensatzes ab. In Proteinstrukturen mit einer Auflösung von 1,5Å bis 2,8Å werden normalerweise die Koordinaten aller Atome außer Wasserstoff, sowie die individuellen, gekoppelten isotropen Temperaturfaktoren verfeinert. Lediglich bei hochaufgelösten Daten  $\leq 1,5\text{\AA}$  können auch Wasserstoffatome und anisotrope Temperaturfaktoren mit einbezogen werden. Eine Verfeinerung ist nur dann sinnvoll, wenn nicht mehr Parameter freigegeben werden, als Reflexe zur Verfügung stehen. Ist dies nicht der Fall und werden somit zu viele Parameter im Verfeinerungsprozess verwendet sinkt der  $R$ -Wert beliebig, was als das so genannte „*overfitting*“ bezeichnet wird. Zur Beschränkung dieser übermäßigen Verfeinerung wurde der freie  $R$ -Wert ( $R_{free}$ ) eingeführt [BRÜNGER, 1992, 1993]. Bei dieser Methode werden die Reflexe in den Arbeitssatz („working set“ - (W)) und den Testsatz („test set“ - (T)) aufgeteilt. Der Testsatz enthält 5-10% der gemessenen Reflexe welche zufällig bestimmt werden. Die Verfeinerung erfolgt ausschließlich gegen der Arbeitssatz und der freie  $R$ -Wert ( $R_{free}$ ) wird aus den Reflexen des Testsatzes nach Gleichung II.23 bestimmt:

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \subset T} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl \subset T} |F_{obs}|} \cdot 100\% \quad (\text{II.23})$$

wobei  $hkl \subset T$  alle zum Testsatz  $T$  gehörigen Reflexe bezeichnet.

Beide, sowohl der  $R$ -Wert als auch der  $R_{free}$ -Wert müssen im Verlauf der Verfeinerung einem mini-

malen Grenzwert entgegen streben. Ist eine Konvergenz für den freien  $R_{free}$ -Wert erreicht kann die Verfeinerung abgeschlossen werden.

Der  $R_{free}$ -Wert stellt somit einen wichtigen Indikator für die Übereinstimmung des Strukturmodells zur realen Situation der gemessenen Daten dar [KLEYWEGT and BRÜNGER, 1996].

### II.17.1 Verfeinerung mit dem Programm REFMAC

Programme: REFMAC4 [MURSHUDOV *et al.*, 1997], TLS & restraint refinement

Geräte: PC, Betriebssystem SuSE 8.2 Linux

Die Verfeinerung des Strukturmodells erfolgt im Programm REFMAC4 [MURSHUDOV *et al.*, 1997] aus dem Programmpaket *CCP4* [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994]. Es basiert auf dem Formalismus der höchsten Wahrscheinlichkeit „maximum likelihood formalism“ [FISHER, 1912], welcher entsprechend BRICOGNE [1997] in die kristallographische Verfeinerung eingeführt wurde.

Die Verfeinerung wird hierbei als „TLS & restraint refinement“ durchgeführt, wobei vier TLS-Gruppen, zwei für die beiden Monomere des BMP-2, sowie zwei für die des BR-IA<sub>ec</sub>, eingerichtet werden. Pro Durchlauf werden jeweils in 25 Zyklen zunächst die TLS-Gruppen verfeinert und anschließend das „restraint refinement“ durchgeführt. Als weitere Parameter werden der Temperaturfaktor und ein Wichtungsterm („weight term“) dem Verlauf der strukturellen Verfeinerung angepasst. Darüber hinaus wird auch der  $\sigma_A$ -Wert mit 50 Zyklen in die Verfeinerung einbezogen.

Das automatische Einfügen von Wassermolekülen in das bereits verbesserte Strukturmodell erfolgt mit der Durchführung von je 10 Zyklen des „APS & restraint refinement“.

Die Qualität der durchgeführten Verfeinerung wird nach jedem Zyklus über die R-Werte  $R$  und  $R_{free}$ , dem mittleren Temperaturfaktor, sowie auf geometrischen Abweichungen (r.m.s.d. der Bindungswinkel) kontrolliert.

Die berechneten Koordinaten (PDB-Dateien) und Elektronendichtekarten  $F_{obs} - F_{calc}$  und  $2F_{obs} - F_{calc}$  werden nachfolgend manuell weiter optimiert.

### II.17.2 Manuelles Bauen der Koordinaten

Programme: Quanta2000 (Accelrys Inc.)

Geräte: SGI Octane, (Silicon Graphics Inc.)

Die manuelle Änderung der Koordinaten wird mit dem Programm Quanta2000 (Accelrys Inc.) durchgeführt. Die Elektronendichtekarten  $F_{obs} - F_{calc}$  und  $2F_{obs} - F_{calc}$  werden hierfür in einer Minimum- bzw. Maximumfunktion mit der für die Aminosäure bzw. Peptidkette errechneten Modelldichte verglichen.

Für das manuelle Einfügen von Wasser wird ein Schwellenwert von  $3-4\sigma$  in der ersten und zweiten  $F_{obs} - F_{calc}$  Elektronendichtekarte festgelegt und diese Wassermoleküle im Refinementprozess überprüft. Treten Positionsänderungen auf oder weist das Wassermolekül einen Temperaturfaktor  $B \geq 70 \text{ \AA}^2$  auf, wird das Molekül wieder entfernt.

### II.17.3 Strukturelle Analyse des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand Rezeptor Komplexes

#### *Bestimmung der Wasserstoff-Brückenbindungen*

Programme: HBPLUS, [MCDONALD *et al.*, 1993; MCDONALD and THORNTON, 1994]

Geräte: PC, Betriebssystem SuSE 8.2 Linux

Für die Bestimmung der Wasserstoff-Brückenbindungen in der Interaktionsfläche zwischen BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub> wird das Programm HBPLUS [MCDONALD *et al.*, 1993; MCDONALD and THORNTON, 1994] verwendet. Das Programm ermittelt dabei die Wasserstoffatome auf Grundlage der Koordinaten-Datei (PDB-Datei) und überprüft paarweise Donor- und Akzeptor-Atome über geometrische Parameter auf mögliche H-Brücken (siehe hierfür auch Abbildung I.9 in Kapitel I.2). Wasserstoff-Brückenbindungen werden ermittelt, wenn ein maximaler Abstand  $d < 3,3\text{\AA}$  bzw.  $r < 2,5\text{\AA}$  nicht überschritten wird, sowie der D-H-A Winkel  $\Theta > 90.0^\circ$ , der D-A-C Winkel  $\phi > 90.0^\circ$  und der H-A-C Winkel  $\gamma > 90.0^\circ$  betragen [BAKER and HUBBARD, 1984].

#### *Bestimmung von Kristall-Kristall Kontakten*

Programme: CONTACT Version 4.2, [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994]

Geräte: PC, Betriebssystem SuSE 8.2 Linux

Für die Bestimmung von Kontakten im Kristallgitter des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes wird das Programm CONTACT aus dem Programmpaket CCP4 [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994] verwendet. Das Programm listet hierbei alle Atomabstände zwischen den symmetrie-äquivalenten Komplexen für Abstände  $< 5\text{\AA}$ .

# III Ergebnisse

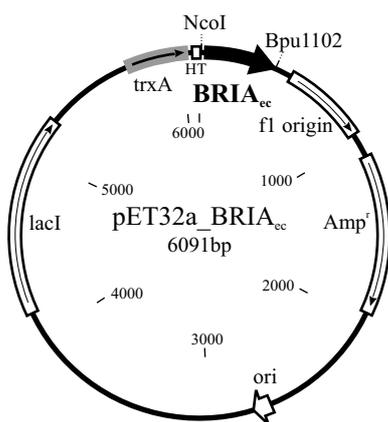
## III.1 Präparation der extrazellulären Domänen der Typ I Rezeptoren

### III.1.1 Präparation von BR-IA<sub>ec</sub> aus *E. coli*

#### III.1.1.1 Expression und Reinigung der extrazellulären Domäne des BR-IA

Die extrazelluläre Domäne des BMP Typ IA Rezeptors (BR-IA<sub>ec</sub>) wurde durch Expression als Thio-redoxin-Fusionsprotein aus *E. coli* erhalten. Ausgehend von dem durch Herrn Dr. T. Kirsch erstellten Expressionsvektor pET32a\_BR-IA<sub>ec</sub> erfolgte die Herstellung und anschließende Reinigung weitgehend entsprechend dem publizierten Protokoll [KIRSCH *et al.*, 2000b].

Die Sequenz, kodierend für die Reste 24 bis 152 des Vorläufer-Proteins [TEN DIJKE *et al.*, 1993], sowie eine N-terminale Verlängerung von GSGAMA wurden von ihm in den modifizierten pET32a unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bpu*1102 kloniert. Der modifizierte Vektor unterschied sich dabei vom originalen pET32a durch die Deletion der Basenpaare 223 bis 297. Der verwendete Expressionsvektor pET32a\_BR-IA<sub>ec</sub> ist in Abbildung III.1 dargestellt und wurde in den *E. coli*-Stamm AD494(DE3) transformiert.



**Abbildung III.1:** Expressionsvektor pET32a\_BR-IA<sub>ec</sub>. Die über die Schnittstellen *Nco*I und *Bpu*1102 eingefügte Sequenz der extrazellulären Domäne des BR-IA (BRIA<sub>ec</sub>) schließt an das Thio-redoxin (trxA), den 6x His-Tag (H) und die Thrombin-Schnittstelle (T) an.

#### *Expression und Zellaufschluss*

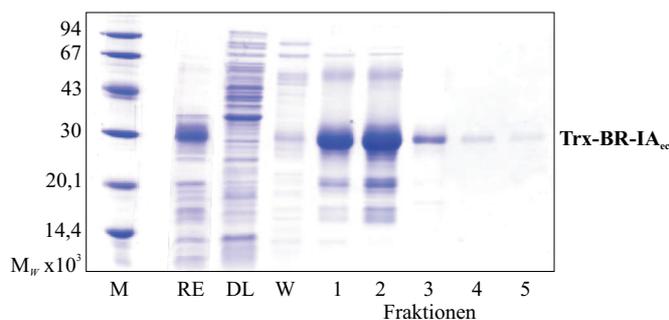
Die Expression von BR-IA<sub>ec</sub> erfolgte im präparativen Maßstab aus 7,2l Bakterienkultur entsprechend dem in Kapitel II.8.4.1 beschriebenen Protokoll. Dabei wurden sowohl die Expression bei 30°C als auch die bei RT wie angegeben durchgeführt.

In beiden Fällen ließen sich etwa 4g Bakterienzellen pro Liter Kulturmedium isolieren, die in Portionen zu 8g bis 10g gelagert und wie nachfolgend beschrieben einzeln aufgearbeitet wurden.

Der Zellaufschluss ist in Kapitel II.8.4.2 angegeben und wurde stets entsprechend durchgeführt. Die so erhaltenen 50ml Rohextrakt wurden umgehend auf die Ni-Chelat Sepharose aufgetragen.

#### *Chromatographie an Ni-Chelat Sepharose und Thrombin-Spaltung*

Die Durchführung des ersten Reinigungsschrittes der Präparation BR-IA<sub>ec</sub> durch Chromatographie an Ni-Chelat Sepharose ist unter II.10.1.1 beschrieben. Das aufgrund des 6x His-Tags an das Säulenmaterial gebundene Thioredoxin-Fusionsprotein wurde im Stufengradienten mit 0,5M Imidazol eluiert und anschließend die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. In Abbildung III.2 ist eine derartige SDS-PAGE gezeigt. Alle Fraktionen, in denen bei einem Auftrag von 10µl Protein-Lösung die Bande des BR-IA<sub>ec</sub> Thioredoxin-Fusionsproteins mit einem Molekulargewicht  $M_W$  von 28.582 (kalkuliert) durch Coomassie-Färbung nachzuweisen waren, wurden zusammengefasst und zur Vorbereitung der Thrombin-Spaltung dialysiert. Dies erfolgte zunächst gegen EDTA-Puffer, um Ni-Ionen aus der Probe abzutrennen, die durch ihrer Interaktion mit dem His-Tag zur Präzipitation des Fusionsproteins führten, und nachfolgend gegen Thrombin-Spaltbuffer.



**Abbildung III.2:** Chromatographie des Trx-BR-IA<sub>ec</sub> an Ni-Chelat Sepharose. SDS-PAGE der Elutionsfraktionen (1-5), mit Auftrag (RE, Rohextrakt), Durchlauf (DL) und Waschschrift (W) bei 60mM Imidazol der Ni-Chelat Säule.

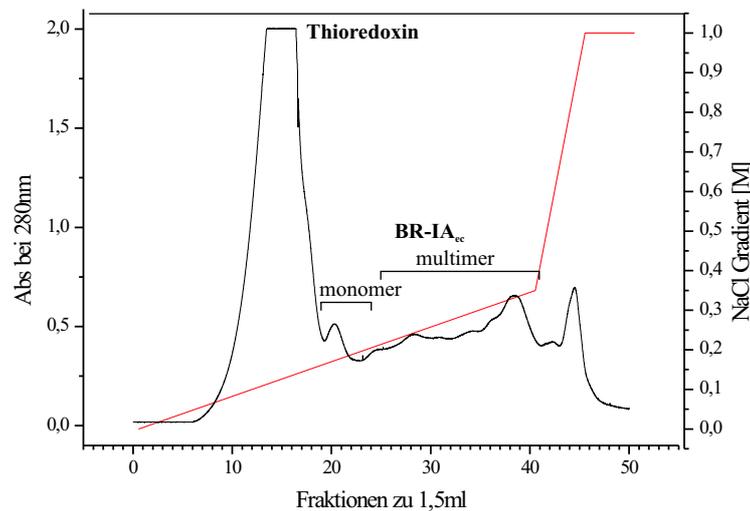
Die Ausbeute dieses ersten Reinigungsschrittes konnte für die Expression bei 30°C mit durchschnittlich 55mg/l ermittelt werden. Die Expression bei RT ergab bis zu 120mg/l BR-IA<sub>ec</sub> Thioredoxin-Fusionsprotein.

Die Durchführung der Thrombin-Spaltung ist in Kapitel II.11.6.1 beschrieben. Das zu einer Konzentration von 100µM in Thrombin-Spaltbuffer vorliegende Thioredoxin-Fusionsprotein wurde durch die Behandlung mit der Protease Thrombin in Thioredoxin inklusive 6x His-Tag und in BR-IA<sub>ec</sub> gespalten. Die bei 30°C über 4h durchgeführte Spaltung erfolgte dabei in Gegenwart von 1/500 Massenteilen Thrombin. Der Spaltansatz wurde anschließend zur Dialyse gegen Auftragspuffer der nachfolgenden Anionenaustausch-Chromatographie gegeben. Die Zusammensetzung der so vorbereiteten Probe ist in der in Abbildung III.4 gezeigten SDS-PAGE mit der Probenbezeichnung „TS“ dargestellt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung III.4 B) überlagern sich die Banden für das Thioredoxin und den BR-IA<sub>ec</sub> nahezu. Eine Unterscheidung war mit einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen, wie sie in Abbildung III.4 A) gezeigt ist möglich, da der BR-IA<sub>ec</sub> dort eine Verschiebung zu einem scheinbar höheren Molekulargewicht zeigte.

#### *Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE*

Die Anionenaustausch-Chromatographie an Trimethylaminoethyl- (TMAE) Material diente sowohl der Abtrennung des Thioredoxins, als auch der Multimeren von BR-IA<sub>ec</sub>. Wie in Kapitel II.10.4.1 beschrieben wurde hierfür in einem linearen Gradienten von 0M bis 0,35M NaCl innerhalb von 60min

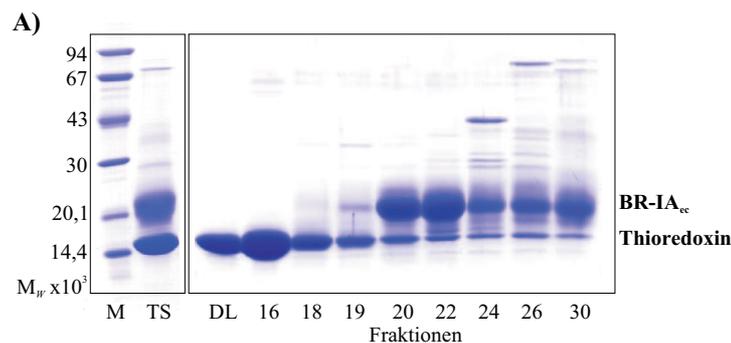
bei einem Fluss von 1ml/min eluiert. Das in Abbildung III.3 dargestellte Chromatogramm dieses Reinigungsschrittes zeigt die Elution des Thioredoxins bei einer NaCl Konzentration bis 0,2M NaCl. Bei einer Konzentration des NaCl-Gradienten von 0,2M bis 0,25M eluierte der monomere BR-IA<sub>ec</sub> unmittelbar nachfolgend und leicht überlappend zum Thioredoxin. In den restlichen Fraktionen des Gradienten bis 1M NaCl konnten verschiedene Multimere von BR-IA<sub>ec</sub> nachgewiesen werden.

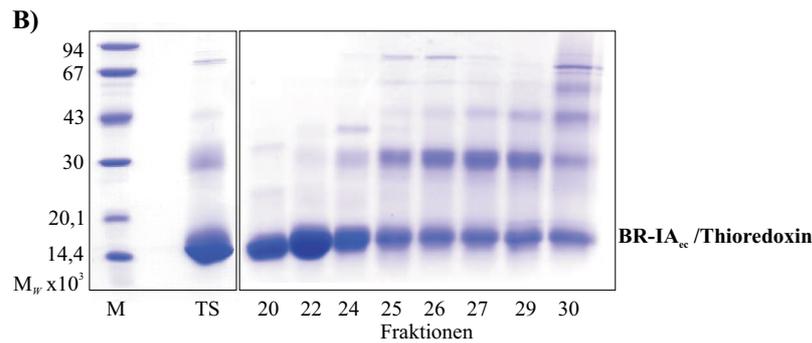


**Abbildung III.3:** Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie von BR-IA<sub>ec</sub> nach Thrombin-Spaltung des Thioredoxin-Fusionsproteins an Fractogel EMD TMAE.

Die zu 1,5ml gesammelten Fraktionen wurden auf ihre Zusammensetzung mittels SDS-PAGE analysiert. Aufgrund des bereits beschriebenen Laufverhaltens von Thioredoxin und BR-IA<sub>ec</sub> waren zur Bestimmung des Pools an monomeren BR-IA<sub>ec</sub> SDS-PAGEs sowohl unter reduzierenden wie auch unter nichtreduzierenden Bedingungen notwendig. Beide sind in Abbildung III.4 gezeigt.

Der Start der Elution an BR-IA<sub>ec</sub> ist damit in Abbildung III.4 A) deutlich ab Fraktion 19 zu erkennen. Dahin gegen ist aus der SDS-PAGE in III.4 B) eine Zunahme an Multimere von BR-IA<sub>ec</sub> ab Fraktion 25 nachzuweisen. Somit wurden die Fraktionen 19 bis 24 zusammengefasst und gegen HBS<sub>500</sub>-Puffer zur Vorbereitung der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie II.10.2.2 dialysiert. Die Ausbeute an BR-IA<sub>ec</sub> nach der Anionenaustausch-Chromatographie lagen mit durchschnittlich 7mg/l bei einer Expression bei 30°C und mit bis zu 8mg/l bei RT-Expression nahezu gleich.





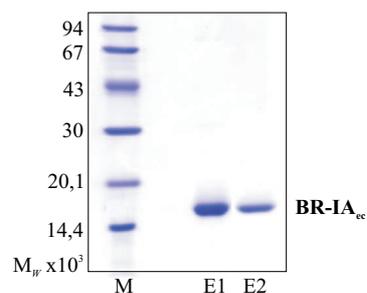
**Abbildung III.4:** Zusammensetzung der Elutionsfraktionen nach Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE.

SDS-PAGE unter **A)** reduzierenden und **B)** nichtreduzierenden Bedingungen mit Proben des Auftrags (TS, Thrombin-Spaltansatz) und Durchlaufs (DL) der TMAE-Säule.

#### BMP-2 Affinitäts-Chromatographie

Die abschließende Reinigung von BR-IA<sub>ec</sub> konnte durch Affinitäts-Chromatographie an BMP-2, wie sie in Abschnitt II.10.2.2 beschrieben ist, erzielt werden. Hierfür wurde zunächst das BMP-2 an die CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt II.10.2.1. Die Kapazität der Säule konnte mit 2mg BR-IA<sub>ec</sub> bestimmt werden. Dieser Reinigungsschritt ermöglichte die Abtrennung von biologisch nicht aktivem monomerem BR-IA<sub>ec</sub> aus den Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE.

Das in HBS<sub>500</sub>-Puffer vorliegende Protein wurde auf ein Volumen von weniger als 1ml konzentriert und auf die BMP-2 Affinitäts-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 4M MgCl<sub>2</sub>. Der gesammelte Durchlauf wurde anschließend erneut konzentriert, aufgetragen und eluiert. Diese Schritte wurden jeweils so oft wiederholt bis kein BR-IA<sub>ec</sub> mehr eluiert werden konnte.



**Abbildung III.5:** SDS-PAGE zweier aufeinander folgender Elutionen (E1 und E2) von BR-IA<sub>ec</sub> der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie.

Die erzielten Ausbeuten an affinitätsgereinigtem Rezeptor lagen für Expression bei 30°C um 1mg/l BR-IA<sub>ec</sub>, wohingegen bis zu 1,5mg/l aus RT-Expressionen erhalten werden konnten. In Abbildung III.5 ist die Analyse der Elution der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie wiedergegeben. Sie zeigt exemplarisch zwei aufeinander folgende Elutionen einer Präparation. Die Probe der ersten Elution wurde dabei mit „E1“ und die der zweiten mit „E2“ gekennzeichnet. Die SDS-PAGE bestätigt eine Reinigung zur Homogenität, wie sie für eine Affinitäts-Chromatographie am Liganden erwartet wurde.

Eine Zusammenfassung der Reinigungsschritte und der erzielten Ausbeuten ist in Tabelle III.1 wiedergegeben. Daraus geht hervor, dass bei einer Expression bei 30°C durchschnittlich 3,5% (auf nmol Ausbeute bezogen) des als Fusionsprotein exprimierten BR-IA<sub>ec</sub> biologisch aktiv sind, wobei sich die biologische Aktivität hier als die Bindung an BMP-2 der Affinitätssäule definiert. Dem stehen nur

2,4% aus der RT-Expression gegenüber. Da sich jedoch durch diese Expression deutlich mehr Fusionsprotein herstellen ließ, wurde das von KIRSCH *et al.* [2000b] etablierte Protokoll auch diesbezüglich für alle weiteren Expressionen von Thioredoxin-Fusionsproteinen modifiziert.

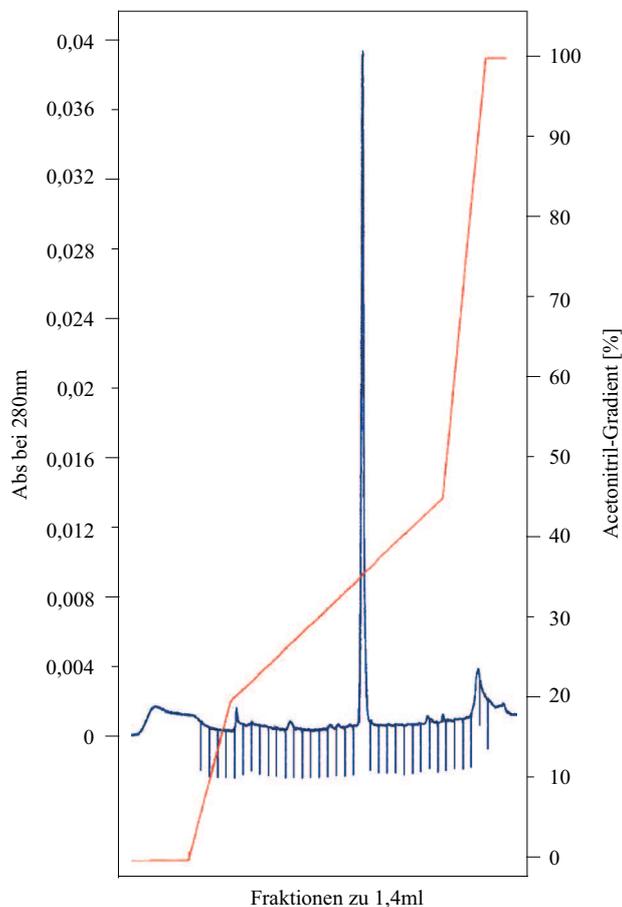
**Tabelle III.1:** Reinigungstabelle der Präparation von BR-IA<sub>ec</sub> als Thioredoxin-Fusionsprotein aus *E.coli*.

Expression bei	Bakterienkultur	Ni-Chelat Sepharose	TMAE Chromatographie	BMP-2 Affinitäts-Chromatographie
30°C	4g/l Zellen	56mg/l (Trx-BR-IA <sub>ec</sub> )	7mg/l BR-IA <sub>ec</sub> (Monomer)	1mg/l
RT (21°C)	4g/l Zellen	120mg/l (Trx-BR-IA <sub>ec</sub> )	8mg/l BR-IA <sub>ec</sub> (Monomer)	1,5mg/l

### III.1.1.2 Biochemische Charakterisierung von BR-IA<sub>ec</sub>

#### Analytische HPLC

Die analytische HPLC diente der Überprüfung der Homogenität des durch die beschriebene Reinigungsstrategie erhaltenen BR-IA<sub>ec</sub>. Sie wurde getrennt für jeden einzelnen Elutions-Pool der BMP-2



**Abbildung III.6:** Analytische HPLC von BR-IA<sub>ec</sub> nach Reinigung des in *E.coli* exprimierten Thioredoxin-Fusionsproteins.

Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. Der Auftrag betrug  $100\mu\text{g}$  und die Elution erfolgte im linearen Acetonitril-Gradienten zwischen 20% und 45% Acetonitril innerhalb von 40min. In Abbildung III.6 ist das Elutionsprofil wiedergegeben. Der BR-IA<sub>ec</sub> eluierte bei 35% Acetonitril als einzelner Peak.

#### *Protein-Sequenzierung und massenspektrometrische Analyse*

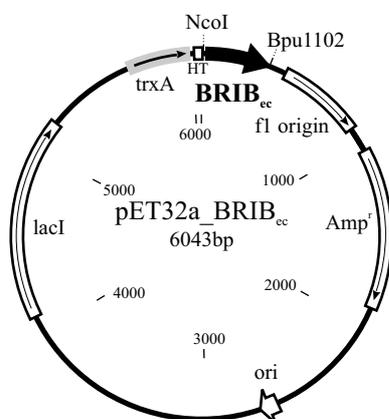
Die weiterführende biochemische Charakterisierung von BR-IA<sub>ec</sub> durch Protein-Sequenzierung und Massenspektrometrie wurden von Herrn Dr. T. Kirsch durchgeführt und sind in KIRSCH *et al.* [2000b] beschrieben. Sie bestätigten die Vollständigkeit der nach Präparation als Thioredoxin-Fusionsprotein aus *E.coli* erhaltenen extrazellulären Domäne des BMP Typ IA Rezeptors.

Die biologische Aktivität von BR-IA<sub>ec</sub> wurde durch Interaktionsanalysen mit der BIAcore-Technik bestimmt. Die Ergebnisse sind in Kapitel III.3 zusammengestellt.

### III.1.2 Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> aus *E. coli*

#### III.1.2.1 Expression und Reinigung der extrazellulären Domäne des BR-IB

Die Präparation der extrazellulären Domäne des BMP Typ IB Rezeptors (BR-IB<sub>ec</sub>) erfolgte als Thioredoxin-Fusionsprotein und wurde in AD494(DE3) *E.coli*-Zellen exprimiert. Dafür fand der in Analogie zum BR-IA<sub>ec</sub> von Herrn Dr. T. Kirsch erstellte Expressionsvektor pET32a\_BR-IB<sub>ec</sub>, wie er in Abbildung III.7 dargestellt ist, Verwendung. Er beinhaltet zur Expression, im Anschluss an die Sequenz des Thioredoxins, des 6x His-Tag und der Thrombin-Schnittstelle, die Reste 14 bis 126 des murinen BR-IB Vorläufer-Proteins [TEN DIJKE *et al.*, 1994a].



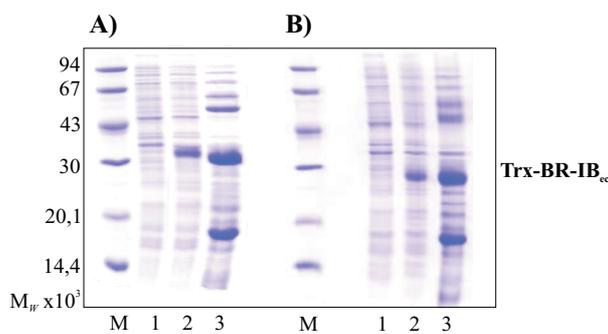
**Abbildung III. 7:** Expressionsvektor pET32a\_BR-IB<sub>ec</sub>.

Die über die Schnittstellen *NcoI* und *Bpu1102* eingefügte Sequenz der extrazellulären Domäne von BR-IB (BRIB<sub>ec</sub>) schließt an das Thioredoxin (*trxA*), den 6x His-Tag (H) und die Thrombin-Schnittstelle (T) an.

#### *Expression und Zellaufschluss*

Aufgrund der Erfahrung mit der Präparation von BR-IA<sub>ec</sub> aus diesem Expressionssystem, sowie dessen unterschiedlichen Ausbeuten in Abhängigkeit von Expressionstemperatur und -dauer wurde der BR-IB<sub>ec</sub> ausschließlich bei RT exprimiert. Hierfür wurden 7,2l Bakterienkultur wie unter II.8.4.1 beschrieben bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von maximal OD<sub>600</sub> 0,5 kultiviert und nachfolgend auf 21°C abgekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur erfolgte die Induktion der BR-IB<sub>ec</sub>-Expression durch Zugabe vom 1mM IPTG. Nach etwa 18h Inkubation bei RT wurde die Expressionsphase durch das Ernten der Zellen beendet. Die so erhaltenen 4,4g/l Bakterienzellen wurden in Portionen zu 10g bei -80°C gelagert und einzeln aufgearbeitet.

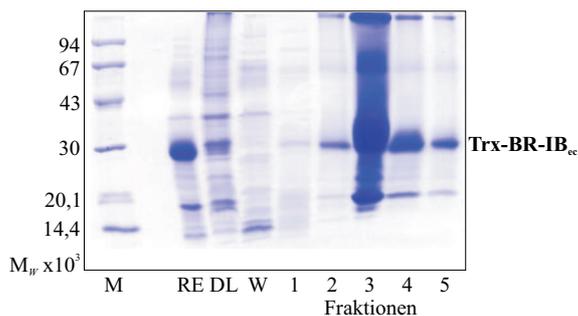
Der Zellaufschluss, der in seiner Durchführung in Kapitel II.8.4.2 beschrieben ist, diente zur Gewinnung des Rohextrakts. Dieser enthält das lösliche Fusionsprotein, welches nachfolgend auf die Ni-Chelat-Sephrose, dem ersten Reinigungsschritt der BR-IB<sub>ec</sub>-Präparation aufgetragen wurde. In Abbildung III.8 ist die SDS-PAGE zur Analyse der Induktion und des Zellaufschlusses abgebildet. Die Bande des Thioredoxin-Fusionsproteins von BR-IB<sub>ec</sub> (Trx-BR-IB<sub>ec</sub>) mit einem kalkulierten Molekulargewicht  $M_W$  von 27.116 ist entsprechend gekennzeichnet.



**Abbildung III.8:** Analyse der Proteinexpression und des Zellaufschlusses. SDS-PAGE unter **A)** reduzierenden und unter **B)** nichtreduzierenden Bedingungen. 1, Zellen nicht-induziert; 2, Zellen induziert; 3, Rohextrakt.

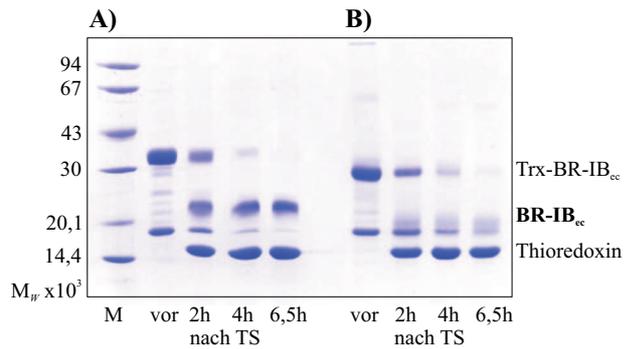
#### Chromatographie an Ni-Chelat Sepharose und Thrombin-Spaltung

Die Elution der Ni-Chelat Sepharose, wie sie bereits für die BR-IA<sub>ec</sub> Präparation beschrieben wurde, erfolgte auch hier isokratisch durch Zusatz von 0,5M Imidazol. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und entsprechend ihrem Gehalt an Trx-BR-IB<sub>ec</sub> wie aus Abbildung III.9 ersichtlich aus Fraktion 2 bis 5 zusammengefasst. Nach Dialyse zunächst gegen EDTA-Puffer und nachfolgend gegen Thrombin-Spaltpuffer konnten durchschnittlich 150mg/l Trx-BR-IB<sub>ec</sub> erhalten und zur Thrombin-Spaltung eingesetzt werden.



**Abbildung III.9:** Chromatographie des Trx-BR-IB<sub>ec</sub> an Ni-Chelat Sepharose. SDS-PAGE der Elutionsfraktionen (1-5), mit Auftrag (RE, Rohextrakt), Durchlauf (DL) und Waschschritt (W) bei 60mM Imidazol der Ni-Chelat Säule.

Die Thrombin-Spaltung erfolgte dabei zunächst wie für den Trx-BR-IA<sub>ec</sub> beschrieben, wobei durch Zugabe von Thrombin im Verhältnis 1:500 zur Masse an Trx-BR-IB<sub>ec</sub> keine vollständige Spaltung innerhalb von 8h erzielt werden konnte. Daher wurde das Massenverhältnis auf 1:300 heraufgesetzt und wie in Abbildung III.10 der Spaltvorgang in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mittels SDS-PAGE untersucht. Hierbei konnte eine vollständige Spaltung nach 6,5h nachgewiesen werden. Die allgemeine Vorschrift zur Thrombin-Spaltung wurde daher für die Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> diesbezüglich geändert.

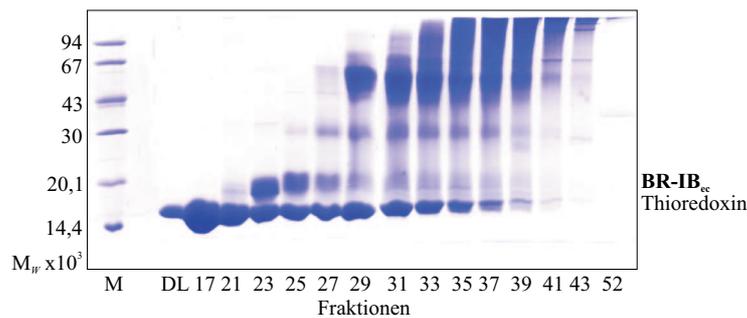


**Abbildung III.10:** Analyse der Thrombin-Spaltung (TS) von Trx-BR-IB<sub>ec</sub> aus *E.coli*.

In **A)** SDS-PAGE mit Spaltansatz vor Zugabe des Thrombins (vor), sowie den Proben nach 2h, 4h und 6,5h Spaltung bei 30°C (reduzierende Bedingungen). **B)** zeigt diese Proben unter nichtreduzierenden Bedingungen.

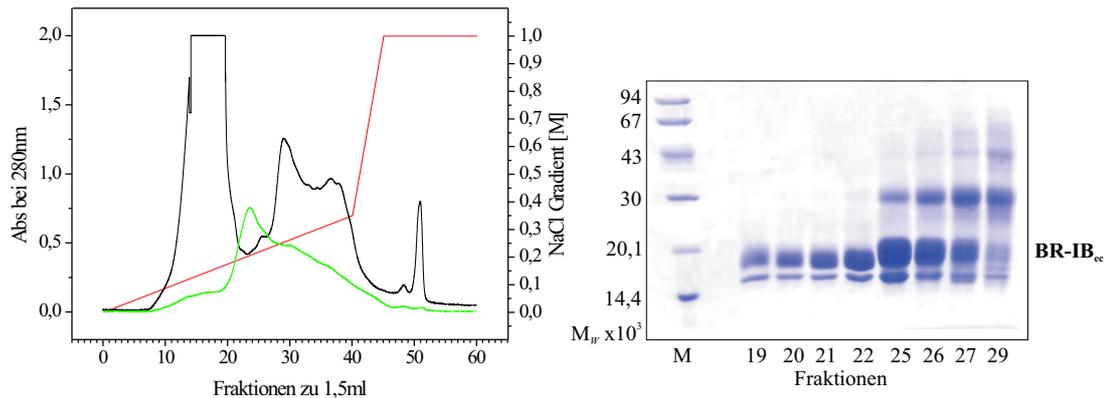
*Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE*

Nach erfolgter Spaltung von BR-IB<sub>ec</sub> vom Fusionsprotein Thioredoxin sowie dem 6x His-Tag wurde auch in dieser Präparation die Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE zur Abtrennung von monomerem BR-IB<sub>ec</sub> angewandt. Die chromatographische Auftrennung erfolgte bei einem pH-Wert von 7,5 mit einem linearen Gradienten bis 0,35M NaCl innerhalb von 60min. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung III.12 in schwarz dargestellt. Die Elution von monomerem BR-IB<sub>ec</sub> konnte mittels SDS-PAGE (siehe Abbildung III.11) in den Fraktionen 21 bis 28 nachgewiesen werden. Dies entspricht einer NaCl-Konzentration von 0,2-0,25M im Gradienten. In Übereinstimmung mit den für BR-IA<sub>ec</sub> gezeigten Daten konnte auch hier die Elution unmittelbar nach der von Thioredoxin und vor denen der Multimeren beobachtet werden. Lediglich eine deutliche Separation des monomeren BR-IB<sub>ec</sub> konnte nicht erzielt werden, wodurch stets eine SDS-PAGE zur Bestimmung der entsprechenden Elutionsfraktionen notwendig war.



**Abbildung III.11:** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Wie durch Abbildung III.11 belegt, wurden die Fraktionen 21 bis 28 zum so genannten Pool 1 (monomerer BR-IB<sub>ec</sub>) zusammengefasst und nach Dialyse gegen HBS<sub>500</sub>-Puffer auf die BMP-2 Affinitäts-Chromatographie aufgetragen. Die entsprechende Vorschrift wurde bereits in der Präparation von BR-IA<sub>ec</sub> erläutert. Die Ausbeute des so gereinigten BR-IB<sub>ec</sub> konnte mit 350µg/l bestimmt werden und betrug somit nur 0,5% an exprimiertem BR-IB<sub>ec</sub> Thioredoxin-Fusionsprotein.



**Abbildung III.12:** Reinigung von BR-IB<sub>ec</sub> durch Anionenaustausch-Chromatographie.

**A)** Überlagerte Darstellung der TMAE-Elutionsprofile für BR-IB<sub>ec</sub> nach Thrombin-Spaltung (schwarz), sowie nach Renaturierung (grün). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der TMAE für BR-IB<sub>ec</sub> nach Renaturierung.

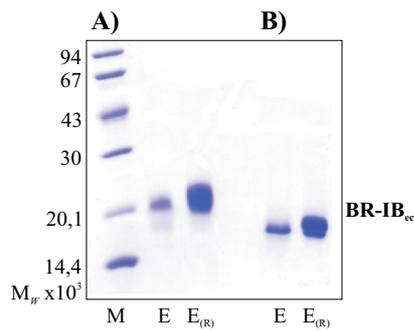
#### *Denaturierung und Renaturierung von BR-IB<sub>ec</sub> nach BOESEN et al. [2000]*

Die geringe Ausbeute an monomerem und BMP-2 bindungsfähigen BR-IB<sub>ec</sub>, trotz sehr hoher Expressionsraten des Fusionsproteines, war Ausgangspunkt für die Überlegung die gebildeten Multimeren durch Renaturierung in biologisch aktives Material umzuwandeln. Derartige Denaturierungs- und Renaturierungs-Protokolle sind für Präparationen von Liganden der TGF- $\beta$  Superfamilie, aber auch für deren extrazellulären Domänen, wie zum Beispiel für den TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor BOESEN et al. [2000] beschrieben. Die entsprechenden Protokolle sind jedoch für *E.coli*-Expression in Einschlusskörpern („inclusion bodies“) etabliert und wurden von Herrn Prof. W. Sebald auf die bereits löslich vorliegende Fraktion von multimerem BR-IB<sub>ec</sub> optimiert.

Hierfür wurden zunächst die TMAE-Fraktionen 29 bis 47 zum so genannten Pool 2 zusammengefasst und auf 50mg/ml eingengt. Diese hoch konzentrierte Proteinlösung wurde unter Zusatz der chaotropen Reagenz Guanidinium-hydrochlorid (GuHCl) und dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) bei einem pH-Wert von 7,5 vollständig denaturiert. Nachdem der Ansatz mindestens 1h bei RT gerührt hatte, konnte die Renaturierung durch Zutropfen des Denaturierungsansatzes in den Renaturierungspuffer, dessen Zusammensetzung unter II.8.4.3 angegeben ist, erfolgen. Die Gegenwart von 0,5M Arginin sowie 0,5mM Cystamin und 5mM Cysteamin ermöglichte die Rückfaltung der Proteinmoleküle in die native Form. Nach anschließendem Einengen des Renaturierungsansatzes und Dialyse wurde erneut die Anionenaustausch-Chromatographie zur Abtrennung von gebildetem BR-IB<sub>ec</sub> Monomer verwendet. Das Elutionsprofil der TMAE-Säule nach Renaturierung ist in Abbildung III.12 A) in grün dargestellt und dem Profil der TMAE vor Renaturierung überlagert. In den Fraktionen 21 bis 26 konnte mittels SDS-PAGE die Elution von monomerem BR-IB<sub>ec</sub> nachgewiesen werden (siehe hierfür auch Abbildung III.12 B)). Diese Fraktionen wurden ebenfalls auf die BMP-2 Affinitäts-Chromatographie aufgetragen. Es konnten so nochmals 450 $\mu$ g/l an BMP-2 bindungsaktiven BR-IB<sub>ec</sub> gewonnen werden.

#### *BMP-2 Affinitäts-Chromatographie*

Wie bereits beschrieben, konnten von der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie sowohl aus Pool 1 als auch nach Renaturierung aus Pool 2 aktiver monomerer BR-IB<sub>ec</sub> eluiert werden. Die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen dieses Reinigungsschrittes sind in Abbildung III.13 dargestellt.



**Abbildung III.13:** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie.

Elution nach Auftrag des TMAE Pool 1 (E) und Elution nach Auftrag des renaturierten TMAE Pool 2 ( $E_{(R)}$ ) unter **A)** reduzierenden und **B)** nichtreduzierenden Bedingungen.

Bei gleichem Auftragsvolumen ist die höhere Konzentration von  $BR-IB_{ec}$  in Fraktionen nach Renaturierung deutlich. Die Homogenität dieser Probe ist jedoch, aufgrund einer zweiten starken Bande minimal niedrigeren Molekulargewichts, nicht so hoch wie in der Elution aus Pool 1. Diese beobachteten Unterschiede sind Gegenstand der biochemischen Charakterisierung und sind im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

**Tabelle III.2:** Reinigungstabelle der Präparation von  $BR-IB_{ec}$  als Thioredoxin-Fusionsprotein aus *E.coli*.

Expression	Bakterienkultur	Ni-Chelat-Sepharose	TMAE	TMAE(R) <sup>†</sup>	BMP-2 Affi.-Chromatogr.
RT (21°C)	4,4g/l Zellen	150mg/l (Trx- $BR-IB_{ec}$ )	Pool 1: (70mg/l) (Monomer)	–	350µg/l
			Pool 2: 80mg/l (Multimer)	35mg/l (Monomer)	450µg/l
<b>gesamt:</b>					800µg/l

<sup>†</sup> TMEA(R), TMAE nach De- und Renaturierung des Pool 2

Die Ausbeuten der Präparation von  $BR-IB_{ec}$  als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E.coli* sind in Tabelle III.2 zusammengefasst. Insgesamt konnten durchschnittlich 800µg/l  $BR-IB_{ec}$  nach Affinitäts-Reinigung erhalten werden, was einer Gesamtausbeute von 1,1% (ausgehend von der Stoffmenge an exprimiertem Fusionsprotein) entspricht. Mit der Einführung der Renaturierung der Multimeren von  $BR-IB_{ec}$  konnte die Ausbeute mehr als verdoppelt werden, lag damit jedoch immernoch deutlich unter der von  $BR-IA_{ec}$ .

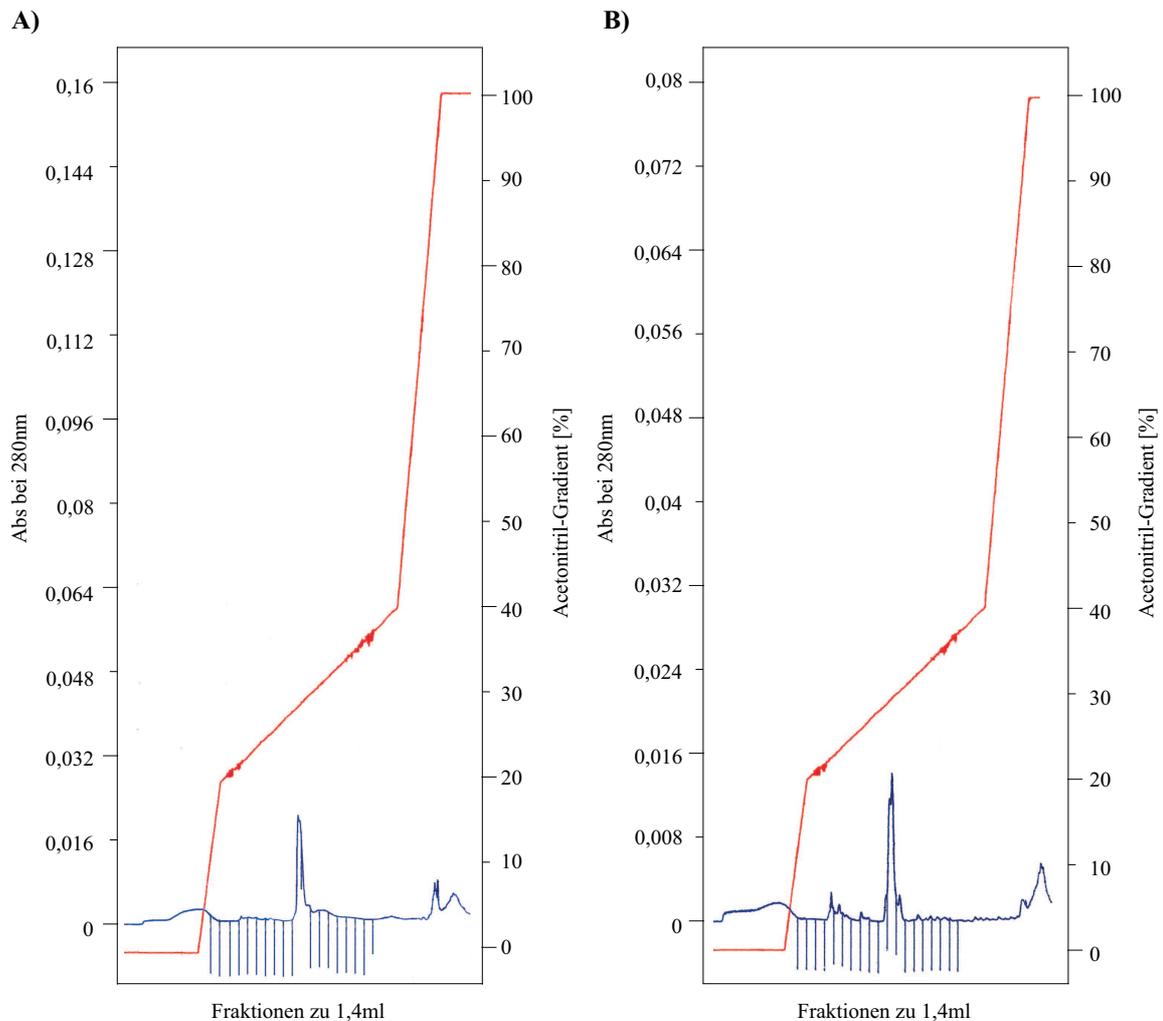
### III.1.2.2 Biochemische Charakterisierung von $BR-IB_{ec}$ aus *E.coli*

#### Analytische HPLC

Die Homogenität des nach abschließender Reinigung durch BMP-2 Affinitäts-Chromatographie erhaltenen  $BR-IB_{ec}$  wurde mit einer analytischen HPLC überprüft. Es wurden hierfür getrennt 100µg aus den Elutions-Pools der Aufarbeitung ohne (Chromatogramm der HPLC in Abbildung III.14 A)) und

mit Renaturierung (Abbildung III.14 B)) aufgetragen. Die Elution erfolgte im linearen Acetonitril-Gradienten für beide Proben bei einer Konzentration von 28% Acetonitril.

Dabei zeigten beide HPLC-Chromatogramme stets zwar einen einzelnen, aber trotz des geringen Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{280}$  von BR-IB<sub>ec</sub> zu niedrigen und verbreiterten Elutionspeak. Dies deutete auf eine nicht homogene Zusammensetzung der Proben hin und wurde durch Protein-Sequenzierung und Massenspektrometrie weiter untersucht.



**Abbildung III.14:** Analytische HPLC von BR-IB<sub>ec</sub> nach Reinigung des in *E.coli* exprimierten Thioredoxin-Fusionsproteins.

**A)** HPLC-Chromatogramm für die Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> ohne Renaturierung.

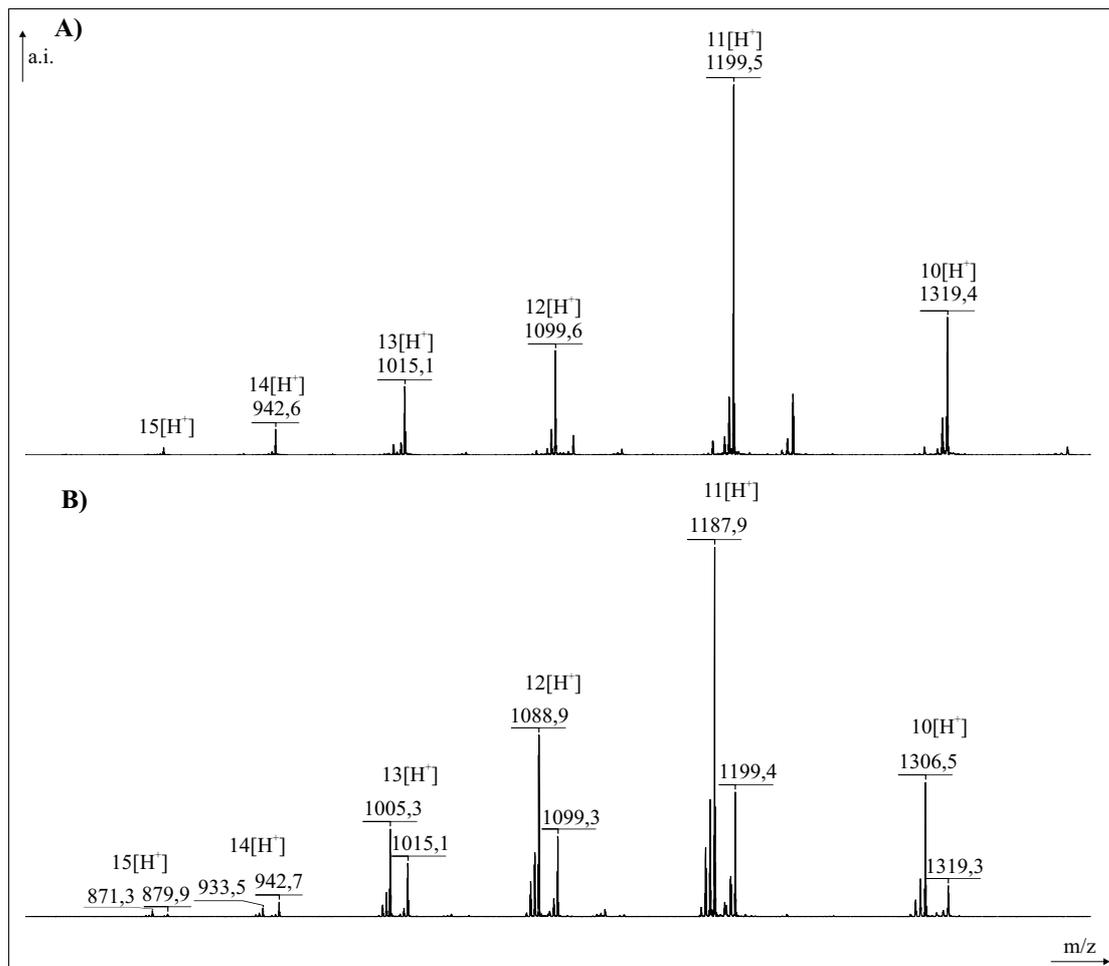
**B)** HPLC-Chromatogramm für die Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> mit Renaturierung.

#### Protein-Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung der ersten zehn Aminosäuren des als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E.coli* exprimierten und aufgereinigten BR-IB<sub>ec</sub> belegte die homogene und korrekte Thrombin-Spaltung. So konnten die aus dem Spaltmotiv stammenden Aminosäuren Gly und Ser und nachfolgend die eingefügten Aminosäuren Gly, Ala, Met, Ala, sowie die ersten vier Aminosäuren der BR-IB<sub>ec</sub> Sequenz (Lys), (Lys), Glu und Asp nachgewiesen werden.

*Massenspektrometrische Analyse*

Zur massenspektrometrischen Analyse von BR-IB<sub>ec</sub> aus *E.coli* wurden mit HPLC gereinigte Elutionsfraktionen der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie verwendet. Dabei wurden die Proben mit und ohne Renaturierung getrennt analysiert. Eine Gegenüberstellung der erhaltenen Rohdaten dieser Messungen ist in Abbildung III.15 angegeben. Dabei ist in Bildteil A) die Messung von BR-IB<sub>ec</sub> ohne Renaturierung (BR-IB) und in Bildteil B) die Messung für den nach Renaturierung erhaltenen BR-IB<sub>ec</sub> (BR-IB(R)) dargestellt. Die unterschiedlich protonierten Formen des Rezeptors sind entsprechend gekennzeichnet.

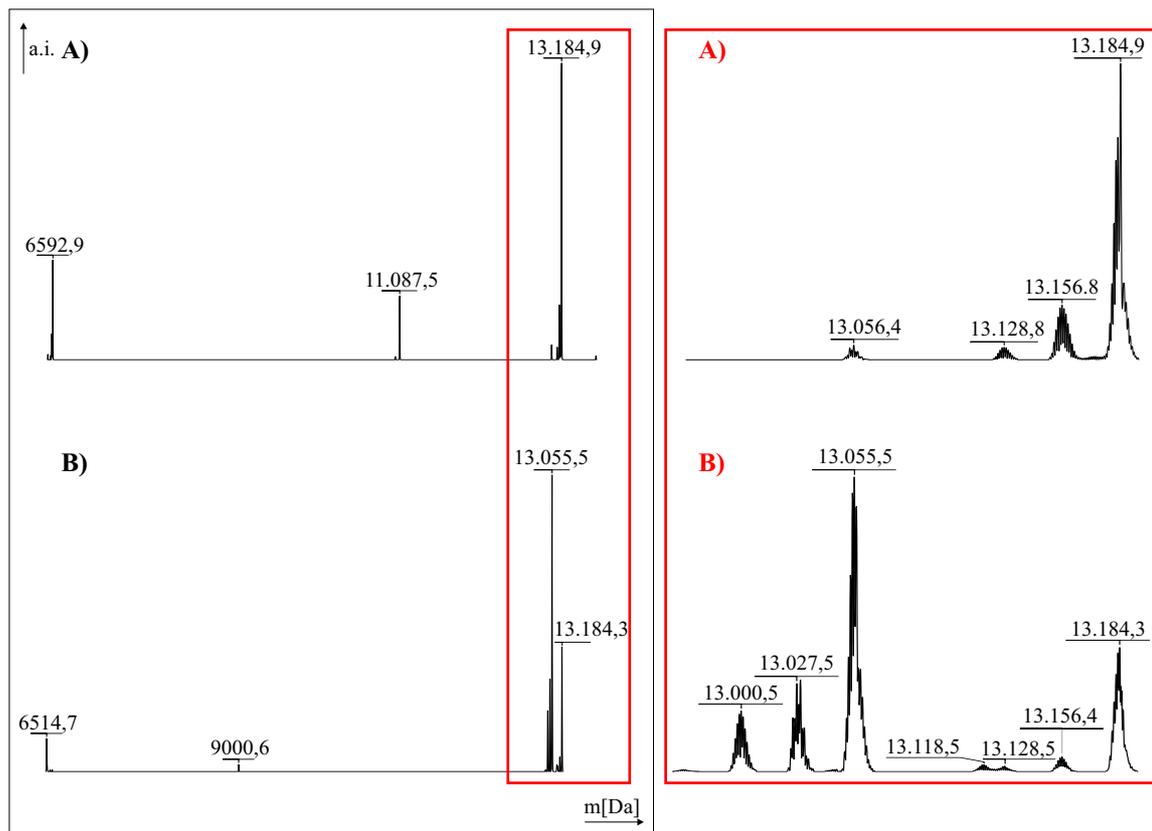


**Abbildung III.15:** Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von BR-IB<sub>ec</sub> aus *E.coli*. **A)** BR-IB<sub>ec</sub> nach BMP-2 Affinitäts-Chromatographie ohne Renaturierung (BR-IB). **B)** BR-IB<sub>ec</sub> nach BMP-2 Affinitäts-Chromatographie mit Renaturierung (BR-IB(R)).

Nach Dekonvolution war für die Probe „BR-IB“ (siehe Abbildung III.16 A)) ein Hauptsignal mit einer molaren Masse von 13.184,9Da zu identifizieren. Dieses Signal konnte durch den Vergleich mit der aus der molekularen Zusammensetzung berechneten theoretischen Isotopenverteilung (13.184,0Da; C<sub>552</sub>H<sub>864</sub>N<sub>167</sub> O<sub>183</sub>S<sub>13</sub> (+1); 5 Disulfid-Brücken) eindeutig dem BR-IB<sub>ec</sub> aus *E.coli* zugeordnet werden. Wie die Vergrößerung des rot umrandeten Ausschnitts im rechten Bildteil zeigt, wurden drei weitere kleinere Signale ermittelt. Zwei Spezies (13.156,8Da und 13.128,8Da) wiesen eine um 28Da geringere molare Masse als für BR-IB<sub>ec</sub> auf. Dieses sich auch in anderen BR-IB<sub>ec</sub>-Proben wiederho-

lende „Muster“ konnte nicht endgültig zugeordnet werden. Es wurde jedoch angenommen, dass es sich hierbei um einen durch die Ionisation erzeugten und für den BR-IB<sub>ec</sub> aus *E.coli* spezifischen Artefakt handelte.

Das dritte Signal wiederum konnte eindeutig, aufgrund einer um 128Da geringeren molaren Masse (13.056,4Da) identifiziert werden. Es entsprach dem um das C-terminale Lys verkürzten BR-IB<sub>ec</sub>. Dieser wurde in der Probe „BR-IB(R)“ (siehe Abbildung III.16 B)) als Hauptsignal ermittelt. Dahingegen war das erwartete Signal von BR-IB<sub>ec</sub> bei 13.184,0Da (theoretische Masse) nur als Nebensignal zu detektieren.



**Abbildung III.16:** Massenspektrometrische Analyse von BR-IB<sub>ec</sub> aus *E.coli*, Daten nach Dekonvolution mit Vergrößerung des Ausschnitts des Hauptsignals (roter Rahmen).

**A)** BR-IB<sub>ec</sub> nach BMP-2 Affinitäts-Chromatographie ohne Renaturierung (BR-IB). **B)** BR-IB<sub>ec</sub> nach Renaturierung und BMP-2 Affinitäts-Chromatographie (BR-IB(R)).

Die massenspektrometrische Analyse des aus *E.coli* präparierten BR-IB<sub>ec</sub> ergab Unterschiede in der Zusammensetzung der Proben „BR-IB“ und „BR-IB(R)“, welche sich durch ihre Aufarbeitung unterscheiden. In der Probe „BR-IB“ konnte hauptsächlich der entsprechend der exprimierten Sequenz korrekte BR-IB<sub>ec</sub> nachgewiesen werden. Dem gegenüber enthielt die Probe „BR-IB(R)“, welche nach Renaturierung des TMAE Pools 2 und BMP-2 Affinitäts-Chromatographie erhalten wurde, neben dem korrekten BR-IB<sub>ec</sub> hauptsächlich eine um das C-terminale Lys verkürzte Variante. Eine Ursache für diese offensichtlich durch die Renaturierung bedingte veränderte Zusammensetzung könnten einmal Degradation während der durch die Renaturierung stark verlängerten Aufarbeitung sein. Denkbar wäre aber auch eine bevorzugte Multimerisierung des bereits ohne Lysin exprimierten Trx-BR-IB<sub>ec</sub>, welcher dann durch die Renaturierung in Monomere umgewandelt würde. Die gezeigten Ergebnisse der

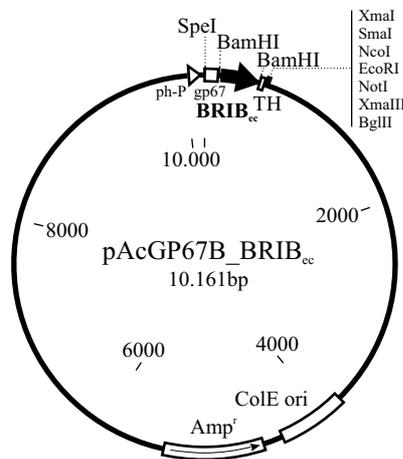
Massenspektrometrie belegen somit die bereits während der Aufarbeitung (siehe hierfür Abbildung III.13) und mittels analytischer HPLC (siehe hierfür Abbildung III.14) beschriebenen Unterschiede in den Proben von BR-IB<sub>ec</sub> ohne und mit Renaturierung.

### III.1.3 Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen

Die Verwendung des Baculovirus Expressionssystems zur Herstellung rekombinanter Proteine ist weit verbreitet. Die Vorteile dieses Expressionssystems liegen dabei in der Überexpression biologisch aktiver Proteine, aufgrund korrekter Faltung und Ausbildung der Disulfidbrücken, sowie einer effizienten Sekretion dieser in das Kulturmedium. Zusätzlich ist das System in der Lage post-translationale Modifikationen wie Glycosylierungen und Phosphorylierungen vorzunehmen. Speziell bei Präparation von Proteinen zur Kristallstrukturanalyse stellen N- oder O-Glycosylierungen jedoch ein Problem dar. Diese flexiblen Bereiche, die zudem Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins nehmen, müssen zumeist durch aufwendige enzymatische Behandlung während der Reinigung vom Protein abgetrennt werden. Dies macht die Präparation komplexer und muss unter diesen Voraussetzungen als Nachteil des Expressionssystem angesehen werden.

Da das Baculovirus Genom für direktes Einfügen fremder Gene zu groß ist, findet ein Transfervektor Verwendung. Die Cotransfektion dieses Vektors zusammen mit der AcNPV DNA führt dann durch homologe Rekombination zur Übertragung des heterologen Gens in die AcNPV DNA, welche zur Infektion der *Sf*-9 Insektenzellen verwendet wird.

#### III.1.3.1 Expression und Reinigung der extrazellulären Domäne des BR-IB



**Abbildung III.17:** Transfervektor pAcGP67B\_BR-IB<sub>ec</sub>. Die über *Bam*HI eingefügte Sequenz der extrazellulären Domäne des BR-IB (BRIB<sub>ec</sub>) schließt an die Signalsequenz (gp67) an und wird durch eine nachfolgende Thrombin-Schnittstelle (T) und den 6x His-Tag (H) ergänzt. Die Expression steht unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promoters (ph-P).

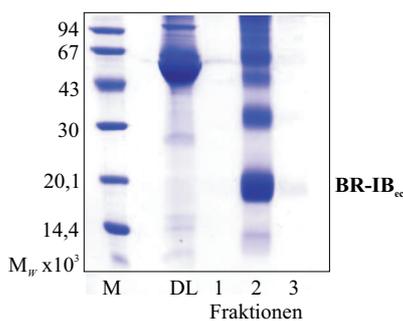
Der in der Arbeit zur Expression der Reste 14 bis 126 des murinen BR-IB Vorläufer-Proteins [TEN DIJKE *et al.*, 1994a]) in *Sf*-9 Insektenzellen verwendete Transfervektor pAcGP67B\_BR-IB<sub>ec</sub> ist in Abbildung III.17 dargestellt. Er wurde von Herrn Dr. J. Nickel zur Verfügung gestellt und beinhaltet die über *Bam*HI in Anschluss an die Signalsequenz gp67 eingefügten Sequenz der extrazellulären Domäne des BR-IB, gefolgt von der Thrombin-Schnittstelle und einen 6x His-Tag. Mit der Verwendung der Signalsequenz gp67 war die Sekretion des exprimierten Proteins in das Medium möglich. Daraus konnte der BR-IB<sub>ec</sub> aufgrund des 6x His-Tags durch Bindung an Ni-NTA Material abgetrennt werden.

*Expression und Chromatographie an Ni-NTA*

Die Durchführung einer Expression von Proteinen in *Sf*-9 Insektenzellen ist in Kapitel II.9.6 beschrieben. Die Insektenzellen wurden hierfür mit 3 MOI aus einem Virenstock mit einer Konzentration von mindestens  $5 \cdot 10^7$  pfu/ml infiziert. Die entsprechende Virenlösung konnte hierfür nach fünf Virus-Amplifikationen aus einem einzelnen Plaques eines Plaques-Assays erhalten werden (zur Durchführung siehe Kapitel II.9.4 und Kapitel II.9.5).

Nach 4d Inkubation im Brutschrank bei 27°C in einer Rollvorrichtung wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt und das Medium für die Chromatographie an Ni-NTA mittels Dialyse gegen Ni-NTA-Puffer vorbereitet.

Die Aufreinigung von BR-IB<sub>ec</sub> aus dem Kulturüberstand war aufgrund der Bindung des 6x His-Tags an die Ni-Ionen der Ni-NTA Agarose möglich. Hierfür wurden 1l Medium 5ml Ni-NTA Säulenmaterial zugesetzt und für mindestens 4h bei 4°C gerührt. Nach Abtrennen des Ni-NTA Agarose in einer Econo-Column® Glassäule (Bio-Rad) erfolgte die Elution isokratisch bei 0,5M Imidazol. Die durch Mediumsbestandteile verursachte Verunreinigung der Elutionsfraktionen konnte dabei durch einen vor der Elution durchgeführten Waschschrift mittels Elution bei 50mM Imidazol minimiert werden. Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE diente zur Bestimmung des BR-IB<sub>ec</sub>-Pools und ist in Abbildung III.18 dargestellt. Die Fraktionen 2 und 3 wurden demnach zusammengefasst und zur Abspaltung des 6x His-Tags durch Thrombin zunächst gegen Thrombin-Spaltpuffer dialysiert.



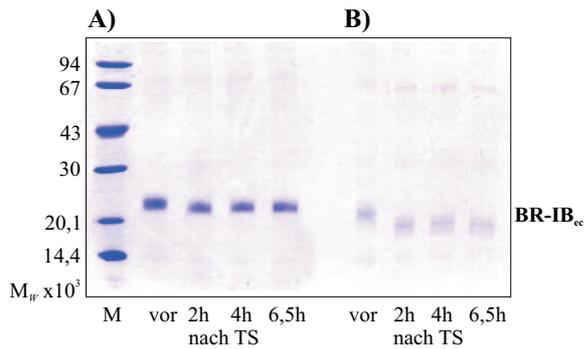
**Abbildung III.18:** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen (1-3) sowie des Durchlaufs (DL) der Chromatographie an Ni-NTA unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Die Ausbeute des in *Sf*-9 Zellen exprimierten und aus dem Mediumsüberstand gewonnenen BR-IB<sub>ec</sub> konnte mit 40mg/l Medium bestimmt werden. Dabei wurde bereits aus der SDS-PAGE der Ni-NTA Elution ersichtlich, dass die Probe zu einem großen Teil Multimere des Rezeptors enthielt. So konnten anhand des Vergleiches mit dem Protein-Standard (M) neben dem Monomer mit einem kalkulierten Molekulargewicht  $M_W$  von 14.868 (Bande bei 20.100) auch Dimere und Trimere, sowie höhere Oligomere (Banden im Bereich von 35.000 bis größer 94.000) identifiziert werden. Zur Abtrennung dieser wurde auch hier die Anionenaustausch-Chromatographie an Fraktogel EMD TMAE verwendet.

*Thrombin-Spaltung und Chromatographie an Fractogel EMD TMAE*

Die Thrombin-Spaltung des in einer Konzentration von 100µM vorliegenden Rezeptors erfolgte wie bereits beschrieben. Dafür wurde Thrombin in einem Massenverhältnis von 1:300 eingesetzt und der Erfolg der Spaltung mit einer SDS-PAGE überprüft. Wie in Abbildung III.19 gezeigt, konnte die Vollständigkeit des proteolytischen Verdaus bei 30°C bereits nach 2h nachgewiesen werden.

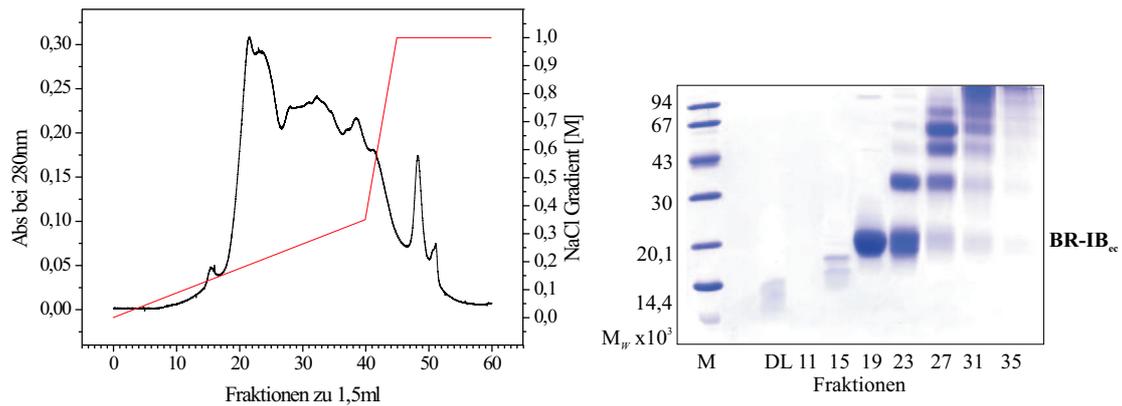
Im Anschluss an die Thrombin-Spaltung folgte auch hier die Anionenaustausch-Chromatographie an EMD TMAE. Sie diente in der Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen, im Gegensatz zu den bereits gezeigten Typ I Rezeptor Präparationen in *E.coli* ausschließlich der Abtrennung der Mulimere. Dabei fand für die Elution im linearen NaCl-Gradienten exakt das bereits mehrfach beschriebene



**Abbildung III.19:** Analyse der Thrombin-Spaltung (TS) von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen.

**A)** SDS-PAGE mit Spaltansatz vor Zugabe von Thrombin (vor), sowie den Proben nach 2h, 4h und 6,5h Spaltung bei 30°C (nach TS) unter reduzierenden Bedingungen. **B)** Proben unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Protokoll Anwendung. Das erhaltene Elutionsprofil, sowie die Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE ist in Abbildung III.20 dargestellt. Die Fraktionen 18 bis 21, welche einer Elution bei 0,15M-0,2M NaCl entsprachen wurden zusammengefasst. Durchschnittlich enthielten sie 8mg/l monomeren BR-IB<sub>ec</sub> welcher abschließend mittels BMP-2 Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt wurde.



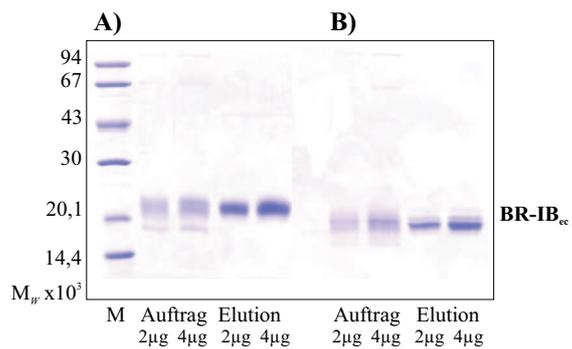
**Abbildung III.20:** Reinigung von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf-9* an Fractogel EMD TMAE.

**A)** Elutionsprofil der Chromatographie. **B)** SDS-PAGE des Durchlaufs (DL) bei Auftrag auf die TMAE-Säule sowie der Elutionsfraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen.

*BMP-2 Affinitäts-Chromatographie und präparative O-Deglycosylierung*

Eine abschließende Reinigung des erhaltenen monomeren BR-IB<sub>ec</sub> durch BMP-2 Affinitäts-Chromatographie war auch für das in *Sf-9* Insektenzellen exprimierte Material notwendig, da bei der Komplexbildung mit BMP-2, GDF-5 und BMP-6 im stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 nur sehr geringe Ausbeuten des jeweiligen Komplexes erhalten werden konnten. Die Bildung der Komplexe in erwarteter Ausbeuten war jedoch erst mit dem Einsatz von bis zu fünflichem Überschuss an Rezeptor möglich. Daher wurde auf das Vorhandensein von monomeren, aber nicht bindungsaktiven BR-IB<sub>ec</sub> in der entsprechenden Fraktion nach TMAE geschlossen. Dies konnte auch durch BIAcore Interaktionsanalyse bestätigt werden (siehe hierfür Kapitel III.3).

Die Abbildung III.21 zeigt die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen dieses letzten Reinigungsschrittes. Die Homogenität der Probe nach Elution der BMP-2 Affinitäts-Säule im Vergleich zu der des Auf-



**Abbildung III.21:** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen.

Proben von 2  $\mu\text{g}$  und 4  $\mu\text{g}$  aus Auftrag und Elution unter **A)** reduzierenden und **B)** nichtreduzierenden Bedingungen.

trages aus dem Pool nach TMAE belegt den Reinigungserfolg. Die finale Ausbeute an BR-IB<sub>ec</sub> fällt damit jedoch auf nur 200  $\mu\text{g}$ /l Insektenzellkultur.

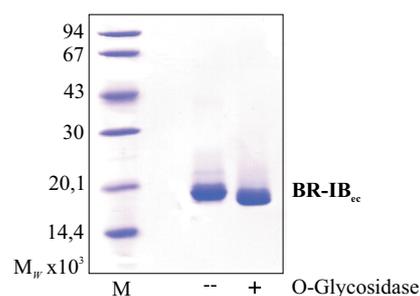
Trotz der beschriebenen Vorteile des Baculovirus Expressionssystems konnten für den BR-IB<sub>ec</sub> nur 0,5% des exprimierten Proteins in biologisch aktiver Form erhalten werden. Die Zusammenstellung der Ausbeuten über die einzelnen Expressionsschritte ist in Tabelle III.3 wiedergegeben.

**Tabelle III.3:** Reinigungstabelle der Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen.

Expressionskultur	Ni-NTA Chromatographie	TMAE Chromatographie	BMP-2 Affinitäts-Chromatographie
1l	40mg	8mg (Monomer)	200 $\mu\text{g}$

Den Abschluss der Präparation, und zur Vorbereitung von BR-IB<sub>ec</sub> für die Komplexbildung und anschließende Kristallisation, bildete die O-Deglycosylierung. Eine Zusammenfassung der für diese präparative O-Deglycosylierung durchgeführten analytischen Spaltungen zur Bestimmung der notwendigen Spaltenzyme, deren optimale Konzentration und Dauer der Behandlung ist im nachfolgenden Kapitel III.1.3.2 beschrieben.

Zur präparativen O-Deglycosylierung wurden der BR-IB<sub>ec</sub> aus den Elutionsfraktionen der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie gegen O-Spaltpuffer dialysiert und auf eine Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingengt. Nach Zusatz von 31  $\mu\text{U}/\mu\text{g}$  Endo- $\alpha$ -N-Acetylglycosaminidase erfolgte die Inkubation des Spaltansatzes über Nacht bei 37°C und wurde nachfolgend mittels SDS-PAGE kontrolliert. In Abbildung III.22 ist diese für eine Probe von BR-IB<sub>ec</sub> vor und nach Behandlung mit O-Glycosidase



**Abbildung III.22:** Präparative O-Deglycosylierung von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen nach BMP-2 Affinitäts-Chromatographie. SDS-PAGE des Spaltansatzes unter nichtreduzierenden Bedingungen vor und nach Inkubation mit O-Glycosidase.

dargestellt. Die Verschiebung der Bande von BR-IB<sub>ec</sub> zu niedrigerem Molekulargewicht belegt die Abtrennung der Zuckerreste.

Der O-deglycosylierte BR-IB<sub>ec</sub> wurde anschließend direkt für die Komplexpräparation eingesetzt.

#### III.1.3.2 Analytik der enzymatischen O-Deglycosylierung von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf-9*

Das Anheften von  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) an die OH-Gruppe von Serin- und Threonin-Seitenketten (O-Glycosylierung) ist eine für Proteine des Zellkerns und des Zytoplasmas von Eukaryoten bekannte, dynamische und essentielle Modifikation [COMER and HART, 2000]. Die funktionelle Konsequenz erscheint dennoch unklar, wenngleich aufgrund dreier Eigenschaften der O-Glycosylierung eine Bedeutung in regulatorischen Prozessen zugeordnet wird. (1) O-GlcNAc erscheint an Positionen der Proteinkette identisch zu denen welche von Proteinkinasen modifiziert werden. (2) O-GlcNAc erscheint reziprok zur Phosphorylierung und (3) ist wie diese sehr dynamisch, mit einem im Vergleich zu zellulären Signalen und Zuständen sehr schnellen Kreislauf („cycling“) [SNOW and HART, 1998; HART, 1997; KELLY *et al.*, 1993].

Nachdem für die Position der O-Glycosylierung kein der N-Glycosylierung vergleichbare Konsensus-Sequenz vorhergesagt werden kann, beschränkt sich die Ermittlung von O-Glycosylierungsseiten auf Sequenzvergleiche, mit zum Beispiel dem PEST-Motif. Dieses ist durch eine Sequenz mit erhöhtem Anteil der Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) gekennzeichnet. Dem PEST-Motif wurde durch RECHSTEINER and ROGERS [1996] eine Bedeutung in der Regulation des schnellen Abbaus von Proteinen zugeordnet. Bisher beschriebene Proteine mit O-Glycosylierungen weisen ebenfalls einen erhöhten Anteil dieser PEST-Sequenzen auf [CHENG *et al.*, 2000] und können daher zur Vorhersage der O-Glycosylierungsseiten herangezogen werden.

Das Ergebnis der *PESTfind\** Analyse für den in *Sf-9* exprimierten BR-IB<sub>ec</sub> ergab einen Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren (7)<sup>†</sup> bis (17)<sup>†</sup>, der das Ser20(12)<sup>†</sup>, Thr21(13)<sup>†</sup> und Thr24(16)<sup>†</sup> als mögliche O-Glycosylierungsstellen einschließt. Dieses Ergebnis konnte durch die Sequenzanalyse von BR-IB<sub>ec</sub> mit dem Programm *NetOGlyc 2.0*<sup>‡</sup> weiter ergänzt werden. So wurden die Aminosäuren Ser20(12)<sup>†</sup> und Thr24(16)<sup>†</sup> der vorherigen Analyse bestätigt und zusätzlich das Thr109(101)<sup>†</sup> als potentielle O-GlcNAc Stelle identifiziert. Die weitere Bestimmung der tatsächlichen Positionen der O-Glycosylierung erfolgte durch Protein-Sequenzierung und Massenspektrometrie und sind im Abschnitt III.1.3.3 ausführlicher beschrieben.

Eine vollständige enzymatische O-Deglycosylierung setzt die Kenntnis der Struktur der angehängten Zuckerkette voraus, da Modifikationen an dieser aus Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc Einheiten bestehenden Kette nicht mit dem einzig zur Verfügung stehenden Enzym, der O-Glycosidase abgetrennt werden können. Als Modifikationen sind allgemein  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal,  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)GlcNAc und Sialinsäure bekannt und müssen vorab durch Verwendung geeigneter Exoglycosidasen wie  $\beta$ (1,4)-Galactosidase,  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase oder  $\alpha$ 2-3,6,8,9-Neuraminidase entfernt werden.

Über die Struktur der O-Glycosylierung von in *Sf-9* Insektenzellen exprimierten rekombinanten Proteinen waren nur wenige Literaturdaten verfügbar. So wurden sowohl durch CHENG *et al.* [2000], CHOU *et al.* [1995] und SUGIYAMA *et al.* [1993] nur unmodifizierte GlcNAc und Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc Zucker an den jeweilig aus *Sf-9* Zellen erhaltenen Proteinen detektiert. Dennoch konnte nach PAJOT-AUGY *et al.* [1999] eine zusätzliche Galactosylierung und Sialinylierung des O-GlcNAc nachgewiesen werden, was auf die prinzipielle Möglichkeit dieser Modifikationen auch in Insektenzellen schließen ließ.

Daher wurden zunächst in einem analytischen Absatz 20  $\mu$ g BR-IB<sub>ec</sub> in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l

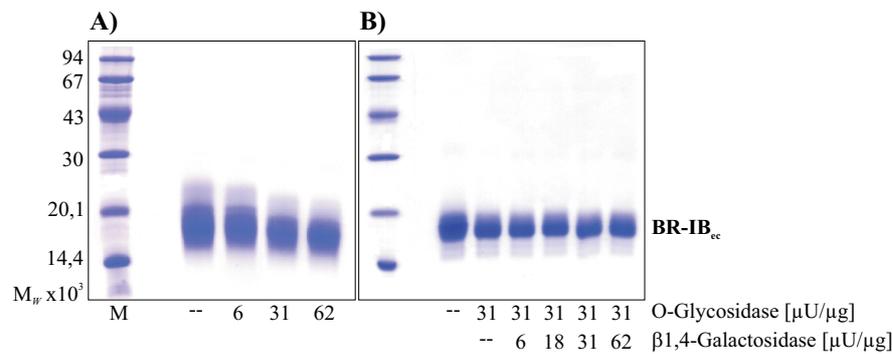
---

\*<http://emb1.bcc.univie.ac.at/embnet/tools/bio/PESTfind/>

<sup>†</sup> () Nummerierung bezüglich der Sequenz des in *Sf-9* Insektenzellen exprimierten BR-IB<sub>ec</sub>-Konstrukts

<sup>‡</sup><http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

in Spaltpuffer eingesetzt und nach Zugabe der O-Glycosidase in Konzentrationen zwischen  $6\mu\text{U}/\mu\text{g}$  und  $62\mu\text{U}/\mu\text{g}$  für bis zu 24h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Spaltung wurde mittels SDS-PAGE verfolgt und ist in Abbildung III.23 A) für die Proben nach 15h Spaltung wiedergegeben. Hierbei konnte bereits ab einer Konzentration von  $31\mu\text{U}/\mu\text{g}$  O-Glycosidase der Verlust an Fraktionen höheren Molekulargewichts innerhalb der diffusen Bande von BR-IB<sub>ec</sub> detektiert werden. Diese wurde der Abtrennung der Zuckerkette durch Endo- $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase zugeschrieben.



**Abbildung III.23:** Analytische O-Deglycosylierung von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen.

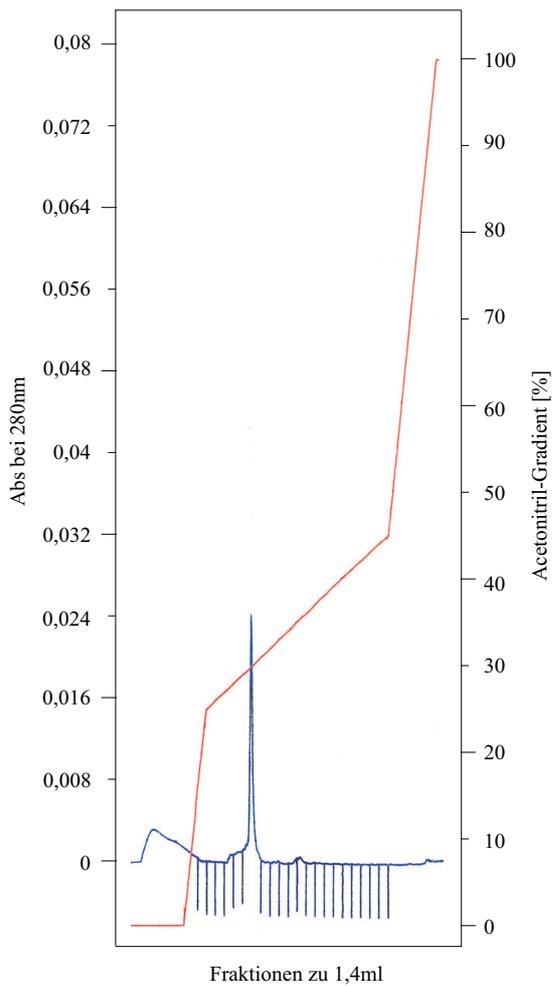
**A)** Spaltung von BR-IB<sub>ec</sub> mit O-Glycosidase, SDS-PAGE der Proben nach 15h unter nichtreduzierenden Bedingungen. **B)** Gleichzeitige Spaltung von BR-IB<sub>ec</sub> mit  $\beta(1,4)$ -Galactosidase und O-Glycosidase, SDS-PAGE der Proben unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Da mit der Massenspektrometrie (siehe Kapitel III.1.3.3) keine anderen Modifikationen als Hexosen oder GlcNAc am BR-IB<sub>ec</sub> nachgewiesen werden konnten, wurde zudem getestet ob die Gal $\beta(1\rightarrow3)$  GlcNAc Zuckerkette durch  $\beta(1\rightarrow4)$ Gal modifiziert war. Hierfür wurde der BR-IB<sub>ec</sub> zunächst mit  $\beta(1,4)$ -Galactosidase in Konzentrationen zwischen  $6\mu\text{U}/\mu\text{g}$  und  $62\mu\text{U}/\mu\text{g}$  für 24h bei  $37^\circ$  inkubiert und nachfolgend mit O-Glycosidase [ $31\mu\text{U}/\mu\text{g}$ ] behandelt. Dabei konnte keine weitere O-Deglycosylierung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde auch in der gleichzeitigen Spaltung mit  $\beta(1,4)$ -Galactosidase und O-Glycosidase in  $\beta(1,4)$ -Galactosidase-Puffer erhalten. Die SDS-PAGE dieser Spaltansätze nach 24h Inkubation ist in Abbildung III.23 B) mit den entsprechend eingesetzten Enzymkonzentrationen angegeben. Die Aktivität der O-Glycosidase auch unter diesen Pufferbedingungen konnte mit der Probe in Spur 2 (Abbildung III.23 B)), welcher nur O-Glycosidase zugesetzt wurde, belegt werden. Nachdem massenspektrometrisch die Vollständigkeit der O-Deglycosylierung mit O-Glycosidase nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel III.1.3.3), wurde die im analytischen Ansatz ermittelte Spaltbedingung in die Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen übernommen.

### III.1.3.3 Biochemische Charakterisierung von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9

#### Analytische HPLC

Die Homogenität des nach BMP-2 Affinitäts-Chromatographie erhaltenen BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen wurde mittels einer analytischen HPLC überprüft. Hierfür wurden  $100\mu\text{g}$  aufgetragen und im linearen Acetonitril-Gradienten zwischen 25% und 45% Acetonitril innerhalb von 40min eluiert. Der einzelne Elutions-Peak von BR-IB<sub>ec</sub> bei 29% Acetonitril ist in Abbildung III.24 gezeigt.



**Abbildung III.24:** Analytische HPLC von BR-IB<sub>ec</sub> nach Reinigung des in *Sf*-9 Insektenzellen exprimierten Proteins.

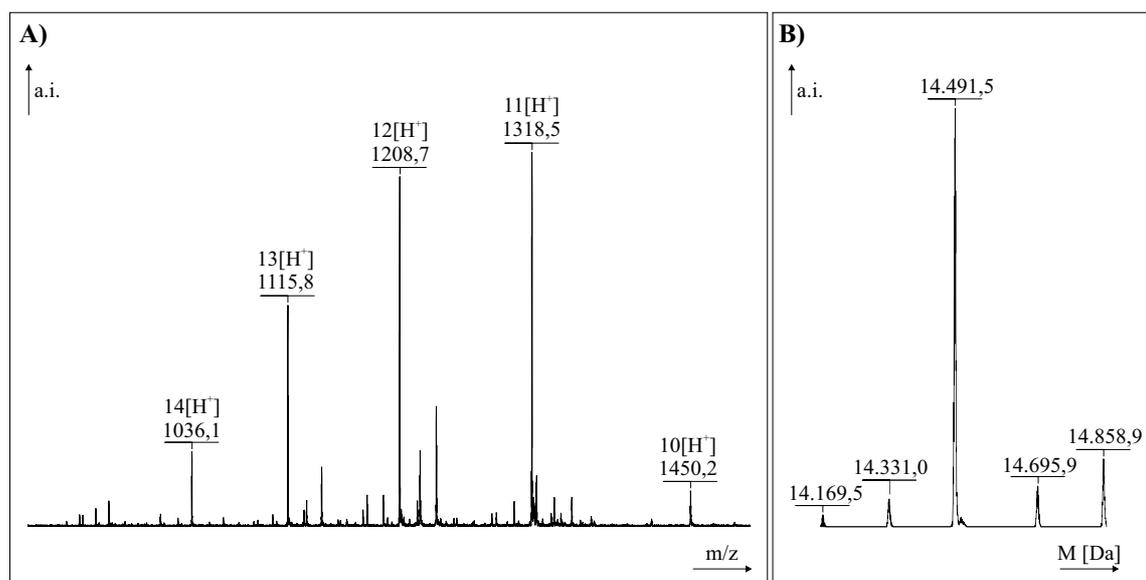
#### Protein-Sequenzierung

Die Protein-Sequenzierung der ersten 19 Aminosäuren belegte die korrekte Abspaltung des gp67 Signalpeptids, wodurch die eigentliche Sequenz von BR-IB<sub>ec</sub> N-terminal um die fünf Aminosäuren Ala, Asp, Leu, Gly und Ser verlängert wurde.

Zudem konnte während der Sequenzierung gezeigt werden, dass nur am Thr24 der beiden potentiellen O-Glycosylierungsstellen Ser20 und Thr24 von BR-IB<sub>ec</sub> eine Modifizierung vorlag und dazu führte, dass Thr24 in der Peptidsequenzierung nicht detektiert werden konnte.

#### Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse bestätigte die O-Glycosylierung von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen (siehe Abbildung III.25 und Tabelle III.4). Darüber hinaus sollte mittels Massenspektrometrie sowohl die Vollständigkeit der enzymatischen Abspaltung mit O-Glycosidase überprüft und des Weiteren die Position der O-Glycosylierungsstellen ermittelt werden. Dafür wurde zunächst BR-IB<sub>ec</sub> nach BMP-2 Affinitäts-Chromatographie ohne O-Deglycosylierung massenspektrometrisch untersucht. Die Rohdaten der Messung unter Angabe des Grades der Protonierung sind in Abbildung III.25 A) dargestellt.



**Abbildung III.25:** Massenspektrometrische Analyse von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen ohne O-Deglycosylierung.

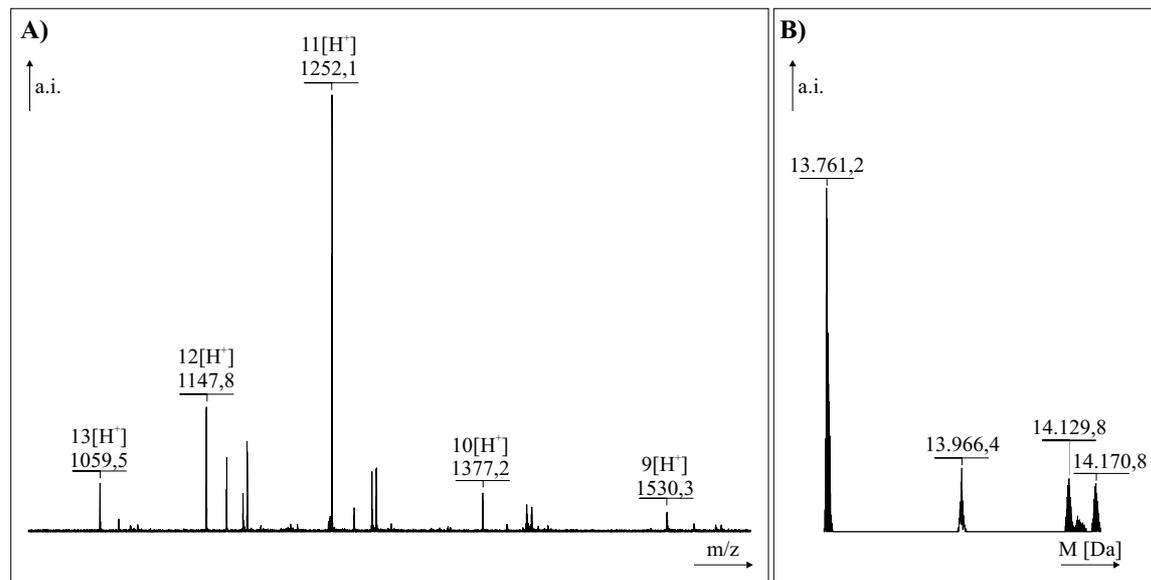
**A)** Rohdaten der Messung. **B)** Daten nach Dekonvolution.

Nach Dekonvolution (Abbildung III.25 B)) konnten ein Hauptsignal mit einer molaren Masse von 14.491,5Da und vier Nebensignale identifiziert werden. Der Vergleich mit den aus der atomaren Zusammensetzung berechneten theoretischen Isotopenverteilungen (14.493,6Da; C<sub>607</sub>H<sub>956</sub>N<sub>177</sub>O<sub>211</sub>S<sub>12</sub> (+1); 5 Disulfid-Brücken; 2GlcNAc, 2Gal) ermöglichte die Zuordnung der in Tabelle III.4 angegebenen Strukturvorschläge.

**Tabelle III.4:** Zuordnung der molaren Massen und Strukturvorschläge im Vergleich mit der berechneten molekularen Masse von BR-IB<sub>ec</sub> (monoisotopisch) mit M<sub>o</sub> = 13.753,34Da (unglycosyliert).

M <sub>max</sub> [Da]	M <sub>o</sub> [Da]	Strukturvorschlag	M <sub>o</sub> (theor.) [Da]	Fehler
14.169,45	14.160,45	+ 2GlcNAc	14.160,22	0,23
14.330,95	14.321,95	+ 2GlcNAc, + Gal	14.321,56	0,95
14.491,50	14.482,50	+ 2GlcNAc, + 2Gal	14.483,61	-1,11
14.695,85	14.686,85	+ 3GlcNAc, + 2Gal	14.686,69	0,16
14.858,92	14.849,92	+ 3GlcNAc, + 3Gal	14.848,77	1,18

Die massenspektrometrische Analyse wurde anschließend mit affinitäts-gereinigtem und O-Glycosidase behandeltem BR-IB<sub>ec</sub> wiederholt. In Abbildung III.26 ist das Messergebnis wiedergegeben. In Bildteil A) sind die Rohdaten der Messung dargestellt, aus denen nach Dekonvolution die in Bildteil B) gezeigten vier Signale identifiziert wurden. Dabei entsprach das Hauptsignal mit einer molaren Masse von 13.761,2Da dem vollständig O-deglycosylierten BR-IB<sub>ec</sub>. Die weiteren Signale repräsentierten hingegen nur unvollständig deglycosylierte extrazelluläre Rezeptordomäne. Eine Zusammenstellung der molaren Massen und dazugehöriger Strukturvorschläge sind in Tabelle III.5 wiedergegeben.



**Abbildung III.26:** Massenspektrometrische Analyse von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen nach O-Deglycosylierung mit Endo- $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase. **A)** Rohdaten der Messung. **B)** Daten nach Dekonvolution.

Der Vergleich beider massenspektrometrischer Analysen vor und nach Spaltung belegte die Substratspezifität der O-Glycosidase. Da diese nur die Abtrennung von unmodifizierten Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc Einheiten katalysiert, wurde erwartet, dass aus Zuckerketten mit einer Stöchiometrie von 2GlcNAc oder 2GlcNAc + Gal und 3GlcNAc + 2Gal (siehe hier auch Tabellen III.4 und III.5) entweder 2GlcNAc oder entsprechend GlcNAc am Protein verbleiben. Lediglich das Nebensignal, welches das Protein mit einer GlcNAc + Gal Zuckerkette repräsentiert, deutete auf eine unvollständige Spaltung hin. Es wäre aber auch möglich, dass diese Zuckerkette nicht die für die Enzymaktivität erforderliche  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) Verknüpfung aufwies.

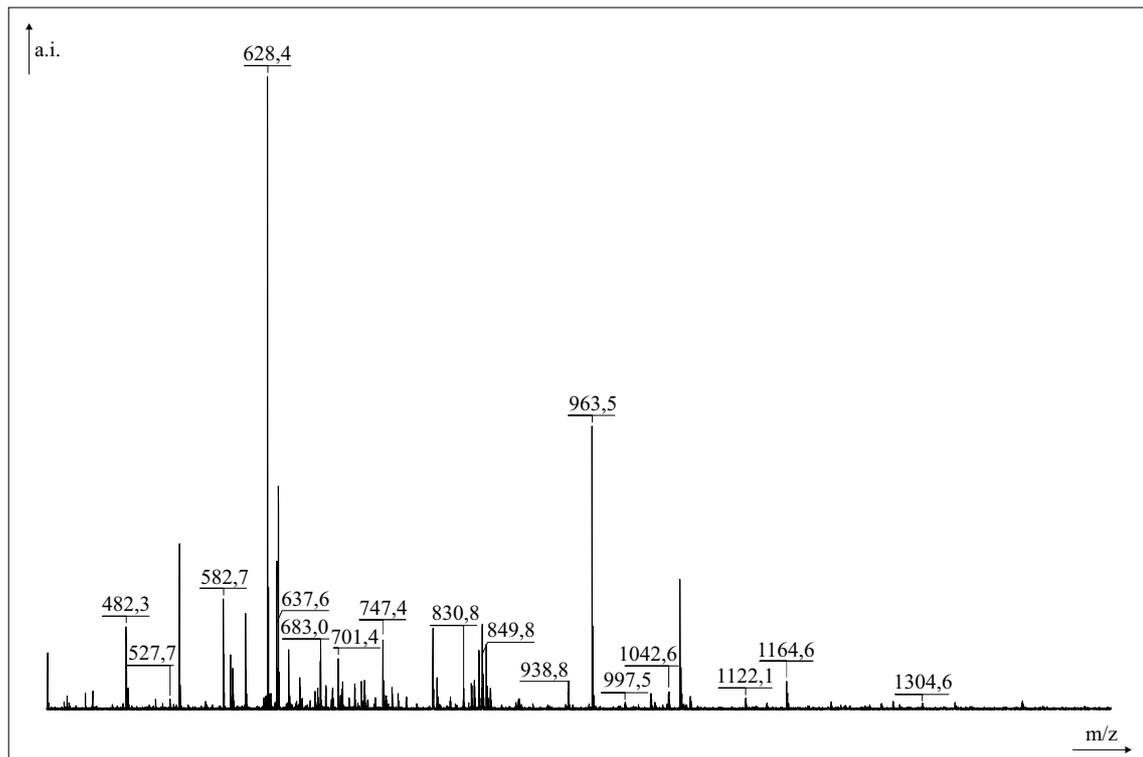
**Tabelle III.5:** Zuordnung der molaren Massen und Strukturvorschläge im Vergleich mit der berechneten molekularen Masse von BR-IB<sub>ec</sub> (monoisotopisch) mit  $M_o = 13.753,34$ Da (unglycosyliert).

$M_{max}$ [Da]	$M_o$ [Da]	Strukturvorschlag	$M_o$ (theor.) [Da]	Fehler
13.762,34	13.754,34	BR-IB <sub>ec</sub>	13.753,34	1,00
13.964,34	13.956,34	+ GlcNAc	13.956,42	-0,08
14.126,58	14.118,58	+ GlcNAc, + Gal	14.118,48	0,10
14.168,45	14.160,45	+ 2GlcNAc	14.159,50	0,94

Da mit der Massenspektrometrie in beschriebener Durchführung (Kapitel II.11.8) nur qualitativ die Zusammensetzung der Probe ermittelt werden kann, ist eine quantitative Aussage über die Konzentration der Proteine nicht möglich. Anhand der SDS-PAGE Analyse der O-Deglycosylierung wie sie in Abbildung III.22 gezeigt wurde, konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass das detektierte Hauptsignal gleichzeitig auch die Hauptfraktion in der Probe repräsentiert.

Die Position der O-Glycosylierung am BR-IB<sub>ec</sub> konnte von Herrn Dr. W. Schmitz durch massenspektrometrische Analyse der mit Trypsin fragmentierten extrazellulären Rezeptordomäne ermittelt werden.

Hierfür wurden 10 µg des O-glycosylierten und mittels BMP-2 Affinitäts-Chromatographie gereinigten BR-IB<sub>ec</sub> in den Verdau eingesetzt. Mit dem Zusatz von RapiGest (Waters), DTT und Iodacetamid erfolgte eine Denaturierung, Reduktion und anschließende Acetamidierung der Probe. Nach Entsalzung konnte dieser Ansatz den Messungen zugeführt und das in Abbildung III.27 in Form der Rohdaten dargestellte Ergebnis erhalten werden.

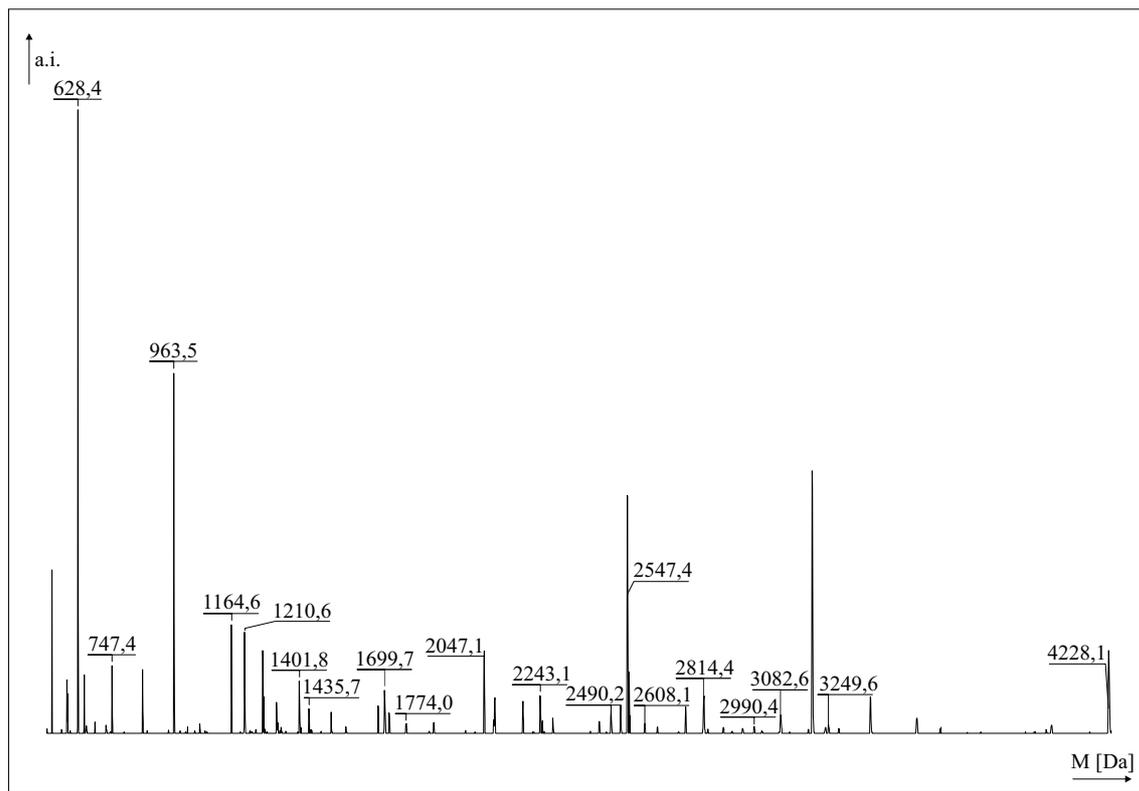


**Abbildung III.27:** Rohdaten der massenspektrometrische Analyse nach Trypsin-Verdau von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen.

Um eine Zuordnung der Signale zu ermöglichen, wurde ein Trypsin-Verdau *in silico* simuliert. Die Sequenzanalyse ergab für BR-IB<sub>ec</sub> 14 mögliche Spaltstellen. Unter der Annahme, dass bis zu zwei dieser Stellen nicht gespalten wurden, keine Disulfidbrücken vorlagen, sowie Carbamidomethylierung (CAM) und Methioninoxidation stattfinden könnte, wurden 150 mögliche Fragmente identifiziert. Anhand der Liste dieser möglichen Fragmente erfolgte die Auswertung der Massenspektren und ist in Form der Tabelle III.6 zusammengestellt. Abbildung III.28 zeigt hierfür die dekonvoluierten Daten einer Messung.

Mit der massenspektrometrischen Analyse des mittels Trypsin gespaltenen O-glycosylierten BR-IB<sub>ec</sub> konnten 29 Fragmente des insgesamt 124 Aminosäuren umfassenden Proteins identifiziert werden. Aus diesen ließ sich die Aminosäuresequenz zwischen den Positionen 1 bis 25 und 75 bis 124 des Expressionskonstrukts lückenlos beschreiben, was einer Abdeckung von 60% entsprach. Das Fragment zwischen Aminosäure 26 und 74 enthielt keine Trypsin-Schnittstelle und war aufgrund der Größe bei den gewählten Messparametern nicht zu detektieren.

Die Analyse der einzelnen Fragmente ergab außerdem, dass alle O-glycosidischen Modifikationen nur



**Abbildung III.28:** Massenspektrometrische Analyse des Trypsin-Verdau von BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen. Daten nach Dekonvolution.

im Bereich der Aminosäurepositionen 1 bis 20 oder 7 bis 20, welche die Sequenz zwischen Lys14 und Lys28 oder Lys15 und Lys28 der extrazellulären Domäne des BMP Typ IB Rezeptors umfasst, lokalisiert waren. Damit konnte eine O-Glycosylierung von Thr109(101)<sup>†</sup> ausgeschlossen und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Sequenzierung Thr24(16)<sup>†</sup> als die O-Glycosylierungsstelle von BR-IB<sub>ec</sub> bestimmt werden.

**Tabelle III.6:** Zuordnung der nach Trypsin-Verdau von BR-IB<sub>ec</sub> erhaltenen Fragmente.

m/z	z	M [Da]	Fragment	O-Glycosylierung
590,32	1	590,32	1 - 6	
628,39	1	628,39	119 - 124	
688,40	1	688,40	21 - 25	
747,45	1	747,45	21 - 25, + CAM	
482,26	2	963,52	75 - 82	
527,71	2	1054,46	84 - 91	
565,85	2	1130,70	97 - 106	
582,80	2	1164,58	109 - 118	
605,79	2	1210,56	83 - 91	
701,41	2	1401,78	97 - 108	
718,36	2	1435,73	107 - 118	

<sup>†</sup>() Nummerierung bezüglich der Sequenz des in *Sf*-9 Insektenzellen exprimierten BR-IB<sub>ec</sub>-Konstrukts

Fortsetzung der Tabelle III.6

m/z	z	M [Da]	Fragment	O-Glycosylierung
756,91	2	1512,81	7 - 20	
850,36	2	1699,72	84 - 96	
591,99	3	1773,95	109 - 124	
591,99	3	1773,95	109 - 124	
592,64	3	1775,92	92 - 106	
683,03	3	2047,07	92 - 108	
1042,57	2	2084,10	1 - 20	
1122,06	2	2243,10	7 - 20	+ 2GlcNAc, + 2Gal
817,05	3	2449,14	1 - 20	+ GlcNAc, + Gal
830,75	3	2490,24	7 - 25	+ GlcNAc, + Gal
637,60	4	2547,39	97 - 118	
1304,62	2	2608,24	7 - 20	+ 3GlcNAc, + 3Gal
703,60	4	2811,39	84 - 106	
938,81	3	2814,42	1 - 20	+ 2GlcNAc, + 2Gal
997,48	3	2990,41	1 - 20	+ GlcNAc, + Gal, + UA
1028,20	3	3082,58	84 - 108	
795,63	4	3179,50	1 - 20	+ 3GlcNAc, + 3Gal
542,45	6	3249,63	92 - 118	
846,43	5	4228,11	84 - 118	

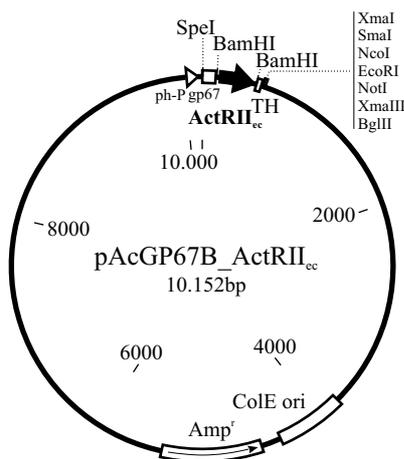
Im Gegensatz zur massenspektrometrischen Analyse von vollständig O-glycosyliertem BR-IB<sub>ec</sub> (siehe Abbildung III.25 und Tabelle III.4) ließen sich nach Trypsin-Spaltung auch unglycosylierte Fragmente im Bereich der Positionen 1 bis 20 nachweisen. Somit konnte angenommen werden, dass BR-IB<sub>ec</sub> sowohl heterogen O-glycosyliert als auch unglycosyliert in *Sf-9* Insektenzellen exprimiert wurde.

## III.2 Präparation der extrazellulären Domänen der Typ II Rezeptoren

### III.2.1 Präparation von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen

#### III.2.1.1 Expression und Reinigung der extrazellulären Domäne von ActR-II

Die Präparation der extrazellulären Domäne des Activin Typ II Rezeptors erfolgte aus *Sf-9* Insektenzellen. Die zur Infektion verwendeten Viren wurden durch Cotransfektion der AcNPV Baculovirus DNA mit dem in Abbildung III.29 gezeigten Transfervektor pAcGP76B\_ActR-II<sub>ec</sub> erhalten. Dieser von Herrn Dr. J. Nickel zur Verfügung gestellte Transfervektor enthielt die Reste 18 bis 127 des humanen Activin Typ II Rezeptor Vorläufer-Proteins [MATZUK and BRADLEY, 1992], die in Analogie zu dem bereits beschriebenen Transfervektor pAcGP76B\_BR-IB<sub>ec</sub> über die Schnittstelle *Bam*HI zwischen der *gp67* Signalsequenz, der Thrombin-Schnittstelle und dem 6x His-Tag eingefügt wurde.



**Abbildung III.29:** Transfervektor pAcGP67B\_ActR-II<sub>ec</sub>. Die über *Bam*HI eingefügte Sequenz der extrazelluläre Domäne von ActR-II (ActRII<sub>ec</sub>) schließt an die Signalsequenz (gp67) an und wird durch eine nachfolgende Thrombin-Schnittstelle (T) und den 6x His-Tag (H) ergänzt. Die Expression steht unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promoters (ph-P).

#### *Expression und Chromatographie an Ni-NTA Agarose*

Die Expression von ActR-II<sub>ec</sub> wurde wie unter II.9.6 beschrieben durchgeführt. Der mit 3 MOI eingesetzte Virusstock eines Viren-Titers von mindestens  $5 \cdot 10^7$  pfu/ml konnte dabei nach fünf Virus-Amplifikationen (siehe Kapitel II.9.5) aus einem einzelnen Plaque eines Plaque-Assays (siehe Kapitel II.9.4) erhalten werden. Die extrazelluläre Domäne wurde anschließend aus dem Mediumsüberstand durch Chromatographie an Ni-NTA Agarose, wie sie bereits in der Präparation von BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf*-9) beschrieben wurde, abgetrennt. Die Elutionsfraktionen der isokratischen Elution mit 0,5M Imidazol wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die Fraktionen 2 bis 4 zusammengefasst. Die SDS-PAGE in Abbildung III.30 A) zeigt die Zusammensetzung dieser vereinigten Fraktionen in Spur 1 mit der Probenbezeichnung „1“. Im Gegensatz zur bereits beschriebenen Zusammensetzung von BR-IB<sub>ec</sub> nach Ni-NTA Reinigung, zeigte die Ni-NTA Fraktionen von ActR-II<sub>ec</sub> bereits eine hohe Homogenität. Neben der starken Bande bei 23.000, die dem monomeren N-glycosylierten ActR-II<sub>ec</sub> entspricht, konnten nur geringe Mengen an Multimeren detektiert werden. Die Reinheit dieser Ni-NTA Fraktionen konnten zudem durch analytische HPLC und Massenspektrometrie belegt werden (siehe hierfür auch Kapitel III.2.1.3). Zusätzlich wurde die biologische Aktivität dieser Fraktionen durch BIAcore Interaktionsanalyse bestätigt (siehe Kapitel III.3).

Die Ausbeute der Expression von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen wurde mit bis zu 8mg/l Expressionskultur ermittelt.

#### *N-Deglycosylierung und Affinitäts-Chromatographie an ConA-Sepharose*

Die aufgrund von Sequenz- und Literaturdaten [GREENWALD *et al.*, 1998, 1999] erwartete N-Glycosylierung an den Positionen Asn43 und Asn66 konnte durch massenspektrometrische Analyse bestätigt werden. Die Entfernung dieser Zuckerreste zur Vorbereitung der Probe für die Kristallisation wurde durch die enzymatische N-Deglycosylierung mit den Endoglycosidasen Endo H und Endo F<sub>3</sub> erreicht. Für die präparative N-Deglycosylierung wurde der ActR-II<sub>ec</sub> zu  $3,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  in N-Spaltpuffer vorgelegt und nach Zugabe von  $100 \mu\text{U}/\mu\text{g}$  Endo H und  $150 \mu\text{U}/\mu\text{g}$  Endo F<sub>3</sub> über Nacht bei 37°C inkubiert (für die Durchführung siehe auch Kapitel II.11.5.1). Der Erfolg der Spaltung ist in Abbildung III.30 A) mit SDS-PAGE belegt. Sie zeigt den Spaltansatz in Spur 2 mit der Probenbezeichnung „2“. Im Vergleich zur Probe vor Spaltung („1“) ist die Abtrennung der Zucker und die damit verbundene Reduktion des Molekulargewichts deutlich erkennbar. Eine vollständige N-Deglycosylierung konnte jedoch, wie die entstandene Doppelbande zeigt, auch in der Kombination der Endoglycosidasen Endo H und Endo F<sub>3</sub> nicht erzielt werden. Eine Zusammenfassung der N-Deglycosylierung und der durchgeführten analyti-

schen Spaltungen zur Bestimmung der benötigten Enzyme und deren minimaler Konzentration, aber auch der chemischen N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> ist in Kapitel III.2.1.2 beschrieben.

Die Ausbeute an vollständig N-deglycosyliertem ActR-II<sub>ec</sub> wurde auf ungefähr 80% des Einsatzes geschätzt, was 6,5mg/l entsprach.

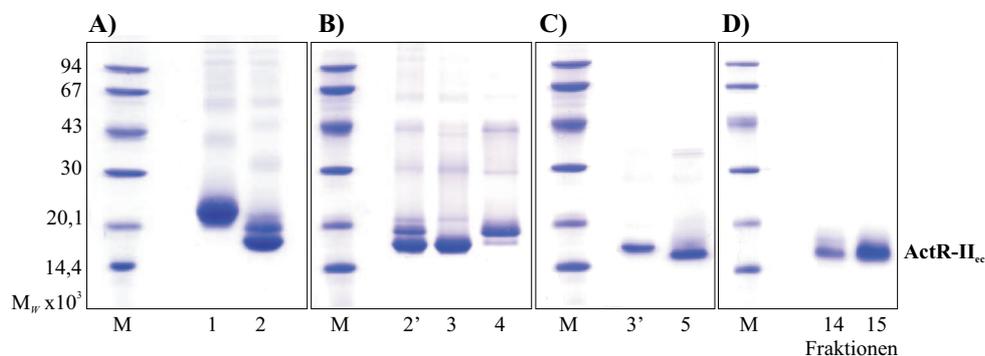
Um eine Abtrennung von teilweise N-glycosyliertem ActR-II<sub>ec</sub> zu erreichen, wurde die Affinität der Zuckerreste zu Concanavalin A (ConA) verwendet und eine chromatographische Aufreinigung an ConA-Sepharose durchgeführt. Der Spaltansatz wurde hierfür in ConA-Puffer dialysiert. Der vollständig N-deglycosylierte ActR-II<sub>ec</sub> konnte so im Durchlauf der Säulenchromatographie aufgefangen werden, während die N-glycosylierten Fraktionen isokratisch mit 100mM Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid eluiert wurden. Die SDS-PAGE des Reinigungsschrittes an ConA-Sepharose ist in Abbildung III.30 B) gezeigt. Der Säulenauftrag trägt die Probenbezeichnung „2“, der Durchlauf „3“ und die Elution „4“. Nach Reinigung an ConA-Sepharose konnten so durchschnittlich 5,2mg/l vollständig N-deglycosylierter ActR-II<sub>ec</sub> erhalten werden, die nachfolgend zur Abspaltung des 6x His-Tags durch Endoproteinase GluC eingesetzt wurden.

#### Spaltung mit Endoproteinase GluC und HPLC

Die Verwendung der Endoproteinase GluC zur Abspaltung des 6x His-Tags wurde aufgrund der von GREENWALD *et al.* [1999] publizierten Daten gewählt. Die dort beschriebene Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von Activin Typ II Rezeptor konnte mit ActR-II<sub>ec</sub> aus *Pichia p.* gelöst werden. Dafür war das Expressionskonstrukt und die nachfolgende Aufarbeitung so gewählt, das die Reste 20 bis 121 zur Kristallisation eingesetzt wurden.

Um den in *Sf-9* Insektenzellen exprimierten und deglycosylierten ActR-II<sub>ec</sub> C-terminal ebenfalls bis auf den Rest 121 zu verkürzen, wurde das von GREENWALD *et al.* [1999] beschriebenen Protokoll zur Spaltung mit Endoproteinase GluC verwendet.

Der aus analytischen Spaltungen ermittelte optimale Einsatz von GluC konnte auf 1 $\mu$ g Proteinase pro 50 $\mu$ g ActR-II<sub>ec</sub> bestimmt werden. Somit wurden im präparativen Ansatz 500 $\mu$ g ActR-II<sub>ec</sub> in GluC-Spaltpuffer vorgelegt und für 24h bei 25°C in Gegenwart von 10 $\mu$ g GluC inkubiert. Der Erfolg der Spaltung wurde nachfolgend mit einer SDS-PAGE, wie sie in Abbildung III.30 C) angegeben ist, analysiert. Die mit Probenbezeichnung „3“ bezeichnete Probe stellt den nach ConA-Säulenchromatographie erhaltenen vollständig N-deglycosylierten ActR-II<sub>ec</sub> dar. Mit der Bezeichnung „5“ ist in der rechts benachbarten Spur die Fraktion das ActR-II<sub>ec</sub> nach GluC-Spaltung aufgetragen.



**Abbildung III.30:** Präparation von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen.

SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen mit **A)** der Ni-NTA Agarose Elution (1) und der Behandlung mit Endo H und Endo F<sub>3</sub> (2, 2'), mit **B)** dem Durchlauf (3, 3') und der Elution (4) der ConA-Sepharose, mit **C)** der GluC-Spaltung (5) und mit den Elutionsfraktionen der abschließenden HPLC in **D)**.

Diese Fraktion wurde abschließend durch HPLC gereinigt. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Acetonitril-Gradienten wie sie in Kapitel II.10.6 beschrieben ist (für das Chromatogramm siehe Abbildung III.33 B)). Die SDS-PAGE der beiden Fraktionen 14 und 15 des Elutionspeaks bei 32% Acetonitril sind in Abbildung III.30 D) gezeigt und bestätigen die Homogenität des durch die beschriebenen Reinigungsstufen erhaltenen ActR-II<sub>ec</sub>.

Eine Zusammenfassung der Reinigung, sowie der erzielten Ausbeuten zeigt Tabelle III.7. Die zur Homogenität gereinigte extrazelluläre Rezeptordomäne konnte vollständig N-deglycosyliert in die Komplexpräparation und nachfolgende Kristallisation eingesetzt werden. Mit durchschnittlich 4,4mg/l lag die Gesamtausbeute der Reinigung bei 55% des ursprünglich aus 1l Mediumsüberstand isolierten ActR-II<sub>ec</sub>.

**Tabelle III.7:** Reinigungstabelle der Präparation von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen.

Expressionskultur	Ni-NTA Chromatographie	Endo HF <sub>3</sub> Spaltung	ConA Affinitäts-Chromatographie	GluC Spaltung	HPLC
1l	8mg (Monomer)	6,5mg	5,2mg		4,4mg

### III.2.1.2 Analytik der enzymatischen und chemischen N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9*

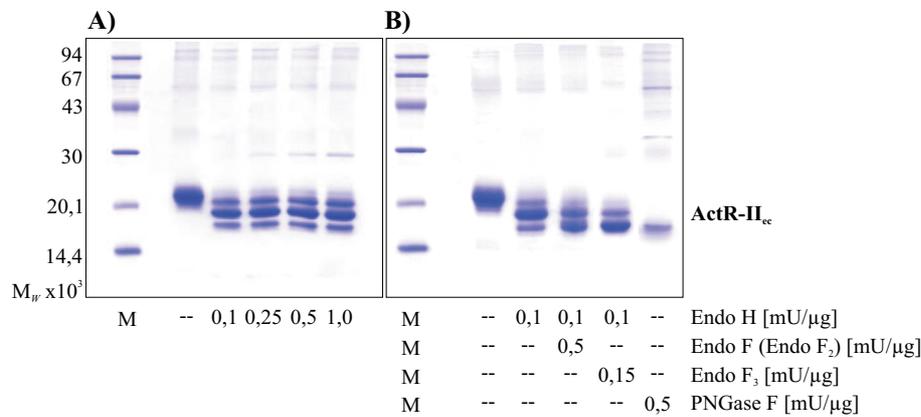
Die über Sequenzanalyse an den Aminosäuren Asn43 und Asn66 erwartet und mittels Massenspektrometrie (siehe Kapitel III.2.1.3) belegte N-Glycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> sollte durch enzymatische Spaltung entfernt werden. Diese Bearbeitung wurde als notwendig erachtet, nachdem erste Kristallisationsversuche des ternären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes zu keiner verwertbaren Kristallisationsbedingung führten.

Eine Vielzahl von Literaturdaten belegen die Fähigkeit der *Sf-9* Insektenzellen zur Expression strukturell sehr verschiedenartig glycosylierter Proteine, wobei sowohl Hybrid- als auch Komplex-Oligosaccharide erzeugt werden. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass mit der Verwendung des Baculovirus Expressionsvektor-Systems hauptsächlich paucomannosidische Strukturen ausgebildet werden. Diese Oligosaccharide haben eine Zusammensetzung der Form (Man)<sub>3</sub>(GlcNAC)<sub>2</sub> und können sowohl  $\alpha(1\rightarrow3)$ Fuc oder  $\alpha(1\rightarrow6)$ Fuc modifiziert vorliegen.

#### *Enzymatische N-Deglycosylierung mit Endo H*

In Erwartung einer derartigen Struktur der Glycosylierung wurden 20 $\mu$ g ActR-II<sub>ec</sub> zunächst in einer Konzentration von 1 $\mu$ g/ $\mu$ l einer analytischen Spaltung mit Endo H unterzogen. Dafür wurde die Endoglycosidase in Konzentrationen zwischen 0,1mU/ $\mu$ g und 1mU/ $\mu$ g eingesetzt und der Spaltvorgang über 24h mittels SDS-PAGE verfolgt. In Abbildung III.31 A) ist die SDS-PAGE der Endo H-Spaltung nach 24h abgebildet. Sie zeigte, dass innerhalb der gegebenen Zeit alle getesteten Konzentrationen an Endo H keine vollständige Abtrennung der Glycosylierung ermöglichten. So war zwischen der Bande des vollständig N-deglycosyliertem ActR-II<sub>ec</sub> (bei ungefähr M<sub>W</sub> von 17.000) und der des unbehandelten ActR-II<sub>ec</sub> bei 21.000 eine weitere Bande bei 19.000 detektiert worden. Diese Fraktion an offensichtlich nur teilweise N-deglycosylierten ActR-II<sub>ec</sub> repräsentierte aufgrund der Bandenstärke den größten Teil der Probe. Dieses Ergebnis war für die Endo H Konzentrationen größer 0,5mU/ $\mu$ g bereits nach 15h erhalten worden (Daten nicht gezeigt).

Mit der bekannten und in Kapitel II.11.5.1 beschriebenen Substratspezifität der Endo H für Oligomannose- und Hybrid-Oligosaccharide war somit keine vollständig N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> zu erzielen, worauf weitere Endoglycosidasen getestet wurden. Hierzu gehörten Endo F und Endo F<sub>3</sub>, wie in Abbildung III.31 B) dargestellt.



**Abbildung III.31:** Enzymatische N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen.

**A)** SDS-PAGE (nichtreduzierende Bedingungen) nach 24h N-Deglycosylierung mit Endo H unterschiedlicher Konzentrationen. **B)** SDS-PAGE der N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> unter Verwendung von Endo H zusammen mit Endo F (Endo F<sub>2</sub>) und Endo F<sub>3</sub>, sowie PNGase F.

#### Enzymatische N-Deglycosylierung mit Endo F/Endo F<sub>2</sub>

Zunächst wurde im Anschluss an die Endo H-Behandlung eine N-Deglycosylierung mit Endo F durchgeführt. Bei diesem Enzym (Boehringer Mannheim) handelte es sich um eine Endoglycosidase mit einer der Endo F<sub>2</sub> identischen Substratspezifität. Diese spaltet in Ergänzung zu Endo H auch doppelt verzweigte Komplex-Oligosaccharide von N-glycosylierten Proteinen ab.

Das Ergebnis des Verdauens mit Endo F, welches durch Behandlung von ActR-II<sub>ec</sub> mit Endo F<sub>2</sub> (Calbiochem bzw. PROzyme) bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt) ist in Abbildung III.31 B) dargestellt. Wie aus der Bandenverteilung der entsprechenden Probe nach SDS-PAGE im Vergleich zur Endo H-Spaltung ersichtlich, konnte so eine noch vollständigere N-Deglycosylierung erhalten werden. Die Fraktion von vollständig N-glycosyliertem ActR-II<sub>ec</sub> (M<sub>W</sub> 21.000) war mit der SDS-PAGE nahezu nicht mehr zu detektieren, wohingegen die von vollständig N-deglycosyliertem ActR-II<sub>ec</sub> (M<sub>W</sub> 17.000) deutlich zu nahm. Vollständig und teilweise N-deglycosylierter ActR-II<sub>ec</sub> (M<sub>W</sub> 17.000 und 19.000) lagen nach Endo H und Endo F (Endo F<sub>2</sub>) Behandlung zu gleichen Teilen in der Probe vor. Dem gezeigten Ergebnis ging auch hier eine Bestimmung der optimalen Bedingungen und Dauer der Spaltung voraus. Dabei konnte ermittelt werden, dass beide Enzyme nach 24h bei 37°C im Parallel-Spaltansatz unter Anpassung der Pufferbedingungen (für die Zusammensetzung des N-Spaltpuffers siehe hierfür Kapitel II.11.5.1) identische Aktivitäten gegenüber den nacheinander im jeweiligen empfohlenen Spaltpuffer durchgeführten Endo H und Endo F (Endo F<sub>2</sub>) N-Deglycosylierungen von ActR-II<sub>ec</sub> entfalteten.

#### Enzymatische N-Deglycosylierung mit Endo F<sub>3</sub>

Eine weitere Steigerung der Ausbeute an vollständig N-deglycosylierten ActR-II<sub>ec</sub> konnte über einen Parallel-Spaltansatz von N-glycosyliertem ActR-II<sub>ec</sub> in Gegenwart von Endo H und Endo F<sub>3</sub> erhalten werden. Die SDS-PAGE des Ansatzes nach 24h Spaltung bei 37°C ist in Abbildung III.31 B) mit den Konzentrationen der eingesetzten Endoglycosidasen angegeben.

Endo F<sub>3</sub> unterscheidet sich von Endo F<sub>2</sub> über die Substratspezifität, wobei auch dreifach verzweigte Komplex-Oligosacchariden abgespalten werden und die Aktivität durch die Anwesenheit von  $\alpha(1\rightarrow6)$  Fucosylierung am Zucker-Stamm gesteigert wird.

Die im analytischen Maßstab ermittelte Spaltbedingung eines Parallel-Spaltansatzes mit 0,1mU/ $\mu$ g Endo H und 0,15mU/ $\mu$ g Endo F<sub>3</sub> in N-Spaltpuffer bei 37°C über 24h wurde für die präparative ActR-II<sub>ec</sub> N-Deglycosylierung angewendet.

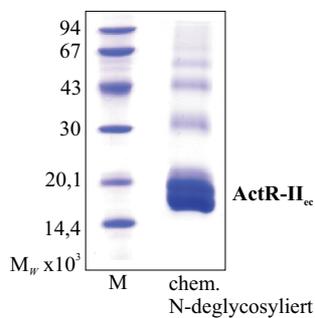
*Enzymatische N-Deglycosylierung mit PNGase F*

Eine komplette und vollständige N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> konnte durch die Behandlung mit PNGase F bereits unter nativen Bedingungen erzielt werden. Die dabei stattfindende Hydrolyse des Glucosamins unter Bildung von Aspartat war jedoch ausschlaggebend, dass diese Form der enzymatischen N-Deglycosylierung nicht in die Präparation von ActR-II<sub>ec</sub> übernommen wurde.

Da PNGase F jedoch keine Aktivität gegenüber  $\alpha(1\rightarrow3)$  fucosylierten Oligosacchariden aufweist, konnte eine derartige Modifikation an der Zuckerreste von ActR-II<sub>ec</sub>, wie sie aus der massenspektrometrischen Analyse (siehe Kapitel III.2.1.3) vermutet wurde, aufgrund der Vollständigkeit der N-Deglycosylierungsreaktion ausgeschlossen werden. Die bei der Endo H und Endo F<sub>3</sub> Behandlung verbliebene geringe Fraktion an unvollständig N-deglycosyliertem ActR-II<sub>ec</sub> (M<sub>W</sub> 19.000) könnte womöglich auf vierfach verzweigte Komplex-Oligosaccharide zurückzuführen sein.

*Chemische N-Deglycosylierung*

Die chemische N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> wie sie in Kapitel II.11.5.2 beschrieben ist, wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. S. Levitskaya durchgeführt.



**Abbildung III.32:** Chemische N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub>. SDS-PAGE der Probe nach 30min Deglycosylierungsreaktion unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Das Ergebnis der chemischen N-Deglycosylierungsreaktion nach einer Dauer von 30min ist als SDS-PAGE in Abbildung III.32 dargestellt. Auch hier waren nach erfolgter Spaltung zwei Fraktionen, die des vollständig (M<sub>W</sub> 17.000) und die des teilweise N-deglycosylierten ActR-II<sub>ec</sub> (M<sub>W</sub> 19.000) zu annähernd gleichen Teilen in der Probe nachzuweisen. Die nicht vollständige N-Deglycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> wurde hierbei auf die reduzierte Dauer der Spaltreaktion zurückgeführt. Trotzdem konnte, im Unterschied zur enzymatischen Spaltung die biologische Aktivität der ActR-II<sub>ec</sub>-Probe nicht erhalten werden (wie mit BIAcore Interaktionsanalyse an BMP-2 belegt, Ergebnisse siehe Kapitel III.3). Die für Proteine harschen Spaltbedingungen waren wahrscheinlich die Ursache für die teilweise Denaturierung der Probe. Zudem war es schwierig, aufgrund des geringen Einsatzes von nur 10mg ActR-II<sub>ec</sub>, den Spaltansatz entsprechend zu optimieren, da eine notwendige Verkleinerung der Reaktionsapparatur nicht erreicht werden konnte.

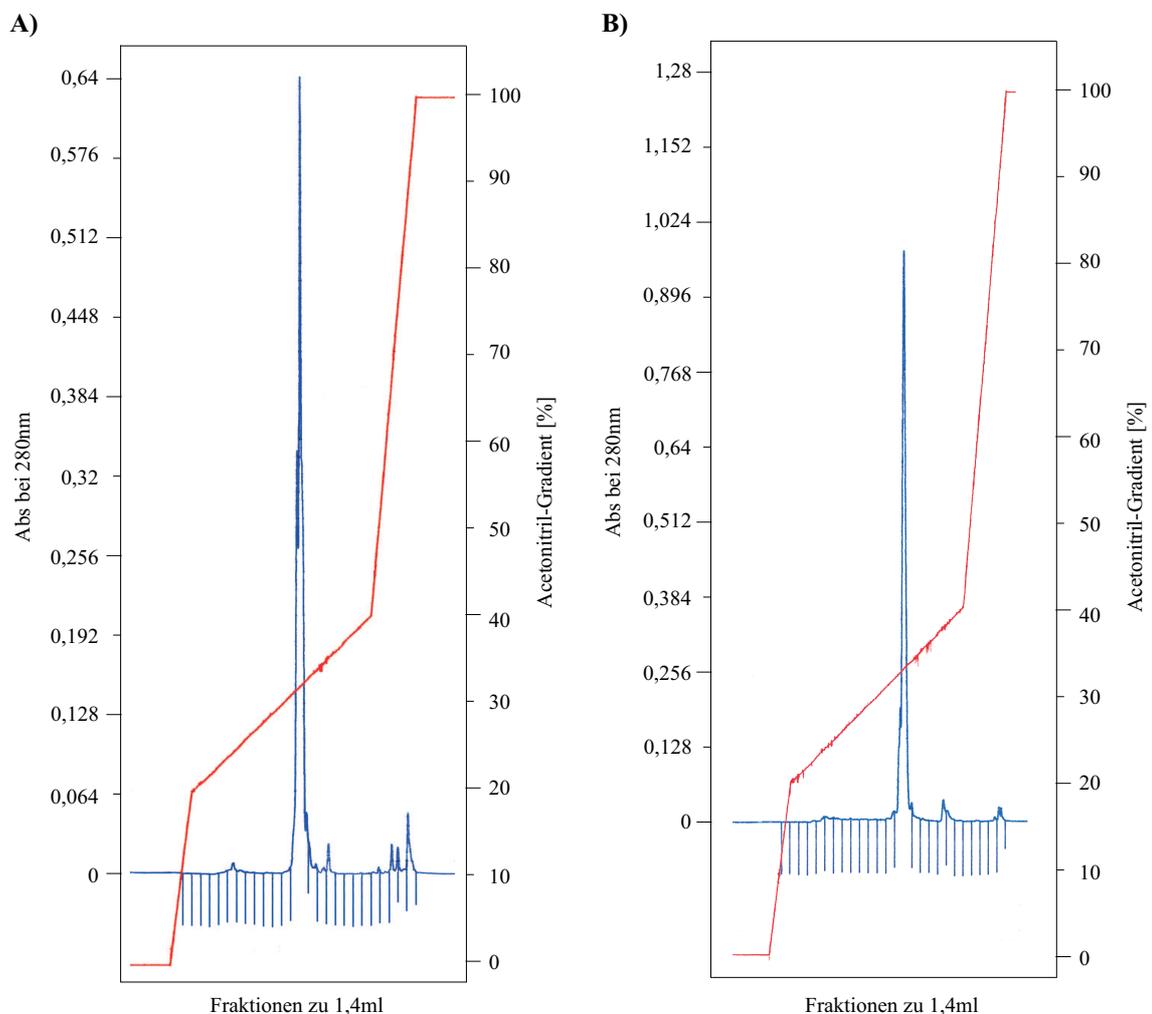
Auf weitere Optimierungen des Protokolls wurde daraufhin verzichtet.

III.2.1.3 Biochemische Charakterisierung von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9**Analytische HPLC*

Die Homogenität von ActR-II<sub>ec</sub> wurde an verschiedenen Stellen der Reinigung durch analytische HPLC überprüft. So konnte, wie in Abbildung III.33 A) gezeigt, eine hohe Reinheit bereits für die Elutionsfraktionen der Chromatographie mittels Ni-NTA Agarose bestätigt werden. Die Elution der HPLC erfolgte hierfür nach Auftrag von 250µg mit Hilfe eines linearen Gradienten zwischen 20% und 40% Acetonitril innerhalb von 40min. Der ActR-II<sub>ec</sub> eluierte als symmetrischer Einzelpeak bei 31% Acetonitril.

Der letzte Reinigungsschritt der Präparation von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen war eine HPLC nach Spaltung mit GluC. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung III.33 B) wiedergegeben. Der einzelne Elutionspeak bei 32% Acetonitril zeigt den Reinigungserfolg.

Die HPLC konnte allerdings die Fraktionen unterschiedlicher N-Glycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> nicht auftrennen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung III.33:** Analytische HPLC von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen.

**A)** Chromatogramm der HPLC der Ni-NTA Elutionfraktionen von ActR-II<sub>ec</sub>.

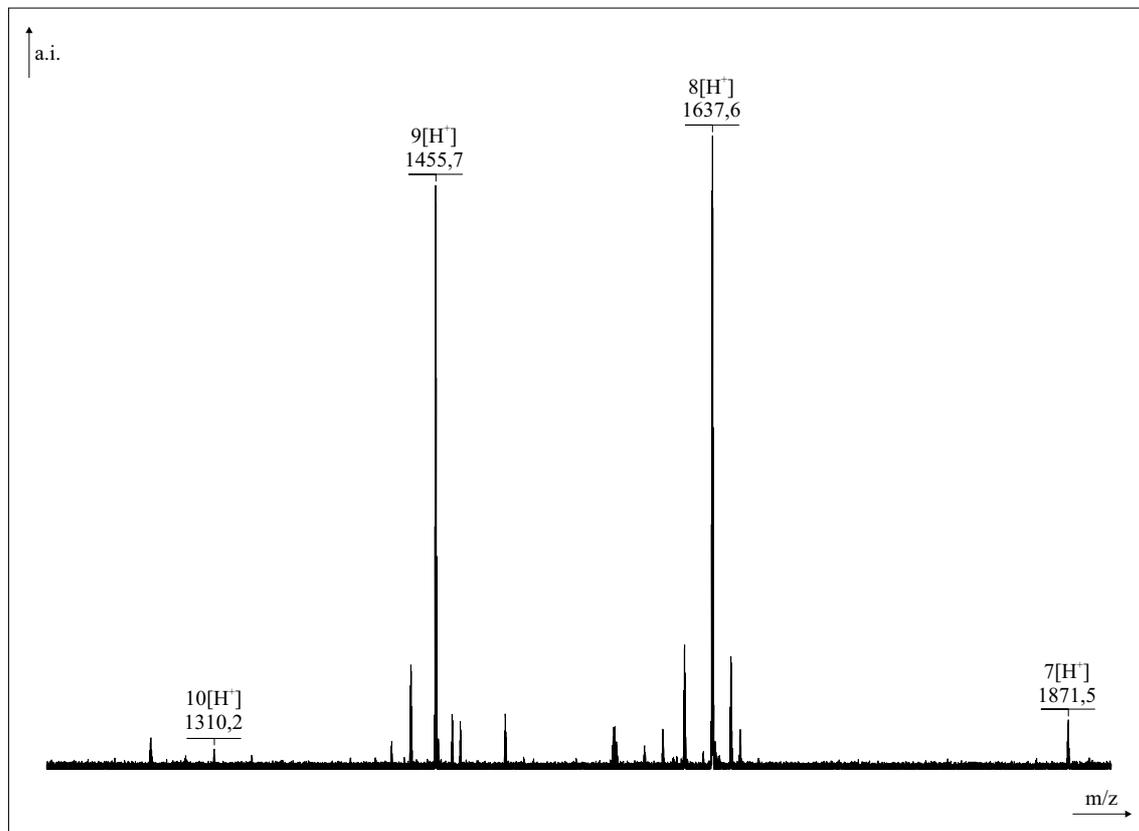
**B)** Chromatogramm der HPLC von ActR-II<sub>ec</sub> nach N-Deglycosylierung und Spaltung mit GluC.

*Protein-Sequenzierung*

Die Protein-Sequenzierung der N-terminalen 10 Aminosäuren des wie beschrieben aufgereinigten ActR-II<sub>ec</sub> bestätigte die homogene und vollständige Abspaltung des gp67 Signal-Peptids. Die durch die Spaltung des Signalpeptids bedingte N-terminale Verlängerung der Sequenz von ActR-II<sub>ec</sub> um die Aminosäuren Ala, Asp, Leu, Gly und Ser, gefolgt von den Aminosäuren Ala, Ile, Leu, Gly und Arg von ActR-II<sub>ec</sub> konnten in der Sequenzierung nachgewiesen werden.

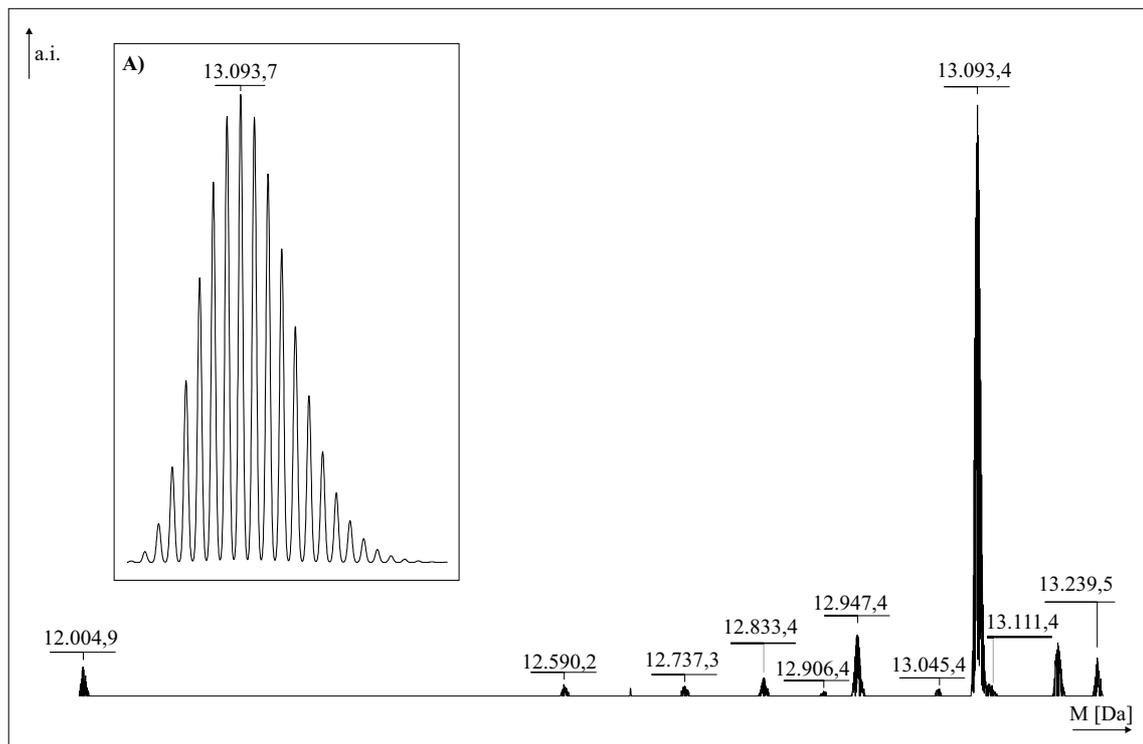
*Massenspektrometrische Analyse*

Für die massenspektrometrische Analyse von ActR-II<sub>ec</sub> wurde eine Präparation ohne N-Deglycosylierung, jedoch mit GluC-Spaltung eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung III.34 in Form der Rohdaten wiedergegeben. Die vier Gruppen von Signalen stehen für die unterschiedlichen Protonierungen der Probe.



**Abbildung III.34:** Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von ActR-II<sub>ec</sub> aus *Sf*-9 Insektenzellen ohne N-Deglycosylierung.

Nach Dekonvolution (siehe Abbildung III.35) war ein Hauptsignal mit einer molaren Masse von 13.093,4 Da und mehrere kleinere Signale zu identifizieren, wobei keiner mit der aus der Proteinsequenz berechneten molaren Masse von 12.550,9 Da übereinstimmte. Die Spezies des Hauptsignals lag hierbei um 542,5 g/mol höher als die erwartete molare Masse und konnte einer Glycosylierung von ActR-II<sub>ec</sub> mit zwei GlcNAc und einer Fucose zugeordnet werden. Diese Zuordnung konnte über die Bestimmung der theoretischen Isotopenverteilung, unter Berücksichtigung der Modifizierung, bestätigt werden (siehe hierfür Abbildung III.35 A)).



**Abbildung III.35:** Massenspektrometrische Analyse von ActR-II<sub>ec</sub>, Daten nach Dekonvolution.

**A)** Theoretische Isotopenverteilung von ActR-II<sub>ec</sub> mit Glycosylierung durch 2GlcNAc und 1Fuc. (13.093,7Da; C<sub>561</sub>H<sub>838</sub>N<sub>149</sub>O<sub>190</sub>S<sub>12</sub> (+1); 5 Disulfid-Brücken; 2GlcNAc 1Fuc)

Die Auswertung der kleineren Signale ergab, dass der ActR-II<sub>ec</sub> in weiteren Glycosylierungsformen, aber auch in Form von N-terminalen und C-terminalen Verkürzungen der Proteinkette vorlag. Die Zuordnung der ermittelten molaren Massen ist in Tabelle III.8 zusammenfassend wiedergeben.

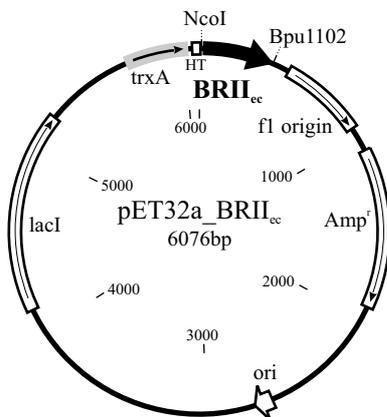
**Tabelle III.8:** Zuordnung der molaren Massen und Strukturvorschläge im Vergleich mit der berechneten molekularen Masse von ActR-II<sub>ec</sub> (monoisotopisch) von  $M_o = 12.532,49\text{Da}$  (unglycosyliert).

$M_{max}$ [Da]	$M_o$ [Da]	Strukturvorschlag	$M_o$ (theor.) [Da]	Fehler
12.004,92	11.997,92	- ADLGSSGAILG (N-Term.) + Fuc	12.143,17	-0,75
12.590,23	12.583,23	- ADLG (N-Term.) + Fuc	12.582,48	-0,75
12.736,28	12.729,28	- ADLG (N-Term.)	12.728,54	-0,74
12.831,36	12.824,36	- ME (C-Term.)	12.824,62	0,26
12.946,39	12.938,39	+ 2GlcNAc	12.938,65	0,26
13.045,36	13.037,36	+ 2GlcNAc, + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		
13.092,44	13.084,44	+ 2GlcNAc, + Fuc	13.084,71	0,27
13.238,50	13.230,50	+ 2GlcNAc, + 2Fuc	13.230,76	0,26

### III.2.2 Präparation von BR-II<sub>ec</sub> aus *E. coli*

#### III.2.2.1 Expression und Reinigung der extrazellulären Domäne von BR-II

Für die Präparation von BR-II<sub>ec</sub> wurde der in Abbildung III.36 gezeigte pET32a-BR-II<sub>ec</sub> Expressionsvektor verwendet. Er ermöglichte die Expression der extrazellulären Domäne, bestehend aus den Resten 27 bis 150 des humanen BMP Typ II Rezeptor Vorläufer-Proteins [ROSENZWEIG *et al.*, 1995] als Thioredoxin-Fusionsprotein in AD494(DE3) *E. coli* Zellen und wurde von Herrn Dr. T. Kirsch zur Verfügung gestellt.



**Abbildung III.36:** Expressionsvektor pET32a-BR-II<sub>ec</sub>. Die über die Schnittstellen *NcoI* und *Bpu1102* eingefügte Sequenz der extrazellulären Domäne von BR-II (BR-II<sub>ec</sub>) schließt an das Thioredoxin (*trxA*), den 6x His-Tag (H) und die Thrombin-Schnittstelle (T) an.

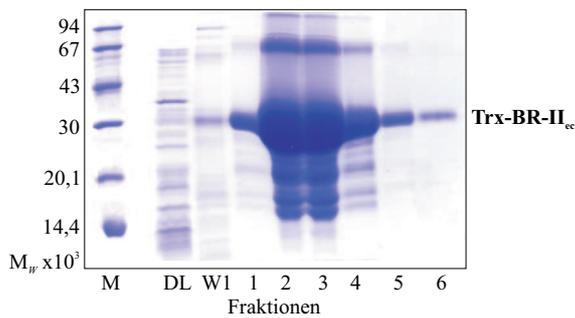
#### Expression und Zellaufschluss

Die Expression erfolgte, wie bereits für BR-IA<sub>ec</sub> beschrieben, bei 30°C aus einem 7,2l Kulturansatz nach Induktion mit 1mM IPTG. Die durch Zentrifugation abgetrennten bis zu 5g/l Zellen wurden in Portionen zu 8 bis 12g Feuchtwicht aufgeteilt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt konnte entweder zur weiteren Reinigung auf die Ni-Chelat-Sepharose aufgetragen werden oder wurde einer Renaturierung durch Dialyse (für die Durchführung siehe auch Kapitel II.8.4.4), wie sie von [HATTA *et al.*, 2000] für den Trx-BR-IA<sub>ec</sub> publiziert wurde, zugeführt. Diese Dialyse-Renaturierungen führten jedoch zu keiner Ausbeutesteigerung von bindungsaktivem BR-II<sub>ec</sub> gegenüber der bisher beschriebenen Aufarbeitung der Thioredoxin-Fusionsproteine.

Die für die Komplexpräparationen notwendige Menge an BR-II<sub>ec</sub> wurde daher ausschließlich nach dem an diese Präparationen angelehnten Reinigungsprotokoll erhalten.

#### Chromatographie an Ni-Chelat Sepharose und Thrombin-Spaltung

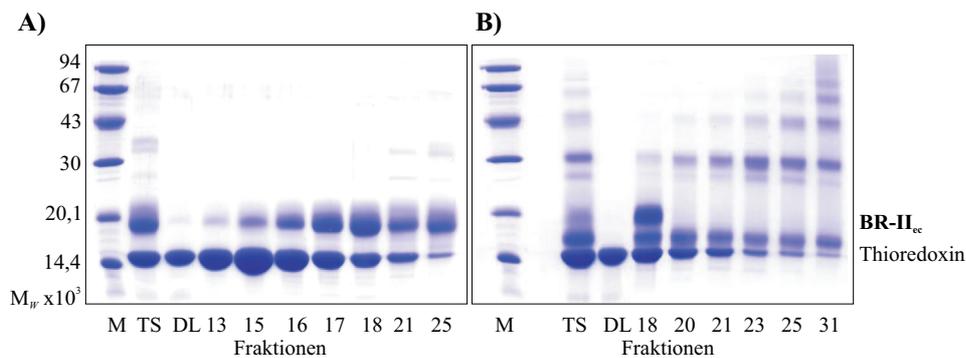
Hierfür wurde der Rohextrakt zunächst auf die Ni-Chelat Sepharose aufgetragen. Die spezifische Wechselwirkung des 6x His-Tags ermöglichte so die Aufreinigung des Trx-BR-II<sub>ec</sub> aus der Proteinlösung des Zellaufschlusses. In Abbildung III.37 ist die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Chromatographie mittels Ni-Chelat Sepharose mit einem Probenauftrag von 10µl dargestellt. Die Elution erfolgte hierfür isokratisch bei 0,5M Imidazol. Die vereinigten Fraktionen 2 bis 6 enthielten durchschnittlich 100mg/l Trx-BR-II<sub>ec</sub> aus denen nach Thrombin-Spaltung durch Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE monomeres BR-II<sub>ec</sub> aufgereinigt wurde.



**Abbildung III.37:** Chromatographie von Trx-BR-II<sub>ec</sub> an Ni-Chelat Sepharose. SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen der Elutionsfraktionen (1-5), des Durchlaufs (DL) und des Waschschrittes (W) mit 60mM Imidazol der Ni-Chelat Säule.

*Anionenaustausch-Chromatographie mittels Fractogel EMD TMAE*

Die Anionenaustausch-Chromatographie mit Fractogel EMD TMAE erfolgte, wie bereits in den entsprechenden Präparationen für BR-IA<sub>ec</sub> und BR-IB<sub>ec</sub> beschrieben, mittels eines linearen NaCl-Gradienten zwischen 0M und 0,35M NaCl. Eine Probe des Auftrags nach Thrombin-Spaltung mit der Probenbezeichnung „TS“ sowie die Analyse der Elutionsfraktionen sind in Abbildung III.38 gezeigt. Ausgehend von dieser SDS-PAGE wurden die Fraktionen 15 bis 23 zusammengefasst welche den monomeren BR-II<sub>ec</sub> enthielten. Im Gegensatz zu allen bisher aufgereinigten Rezeptoren zeigte BR-II<sub>ec</sub> dabei veränderte Laufeigenschaften in der SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen. Wie in Abbildung III.38 B) und Abbildung III.40 dargestellt, wies die Bande von bindungsaktiven BR-II<sub>ec</sub> ein Molekulargewicht  $M_W$  von 20.000 auf und lag somit deutlich über dem kalkulierten  $M_W$  von 14.370. Die intensiv gefärbte Bande bei einem  $M_W$  von 17.000, welche in den Proben des Spaltansatzes (TS) sichtbar war und zunächst im Vergleich mit den anderen Rezeptor-Präparationen als monomeres BR-II<sub>ec</sub> angesehen wurde, enthielt hingegen keinen biologisch aktiven Rezeptor. Die Ausbeute an monomeren BR-II<sub>ec</sub> nach diesem Reinigungsschritt betrug 10mg/l.



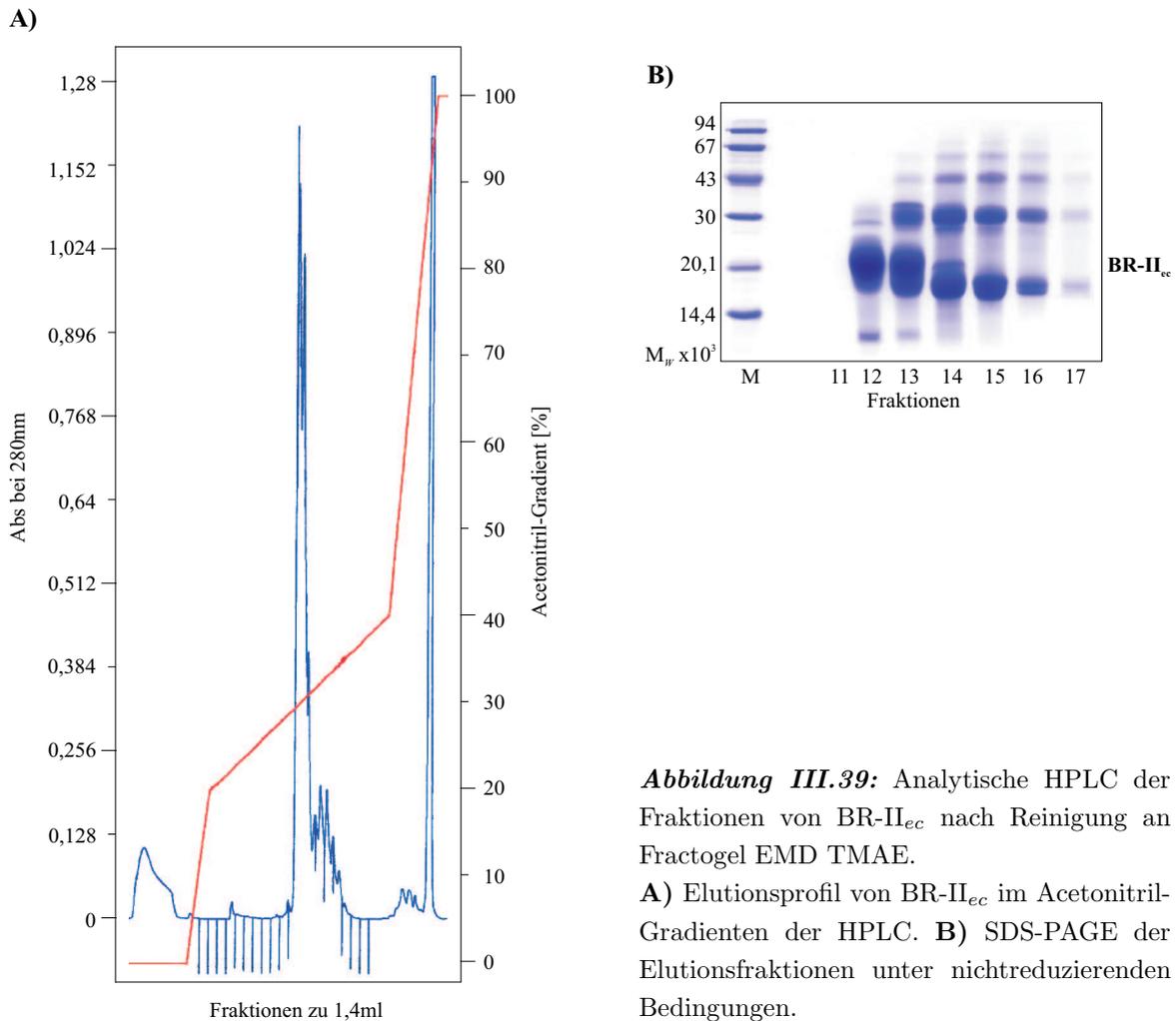
**Abbildung III.38:** Anionenaustausch-Chromatographie des Thrombin-Spaltansatzes von Trx-BR-II<sub>ec</sub> (TS) mittels Fractogel EMD TMAE. SDS-PAGE der Elutionsfraktionen unter **A)** reduzierenden und **B)** nichtreduzierenden Bedingungen.

*HPLC und BMP-2 Affinitäts-Chromatographie*

Die Zusammensetzung der vereinigten Elutionsfraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie mit Fractogel EMD TMAE wurde zunächst mit einer analytischen HPLC analysiert. Abbildung III.39 zeigt das entsprechende Elutionsprofil eines Acetonitril-Gradienten sowie die SDS-PAGE Analyse der einzelnen Fraktionen. Die Elution von BR-II<sub>ec</sub> erfolgte dabei im Bereich von 30% bis 35% Acetonitril

und die Fraktionen 12 und 13, sowie 14 bis 16 wurden zusammengefasst.

Nachdem nur in den Fraktionen 12 und 13 die biologische Aktivität mit der Bindung an BMP-2 mittels BIAcore Interaktionsanalyse festgestellt werden konnte (siehe Kapitel III.3), wurden diese Fraktionen auch der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Die Ergebnisse sind in den anschließenden Abschnitten genauer beschrieben.

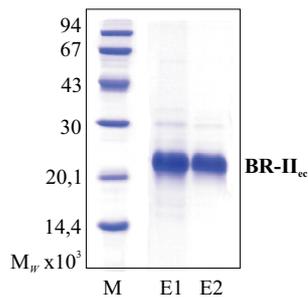


**Abbildung III.39:** Analytische HPLC der Fraktionen von BR-II<sub>ec</sub> nach Reinigung an Fractogel EMD TMAE.

**A)** Elutionsprofil von BR-II<sub>ec</sub> im Acetonitril-Gradienten der HPLC. **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Darüber hinaus wurden die Elutionsfraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE einer weiteren Reinigung an BMP-2 Affinitäts-Chromatographie unterzogen. Aufgrund der geringen Affinität zwischen gekoppeltem BMP-2 und dem löslichen Rezeptor musste der Auftrag und die isokratische Elution mit 4M MgCl<sub>2</sub> mehrfach wiederholt werden. Dabei konnten die Ausbeuten gesteigert werden, wenn der Auftrag des TMAE-Elutionsfraktionen (bzw. des Durchlaufs einer vorangegangenen Elution) in sehr hoher Konzentration erfolgte.

Insgesamt wurden bis zu 300 µg/l BR-II<sub>ec</sub> isoliert und für die Komplexpräparationen eingesetzt. Mit der Anwendung der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie konnte der Reinheitsgrad von BR-II<sub>ec</sub> nochmals gesteigert werden, wie die in Abbildung III.40 dargestellte SDS-PAGE der entsprechenden Elutionsfraktionen belegt.



**Abbildung III.40:** SDS-PAGE zweier aufeinander folgender Elutionen (E1 und E2) der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie nach Auftrag der vereinigten TMAE-Elutionsfraktionen.

Eine Zusammenstellung aller Ausbeuten der Aufarbeitung von BR-II<sub>ec</sub> entsprechend dem BR-IA<sub>ec</sub>-Protokoll ist in Tabelle III.9 angegeben. Es wurden trotz Expression bei 30°C vergleichsweise hohe Expressionsraten an Trx-BR-II<sub>ec</sub> erzielt. Dennoch konnten nur ungefähr 0,6% des nach Thrombin-Spaltung erhaltenen monomeren BR-II<sub>ec</sub> durch BMP-2 Affinitäts-Reinigung isoliert werden.

**Tabelle III.9:** Reinigungstabelle der Präparation von BR-II<sub>ec</sub> als Thioredoxin-Fusionsprotein aus *E.coli*.

Expression bei	Bakterien-Kultur	Ni-Chelat Sepharose	TMAE	HPLC	BMP-2 Affinitäts-Chromatographie
30°C	5g/l Zellen	100mg/l (Trx-BR-II <sub>ec</sub> )	10mg/l (Monomer)	400µg/l <sup>†</sup>	300µg/l

<sup>†</sup> ... aus Fraktionen 12 und 13 der HPLC.

### III.2.2.2 Biochemische Charakterisierung von BR-II<sub>ec</sub> aus *E.coli*

#### Protein-Sequenzierung

Die Sequenzierung der N-terminalen zehn Aminosäuren des als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E.coli* exprimierten und aufgereinigten BR-II<sub>ec</sub> belegte die homogene und korrekte Thrombin-Spaltung. So konnten die aus dem Spaltmotiv stammenden Aminosäuren Gly und Ser und nachfolgend die eingefügten Aminosäuren Gly, Ala, Met, Ala (siehe Expressionsvektor in Abbildung III.36), sowie die ersten vier Aminosäuren der BR-II<sub>ec</sub> Sequenz Ser, Gln, Asn und Gln nachgewiesen werden.

#### Massenspektrometrische Analyse

Für die massenspektrometrische Analyse von BR-II<sub>ec</sub> wurde die Fraktion 12 einer analytischen HPLC der TMAE-Elutionsfraktionen verwendet. Die Rohdaten der Messung, welche in Abbildung III.41 dargestellt sind, zeigten drei Signale die dem monomeren BR-II<sub>ec</sub> in 8-facher, 9-facher und 10-facher Protonierung zugeordnet werden konnten. Nach Dekonvolution wurde ein einzelner Peak mit einer molaren Masse von 14.360,1Da ermittelt. Dieser konnte, durch den Vergleich mit der aus der atomaren Zusammensetzung und der theoretischen Isotopenverteilung kalkulierten molaren Masse von 14.360,4Da (C<sub>615</sub>H<sub>925</sub>N<sub>172</sub>O<sub>205</sub>S<sub>11</sub> (+1); 5 Disulfid-Brücken), eindeutig dem monomeren BR-II<sub>ec</sub> zugeordnet werden. Dies bestätigte die Vollständigkeit des exprimierten BR-II<sub>ec</sub>-Konstrukts, sowie das Vorhandensein der erwarteten fünf Disulfidbrücken.

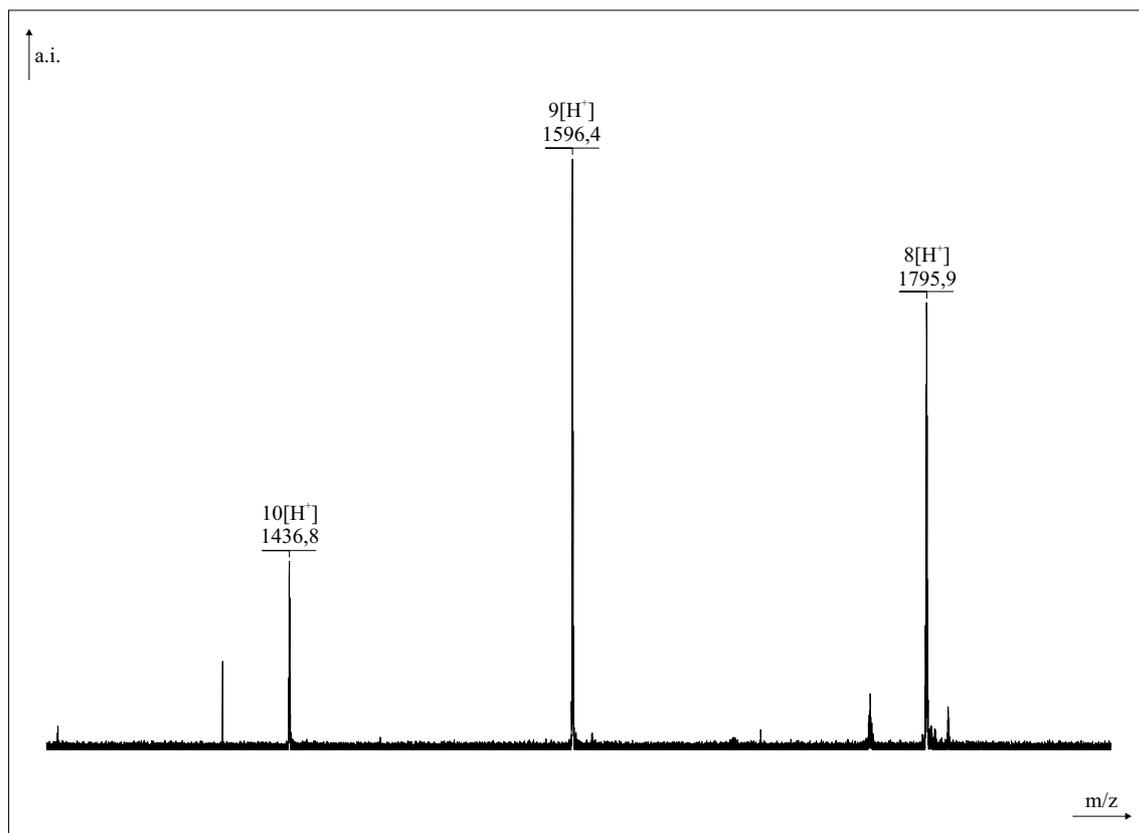


Abbildung III.41: Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von BR-II<sub>ec</sub> aus *E.coli*.

### III.3 BIAcore Interaktionsanalysen der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung

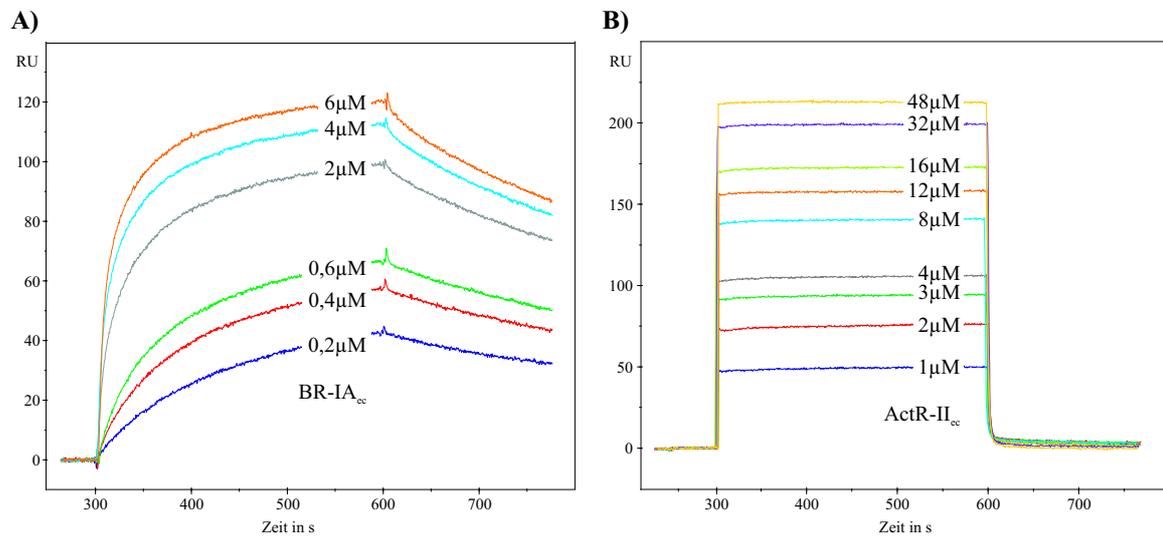
Als wichtiges Kriterium für die biologischen Aktivität der präparierten extrazellulären Rezeptordomänen wurde die Bindung zu deren Liganden angewandt. Die Ligand-Rezeptor Wechselwirkung wurde hierfür mittels Oberflächen Plasmon Resonanz Spektroskopie (BIAcore) analysiert. Dabei wurden die Rezeptoren sowohl an am Sensorchip immobilisierten Liganden, als auch in umgekehrter Reihenfolge durch Immobilisierung der Rezeptoren und Überspülung mit löslichem Ligand vermessen. Die erhaltenen Sensogramme wurden anschließend wie unter II.12 angegeben ausgewertet.

Dabei konnten von der Messanordnung abhängig unterschiedliche  $K_D$ -Werte für entsprechende Ligand-Rezeptor Paare ermittelt werden, wobei bei immobilisierten Rezeptor generell höhere Affinitäten bestimmt wurden (Daten nicht gezeigt). Dies ließ sich mit der Kooperativität der Wechselwirkung beider Bindungsepitope eines Liganden zu zwei räumlich nah beieinander stehenden Rezeptorketten an der Sensorchip-Oberfläche erklären (Nickel, J., zur Publikation eingereichte Daten). Diese Messanordnung repräsentierte damit eine 1:2 Interaktion wie sie an der Zelloberfläche stattfindet.

Demgegenüber wurden die aus der Messung mit immobilisierten Liganden ermittelten Affinitäten als 1:1 Interaktion, das heißt eines Liganden-Bindungsepitops mit einer extrazellulären Rezeptorkette interpretiert. Dies entsprach einer Interaktion wie sie bei der Komplexpräparation in Lösung erwartet wird.

Zur Charakterisierung der biologischen Aktivität der verschiedenen extrazellulären Typ I und Typ II Rezeptordomänen wurden daher die Messungen am immobilisierten Liganden ausgewertet. In Ab-

bildung III.42 A) ist beispielhaft für die an den Typ I Rezeptoren durchgeführten Messungen das Sensogramm der Bindung von BR-IA<sub>ec</sub> in Konzentrationen von 0,2µM bis 6µM an immobilisiertes BMP-2 dargestellt. Demgegenüber zeigt Abbildung III.42 B) das Sensogramm der Typ II Rezeptor Wechselwirkung am Beispiel der BMP-2 : ActR-II<sub>ec</sub> Interaktion. Hierfür wurde der ActR-II<sub>ec</sub> in Konzentrationen von 1µM bis 48µM eingesetzt.



**Abbildung III.42:** BIAcore Interaktionsanalyse binärer Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Sensogramm der Interaktion von BR-IA<sub>ec</sub> an immobilisiertes BMP-2. **B)** Sensogramm der Interaktion von ActR-II<sub>ec</sub> an immobilisiertes BMP-2.

Der Vergleich beider Sensogramme und der daraus ermittelten Daten repräsentiert zwei generelle Typen von Bindungskinetiken. Die Erste, als „langsam“ charakterisierte Bindungskinetik war typisch für die Ligand : Typ I Rezeptor Interaktion (siehe Abbildung III.42 A)) und wurde durch relativ geringe Werte für die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ( $k_{on}$ ) und der Dissoziation ( $k_{off}$ ) gekennzeichnet (siehe auch Tabelle III.10). Die Zweite, als „schnell“ charakterisierte Bindungskinetik war hingegen bei der Interaktion von Ligand mit den Typ II Rezeptoren zu beobachten. Sie ist durch vergleichsweise hohe Assoziations-Geschwindigkeit ( $k_{on} > 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) gekennzeichnet (siehe Abbildung III.42 A) und Tabelle III.10).

Die Zusammenstellung aller durchgeführten Messungen und der daraus ermittelten Werte zur Berechnung von  $K_D$  sind in Tabelle III.10 wiedergegeben. Dabei erfolgte die Bestimmung der Affinitäten ( $K_D$ ) für die „langsame“ Interaktion der Liganden mit den Typ I Rezeptoren BR-IA<sub>ec</sub> und BR-IB<sub>ec</sub> aus den kinetischen Konstanten  $k_{on}$  und  $k_{off}$ , da bei den geringen Konzentrationen des Analyten eine konzentrationsabhängige Bindung im Equilibrium nicht erreicht wurde. Für die „schnelle“ Interaktion der Liganden mit den Typ II Rezeptoren ActR-II<sub>ec</sub> und BR-II<sub>ec</sub> musste hingegen die Affinität ( $K_D$ ) aus der Bindung im Gleichgewicht bestimmt werden. Eine Auswertung aus den kinetischen Konstanten war aufgrund der geringen Anzahl an Messpunkten innerhalb der Assoziations- und Dissoziations-Phase nicht möglich.

Der BR-IA<sub>ec</sub> zeigte in der Gruppe der Typ I Rezeptoren zum BMP-2, mit einem  $K_D$ -Wert von 48nM, die insgesamt höchste gemessene Bindungsaffinität (siehe Tabelle III.10). Dagegen wurden für BMP-6 ( $K_D = 2,0\mu\text{M}$ ) und GDF-5 ( $K_D = 3,3\mu\text{M}$ ) deutlich geringere Affinitäten bestimmt.

Für die Interaktionen von BR-IB<sub>ec</sub> konnten sowohl mit BMP-2 ( $K_D = 350\text{nM}$ ) als auch mit GDF-5 ( $K_D = 300\text{nM}$ ) nahezu gleiche Affinitäten ermittelt werden. Für die Interaktion zwischen BR-IB<sub>ec</sub>

**Tabelle III.10:** Auswertung der BIAcore Interaktionsanalyse für Messungen an immobilisierten Liganden.

Ligand (immobilisiert)	Typ I Rezeptor (löslich)		Typ II Rezeptor (löslich)	
	BR-IA <sub>ec</sub> ( <i>E.coli</i> )	BR-IB <sub>ec</sub> ( <i>E.coli</i> )	ActR-II <sub>ec</sub> ( <i>Sf-9</i> )	BR-II <sub>ec</sub> ( <i>Sf-9</i> )
BMP-2				
$k_{on}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$3,9 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$	$> 1 \cdot 10^7$	$> 1 \cdot 10^7$
$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$8,0 \cdot 10^{-3}$	$> 1 \cdot 10^{-1}$	$> 1 \cdot 10^{-1}$
$K_D$ (kin) [ $nM$ ]	48	350	n.e.	n.e.
$K_D$ (eq) [ $nM$ ]	n.e.	n.e.	3800	13.000
BMP-6				
$k_{on}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$2,3 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$1,6 \cdot 10^{-1}$
$K_D$ (kin) [ $nM$ ]	(600)	(200)	980	1930
$K_D$ (eq) [ $nM$ ]	2000	1400	1780	7350
GDF-5				
$k_{on}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$5,0 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$	$> 1 \cdot 10^7$	$> 1 \cdot 10^7$
$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$> 1 \cdot 10^{-1}$	$> 1 \cdot 10^{-1}$
$K_D$ (kin) [ $nM$ ]	3300	300	n.e.	n.e.
$K_D$ (eq) [ $nM$ ]	n.e.	n.e.	22.000	60.000

und BMP-6 konnte ein  $K_D$ -Wert von  $1,4\mu M$  bestimmt werden. Sie zeigte damit eine der BMP-6 : BR-IA<sub>ec</sub> Wechselwirkung vergleichbare Affinität.

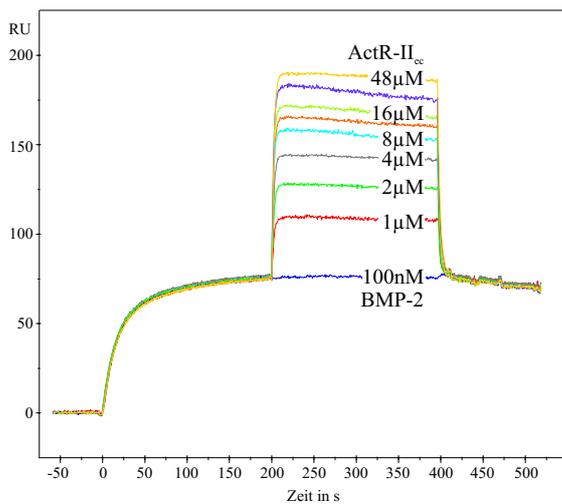
Die höchste Affinität innerhalb der Gruppe der Typ II Rezeptoren wurde für die Bindung von ActR-II<sub>ec</sub> an BMP-6 ( $K_D = 1,8\mu M$ ) ermittelt. Dieser Rezeptor wies dagegen für BMP-2 nur eine Affinität von  $K_D = 3,8\mu M$  und zum GDF-5 von  $K_D = 22\mu M$  auf. Für die Wechselwirkung des BR-II<sub>ec</sub> war eine ähnliche Abstufung in den Affinitäten zwischen BMP-6 und BMP-2 bzw. GDF-5 zu beobachten, wobei insgesamt geringere  $K_D$ -Werte bestimmt wurden. Mit einem  $K_D$ -Wert von  $60\mu M$  wurde die Bindung zwischen BR-II<sub>ec</sub> und GDF-5 als die Interaktion mit der geringsten Affinität ermittelt.

Anhand dieser Werte erfolgte die vergleichende Bewertung der unterschiedlichen Rezeptorpräparationen. So konnten durch Interaktionsmessungen an BMP-2 für die mittels HPLC gereinigten TMAE-Elutionsfraktion von monomerem BR-IB<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen zunächst nur fünffach höhere  $K_D$ -Werte ermittelt werden. Erst mit der Einführung des zusätzlichen Reinigungsschritts an der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie wurden auch für BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) ein dem *E.coli*-Material vergleichbarer  $K_D$ -Wert von  $300nM$  bestimmt.

Für den aus *E.coli* präparierten BR-II<sub>ec</sub> wurden die  $K_D$ -Werte für die Proben der HPLC Fraktionen 12 und 13 bestimmt. Sie zeigten eine um den Faktor fünf geringere Affinität zu BMP-2 als vergleichbar aufgereinigter BR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9* Insektenzellen.

Für den enzymatisch vollständig N-deglycosylierten ActR-II<sub>ec</sub> lag der  $K_D$ -Wert bei  $5\mu M$ . Dem gegenüber wies der chemische N-deglycosylierte ActR-II<sub>ec</sub> eine deutlich erhöhten  $K_D$ -Wert auf, was mit der teilweisen Denaturierung der Probe während der N-Deglycosylierungsreaktion begründet werden konnte.

Mit der BIAcore Interaktionsanalyse ließen sich zudem die Affinitäten der Typ II Rezeptor Interaktion am binären Ligand-Typ I Rezeptor Komplex bestimmen. Ein entsprechendes Sensogramm ist für die Bildung des ternären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes in Abbildung III.43 wiedergegeben. Der auf der Chipoberfläche immobilisierte BR-IA<sub>ec</sub> wurde hierfür zunächst mit  $100nM$



**Abbildung III.43:** BIAcore Interaktionsanalyse eines ternären Komplexes von BMP-2, BR-IA<sub>ec</sub> und ActR-II<sub>ec</sub>.

BMP-2 beladen und anschließend, unter Beibehaltung dieser BMP-2 Konzentration, mit 1µM, 2µM, 4µM, 8µM, 12µM(orange), 16µM, 32µM(violett) und 48µM ActR-II<sub>ec</sub> überspült. Die Auswertung dieser Messungen, sowie für den ternären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex sind in Tabelle III.11 zusammengestellt. Die so bestimmten  $K_D$ -Werte der BMP-2 - Typ II Rezeptor Interaktion bestätigten die ermittelten Werte für die bereits beschriebene Messanordnung am immobilisierten Liganden.

**Tabelle III.11:** Affinität der Typ II Rezeptor Interaktion im ternären Komplex mit BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub>.

Typ I Rezeptor (immobilisiert)	Ligand (löslich)		Typ II Rezeptor (löslich)	
			ActR-II <sub>ec</sub> ( <i>Sf-9</i> )	BR-II <sub>ec</sub> ( <i>Sf-9</i> )
BR-IA <sub>ec</sub>	BMP-2	$K_D$ (eq) [ <i>nM</i> ]	4200	22.000

### III.4 Präparation der Ligand-Rezeptor Komplexe

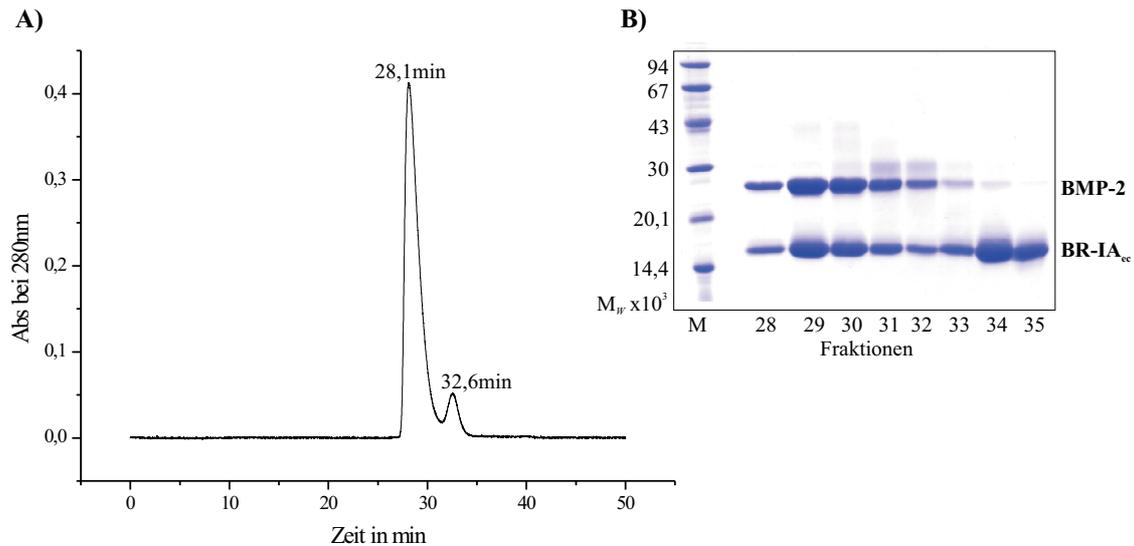
Mit der Präparation der Ligand-Rezeptor Komplexe wurde die Vorbereitung der Proben für die Kristallisation abgeschlossen. Die eingesetzten Liganden BMP-2, BMP-6 und GDF-5 wurden hierfür von Herrn Prof. W. Sebald zur Verfügung gestellt und mit den wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben präparierten Rezeptoren zusammengebracht.

Die Hauptschwierigkeit der Komplexpräparationen in Lösung lag in der Optimierung der Bildungsbedingungen, da die Liganden eine äußerst geringe Löslichkeit aufwiesen. Der gewählte Komplex-Puffer musste daher sowohl zur Stabilisierung der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung beitragen, als auch die Löslichkeit des gebildeten Komplexes sowie der einzelnen Komponenten gewährleisten.

### III.4.1 Präparation der binären Ligand-Typ I Rezeptor Komplexe

Ausgehend von der Präparations-Vorschrift für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes [KIRSCH *et al.*, 2000b] wurden die Bildung des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> und des BMP-6 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes, sowie die Bildung der entsprechenden BR-IB<sub>ec</sub> Komplexe untersucht.

#### III.4.1.1 Der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex



**Abbildung III.44:** Bildung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

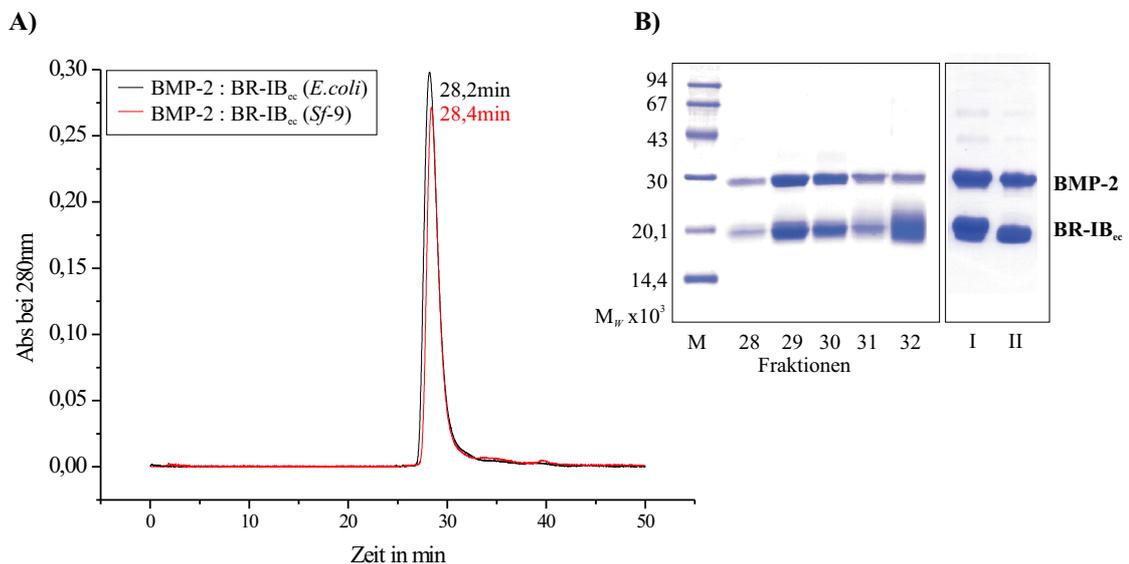
**A)** Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex wurde wie in Kapitel II.13.1.1 beschrieben durch Mischen der Einzelkomponenten in hoher Verdünnung und anschließendem Einengen auf ein Endvolumen von 100 $\mu$ l erhalten. Der eingesetzte Überschuss von 10% Rezeptor wurde nachfolgend mittels Gelfiltrations-Chromatographie abgetrennt. Das Chromatogramm der Gelfiltration einer präparativen Komplexpräparation aus 15nmol BMP-2 und 33nmol BR-IA<sub>ec</sub> ist in Abbildung III.44 A) dargestellt. Mit der angebenen Elutionszeit von 28,1min für den binären Komplex und 32,6min für den freien Rezeptor stimmt das Ergebnis mit den von KIRSCH *et al.* [2000b] gezeigten Elutionzeiten bzw. Elutionsvolumina überein. Dies bestätigt die Bildung des binären Komplexes, sowie die 1:2 Stöchiometrie zwischen dem homodimeren Liganden BMP-2 und den zwei monomeren extrazellulären Rezeptorketten des BR-IA. Die Bildung des Komplexes konnte zudem durch SDS-PAGE (siehe Abbildung III.44 B) der Elutionsfraktionen 28 bis 35 nachgewiesen werden. So eluierte der Komplex aus BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub> in den Fraktionen 28 bis 31 und der nicht gebundene Rezeptor BR-IA<sub>ec</sub> in den Fraktionen 32 bis 35.

#### III.4.1.2 Der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex

Der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex wurde gemäß der in Kapitel II.13.1.1 beschriebenen Vorschrift gebildet. Hierfür wurden im präparativen Ansatz 33nmol BR-IB<sub>ec</sub> und 15nmol Ligand

BMP-2 verwendet. Die Komplexbildung konnte, mit vergleichbaren Ausbeuten auch durch die tropfenweise Zugabe einer konzentrierten Stammlösung des Liganden zu dem in 4ml MES<sub>700</sub>-Puffer vorgelegten Rezeptor erzielt werden. Der im Überschuss eingesetzte Rezeptor wurde im Anschluss durch die Gelfiltrations-Chromatographie mit einer Superdex200 HR10/30 Säule abgetrennt.



**Abbildung III.45:** Bildung des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30). **B)** SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen. Einzelne Elutionsfraktionen der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) Komplexpräparation (links) und vereinigte Elutionsfraktionen der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (E.coli) Komplexpräparation (rechts). „I“, BR-IB<sub>ec</sub> (E.coli) mit Renaturierung und „II“, BR-IB<sub>ec</sub> (E.coli) ohne Renaturierung.

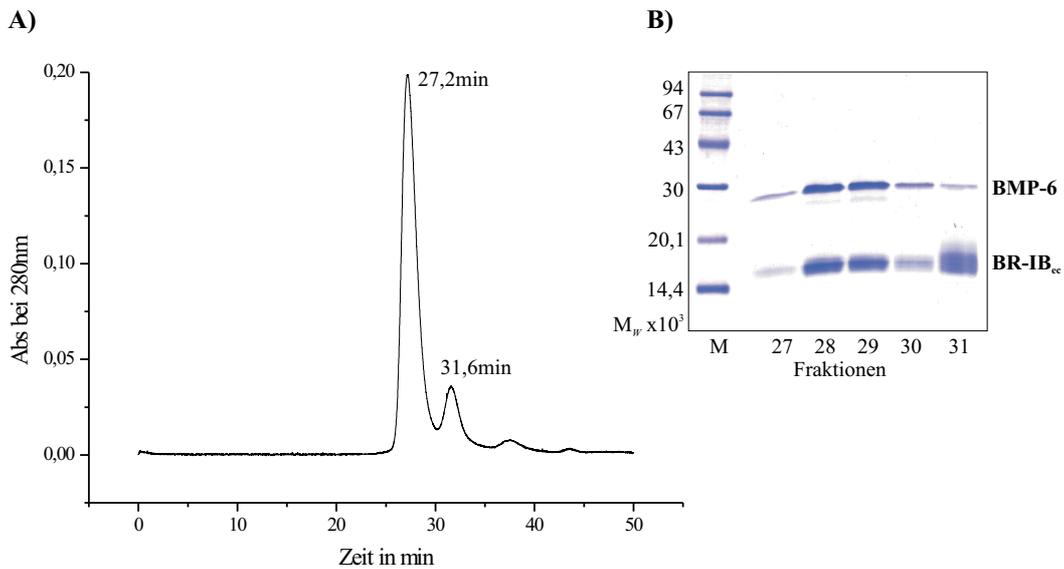
Das Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie ist in Abbildung III.45 A) wiedergegeben. Es zeigt eine überlagerte Darstellung zweier Elutionsprofile des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes für die das Sf-9 Material bzw. der in E.coli exprimierte Rezeptor zur Komplexpräparation eingesetzt wurden. Das Elutionsmaximum für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (E.coli) Komplex bei 28,2min, sowie das für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) Komplex bei 28,4min bestätigten die Bildung des Komplexes in der erwarteten 1:2 Stöchiometrie. Das aus der Kalibrierung der Gelfiltrations säule (siehe Kapitel II.10.5.2) ermittelte Molekulargewicht M<sub>W</sub> von 50.000 bis 52.000 stimmte mit den aus der Sequenz errechneten Werten. (siehe hierzu Kapitel II.11.4). Zusätzlich war aus den identischen Flächeninhalten der Elutionsprofile ersichtlich, dass bei Einsatz gleicher Mengen von Ligand und Rezeptor auch gleiche Mengen an Komplex gebildet wurden. Damit war kein Unterschied hinsichtlich der Aktivität zur Komplexbildung zwischen BR-IB<sub>ec</sub> (E.coli) und BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) erkennbar.

Die Bildung des Komplexes wurde durch die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE belegt und ist in Abbildung III.45 B) dargestellt. Die Elutionsfraktionen im linken Bildteil stammen von der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) Komplexpräparation. Der rechte Bildteil mit den Proben-Bezeichnungen „I“ und „II“ zeigt die vereinigten Elutionsfraktionen (28 bis 31) der Präparation des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (E.coli) Komplexes. In „I“ wurde hierfür der Rezeptor nach erfolgter Renaturierung eingesetzt. Für Probe „II“ wurde BR-IB<sub>ec</sub> verwendet welcher biologisch aktiv aus den TMAE-Elutionsfraktionen isoliert werden konnte (siehe Kapitel III.1.2.1). Die mit der Protein-Analytik während der BR-IB<sub>ec</sub>-Präparation aufgedeckten Unterschiede in der Zusammensetzung der Rezeptor-Proben sind aus den

Banden der Rezeptoren auch nach der Komplexbildung mit BMP-2 deutlich erkennbar. Es konnte dabei aber kein Unterschied zwischen den Herstellungsvarianten von BR-IB<sub>ec</sub> aus (*E.coli*) hinsichtlich der Bildung des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes festgestellt werden.

### III.4.1.3 Der BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex

Die Präparation des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes erfolgte gemäß der in Kapitel II.13.1.1 angegebenen Vorschrift. Das Chromatogramm der Gelfiltration nach Einengen der in Verdünnung zusammengebrachten Komponenten von 15nmol BMP-6 und 33nmol BR-IB<sub>ec</sub> ist in Abbildung III.46 A) dargestellt.



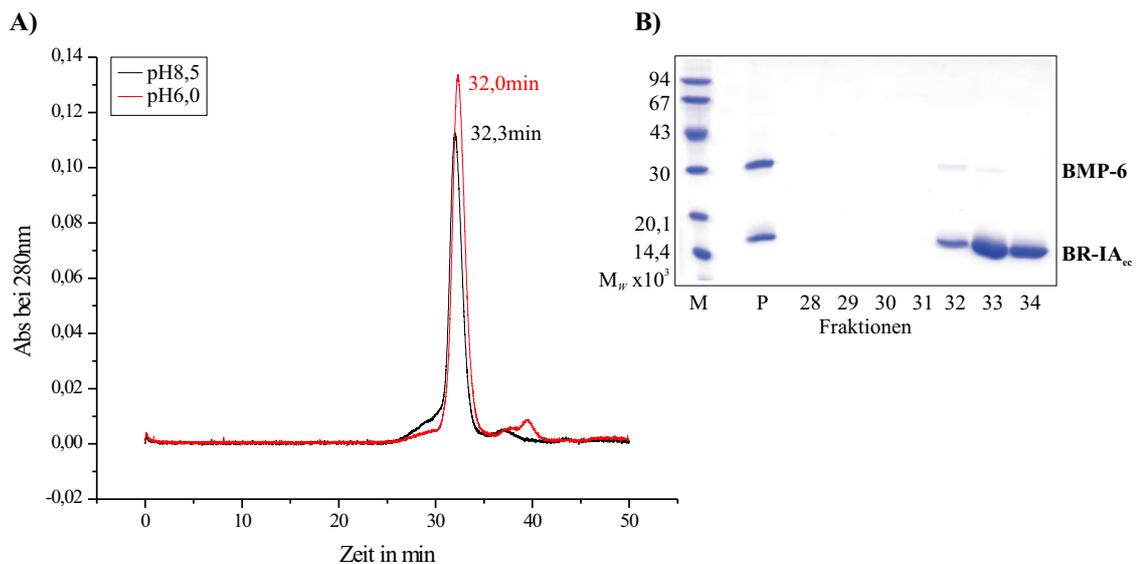
**Abbildung III.46:** Bildung des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Die Bildung des binären Komplexes konnte durch SDS-PAGE (siehe Abbildung III.46 B)) bestätigt werden. Mit 27,2min Retentionszeit eluierte der BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex, aufgrund des Molekulargewichts  $M_W$  von 57.260, deutlich zeitiger als die anderen präparierten Ligand-Typ I Rezeptor Komplexe.

### III.4.1.4 Der BMP-6 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex

Der BMP-6 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex konnte in Lösung nicht gebildet werden. In Analogie zur Präparation des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes (siehe unten) wurden auch hier mehrere pH-Werte (Durchführung entsprechend Kapitel II.13.1.1) getestet. Wie jedoch aus dem Chromatogramm der Gelfiltration in Abbildung III.47 A) ersichtlich, konnte keine Komplexbildung nachgewiesen werden. Bereits während der Konzentrierung der Probe kam es aufgrund der geringen Löslichkeit des Liganden sowohl in MES<sub>700</sub>-Puffer pH6,0 als auch in Tris<sub>500</sub>-Puffer pH8,5 zu einer quantitativen Präzipitation des BMP-6. Daher war nach Abtrennen dieses Niederschlags für den Auftrag



**Abbildung III.47:** Bildung des BMP-6 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen für die Komplexpäparierung in MES<sub>700</sub>-Puffer pH6,0 unter nichtreduzierenden Bedingungen.

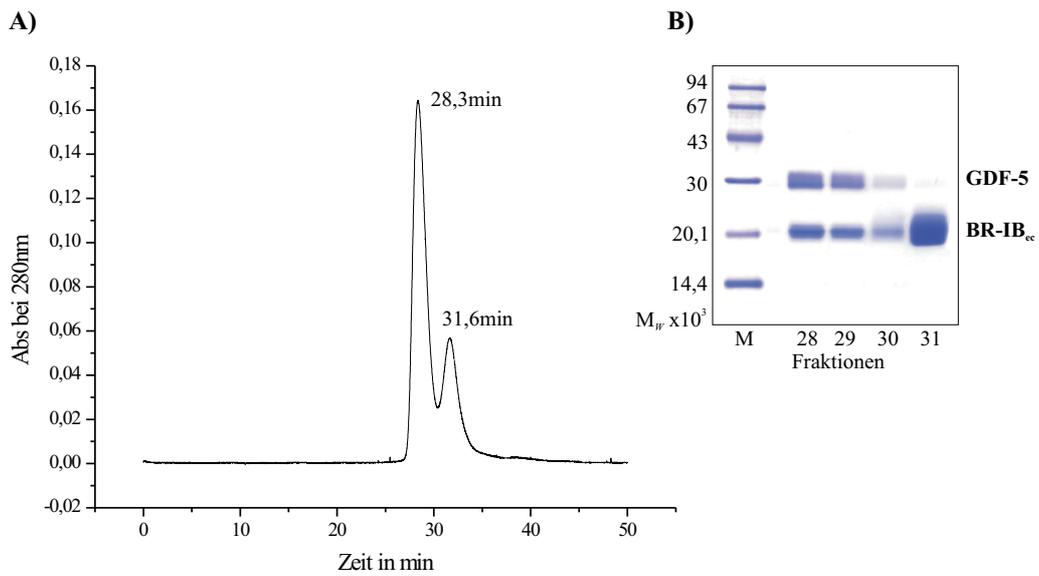
*P*, Präzipitat während des Einengens der Komplex-Probe.

auf die Superdex200 HR10/30 lediglich der freie Rezeptor mit einem Elutionsmaximum bei 32,0min bzw. 32,3min im Elutionsprofil nachzuweisen. Dies konnte mit der in Abbildung III.47 B) gezeigten SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen sowie der Probe des Präzipitats *P* bestätigt werden.

#### III.4.1.5 Der GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplex

Die Präparation des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes stellt hinsichtlich der Puffer-Bedingungen einen Sonderfall dar. Insbesondere aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit des gebildeten Komplexes unter den gewählten Bedingungen (siehe Kapitel II.13.1.1) konnten für präparative Komplexbildungen nur 10nmol GDF-5 und 22nmol BR-IB<sub>ec</sub> eingesetzt werden, wenn der Ansatz für eine Gelfiltration auf 100μl eingengt werden sollte. Im Fall größerer Ansätze wurde eine massive Präzipitation des Komplexes während des Einengens der Probe beobachtet. Zudem konnte der Komplex nicht bei 4°C gelagert werden, da bei dieser Temperatur ebenfalls Präzipitation auch aus verdünnten Lösungen, wie etwa in Elutionsfraktionen der Gelfiltration beobachtet wurden. Die Ausbeute der so durchgeführten Komplexbildung betrug lediglich 20% bis 25% (bezogen auf nmol eingesetzten Ligand).

Das Chromatogramm der Gelfiltration ist in Abbildung III.48 A) dargestellt. Es zeigt die Bildung des binären Komplexes mit einem Elutionsmaximum bei 28,3min. Der nicht gebundene BR-IB<sub>ec</sub> ist, mit einer Elution bei 31,6min, deutlich zu sehen. Unterschiede hinsichtlich der Löslichkeit der gebildeten Komplexe mit glycosyliertem bzw. vollständig O-deglycosyliertem BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*), sowie bei der Verwendung von BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) wurden nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen dieser Chromatographie mittels Superdex200 HR10/30 Säule ist in Abbildung III.48 B) gezeigt und bestätigte die Bildung des Komplexes.

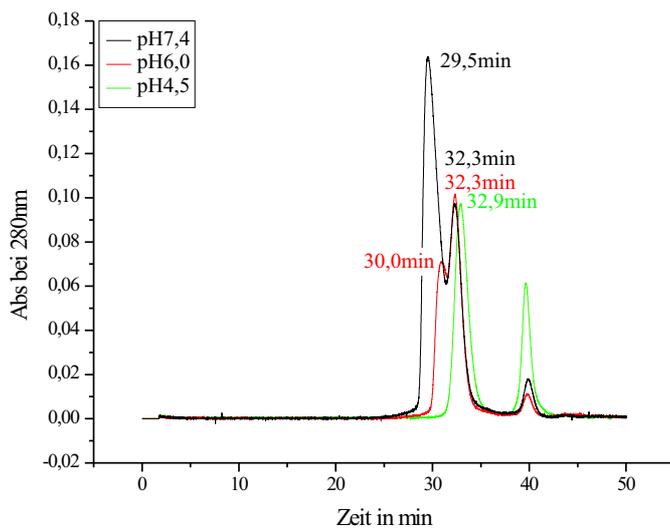


**Abbildung III.48:** Bildung des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen.

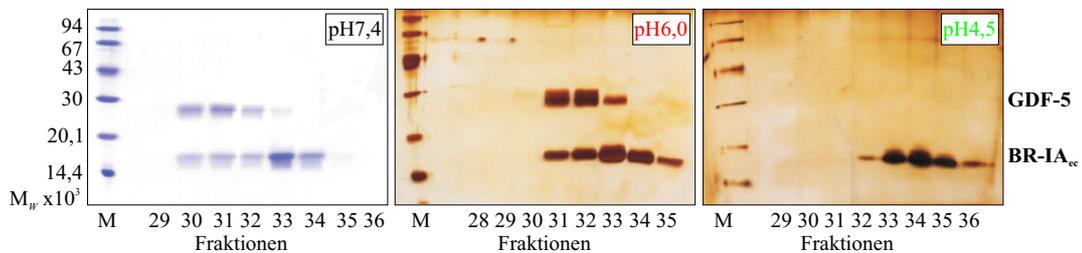
#### III.4.1.6 Der GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex

Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Komplexpräparationen konnte der GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex nicht unter der Standardbedingung des MES<sub>700</sub>-Puffers bei pH6,0 hergestellt werden. Die Untersuchungen hinsichtlich der pH-Abhängigkeit der Komplexbildung sind in Ab-



**Abbildung III.49:** pH-abhängige Bildung des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes. Chromatogramme der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30).

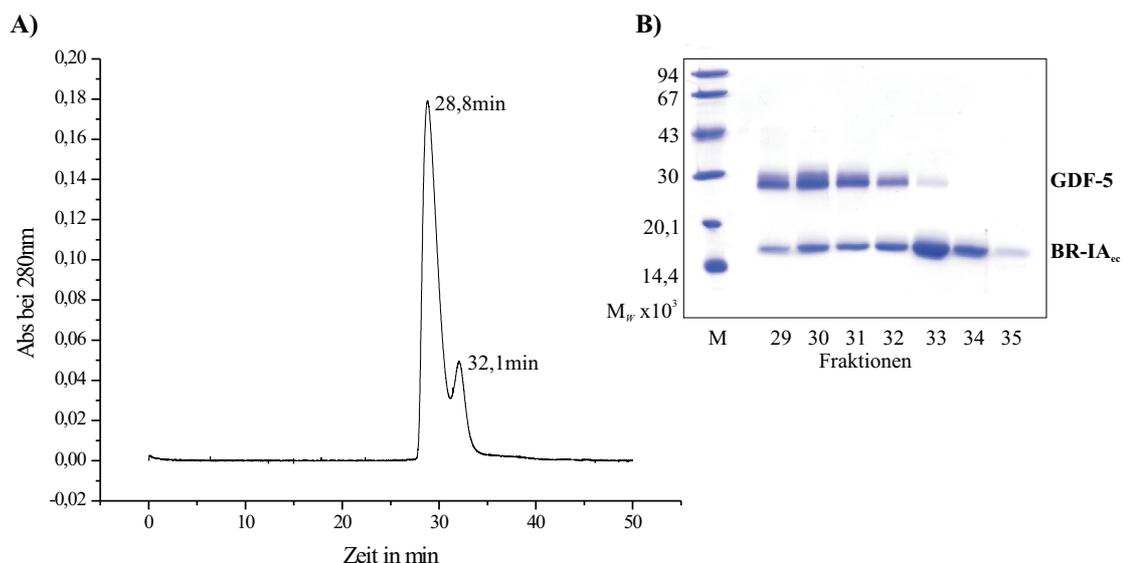
bildung III.49 und III.50 dargestellt. Dafür wurden analytische Ansätze entsprechend Kapitel II.13.1.1 aus 4nmol GDF-5 und 8,8nmol BR-IA<sub>ec</sub> für die Präparation eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass unter Bedingungen mit pH-Werten niedriger als pH7,4 kein GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex nach Gelfiltration nachgewiesen werden konnte. Die entsprechende Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte dabei auch mittels SDS-PAGE, die in Abbildung III.50 dargestellt sind.



**Abbildung III.50:** pH-abhängige Bildung des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes. SDS-PAGE der Elutionsfraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen. (Coomassie-Färbung (links) und Silberfärbung (Mitte und rechts))

Aus den Elutionsmaxima der Gelfiltrationsläufe bei pH7,4, pH8,0 (Daten nicht gezeigt) sowie pH8,5 (siehe hierfür Abbildung III.51) und der Kontrolle der zugehörigen Elutionsfraktion mit SDS-PAGE, war die Komplexbildung erst bei pH-Werten > pH8,0 nachzuweisen. Die Verringerung der Elutionszeit des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes bei Erhöhung des pH-Wertes deutet dabei auf eine zunehmende Stabilität des gebildeten Komplexes hin.

Aufgrund der beschriebenen Voruntersuchungen wurde der GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex im präparativen Maßstab für den Einsatz zur Kristallisation bei pH8,5 in Tris<sub>500</sub>-Puffer hergestellt. Hierfür wurden 15nmol GDF-5 zu 75nmol BR-IA<sub>ec</sub> in Komplex-Puffer gegeben, wobei das Vo-



**Abbildung III.51:** Bildung des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes. **A)** Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen.

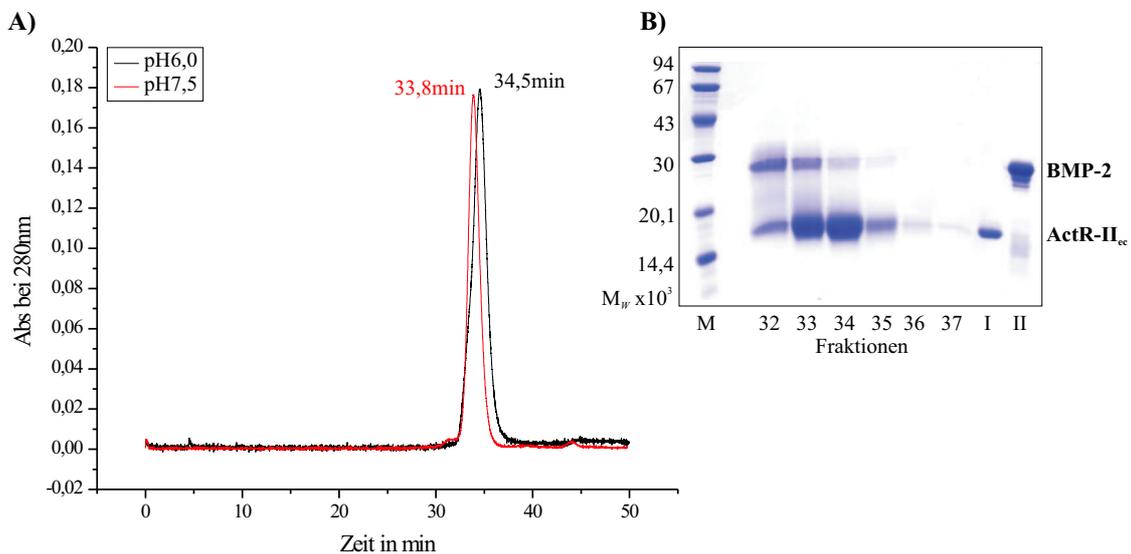
lumen des gesamten Ansatzes so gewählt wurde, dass der Ligand zunächst in einer Konzentration von weniger als  $1\mu\text{M}$  vorlag. Dieser Ansatz wurde anschließend wie in Kapitel II.13.1.1 beschrieben eingengt und  $100\mu\text{l}$  zur Gelfiltrations-Chromatographie mittels Superdex200 HR10/30 Säule aufgetragen. Das Chromatogramm dieser Komplexpräparation sowie die Analyse der entsprechenden Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE sind in Abbildung III.51 dargestellt.

Mit dem Einsatz von BR-IA<sub>ec</sub> im Verhältnis 1:5 konnte die Ausbeute deutlich gesteigert werden. Die Elution des Komplexes erfolgte nach 28,8min und entspricht gemäß der Kalibrierung (siehe Kapitel II.10.5.2) einem Molekulargewicht  $M_W$  von nur 47.600. Dieser Wert unterscheidet sich von dem für eine 1:2 Stöchiometrie des Komplexes kalkulierten  $M_W$  von 54.720 und zeigt, dass auch unter dieser Bedingung der GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex für eine Reinigung durch Gelfiltration nicht ausreichend stabil war. Für die Kristallisation wurden daher die Fraktionen 29-32 zusammengefasst, so dass BR-IA<sub>ec</sub> in der Probe in geringem Überschuss vorliegen sollte.

### III.4.2 Präparation der binären Ligand-Typ II Rezeptor Komplexe

Neben der Präparation der binären Ligand-Typ I Rezeptor Komplexe, welche in der Gruppe der BMPs und GDFs durch eine hohe Affinität der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung gekennzeichnet ist, sollte ebenso die Bildung der niederaffinen Ligand-Typ II Rezeptor Komplexe in Lösung überprüft werden. Hierzu wurden sowohl BMP-2 als auch das BMP-6 zur Komplexbildung mit ActR-II<sub>ec</sub> zusammengebracht. Die Ergebnisse sind in den folgenden zwei Abschnitten erläutert.

#### III.4.2.1 Der BMP-2 : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex



**Abbildung III.52:** Bildung des BMP-2 : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30). Überlagerte Darstellung der Elutionsprofile für die Präparation bei pH6,0 und pH7,4. **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen aus der Präparation in MES<sub>700</sub>-Puffer pH6,0 unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Für die Präparation im analytischen Maßstab wurden 3,5nmol BMP-2 mit 7,7nmol ActR-II<sub>ec</sub> in MES<sub>700</sub>-Puffer zur Komplexbildung zusammen gegeben. Der Ansatz mit einem Startvolumen von 4ml

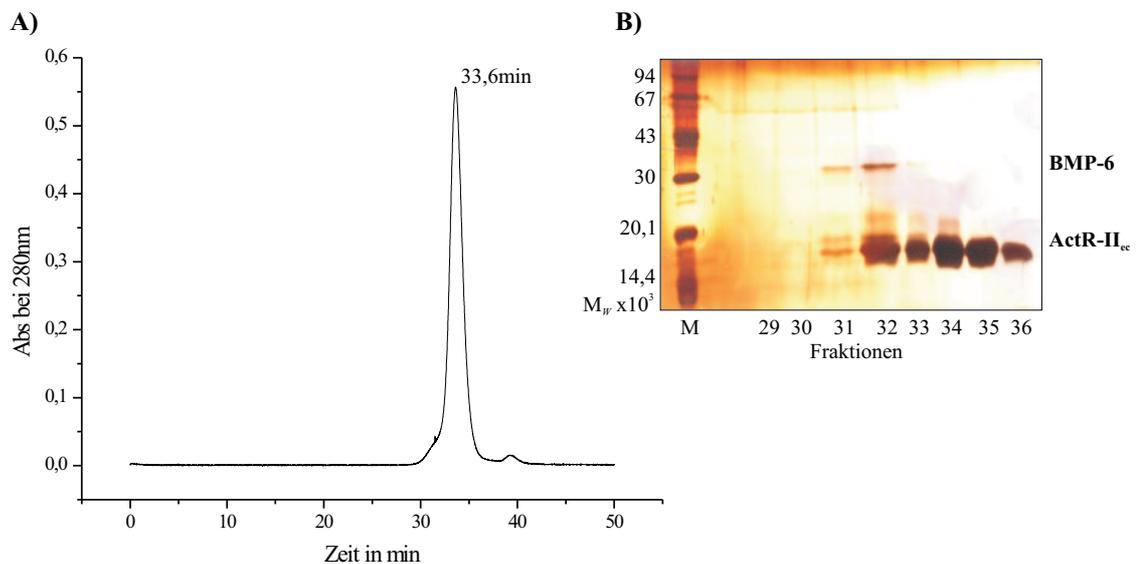
wurde für die Gelfiltration auf 100 $\mu$ l eingengt. Eine Darstellung des Elutionsprofils ist in Abbildung III.52 gezeigt. Das Elutionsmaximum bei 34,5min war dabei ein Hinweis, dass lediglich der freie Rezeptor eluierte. Dies konnte mit der SDS-PAGE (siehe auch Abbildung III.52 B)) bestätigt werden. Für die bessere Zuordnung der Banden in den Elutionsfraktionen wurde sowohl ActR-II<sub>ec</sub> als auch BMP-2 als Kontrolle mit auf das Gel aufgetragen. Die entsprechenden Proben sind in der Abbildung III.52 B) mit „I“ für ActR-II<sub>ec</sub> und „II“ für BMP-2 bezeichnet.

Die Bildung des BMP-2 : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes wurde zudem unter den Bedingungen der ternären Komplexpräparation (siehe auch Kapitel III.4.3.1) untersucht. Hierfür wurden 3,5nmol Ligand und 7,7nmol Rezeptor in Tris<sub>500</sub>-Puffer pH7,5 eingesetzt. Der Komplex konnte aber auch unter diesen Bedingungen nicht gebildet werden, wie aus der Elutionszeit von 33,8min (siehe Kapitel III.52 A)) ersichtlich wurde.

### III.4.2.2 Der BMP-6 : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex

Die Präparation des BMP-6 : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes erfolgte wie in Kapitel II.13.1.1 beschrieben in MES<sub>700</sub>-Puffer pH6,0. Zur Präparation wurden Ligand und Rezeptor im stöchiometrischen Verhältnis von 1:5 eingesetzt, um mit einem großen Überschuss an Rezeptor einem Ausfallen des Liganden während des Einengens vorzubeugen.

Das Elutionsprofil der Gelfiltration und die Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE sind in Abbildung III.53 A) und B) wiedergegeben.



**Abbildung III.53:** Bildung des BMP-6 : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Chromatogramm der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Im Chromatogramm der Gelfiltration konnte lediglich eine Elution des freien Rezeptors mit einem Elutionsmaximum bei 33,6min nachgewiesen werden. Die SDS-PAGE bestätigte dieses Ergebnis. Nachdem keine Präzipitation des Liganden während der Konzentration der Probe zu beobachten war, muss der Zerfall des Komplexes, aufgrund der Verdünnung während der Gelfiltration, stattgefunden haben. Das BMP-6 konnte nicht von der Superdex200 HR10/30 Säule eluiert werden.

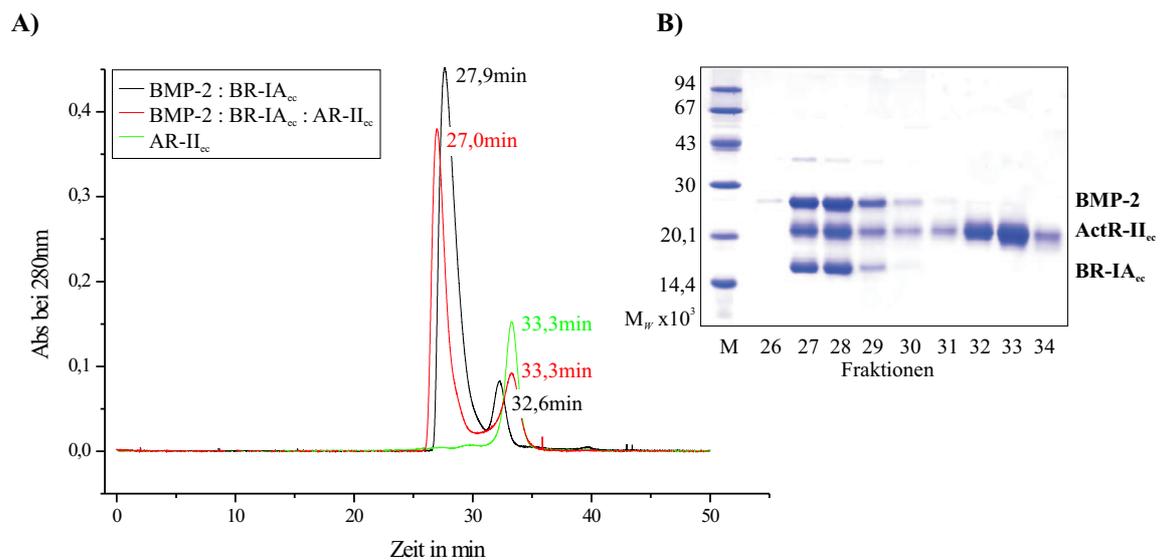
### III.4.3 Präparation der ternären Ligand-Typ I und Typ II Rezeptor Komplexe

Mit der Präparation der ternären Ligand- Typ I und Typ II Rezeptor Komplexe sollte die Bildung eines vollständigen Signalkomplexes, bestehend aus dem Liganden sowie den gebundenen extrazellulären Domänen der Typ I und Typ II Rezeptoren in Lösung nachgewiesen und nachfolgend zur Kristallisation eingesetzt werden.

Neben dem BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex wurden auch der BR-II<sub>ec</sub> zur Komplexpräparation verwendet. Die Ergebnisse dieser Präparationen sind nachfolgend erläutert.

#### III.4.3.1 Der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex

Ausgehend vom binären Ligand-Rezeptor Komplex aus BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub> wurde der ternäre BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplex durch Zugabe von ActR-II<sub>ec</sub> im stöchiometrischen Verhältnis von 1:2,2 erhalten. Dafür wurden wie in Kapitel II.13.2 beschrieben 10nmol BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex in 4ml Tris<sub>500</sub>-Puffer pH7,5 vorgelegt und nach Zugabe von 22nmol ActR-II<sub>ec</sub> auf 100 $\mu$ l eingengt. Der Überschuss an eingesetztem Typ II Rezeptor wurde anschließend durch Gelfiltration abgetrennt. In Abbildung III.54 A) ist das Elutionsprofil einer derartigen Komplexpräparation dargestellt.



**Abbildung III.54:** Bildung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Überlagerte Darstellung von Elutionsprofilen der Gelfiltration (Superdex200 HR10/30) für die BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Präparation (rot), BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Präparation (schwarz) und freiem ActR-II<sub>ec</sub> (grün). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplexpräparation unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Die Bildung des ternären Komplexes ist dabei in rot gezeigt und den Elutionsprofilen der binären Komplexpräparation (schwarz) und von freiem ActR-II<sub>ec</sub> (grün) überlagert. Die Bildung des ternären Komplexes ist durch die Verschiebung des Elutionsmaximums (27,0min) im Vergleich zu dem des binären Komplexes (27,9min) deutlich zu erkennen und konnte mittels SDS-PAGE bestätigt werden. Die SDS-PAGE der entsprechenden Elutionsfraktionen ist in Abbildung III.54 B) gezeigt.

Das aus der Elutionszeit von 27min (für die Kalibrierung der Gelfiltration siehe Kapitel II.10.5.2) ermittelte Molekulargewicht lag dabei mit 71.000 unter dem kalkulierten Molekulargewicht von 79.346 (siehe Kapitel II.11.4). Daher wurden die Elutionsfraktionen 27 bis 29 des ternären Komplexes mittels HPLC analysiert. Durch quantitative Auswertung des Elutionsprofils konnte die erwartete Stöchiometrie eines 1:2:2 BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wurde zudem durch die analytische Komplexpräparation aus dem BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex und ActR-II<sub>ec</sub> in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 (für Durchführung siehe Kapitel II.13.1.1) belegt (Daten nicht gezeigt).

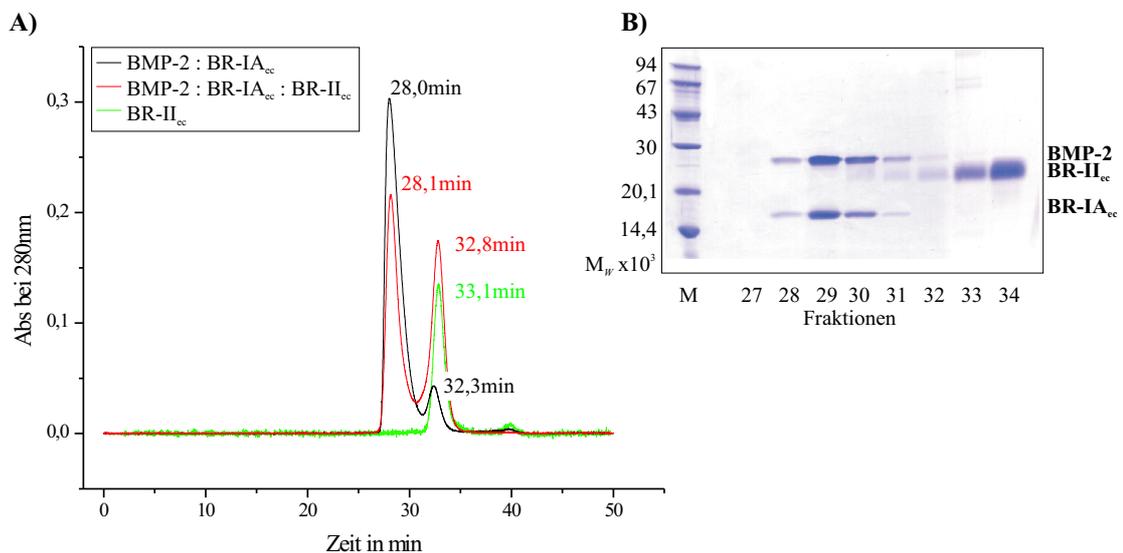
Für die Kristallisation des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes wurde der ActR-II<sub>ec</sub> für die Präparation in allen unter Kapitel III.2.1 beschriebenen Glycosylierungsformen eingesetzt. Unterschiede für die Komplexbildung und Löslichkeit konnten zwischen N-glycosyliertem, teilweise N-deglycosyliertem und vollständig N-deglycosyliertem Rezeptor, in Übereinstimmung mit den Daten der BIAcore Interaktionsanalysen (siehe Kapitel III.3) nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zum allgemeinen Protokoll der Komplexbildung (siehe Kapitel II.13.2) wurde bei der Bildung des Komplexes im 1:4 Überschuss für den entsprechenden Kristallisationsansatz auf den Reinigungsschritt mittels Gelfiltration verzichtet.

### III.4.3.2 Der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> Komplex

Für die Präparation des ternären Ligand-Rezeptor Komplexes aus BMP-2, BR-IA<sub>ec</sub> und BR-II<sub>ec</sub> wurde zunächst BR-II<sub>ec</sub> aus *E.coli* eingesetzt. Die Durchführung dieser Komplexbildung ist in Kapitel II.13.2 beschrieben und das Ergebnis in Abbildung III.55 dargestellt.

Wie durch die Überlagerung der Elutionsprofile für die ternären Komplexpräparation in rot mit denen der binären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Präparat in schwarz und des freien BR-II<sub>ec</sub> in grün ersichtlich, konnte

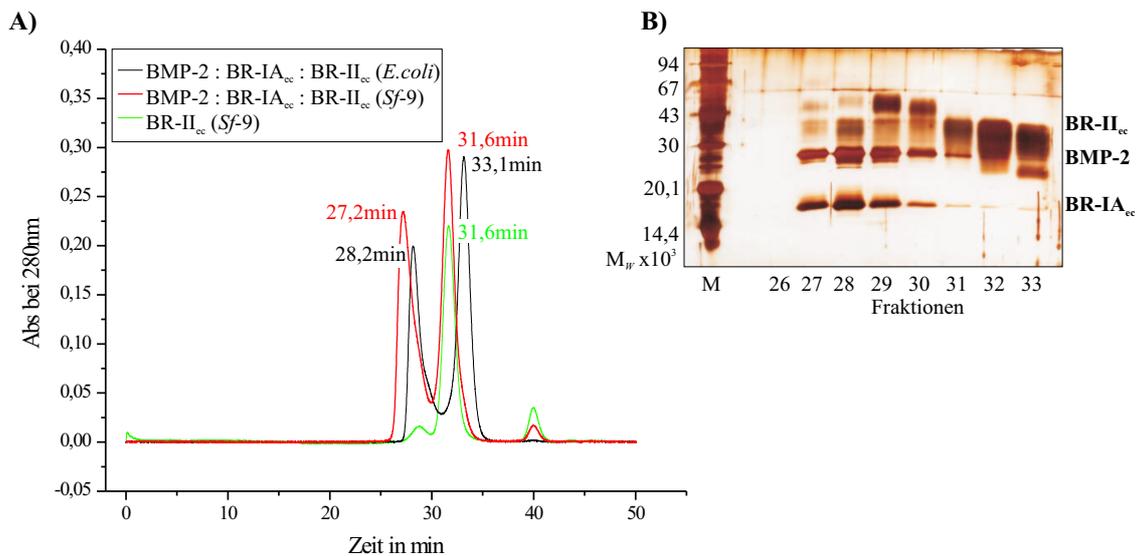


**Abbildung III.55:** Bildung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*E.coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes. **A)** Überlagerte Darstellung der Elutionsprofile der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30) aus der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> Präparation (rot), BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Präparation (schwarz) und freiem BR-II<sub>ec</sub> (*E.coli*) (grün). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexpräparation unter nichtreduzierenden Bedingungen.

die Bildung des ternären Komplexes mittels Gelfiltration nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Affinität der Wechselwirkung zwischen BR-II<sub>ec</sub> und BMP-2 (siehe Kapitel III.3) wurden in weiteren Komplexpräparation BR-II<sub>ec</sub> im molaren Verhältnis von bis zu 1:20 eingesetzt. Die Bildung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*E.coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes konnte auch unter diesen Bedingungen nicht erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Elutionsfraktionen einer BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> Komplexpräparation im Verhältnis 1:2,2 mittels SDS-PAGE ist in Abbildung III.55 B) dargestellt. Der vorgelegte BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex konnte in den Fraktionen 27 bis 31 nachgewiesen werden. Erst in den nachfolgenden Fraktionen 32 bis 34 eluierte der nicht gebundenen BR-II<sub>ec</sub>.

Die Bildung des ternären Komplexes konnte dahingegen mit BR-II<sub>ec</sub> aus einer *Sf-9* Expression erzielt werden. Hierfür wurden in einem analytischen Maßstab ausgehend von 5nmol BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex 25nmol BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) zugegeben und nach Einengen mittels Gelfiltration (Superdex200 HR10/30) analysiert. Die Überlagerung der Chromatogramme der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplexbildung in rot mit der einer vergleichbaren BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexpräparation in schwarz und dem freien BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) in grün ist in Abbildung III.56 A) gezeigt.



**Abbildung III.56:** Bildung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Überlagerte Darstellung der Elutionsprofile der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex200 HR10/30) aus der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Präparation (rot), BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*E.coli*) Präparation (schwarz) und freiem BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) (grün). **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplexpräparation unter nichtreduzierenden Bedingungen (Silberfärbung).

Die Bindung von BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) an den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex führt zur Verschiebung des Elutionsmaximums hin zu 27,2min, wie sie auch bei der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplexpräparation beobachtet wurde. Die SDS-PAGE dieser Elutionsfraktionen ist in Abbildung III.56 B) dargestellt. In den Fraktionen 27 bis 29 sind verschiedene Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 25.000 und 50.000 zusätzlich zu denen des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes zu erkennen, die dem BR-II<sub>ec</sub> aus *Sf-9* zugeordnet werden konnten. Das besondere Laufverhalten von BR-II<sub>ec</sub> konnte dabei mit der inhomogenen

genen und starken Glycosylierung aufgrund der Expression in *Sf-9* Zellen (Dr. J. Nickel, persönliche Mitteilung) erklärt werden. Die Analyse der Elutionsfraktionen 27 und 28 mittels HPLC bestätigte die Anwesenheit von BR-II<sub>ec</sub> (*Sf-9*) in diesen Fraktionen (Daten nicht gezeigt).

### III.5 Kristallisation und kristallographische Charakterisierung

Eine theoretische Einleitung zur Kristallisation von Proteinen, sowie deren Durchführung wurden bereits im Kapitel II.14 beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die nun folgend dargestellten Kristallisationsexperimente der Ligand-Rezeptor Komplexe nach der Dampfdiffusions-Methode im hängenden Tropfen.

In der kristallographischen Charakterisierung wurden die zu einer ausreichenden Größe herangewachsenen Kristalle zunächst auf ihre Fähigkeit Röntgenstrahlen zu beugen getestet. Dafür erfolgte die Datenaufnahme von  $1^\circ$  (Rotation um  $\omega$ - oder  $\phi$ , siehe hierfür III.6) für zwei um  $90^\circ$  zueinander gedrehte Orientierungen des Kristalls. Bei ausreichend hoher Auflösung konnten nachfolgend vollständige Datensätze aufgezeichnet werden, die zunächst zur Ermittlung der Raumgruppe verwendet wurden. Die Aufnahme von Beugungsdaten wird im Kapitel III.6 genauer erläutert. An dieser Stelle sei nur darauf verwiesen, dass hierfür sowohl Messeinrichtungen mit Drehanodengeneratoren am Lehrstuhl und an der GBF (Gesellschaft für Biologische Forschung, Braunschweig, Deutschland), als auch die verschiedenen Synchrotron-Strahllinien des SLS (Swiss Light Source, Villigen, Schweiz) und des ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, Frankreich) verwendet wurden.

#### III.5.1 Kristallisation des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

Die Kristallisation des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes wurde entsprechend den von KIRSCH *et al.* [2000c] publizierten Bedingung durchgeführt. Zur Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten konnten Kristalle aus folgenden Bedingungen (siehe Tabelle III.12) erhalten werden. Die geringen

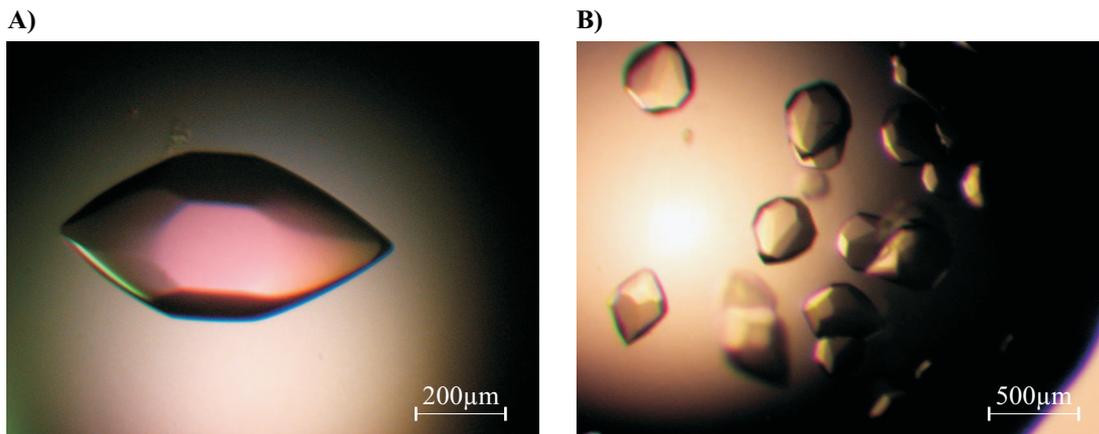
**Tabelle III.12:** Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes.

KT*	PK <sup>†</sup>	Verhältnis PL/RL <sup>‡</sup>	Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	maximale Auflösung
10°C	10µg/µl	3/1	0,1M Imidazol pH7,0	0,75M NaOAc 30% Glucose	1,86Å 100K (SLS)
RT	10µg/µl	3/1	0,1M Imidazol pH6,9	0,9M NaOAc	5Å RT

\* KT - Kristallisation-Temperatur, <sup>†</sup> PK - Konzentration der Proteinlösung, <sup>‡</sup> PL - Proteinlösung, RL - Reservoirlösung

Unterschiede im pH-Wert und der Fällungsmittel-Konzentration im Vergleich mit anderen Kristallisationsexperimenten wurden dem Zusatz an Glucose zugeschrieben.

Unter beiden Bedingungen erschienen erste spindelförmige Kristalle nach 2 bis 3 Wochen in den Tropfen. Diese bildeten innerhalb der Wochen 3 bis 4 die in Abbildung III.57 sichtbaren Kanten aus und waren nach 4 Wochen zur endgültigen Größe gewachsen. Die Kristalle der Kristallisation bei 10°C unter Zusatz von Glucose erreichten dabei Abmessungen von  $l = 500\mu\text{m}$ ,  $\phi = 400\mu\text{m}$ . Die Kristallisation bei Raumtemperatur erzeugte Kristalle mit  $l = 700\mu\text{m}$  und  $\phi = 500\mu\text{m}$ . Nach Erreichen der vollen Größe wurden beide Kristallisationsexperimente bis zur Messung bei RT gelagert.



**Abbildung III.57:** Kristalle des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes.

**A)** Imidazol pH6,9; 0,9M NaOAc. **B)** Imidazol pH7,0; 0,75M NaOAc, 30% Glucose.

Eine erste kristallographische Charakterisierung ergab am SLS eine Auflösung bis zu 1,9Å und die Raumgruppe P6<sub>5</sub> mit den Dimensionen  $a = b = 107,43\text{Å}$ ;  $c = 102,25\text{Å}$  und  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ;  $\gamma = 120^\circ$  (siehe auch Kapitel III.6.1).

### III.5.2 Kristallisation des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

Bei der Kristallisation des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes konnten sehr unterschiedliche Kristallisationsbedingungen, auch in Abhängigkeit von dem für die Präparation des BR-IB<sub>ec</sub> verwendeten Expressionssystem, ermittelt werden. Daher werden die Ergebnisse der Kristallisationsexperimente nun folgend getrennt dargestellt.

#### III.5.2.1 Der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) Komplex

Zur Ermittlung geeigneter Kristallisationsbedingungen für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) Ligand-Rezeptor Komplexes, wurden die entsprechenden Fraktionen der Gelfiltration nach Komplexbildung auf  $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingengt und in den initialen „Matrix-Screen“ mit 48 verschiedenen Kristallisationsbedingungen eingesetzt. Hierfür wurden  $2\mu\text{l}$  der Proteinlösung mit jeweils  $1\mu\text{l}$  der Reservoirolösung versetzt und im hängenden Tropfen über den mit  $500\mu\text{l}$  Reservoir gefüllten Kammern einer Linbro-Platte equilibriert. Tabelle III.13 zeigt die Zusammensetzung aller Bedingungen in denen Kristallwachstum beobachtet werden konnte.

Besonders vielversprechend waren hierbei die Bedingungen 7 (MD-I) und 27 (MD-I) welche nachfolgend optimiert wurden.

Ausgehend von der Zusammensetzung der Bedingung 7 (MD-I) wurde im pH-Bereich zwischen 5,0 und 7,5 im PEG 4000 Konzentrationsbereich von 20% bis 35%, bei konstanten 0,2M Ammoniumazetat auf Kristallisation getestet. Hierfür wurde der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) Komplex in einer Konzentration vom  $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingesetzt. Eine Verbesserung der Kristallisation von Mikro-Kristallen hin zu größeren Einzelkristallen konnte dabei nicht erzielt werden. Im gesamten Bereich war ausschließlich Präzipitat zu detektieren.

**Tabelle III.13:** Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf*-9) Komplexes im „Structure Screen I“ (Molecular Dimensions Ltd., (MD-I)) Proteinkonzentration 4 $\mu$ g/ $\mu$ l; im Verhältnis 2 $\mu$ l PL - 1 $\mu$ l RL bei RT gesetzt.

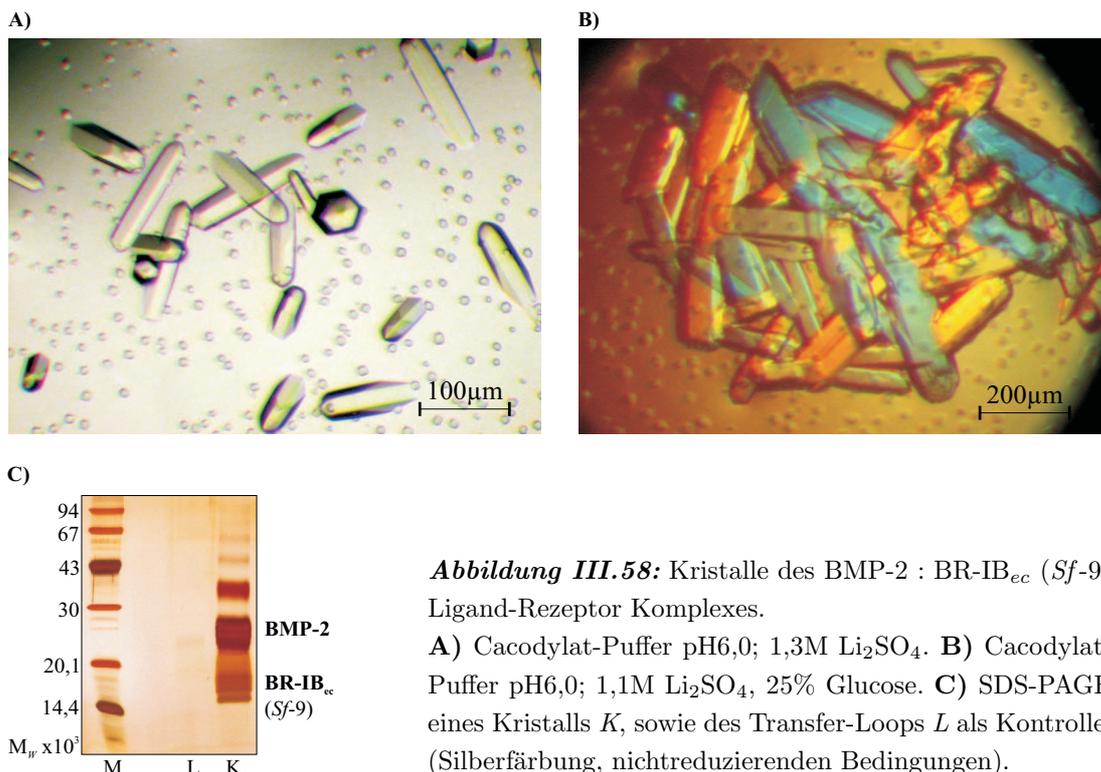
Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
7 (MD-I)	0,1M Na-Citrat pH5,6	30% PEG 4000, 0,2M NH <sub>4</sub> OAc	14d	Mikro-Kristalle
13 (MD-I)	0,1M Na-Cacodylat pH6,5	30% Isopropanol, 0,2M Na-Citrat	6Monate	einzelner Kristall
15 (MD-I)	0,1M Na-Cacodylat pH6,5	20% PEG 8000, 0,2M Mg(OAc) <sub>2</sub>	4Monate	dünne Nadeln
25 (MD-I)	0,1M Na-Hepes pH7,5	20% Isopropanol, 0,2M Na-Citrat	7d,	mikro-kristallines Präzipitat
26 (MD-I)	0,1M Na-Hepes pH7,5	0,8M K <sub>2</sub> Na-Tartrat	7d	mikro-kristallines Präzipitat
27 (MD-I)	0,1M Na-Hepes pH7,5	1,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7d	einzelner Kristall
39 (MD-I)	0,1M Tris-HCl pH8,5	2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7d	mikro-kristallines Präzipitat
45 (MD-I)	kein	4M Na-Formiat	14d	mikro-kristallines Präzipitat

Erfolgreicher war die Verfeinerung der Bedingung 27 (MD-I). Im pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,5 konnten innerhalb von einem Monat Kristalle bei 1,1M und 1,3M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> erhalten werden (siehe Abbildung III.58 A)). Kristalle mit einem Durchmesser von bis zu 400 $\mu$ m und einer Länge von 600 $\mu$ m wurden dabei für pH-Werte zwischen 6,0 und 7,5 sowohl in Cacodylat- als auch in Imidazol-Puffer erhalten. Im Bereich höherer Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentrationen (1,5M und 1,7M) bildeten sich dagegen im gesamten pH-Bereich zumeist Mikro-Kristalle bis hin zu mikro-kristallinem Präzipitat. Zur Bestätigung, dass die ermittelten Kristallisationsbedingungen auch zur Bildung von Komplex-Kristallen führten, wurden einzelne Kristalle mittels SDS-PAGE auf ihre Zusammensetzung analysiert. In Abbildung III.58 C) ist die SDS-PAGE eines Kristalls *K* aus der Bedingung bei pH6,5 und 1,3M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dargestellt. Sowohl BMP-2 als auch der BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf*-9) konnten im Vergleich mit der SDS-PAGE einer Komplexpräparation (siehe Kapitel III.4.1.2) identifiziert werden. Da der Kristall mit einer Schlaufe (Loop) aus dem Kristallisationstropfen entnommen werden musste, stellt Probe *L* die Kontrolle auf die Proteinmenge dar, welche möglicherweise aus der Lösung übertragen wurde .

Der Zusatz von 25% Glucose (Gefrierschutz) zur Kristallisationslösung führte bei gleichzeitiger Verringerung der Fällungsmittel-Konzentration auf 0,9M bis 1,1M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu Kristallen von bis 300 $\mu$ m Kantenlänge (längste Dimension), wie sie auch in Abbildung III.58 B) dargestellt sind.

Die Kristallisation bei 10°C oder 4°C verhinderte die Bildung von Kristallen im oben beschriebenen pH- und Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Bereich.

Die Kristalle wurden auf ihre Fähigkeit zur Röntgenbeugung getestet, wobei wie Tabelle III.14 belegt, am Drehanoden-Messsystem lediglich Beugungsmuster mit einer maximalen Auflösung von 22Å detektiert werden konnten. Eine deutliche Verbesserung dieses Ergebnisses war auch mit der Verwendung von Synchrotron-Strahlung nicht zu erzielen; Daten bis 9Å konnten hier erhalten werden.



**Abbildung III.58:** Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Ligand-Rezeptor Komplexes.  
**A)** Cacodylat-Puffer pH6,0; 1,3M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. **B)** Cacodylat-Puffer pH6,0; 1,1M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25% Glucose. **C)** SDS-PAGE eines Kristalls *K*, sowie des Transfer-Loops *L* als Kontrolle. (Silberfärbung, nichtreduzierenden Bedingungen).

Die Anwendung der Kristallisationsbedingung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bei pH-Werten zwischen 6,6 und 7,2 in Imidazol-Puffer unter Zusatz von 0,4M bis 1,4M NaOAc ergab keine Kristalle. Hierfür wurden 10µg/µl Komplex-Lösung bei 10°C und 4°C eingesetzt.

Aufgrund der geringen Beugung von Röntgenstrahlen der unter Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> erhaltenen Kristalle, war eine Aufnahme von Beugungsdaten zur Strukturbestimmung des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes nicht möglich.

**Tabelle III.14:** Zusammenfassung getesteter Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplexes.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [µm] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Na-Cacodylat pH6,0	1,3M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500x300x300	RT	1	keine
0,1M Imidazol pH7,0	1,3M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	600x400x400	RT	1	22Å
0,1M Na-Cacodylat pH6,0	1,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 25% Glucose	300x150x150	100K	1	keine
0,1M Na-Cacodylat pH6,5	1,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 25% Glucose	300x120x120	100K	2	keine
0,1M Na-Hepes pH7,5	1,1M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 25% Glucose	300x100x100	100K	1	9Å (SLS)

\* MT - Mess-Temperatur, † K - Anzahl getesteter Kristalle.

III.5.2.2 Der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplex

Mit der Verfügbarkeit von BR-IB<sub>ec</sub> aus *E.coli* für die Komplexbildung und Kristallisation wurden die Kristallisationsexperimente auch mit dem BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplex durchgeführt. Es konnte hinsichtlich des Kristallisationsverhaltens von BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) kein Unterschied zwischen dem Proteinmaterial festgestellt werden, das einer Renaturierung unterzogen wurde oder aber nativ aus den Bakterienzellen isoliert wurde.

Deutliche Unterschiede in den Kristallisationsbedingungen wurden hingegen in Abhängigkeit vom Expressionssystem des im Komplex befindlichen BR-IB<sub>ec</sub> ermittelt. So konnten unter der für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplex ermittelten Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Bedingung keine Kristalle erhalten werden. Weitere Unterschiede waren auch aus der Auswertung des initialen, 96 Kristallisationslösungen umfassenden „Hampton (Matrix-) Screen“ deutlich. Tabelle III.15 gibt die Zusammenstellung aller für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplex ermittelten Kristallisationsbedingungen wieder. Es sei hier darauf hin-

**Tabelle III.15:** Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes im „Hampton Screen I und II“ (Hampton Research, (HR-I) und (HR-II)). Proteinkonzentration 10,5µg/µl; im Verhältnis 2µl PL : 1µl RL bei RT gesetzt.

Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
7 (HR-I)	0,1M Na-Cacodylat pH6,5	1,4M NaOAc	4Wochen	stäbchenförmige Kristalle
11 (HR-I)	0,1M Na-Citrat pH5,6	1M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7d	Mikro-Kristalle
24 (HR-I)	0,1M Na-Azetat pH4,6	20% Isopropanol, 0,2M CaCl <sub>2</sub>	4Wochen	einzelner Kristall
29 (HR-I)	0,1M Na-Hepes pH7,5	0,8M K,Na-Tartrat	7d,	Stäbchenhaufen
34 (HR-I)	0,1M Na-Azetat pH4,6	2M Na-Formiat	4Wochen	mikro-kristallines Präzipitat
48 (HR-I)	0,1M Tris-HCl pH8,5	2M (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7d	mikro-kristallines Präzipitat
5 (HR-II)	kein	5% Isopropanol, 2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4Wochen	mikro-kristallines Präzipitat
8 (HR-II)	kein	10% Ethanol, 1,5M NaCl	7d	einzelne Kristalle
17 (HR-II)	0,1M Na-Citrat pH5,6	35% tert-Butanol	7d	Mikro-Kristalle
20 (HR-II)	0,1M Mes pH6,5	1,6M MgSO <sub>4</sub>	7d,	einzelne Kristalle
21 (HR-II)	0,1M Mes pH6,5	2M NaCl, 0,1M K,Na-Phosphat	4Wochen	Mikro-Kristalle
22 (HR-II)	0,1M Mes pH6,5	12% PEG 20.000	7d	einzelne Kristalle
24 (HR-II)	0,1M Mes pH6,5	30% Jeffamine M-600, 0,05M CsCl	7d	mikro-kristallines Präzipitat
30 (HR-II)	0,1M Na-Hepes pH7,5	30% MPD, 0,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7d	mikro-kristallines Präzipitat

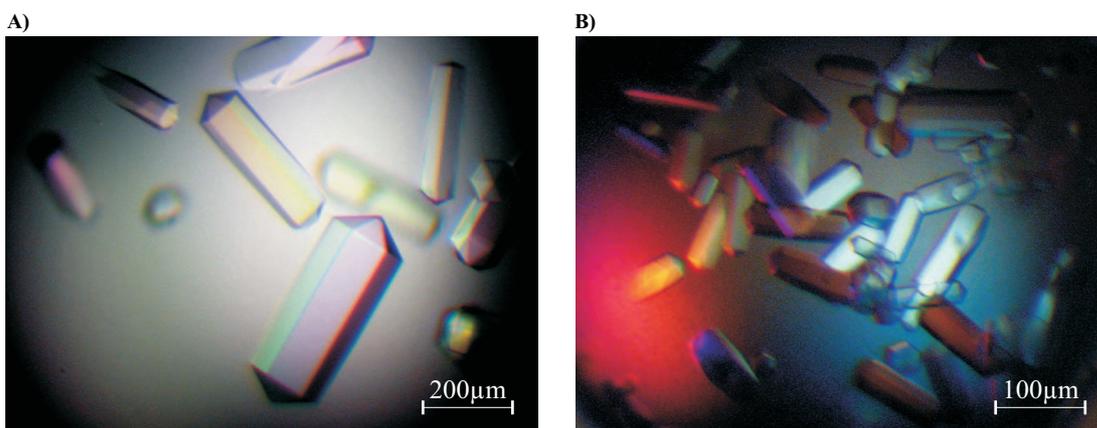
gewiesen, dass mit „Structure Screen I“ (MD-I) und „Hampton Screen I“ (HR-I) auf die gleichen Bedingungen getestet werden konnte, da sich die beiden Screens lediglich in ihrer Nummerierung der Proben unterscheiden. Die zusätzliche Verwendung des „Hampton Screen II“ (HR-II) für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplex wurde dagegen als notwendig erachtet, nachdem im HR-I nur eine vergleichsweise geringe Anzahl verwertbarer Kristallisationsbedingungen bestimmt werden konnte.

Im Gegensatz zu den für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplex ermittelten Kristallisationsbedingungen (siehe Tabelle III.13) wurden für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplex einzelne Kristalle nur unter den Bedingungen mit MgSO<sub>4</sub> (20, HR-II) und PEG 20.000 (22, HR-II) erhalten. Darüber hinaus unterschieden sich auch die Bedingungen in denen lediglich Mikro-Kristalle und kristallines Präzipitat bestimmt werden konnten. Nur die K,Na-Tartrat-Bedingung (29, HR-I) ergab auch für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplex ein vergleichbares Ergebnis.

Für die Optimierung wurde zunächst von den Bedingungen 20 (HR-II) und 22 (HR-II) ausgegangen. Von einer Verfeinerung der Bedingungen 24 (HR-I) und 8 (HR-II) in denen Alkohole als Fällungsmittel dienten wurde dagegen abgesehen, da diese den Kristallisationsbedingungen des freien Liganden zu sehr ähnelten [SCHEUFLER *et al.*, 1999]. Zudem konnte in BIAcore Experimenten nachgewiesen werden, dass unter diesen Bedingungen keine Bindung zwischen Ligand und Rezeptor stattfindet (Dr. J. Nickel, persönliche Mitteilung).

#### Kristallisation mit MgSO<sub>4</sub>

Ausgehend von der Bedingung 20 (HR-I) wurde die Kristallisation des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes zwischen den pH-Werten 5,6 und 6,6 in Cacodylat-Puffer und MgSO<sub>4</sub> Konzentrationen von 1,4M bis 2,0M getestet. Hierbei konnten unter Verwendung von 10µg/µl Proteinlösung, bei einem Verhältnis von 2:1 Protein- zu Reservoirolösung innerhalb von 14 Tagen in allen Tropfen Kristalle erhalten werden. Die Anzahl der Kristalle pro Tropfen nahm dabei mit steigender MgSO<sub>4</sub> Konzentration und steigendem pH-Werten zu. Unter pH8,5 und bei einer MgSO<sub>4</sub> Konzentration von 1,4M konnten Kristalle mit einer Größe von 400x200x200µm erhalten werden (siehe Abbildung III.59 A)), die am Drehanoden-Messsystem ein Beugungsmuster mit einer maximalen Auflösung von 15Å zeigten. Kristalle vergleichbarer Größe benachbarter Kristallisationsbedingungen zeigten hingegen hier keine Beugung, wie auch in Tabelle III.19 aufgeführt.



**Abbildung III.59:** Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Cacodylat-Puffer pH5,8; 1,4M MgSO<sub>4</sub>. **B)** Cacodylat-Puffer pH6,0; 1,8M MgSO<sub>4</sub>, 10% Glucose.

Für eine Messung am Synchrotron ist aufgrund der hohen Intensität der Röntgenstrahlen die Aufnahme von Beugungsdaten nur Kryo-Bedingungen (100K) sinnvoll. Da die Kristallisationsbedingungen

keinen Gefrierschutz für die Kristalle gewährleisten, wurden sie vor dem Einfrieren in 2,5M  $MgSO_4$  gebadet. Trotz Optimierung dieses Transfers konnten am Drehanoden-Messsystem keine und am SLS Beugungsdaten nur bis zu einer maximalen Auflösung von  $8,7\text{\AA}$  detektiert werden. Dabei zeigten auch hier einige der Kristalle keine Beugung der Röntgenstrahlen, was dem Transfer und dem damit verbundenen osmotischen Stress auf den Kristall zugeschrieben wurde. Zur Ermittlung eines besser geeigneten Gefrierschutzes erfolgten Ko-Kristallisationsexperimente mit Glucose.

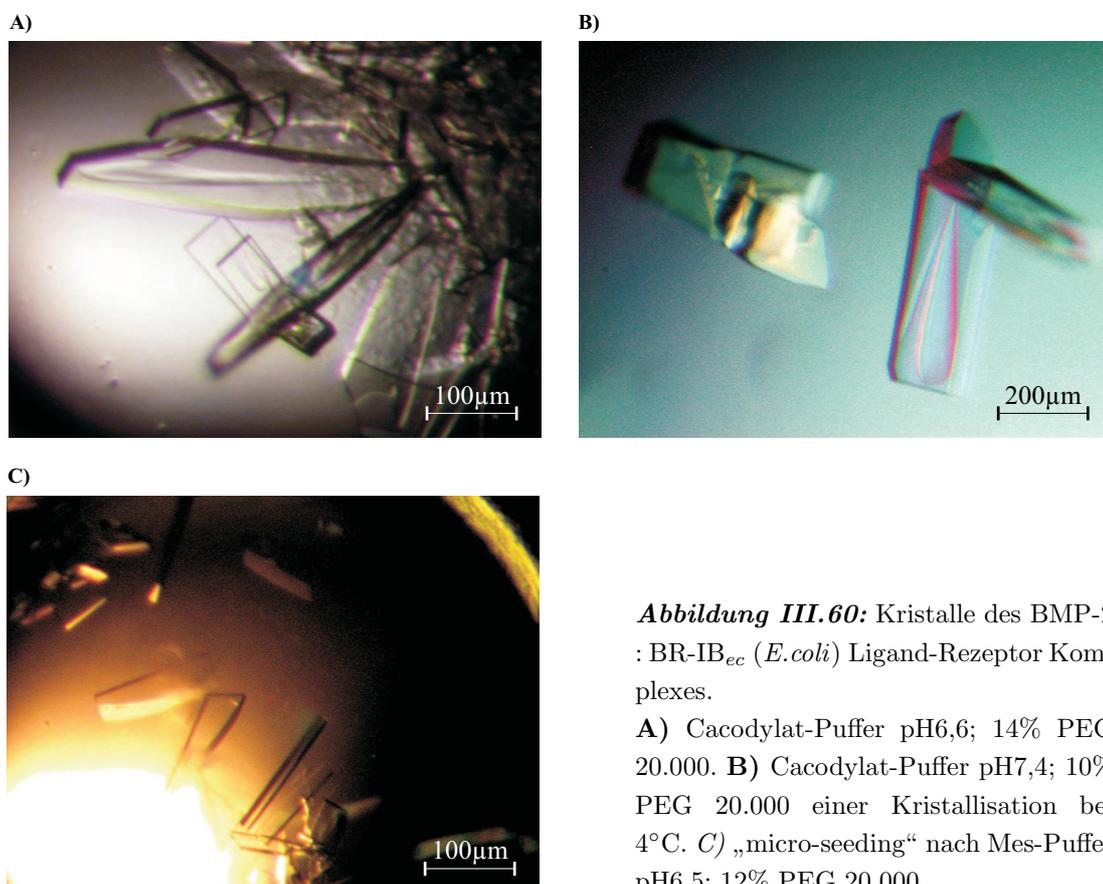
Die Ko-Kristallisation in Gegenwart von 10% Glucose als Gefrierschutz führte zu einer Verlangsamung des Kristallwachstums. Kristalle entsprechender Größen (siehe auch Abbildung III.59 B)) wurden erst nach 3 Wochen und nur bei  $MgSO_4$  Konzentrationen größer 1,8M erhalten. Weitere Kristalle aus Bedingungen zwischen 1,2M bis 1,4M  $MgSO_4$  waren sogar erst nach 6 Monaten entdeckt worden.

Eine Verbesserung der Beugungseigenschaften für die unter Ko-Kristallisation mit Glucose erhaltenen Kristalle konnte bei Messungen am ESRF nicht bestätigt werden. Wie die Zusammenstellung der Messungen in Tabelle III.20 belegt, waren auch hier nur Auflösungsvermögen zwischen  $7\text{\AA}$  und  $15\text{\AA}$  bestimmt worden.

Aufgrund der schlechten Röntgenbeugung der unter  $MgSO_4$  erhaltenen Kristalle, war eine Aufnahme von Beugungsdaten zur Strukturlösung des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes nicht möglich.

#### *Kristallisation mit PEG 20.000*

In weiteren „Fine-Screens“ wurde auch die Kristallisationsbedingung 22 (HR-II) optimiert. Hierfür waren unter Verwendung von Mes-, HEPES-, Imidazol- und Cacodylat-Puffer der pH-Bereich zwischen



**Abbildung III.60:** Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Cacodylat-Puffer pH6,6; 14% PEG 20.000. **B)** Cacodylat-Puffer pH7,4; 10% PEG 20.000 einer Kristallisation bei  $4^{\circ}C$ . **C)** „micro-seeding“ nach Mes-Puffer pH6,5; 12% PEG 20.000.

pH6,0 bis pH7,4, sowie PEG 20.000 Konzentrationen von 4% bis 16% zur Kristallisation getestet worden. Unter allen Bedingungen konnten bereits nach 5 Tagen Kristalle erhalten werden, wobei sich bei pH6,6 und 14% PEG 20.000 die größten Kristalle bildeten. Abbildung III.60 A) und B) zeigen diese sehr dünnen und verwachsenen plättchenförmigen Kristalle.

Die Kristallform als auch die Verwachsungen konnten durch „micro-seeding“ Experimente (Durchführung siehe Kapitel II.14.2) nicht vollständig verhindert werden. So wurden, wie Abbildung III.60 C) zeigt, zwar einzelne aber sehr dünne Plättchen gebildet. Für dieses Animpfen wurde ein unter Cacodylat-Puffer pH6,5 mit 14% PEG 20.000 gewachsener Kristall zerstört und aus einer 1:10 Verdünnung in einen vorab equilibrierten Tropfen der Bedingung Mes pH6,5 mit 12% PEG 20.000 übertragen. Neben der gezeigten, wurden „micro-seeding“ Experimente ebenfalls für Bedingungen im pH-Bereich zwischen pH6,0 und pH6,5 sowie PEG 20.000 Konzentrationen von 12% bis 16% mit identischem Resultat durchgeführt. Die Proteinkonzentration des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes wurde hierfür auf 8 µg/µl reduziert.

Zur Verbesserung der Kristallqualität konnte auch der Zusatz von Salzen (0,02M bis 0,12M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder 0,04M bis 0,24M MgSO<sub>4</sub>) nicht beitragen. Bereits die niedrigsten getesteten Konzentrationen dieser Salze verhinderten das Kristallwachstum vollständig.

Die Verringerung der Kristallisationstemperatur auf 4°C hatte ebenfalls keine Einfluss auf die Kristallqualität. Wie in Tabellen III.19 und III.20 zusammengestellt, zeigten vergleichbare Kristalle aus der Kristallisation bei RT und bei 4°C gleiche Beugungseigenschaften sowohl an den Drehanoden-Messeinrichtungen, wie auch am Synchrotron. Der Kristallisationsprozess selbst schien von der Temperatur unabhängig, da auch hier exakt nach 5 Tagen in den entsprechenden Kristallisationsbedingungen Kristalle der bereits beschriebenen Form und Größe erhalten wurden (siehe Abbildung III.60 B)).

Das für Messungen am Synchrotron notwendige Einfrieren der Kristalle setzt wie bereits erläutert einen Gefrierschutz voraus. Daher sollten zunächst durch Ko-Kristallisation mit PEG 400, MPEG 5000, Glucose oder Glycerin kryo-geeignete Bedingungen ermittelt werden. Der Zusatz dieser Substanzen in Konzentrationen von nur 1% (w/v) verhinderten jedoch die Kristallisation vollständig. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch für „micro- und macro-seeding“ Experimente (Durchführung siehe Kapitel II.14.2) der unter regulären PEG 20.000 Bedingungen erhaltenen Kristalle in Ko-Kristallisationsbedingungen mit 15% Glucose oder 10% Glycerin beobachtet. Dabei lösten sich die Kristalle unter Bildung von Präzipitat oder Phasentrennung bereits wenige Minuten nach dem Transfer vollständig auf. Der komplette Ersatz des PEG 20.000 durch niedermolekulare Polyethylenglykole ergab schon bei niedrigen PEG-Konzentration lediglich Phasentrennungen in den Kristallisationstropfen.

Nachdem alle Versuche für eine Ko-Kristallisation des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes in der PEG 20.000 Bedingung mit den Zusätzen von verschiedenen Gefrierschutzmitteln erfolglos waren, wurden durch „soaking“ (siehe Kapitel II.14.3) diese Substanzen nachträglich in den Kristall eingebracht. Hierfür waren zunächst Glucose, Glycerin und PEG 400 getestet und nur die Glucose als möglicher Zusatz ermittelt worden, da Glycerin und PEG 400 wie bereits in der Ko-Kristallisation beobachtet, zum vollständigen Auflösen der Kristalle innerhalb weniger Minuten führten. Trotzdem wurde versucht die Verweildauer des Kristalls während des Transfers nach PEG 400 so kurz zu wählen, dass die Kristalle nicht vollständig zerstört wurden. Erwartungsgemäß konnte jedoch nach dieser Behandlung, wie auch in Tabelle III.20 aufgelistet, keine Röntgenbeugung mehr detektiert werden.

Zum Einbringen des Glucose-Puffers wurde das in Kapitel II.14.3 beschriebene Protokoll verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass längere Inkubationen zwischen den einzelnen Glucose-Konzentrationen, sowie die Verwendung einer 40%igen Glucose-Stammlösung ohne zusätzlichen Puffer und Präzipitanz zur Schädigung der eingebrachten Kristalle führten. Mit der Optimierung konnten sichtbare

Schäden an den Kristallen, wie Risse und Auflösung der Kristallkanten weitestgehend vermieden werden. Diese Kristalle wiesen am Synchrotron, insbesondere aber an der Mikrofokus-Strahllinie ID-13 des ESRF ein räumlich eingegrenztes Beugungsverhalten auf. Dabei existierten Zonen innerhalb des Kristalls die Beugung aufwiesen (8Å bis 3,5Å Auflösung) und Bereiche die keinerlei Beugung zeigten (siehe auch Tabelle III.20).

Das dennoch keine zur Strukturlösung verwertbaren Daten aufgezeichnet werden konnten, wird in Abschnitt III.6 genauer erläutert. Die Qualität der gemessenen Daten für gefrorene Kristalle (mit beschriebener Vorbehandlung) unterschieden sich dabei nicht von denen bei RT analysierten Kristallen. Dies wurde durch Messungen mittels eines leistungsfähigeren Drehanoden-Messsystems der GBF belegt, auch wenn hier aufgrund geringerer Intensität der Röntgenstrahlung nur Auflösungen bis 10Å in Tabelle III.19 aufgelistet sind.

Aufgrund der Qualität der Beugungsdaten der unter PEG 20.000 erhaltenen Kristalle, war eine Strukturlösung des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes aus den aufgezeichneten Datensätzen nicht möglich.

*Kristallisationsexperimente mittels des „JBS Screen 5“*

Die Substitution von PEG 20.000 durch andere höher-molekulare Polythylenglykole stellte einen weiteren Versuch zur Verbesserung der Kristallqualität dar. Hierfür wurde zunächst der „JBS Screen 5“ verwendet, welcher als „Grid-Screen“ den Test auf ein breites Spektrum an Bedingungen mit höhermolekularen Polyethylen glykolen als Fällungsmittel ermöglichte. Das Ergebnis dieses Kristallisationsexperiments aus einer 10µg/µl Proteinlösung des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes ist in Tabelle III.16 zusammengestellt.

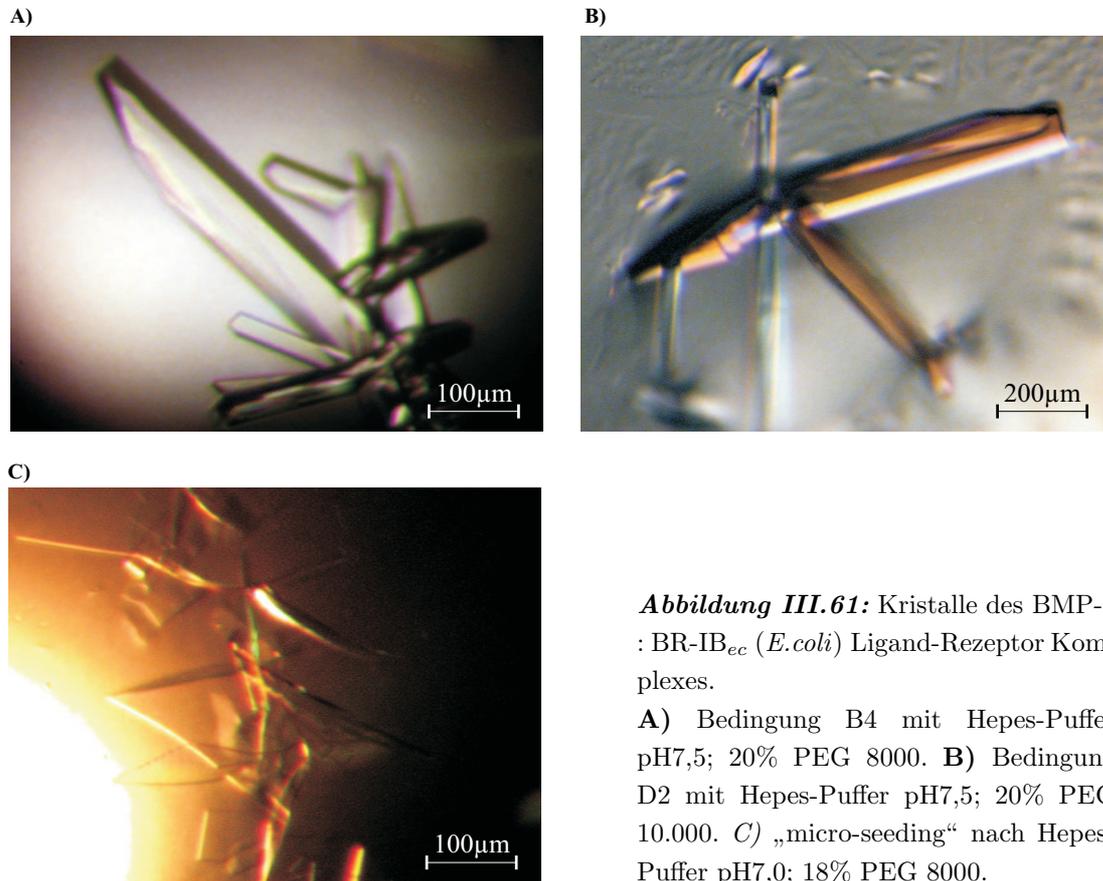
**Tabelle III.16:** Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes im „JBS Screen 5“ (Jena BioScience). Proteinkonzentration 10µg/µl; im Verhältnis 2µl PL : 1µl RL bei RT gesetzt.

Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
A1	kein	12% PEG 8000, 0,1M KCl, 5% Glycerin	8d	mikro-kristallines Präzipitat
B2	0,1M Na-Hepes pH7,5	18% PEG 8000, 0,1M NaOAc, 2% Isopropanol	8d	mikro-kristallines Präzipitat Präzipitat
B4	0,1M Na-Hepes pH7,5	20% PEG 8000	8d	einzelner Kristall
D2	0,1M Na-Hepes pH7,5	20% PEG 10.000	8d	einzelner Kristall aus Phase
D4	0,1M Mes pH6,5	10% PEG 20.000	8d	großer verwachsener Kristall
D5	kein	20% PEG 20.000	8d	kleine verwachsene Kristalle

Der „JBS Screen 5“ bestätigte die bereits bekannte Bedingung (Mes-Puffer pH6,5, PEG 20.000), ergab aber auch Kristalle unter PEG 8000 (B4, Abbildung III.61 A)) und PEG 10.000 Bedingungen (D2, Abbildung III.61 B)), welche daraufhin weiter optimiert wurden.

Ausgehend von Bedingung B4 erfolgten verschiedene Kristallisationsexperimente, welche insgesamt

den pH-Bereich zwischen pH6,9 bis pH7,9 und Fällungsmittel-Konzentrationen von 10% bis 22% PEG 8000 abdeckten. In all diesen Bedingungen, die sowohl bei RT und 4°C als auch unter Zusatz von 15% Glucose ausprobiert wurden, konnten keine Kristallisation erzielt werden. Nur durch „micro-seeding“ aus einer PEG 20.000 Bedingung waren die in Abbildung III.61 C) gezeigten Kristalle erhalten worden. Diese konnte aufgrund der geringen Dicke nicht für Messungen verwendet werden. Die einzigen



**Abbildung III.61:** Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Bedingung B4 mit HEPES-Puffer pH7,5; 20% PEG 8000. **B)** Bedingung D2 mit HEPES-Puffer pH7,5; 20% PEG 10.000. **C)** „micro-seeding“ nach HEPES-Puffer pH7,0; 18% PEG 8000.

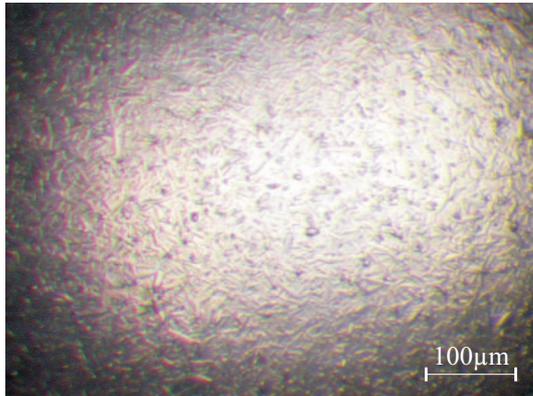
Kristalle aus dem „JBS Screen 5“ welche für eine kristallographische Charakterisierung verwendet werden konnten, wurde direkt aus den Bedingungen B4 und D2 entnommen. Beide zeigten dabei Beugungsmuster mit einer Auflösung von bis zu 10Å an der Drehanoden-Messeinrichtung und bis 3,5Å am Synchrotron (siehe Zusammenstellung in Tabellen III.19 und III.20). Die Qualität der Beugungsdaten unterschied sich jedoch nicht von denen der mit PEG 20.000 erhaltenen Kristalle.

*Kristallisationsexperimente mittels des „PEG/Ion Screen“*

**Tabelle III.17:** Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes im „PEG/Ion Screen“ (Hampton Research (P/I)). Proteinkonzentration 10µg/µl; im Verhältnis 2µl PL : 1µl RL bei RT gesetzt.

Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
45	kein, pH8,1	20% PEG 3350 0,2M Li-Citrat	14d	mikro-kristalline Nadeln
46	kein, pH8,2	20% PEG 3350 0,2M Na-Citrat	14d	mikro-kristalline Nadeln

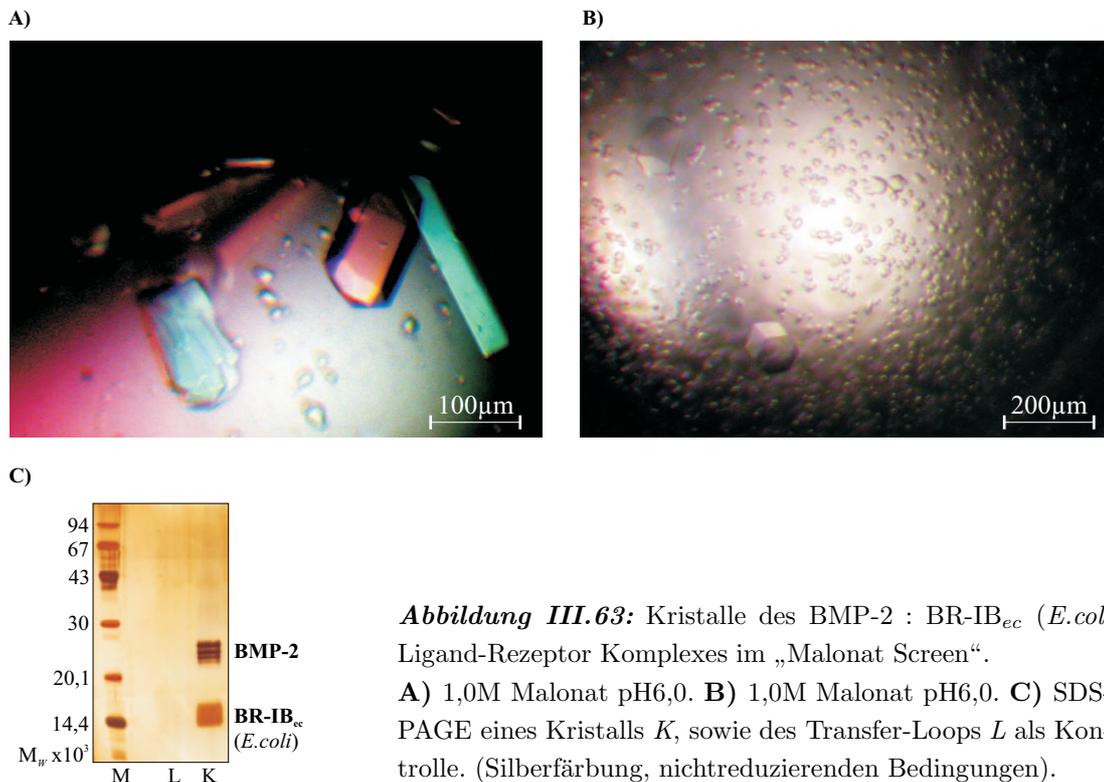
Die Verwendung des 48 Lösungen umfassenden „PEG/Ion Screens (P/I)“ brachte hingegen keine neuen Kristallisationsbedingungen. Neben einer Vielzahl von Phasenseparationen aufgrund des PEG 3350, wie sie auch bei der Verwendung anderer niedermolekularer Polyethylenglycole beobachtet wurden, waren nur in den Proben 45 (P/I) und 46 (P/I) Mikro-Kristalle detektiert worden (siehe Tabelle III.17). Abbildung III.62 zeigt den Tropfen aus der Bedingung 45 (P/I). Eine weitere Optimierung erfolgte nicht.



**Abbildung III.62:** Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E. coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes aus Kristallisationsbedingung 45 (P/I).

*Kristallisationsexperimente mittels des „Malonat Screen“*

Die in Abbildung III.63 gezeigten Kristalle waren aus den Bedingungen B1 (Bildteil B) und C1 (Bildteil A)) des „Malonat Screens“ erhalten worden (siehe auch Tabelle III.18). Beide Kristallisationsbedingungen enthielten 1M Malonat bei den pH-Werten 5,0 und 6,0. Die Kristalle aus Bedingung C1 wurden



**Abbildung III.63:** Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E. coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes im „Malonat Screen“.

**A)** 1,0M Malonat pH6,0. **B)** 1,0M Malonat pH6,0. **C)** SDS-PAGE eines Kristalls *K*, sowie des Transfer-Loops *L* als Kontrolle. (Silberfärbung, nichtreduzierenden Bedingungen).

zudem mittels SDS-PAGE analysiert. So konnte, wie auch mit Abbildung III.63 C) belegt, sowohl das BMP-2 als auch der BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) eindeutig nachgewiesen werden.

In Bedingungen mit 1,5M Malonat dieser pH-Werte konnte bereits nach 4 Tagen die Bildung von Mikro-Kristallen beobachtet werden. In den restlichen Bedingungen des Screens mit höheren Malonatkonzentrationen wurde ausschließlich Präzipitat detektiert.

Der Beugungstest (am SLS) der unter 1,0M Malonat pH6,0 erhaltenen Kristalle ergab eine Auflösung von maximal 20Å mit sehr eng beieinander liegenden Reflexen. Dies ließ auf eine sehr große Einheitszelle schließen. Eine weitere Charakterisierung war aufgrund der geringen Auflösung nicht möglich.

**Tabelle III.18:** Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes im „Malonat Screen“ (Hampton Research). Proteinkonzentration 10µg/µl; im Verhältnis 2µl PL : 1µl RL bei RT gesetzt.

Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
B1	kein	1M Malonat pH5,0	9d	Mikro-Kristalle
C1	kein	1M Malonat pH6,0	9d	einzelne Kristalle
D1	kein	1M Malonat pH7,0	9d	mikro-kristallines Präzipitat

*Übersicht über die Röntgenbeugungsexperimente von Kristallen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes*

Für die Kristallisation des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes konnten, wie bereits einzeln dargestellt, verschiedenste Kristallisationsbedingungen ermittelt werden, welche nachfolgend auf Röntgenbeugung getestet wurden. Die Zusammenstellung der Resultate aller an Kristallen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes durchgeführten Beugungstest ist in den Tabelle III.19 und Tabelle III.20 wiedergegeben.

Die Ergebnisse für die an Drehanoden-Systemen durchgeführten Messungen sind in Tabelle III.19 mit Kristallisationsbedingung, Größe und Mess-Temperatur aufgelistet.

**Tabelle III.19:** Zusammenstellung der an Drehanoden-Messeinrichtungen getesteten Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [µm] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Na-Cacodylat pH5,6	1,4M MgSO <sub>4</sub>	300x100x100	RT	1	keine
0,1M Na-Cacodylat pH5,8	1,4M MgSO <sub>4</sub>	350x150x150	RT	2	15Å
0,1M Na-Cacodylat pH5,6	1,8M MgSO <sub>4</sub> , 10% Glucose	200x100x100	100K	1	keine
0,1M Na-Cacodylat pH5,8	1,4M MgSO <sub>4</sub> , 2,5M MgSO <sub>4</sub> (trans)	350x100x100	100K	1	keine
0,1M Na-Cacodylat pH6,4	1,4M MgSO <sub>4</sub> , 2,5M MgSO <sub>4</sub> (trans)	300x150x150	100K	1	keine
0,1M Na-Cacodylat pH6,6	13% PEG 20.000 (4°C)	500x200x20	RT	2	10Å (GBF)
0,1M Na-Cacodylat pH6,6	14% PEG 20.000	600x300x30	RT	2	10Å
0,1M Na-Cacodylat pH7,0	10% PEG 20.000 (4°C)	300x20x5	RT	1	10Å

Fortsetzung der Tabelle III.19.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [ $\mu\text{m}$ ] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Na-Cacodylat pH7,2	16% PEG 20.000 (4°C)	300x100x10	RT	1	10Å (GBF)
0,1M Na-Cacodylat pH7,4	4% PEG 20.000	100x75x75	RT	1	12Å
0,1M Na-Cacodylat pH7,4	10% PEG 20.000	100x100x50	RT	1	9Å
0,1M Na-Cacodylat pH7,4	13% PEG 20.000 (4°C)	200x100x25	RT	1	10Å (GBF)
0,1M Na-Cacodylat pH7,4	10% PEG 20.000, 30%PEG 400 (trans)	300x150x20	100K	1	keine
0,1M Na-Cacodylat pH7,4	6% PEG 20.000, 30%PEG 400 (soak)	200x100x20	100K	1	keine
0,1M Na-Cacodylat pH7,4	8% PEG 20.000, 30% Glucose (soak)	200x100x20	100K	1	10Å
0,1M Na-Hepes pH7,5	20% PEG 8000, 30% Glucose (soak)	700x400x100	100K	1	10Å

\* MT - Mess-Temperatur., † K - Anzahl getesteter Kristalle.

Die Ergebnisse für die am Synchrotron auf Röntgenbeugung getesteten Kristalle sind in Tabelle III.20 getrennt zusammengefasst. Die Anzahl der aus den verschiedenen Kristallisationsbedingungen entnommen Kristalle, deren Größe und die Synchrotron-Strahllinie sind angegeben.

**Tabelle III.20:** Zusammenstellung der am Synchrotron getesteten Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [ $\mu\text{m}$ ] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Na-Cacodylat pH5,6	1,4M MgSO <sub>4</sub> , 2,5M MgSO <sub>4</sub> (trans)	300x100x100	100K	8	8,3Å-keine (SLS)
0,1M Na-Cacodylat pH5,6	1,2M MgSO <sub>4</sub> , 10% Glucose	300x150x100	100K	1	keine (ID14, ESRF)
0,1M Na-Cacodylat pH6,0	1,2M MgSO <sub>4</sub> , 10% Glucose	150x100x100	100K	1	13Å (ID14, ESRF)
0,1M Na-Cacodylat pH6,0	1,8M MgSO <sub>4</sub> , 10% Glucose	300x200x200	100K	2	7Å (ID14, ESRF)
0,1M Na-Cacodylat pH6,2	1,3M MgSO <sub>4</sub> , 10% Glucose	200x100x100	100K	1	15Å (ID14, ESRF)
0,1M Na-Cacodylat pH6,2	1,7M MgSO <sub>4</sub> , 10% Glucose	300x100x100	100K	1	8Å (ID14, ESRF)
0,1M Na-Cacodylat pH6,2	1,8M MgSO <sub>4</sub> , 10% Glucose	300x100x100	100K	2	8Å-keine (ID14, ESRF)
0,1M Mes pH6,0	12% PEG 20.000, 30% Glucose (soak)	150x150x10	100K	2	3,5Å (ID13, ESRF)
0,1M Mes pH6,5	10% PEG 20.000 30% Glucose (soak)	600x300x50	100K	1	6Å (SLS)

Fortsetzung der Tabelle III.19.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [ $\mu\text{m}$ ] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Mes pH6,5	12% PEG 20.000, 30% Glucose (soak)	150x150x10	100K	1	6Å (ID13, ESRF)
0,1M Na-Cacodylat pH7,0	5% PEG 20.000 (4°C) 30% Glucose (soak)	100x50x20	100K	1	3,5Å (ID13, ESRF)
0,1M Na-Cacodylat pH7,0 (0,1M Imidazol pH7,0)	12% PEG 20.000, 30% Glucose (soak)	250x100x20	100K	9	3,7-7,0Å (SLS)
0,1M Na-Cacodylat pH7,0	12% PEG 20.000 (4°C) 30% Glucose (soak)	300x200x20	100K	4	3,5-6,0Å (ID13, ESRF)
0,1M Na-Cacodylat pH7,4	12% PEG 20.000, 30% Glucose (soak)	300x150x20	100K	2	4,6-12Å (SLS)
kein	1M Malonat pH6,0, 3,5M Malonat (trans)	100x100x150	100K	2	20-25Å (SLS)
0,1M Na-Hepes pH7,5	20% PEG 8000 30% Glucose (soak)	700x400x75	100K	1	4Å (SLS)
0,1M Na-Hepes pH7,5	20% PEG 10.000 30% Glucose (soak)	400x300x50	100K	2	3,5Å (SLS)

\* MT - Mess-Temperatur., † K - Anzahl getesteter Kristalle.

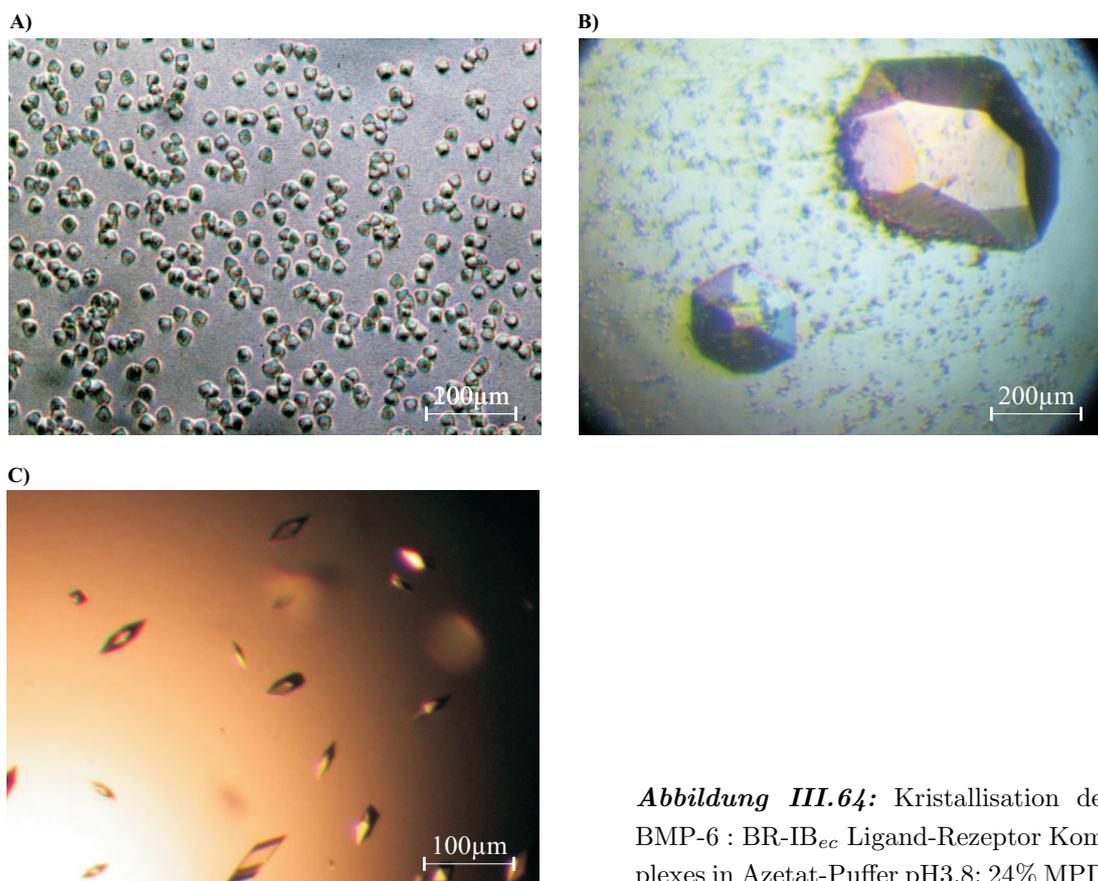
### III.5.3 Kristallisation des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

Mit dem Einsatz des nach Gelfiltration mit einer Konzentration von 3,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  präparierten BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) Ligand-Rezeptor Komplexes in den „Structure Screen I“ konnten Kristalle unter den in Tabelle III.21 aufgelisteten Kristallisationsbedingungen erhalten werden.

**Tabelle III.21:** Kristallisationsbedingungen des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> (Sf-9) Komplexes im „Structure Screen I“ (Molecular Dimensions Ltd.). Proteinkonzentration 3,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; im Verhältnis 2 $\mu\text{l}$  PL : 1 $\mu\text{l}$  RL bei RT gesetzt.

Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
1	0,1M Na-Azetat pH4,6	30% MPD, 0,02M CaCl <sub>2</sub>	7d	einzelne Kristalle
11	0,1M Na-Azetat pH4,6	20% Isopropanol 0,02M CaCl <sub>2</sub>	7d	Mikro-Kristalle

Die anschließende Optimierung der Bedingung 1 (MD-I) wurde im pH-Bereich zwischen pH3,8 und pH5,0 unter Zusatz von 20% bis 32,5% MPD durchgeführt. Dabei konnten innerhalb von 14 Tagen Kristalle in Azetat-Puffer pH3,8 bis pH4,2 und einer MPD-Konzentration zwischen 20% und 25% erhalten werden. Höhere pH-Werte und MPD-Konzentration führten hingegen zur Bildung von Mikro-Kristallen. Die weitere Einschränkung des pH-Bereichs lieferte dann die in Abbildung III.64 B) gezeigten Kristalle bei 2,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Proteinlösung, wobei deren Bildung nicht immer reproduzierbar war. Mehrheitlich wurden nur die Abbildung III.64 B) abgebildeten Mikro-Kristalle erhalten, wobei eine Ursache für dieses unregelmäßige Kristallisationsverhalten zunächst nicht ermittelt werden konnte. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration, auch unter Verringerung der Fällungsmittel-Konzentration führte stets zur Bildung von Präzipitat.



**Abbildung III.64:** Kristallisation des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes in Azetat-Puffer pH3,8; 24% MPD.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Kristalle wenigen Tage nach ihrer Bildung wieder in Lösung gingen. Als Ursache dieser Auflösung wurde zunächst eine Verringerung der Fällungsmittel-Konzentration während der Lagerung der Kristallisationsplatten angenommen. Dies könnte durch das Material der Linbro-Platte verursacht werden, da es eine geringe Durchlässigkeit gegenüber flüchtigen organischen Lösungsmitteln aufweist. Nach weiteren 3 Monaten wurden in diesen Ansätzen die in Abbildung III.64 C) dargestellten Mikro-Kristalle erhalten.

**Tabelle III.22:** Zusammenstellung getesteter Kristalle des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplexes.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [ $\mu\text{m}$ ] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Na-Azetat pH3,8	24% MPD	300x200x100	100K	1	4Å
0,1M Na-Azetat pH3,6	24% MPD	200x200x50	100K	1	10Å

\* MT - Mess-Temperatur., <sup>†</sup> K - Anzahl getesteter Kristalle.

Wie in Tabelle III.22 zusammengestellt konnten nur zwei Kristalle für eine Messung erhalten werden. Beide Kristalle zeigten am Drehanoden-Messsystem ein Beugungsbild, wobei auswertbare Daten bis bis 4Å aufgezeichnet wurden. Für diesen Kristall konnte die Raumgruppe P3<sub>1</sub>21 mit den Zellkonstanten  $a = b = 97,5\text{Å}$ ;  $c = 85,6\text{Å}$  und  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ;  $\gamma = 120^\circ$  zu ermittelt werden. Diese stimmte exakt mit der für den freien Liganden überein (Müller, T. unpublizierte Daten) woraufhin eine weitere

Verfolgung dieser Kristallisationsbedingung im niedrigen pH-Bereich unter Verwendung von Alkoholen als Fällungsmittel nicht fortgesetzt wurde.

Die Kristallisation des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplexes unter Anwendung der für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex beschriebene Kristallisationsbedingung ergab keine Kristalle. Hier wurden bei einer Konzentration von 4,2µg/µl Komplex, unter Verwendung der Cacodylat-, Imidazol- oder Hepes-Puffer (pH 6,2 bis 7,7), die NaOAc-Konzentrationen zwischen 0,4M und 2,4M, bei RT und 4°C ausgetestet und stets klare Tropfen erhalten.

### III.5.4 Kristallisation des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

Mit dem Einsatz von 2,4µg/µl des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplexes konnten Kristalle unter den in Tabelle III.23 zusammengestellten Kristallisationsbedingungen erhalten werden. Für eine weitere Verfeinerung wurden daraufhin die Bedingungen 4 (MD-I) und 26 (MD-I) ausgewählt.

**Tabelle III.23:** Kristallisationsbedingungen für den GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplex im „Structure Screen I“ (Molecular Dimensions Ltd.). Proteinkonzentration 2,4µg/µl; im Verhältnis 2µl PL : 1µl RL bei RT gesetzt.

Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
4	0,1M Na-Azetat pH4,6	2,0M Na-Formiat	14d	einzelne Kristalle
9	0,1M Na-Citrat pH5,6	20%Isopropanol, 20% PEG 4000	5d	Mikro-Kristalle
12	0,1M Na-Cacodylat pH6,5	1,4M NaOAc	6Monate	einzelner Kristall
16	0,1M Na-Cacodylat pH6,5	30% MPD, 0,2M Mg(OAc) <sub>2</sub>	7d (nach 14d)	Mikro-Kristalle aufgelöst
21	0,1M Na-Hepes pH7,5	30% MPD, 0,2M Na-Citrat	7d (nach 14d)	Mikro-Kristalle aufgelöst
25	0,1M Na-Hepes pH7,5	20% Isopropanol, 0,2M Na-Citrat	6Monate	einzelner Kristall
26	0,1M Na-Hepes pH7,5	0,8M K <sub>2</sub> Na-Tartrat	5d	einzelner Kristall
27	0,1M Na-Hepes pH7,5	1,5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6Monate	Mikro-Kristalle
28	0,1M Na-Hepes pH7,5	0,8M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,8M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6Monate	Mikro-Kristalle
31	0,1M Na-Hepes pH7,5	10% Isopropanol, 20% PEG 4000	10d	mikro-kristalline Nadeln
36	0,1M Tris-HCl pH8,5	30% Isopropanol 0,2M NH <sub>4</sub> OAc	6Monate	einzelner Kristall
40	kein	0,4M K <sub>2</sub> Na-Tartrat	6Monate	einzelner Kristall

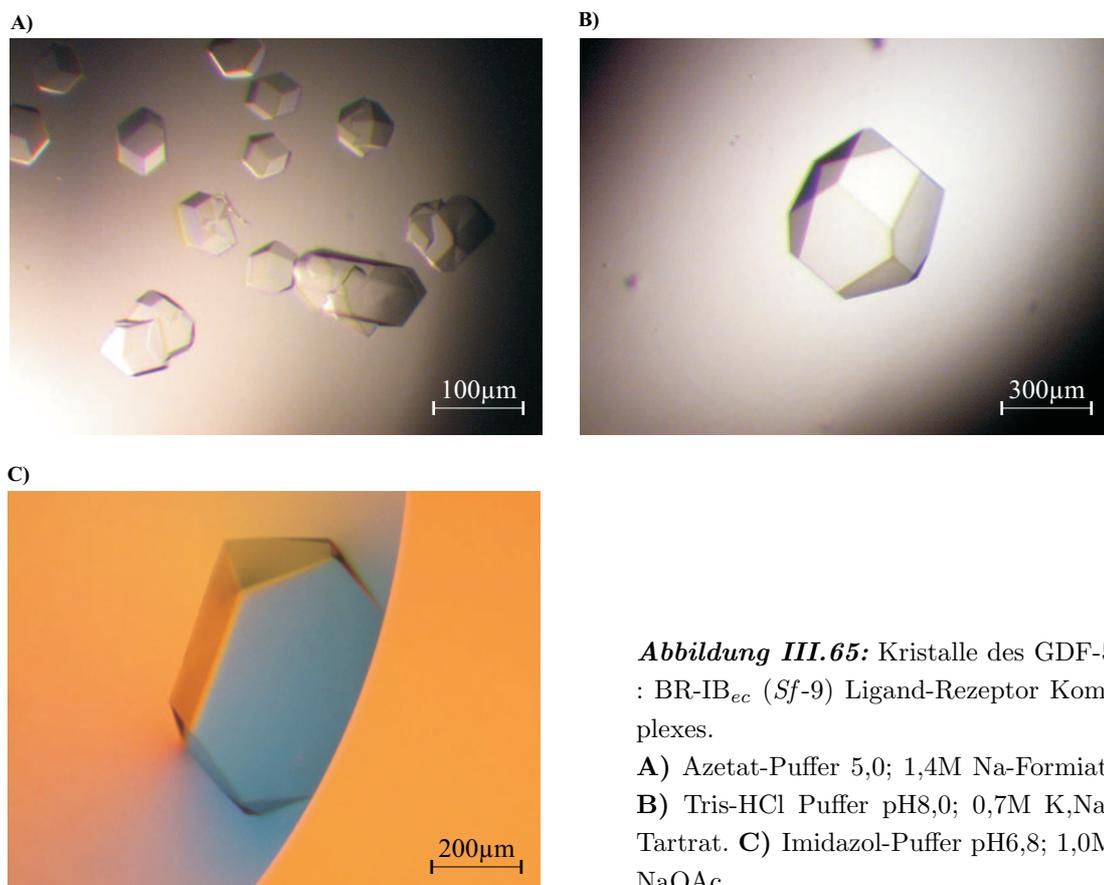
#### *Kristallisation mit Na-Formiat*

Mit der Optimierung der Bedingung 4 (MD-I) konnten für den GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplex mit einer Konzentration von bis zu 2,7µg/µl Kristalle wie in Abbildung III.65 A) gezeigt erhalten werden.

Sie bildeten sich in einem weiten Bereich von pH3,8 und 2,2M Na-Formiat bis hin zu pH5,0 und 1,4M Na-Formiat aus. Bei pH-Werten größer als pH4,2 und Na-Formiat Konzentrationen höher als 2,0M wurden nur Mikro-Kristalle erhalten. Keine Kristallisation erfolgte bei pH-Werten niedriger als pH3,8 und Na-Formiat-Konzentrationen geringer als 1,4M.

Eine Erhöhung der Protein-Konzentration, sowie die Änderung des Verhältnisses von Proteinlösung zu Reservoirlösung von 2:1 auf 3:1 oder 4:1 führte zur Bildung von Präzipitat.

Wie aus der Zusammenstellung in Tabelle III.24 hervorgeht, wurde nur für zwei der aus dieser Bedingung getesteten Kristalle eine Beugung mit einer maximalen Auflösung von 20Å an der Drehanoden-Messeinrichtung festgestellt. Eine weitere Bearbeitung dieser Bedingung wurde daraufhin eingestellt.



**Abbildung III.65:** Kristalle des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Ligand-Rezeptor Komplexes.

**A)** Azetat-Puffer 5,0; 1,4M Na-Formiat.  
**B)** Tris-HCl Puffer pH8,0; 0,7M K,Na-Tartrat.  
**C)** Imidazol-Puffer pH6,8; 1,0M NaOAc.

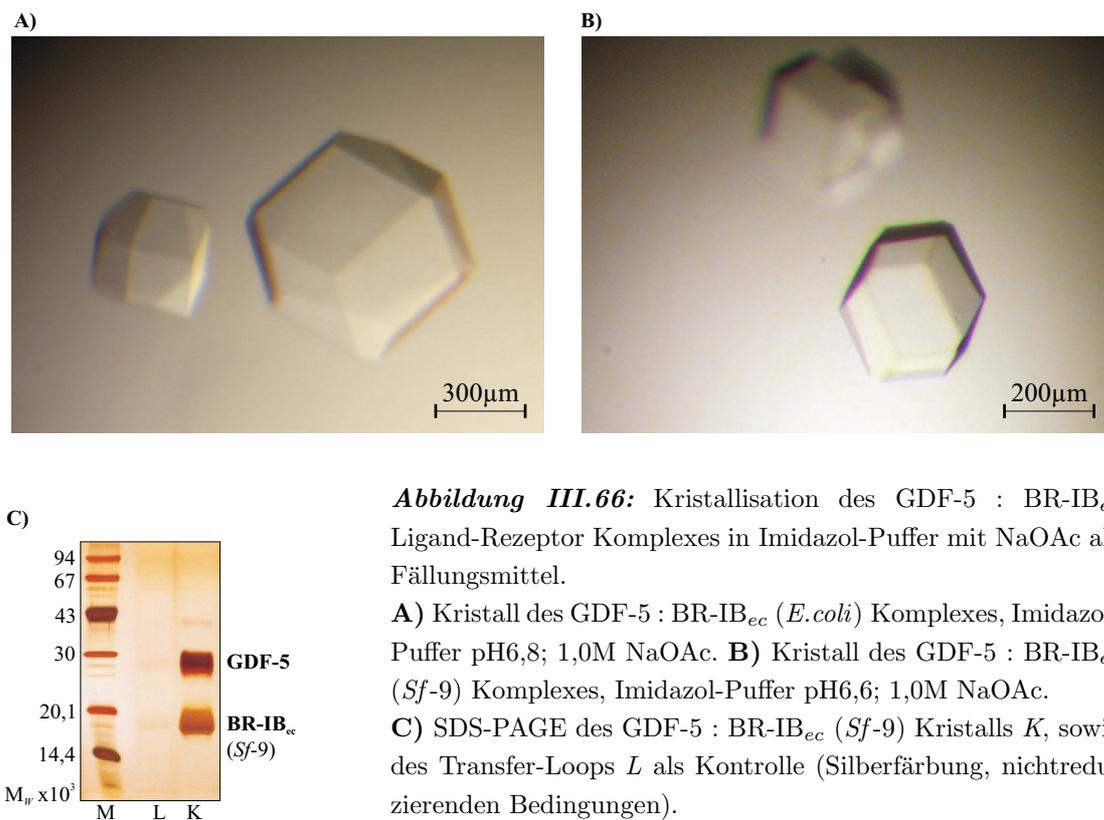
#### *Kristallisation mit K,Na-Tartrat*

Die Kristallisation ausgehend von Bedingung 26 (MD-I) ergab Kristalle wie in Abbildung III.65 B) gezeigt. Sie wurden in einem pH-Bereich von pH6,5 bis pH8,0 und K,Na-Tartrat Konzentrationen zwischen 0,5M und 1,0M gewonnen. Kristalle mit Kantenlängen um 150µm bildeten sich dabei im gesamten pH-Bereich und Konzentration bis 0,7M K,Na-Tartrat. Mikro-Kristalle wurden hingegen bei höheren K,Na-Tartrat Konzentrationen detektiert. Die Kristallisation erfolgte dabei innerhalb weniger Stunden.

Alle aus diesen Bedingungen getesteten Kristalle zeigten jedoch keine Röntgenbeugung, wie auch in Tabelle III.24 gezeigt. Eine weitere Bearbeitung dieser Kristallisationsbedingung erfolgte daher nicht.

*Kristallisation mit NaOAc*

Die Kristallisation des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes erfolgte auch unter Verwendung der Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes. Hierfür wurde zunächst in Imidazol-Puffer zwischen den pH-Werten 6,2 und 7,7 und NaOAc-Konzentration von 0,4M bis 1,4M auf eine Kristallisation getestet. Es konnten Kristalle dabei die in den Abbildungen III.65 C) und III.66 B) gezeigt erhalten werden, wobei in der Kristallisation 2,7µg/µl GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*, vollständig O-deglycosyliert) Komplex eingesetzt wurde.



**Abbildung III.66:** Kristallisation des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes in Imidazol-Puffer mit NaOAc als Fällungsmittel.

**A)** Kristall des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplexes, Imidazol-Puffer pH6,8; 1,0M NaOAc. **B)** Kristall des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Komplexes, Imidazol-Puffer pH6,6; 1,0M NaOAc.

**C)** SDS-PAGE des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) Kristalls *K*, sowie des Transfer-Loops *L* als Kontrolle (Silberfärbung, nichtreduzierenden Bedingungen).

Dieses Ergebnis konnte auch in der Ko-Kristallisation mit 5% Glycerin zur Reservoirlösung bestätigt werden, wenn die Proteinkonzentration auf 4,7µg/µl angehoben und die Tropfen im Verhältnis 3µl Proteinlösung (PL) zu 1µl Reservoirlösung (RL) gesetzt worden.

Nachdem keiner der getesteten Kristalle eine Beugung der Röntgenstrahlung zeigte (siehe Tabelle III.24), wurde mittels SDS-PAGE die Zusammensetzung der Kristalle analysiert. Die entsprechende SDS-PAGE ist in Abbildung III.66 C) dargestellt. Im Vergleich mit der SDS-PAGE der Komplexpräparation (siehe Kapitel III.4.1.5) konnten sowohl GDF-5, wie auch der BR-IB<sub>ec</sub> im Kristall nachgewiesen werden.

Kein Unterschied hinsichtlich des Kristallisationsverhaltens, wie auch der Beugungseigenschaften zeigte sich in den Kristallisationsexperimenten mit dem GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Komplex. So wurden unter identischen Bedingungen die in Abbildung III.66 A) dargestellten Kristalle erhalten.

Durch Kristallisation bei 4°C konnte die Kristallqualität nicht verbessert werden.

**Tabelle III.24:** Zusammenstellung getesteter Kristalle des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Komplexes.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [ $\mu\text{m}$ ] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Na-Cacodylat pH6,5	0,6M K,Na-Tartrat	500x400x250	RT	1	keine
0,1M Imidazol pH7,0	0,7M K,Na-Tartrat	250x200x200	RT	1	keine
0,1M Na-Hepes pH7,5	0,6M K,Na-Tartrat	300x250x250	RT	1	keine
0,1M Na-Hepes pH7,5	0,7M K,Na-Tartrat	500x350x350	RT	1	keine
0,1M Tris-HCl pH8,0	0,7M K,Na-Tartrat	400x250x350	RT	1	keine
0,1M Na-Azetat pH4,2	1,6M Na-Formiat	400x400x250	RT	3	20Å-keine
0,1M Na-Azetat pH4,6	1,6M Na-Formiat	200x200x200	RT	1	keine
0,1M Na-Azetat pH5,0	1,4M Na-Formiat	200x150x150	RT	1	keine
0,1M Na-Azetat pH4,2	1,6M Na-Formiat 30% Glucose (soak)	300x300x300	100K	2	20Å-keine
0,1M Imidazol pH6,6	1,0M NaOAc	400x150x150	RT	1	keine
0,1M Imidazol pH6,8	1,0M NaOAc	400x100x100	RT	1	keine

\* MT - Mess-Temperatur., † K - Anzahl getesteter Kristalle.

### III.5.5 Kristallisation des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

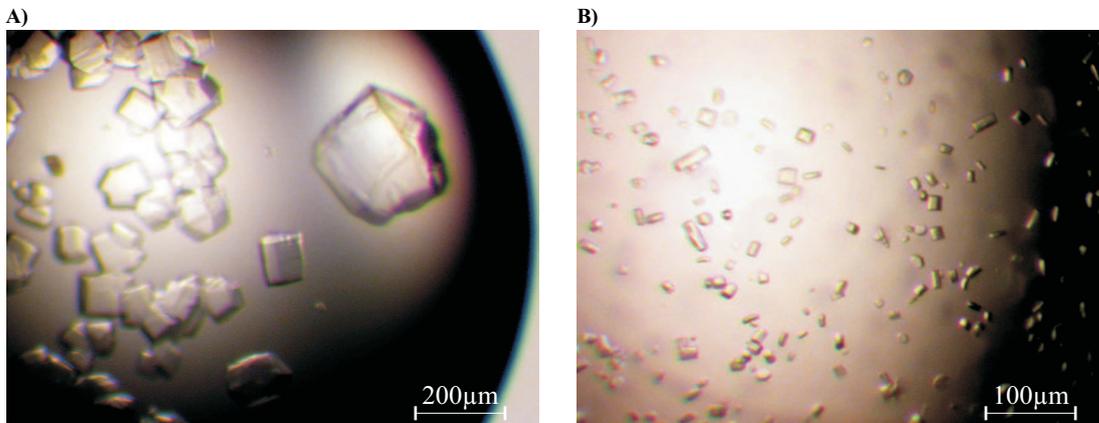
Im initialen „Matrix-Screen“ konnten für den GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex die in Tabelle III.25 aufgelisteten Kristallisationsbedingungen erhalten werden. Dabei wurden in keiner Bedingung Einzelkristalle erzeugt. Einzig durch den Zusatz von 5% PEG 8000 in die bereits 2 Monate alte Kristallisationslösung der Bedingung 36 (HR-I) konnten nach 5 Monaten kleine einzelne Kristalle entdeckt werden.

**Tabelle III.25:** Kristallisationsbedingungen des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes im „Hampton Screen I“ (Hampton Research). Proteinkonzentration 3,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; im Verhältnis 2 $\mu\text{l}$  PL : 1 $\mu\text{l}$  RL bei RT gesetzt.

Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
2	keine	0,4M K,Na-Tartrat	4Wochen	mikro-kristallines Präzipitat
12	0,1M Na-Hepes pH7,5	30% Isopropanol, 0,2M MgCl <sub>2</sub>	7d	Mikro-Kristalle (aus Phase)
19	0,1M Tris-HCl pH8,5	30% Isopropanol, 0,2M NH <sub>4</sub> OAc	7d	mikro-kristalline Nadeln
25	0,1M Imidazol pH6,5	1M NaOAc	4Wochen	mikro-kristallines Präzipitat
36	0,1M Tris-HCl pH8,5	8%(+5%) PEG 8000	2(+5) Monate	einzelner Kristall
41	0,1M Na-Hepes pH7,5	10% Isopropanol, 20% PEG 4000	7d	mikro-kristallines Präzipitat
42	kein	20% PEG 8000 0,05M K-Phosphat	7d	mikro-kristallines Präzipitat

In einer weiteren Verfeinerung konnte mit dem Einsatz von 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Proteinlösung die Kristallisationsbedingung unter PEG 8000 bestätigt werden. Hier wurden mit Tris-HCl Puffer pH8,2 bis pH8,4

und 5% bzw. 6% PEG 8000 die in Abbildung III.67 B) abgebildeten Mikro-Kristalle erhalten. Bei anderen pH-Werten des getesteten Bereiches zwischen pH7,7 und pH9,0, sowie höheren Fällungsmittel-Konzentrationen konnten jedoch nur Phasentrennungen erhalten werden.



**Abbildung III.67:** Kristalle des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.  
**A)** Tris-HCl Puffer pH8,5; 1,2M NaOAc. **B)** Tris-HCl Puffer pH7,7; 5% PEG 8000.

Einzelne Kristalle des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes waren hingegen mit der Anwendung der Kristallisationsbedingung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes erhalten worden. So wurden die in Abbildung III.67 A) gezeigten Kristalle in Tris-HCl Puffer pH7,7 und 1,2M NaOAc gebildet. Kleinere Kristalle konnten auch in weiteren Ansätzen bei diesem pH-Wert mit Fällungsmittel-Konzentrationen zwischen 1,0M und 1,4M NaOAc detektiert werden.

**Tabelle III.26:** Zusammenstellung getesteter Kristalle des GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [µm] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Tris-HCl pH8,5	1,2M NaOAc	200x200x75	RT	1	25Å (SLS)

\* MT - Mess-Temperatur., <sup>†</sup> K - Anzahl getesteter Kristalle.

In einer Messung am SLS bei Raumtemperatur wurde ein großer Kristall auf Röntgenbeugung getestet (siehe Tabelle III.26). Aufgrund der hohen Intensität der Synchrotronstrahlung war nur die Aufnahme eines einzelnen Beugungsbildes möglich. Hier konnte eine maximale Auflösung von 25Å bestimmt werden. Bereits mit der zweiten Bestrahlung war das Beugungsvermögen des Kristalls zerstört. Weiterhin konnten mit Optimierung der Bedingung 2 (HR-I), unter 0,55M und 0,6M K,Na-Tartrat Kristalle erhalten werden. Eine weitere Charakterisierung war hier aufgrund der Kristallgröße von maximal 100µm nicht möglich.

### III.5.6 Kristallisation des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

Die im Ergebnis des initialen „Matrix-Screens“ für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex erhaltenen Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle III.27 zusammengestellt. Hierfür wur-

den  $4,8\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Proteinlösung eingesetzt, wobei für die Komplexpräparation nur unvollständig N-deglycosylierter ActR-II<sub>ec</sub> (Endo H und Endo F3 behandelt, keine ConA-Affinitäts-Reinigung, siehe hierfür auch Kapitel III.2.1) verwendet wurde. Eine Wiederholung des Screens mit N-deglycosyliertem ActR-II<sub>ec</sub> im Komplex bestätigte die Bedingungen 7 (HR-I) und 29 (HR-I).

**Tabelle III.27:** Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplexes im „Hampton Screen I“ (Hampton Research). Proteinkonzentration  $4,8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; im Verhältnis 2 $\mu\text{l}$  PL : 1 $\mu\text{l}$  RL bei RT gesetzt.

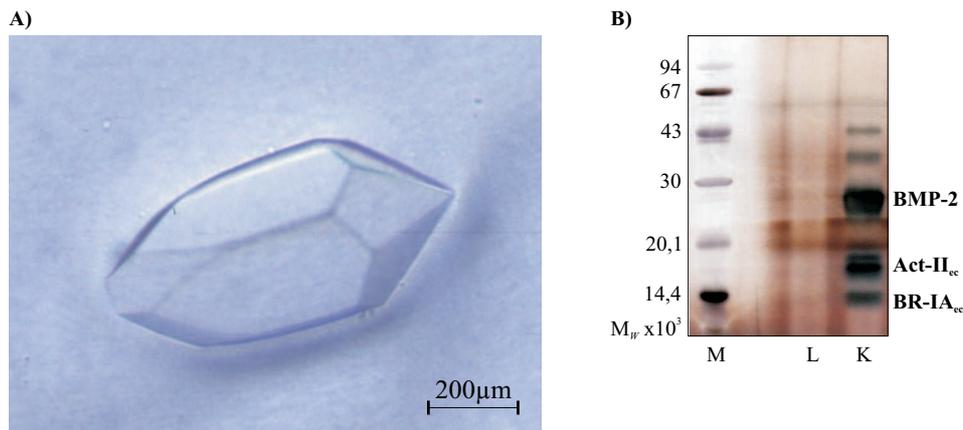
Bedingung	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
7	0,1M Na-Cacodylat pH6,5	1,4M NaOAc	14d	Mikro-Kristalle
9	0,1M Na-Citrat pH5,6	30% PEG 4000 0,2M NH <sub>4</sub> OAc	14d	Mikro-Kristalle
15	0,1M Na-Cacodylat pH6,5	30% PEG 8000 0,2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14d	mikro-kristallines Präzipitat
17	0,1M Tris-HCl pH8,5	30% PEG 4000 0,2M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4Wochen	einzelne Kristalle
18	0,1M Na-Cacodylat pH6,5	20% PEG 8000 0,2M Mg(OAc) <sub>2</sub>	4Wochen	einzelner Kristall
29	0,1M Na-Hepes pH7,5	0,8M K,Na-Tartrat	14d	mikro-kristallines Präzipitat
43	kein	30% PEG 1500	14d	mikro-kristalline Nadeln

Zunächst wurden für eine weitere Optimierung der Bedingungen 18 (HR-I) und 29 (HR-I) ausgegangen. Von einer Bearbeitung der Bedingung 7 (HR-I) wurde hingegen abgesehen, weil diese die Kristallisationsbedingung des binären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes darstellte.

Im „Fine-Screen“ der Bedingung 18 (HR-I) wurden mittels Cacodylat, Mes-, Imidazol- und Hepes-Puffer der pH-Bereich zwischen pH5,5 und pH7,5 bei PEG 8000 Konzentrationen von 14% und 30% auf Kristallisation getestet. Unter Verwendung von Komplex einer Konzentration von  $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$  konnte jedoch in all diesen Bedingungen nur Präzipitat detektiert werden. Da der aus dem „Hampton Screen I“ entnommene Einzelkristall zudem keine Röntgenbeugung zeigte (siehe Tabelle III.28) wurde die Untersuchung dieser Kristallisationsbedingung daraufhin eingestellt.

Dem gegenüber ergab die Optimierung der Bedingung 29 (HR-I) im gesamten überprüften pH-Bereich zwischen pH6,0 und pH8,0 Kristalle bei Konzentrationen größer 0,8M K,Na-Tartrat. Einer der Kristalle, welche durchschnittlich nach 3Wochen erschienen, ist in Abbildung III.68 A) gezeigt. Die Analyse der Zusammensetzung mittels SDS-PAGE ist in Bildteil B) dargestellt. Sowohl BMP-2 als auch die beiden extrazellulären Rezeptorketten des BR-IA und des ActR-II waren nachweisbar.

Auch unter Zusatz von 20% oder 30% Glucose in Ko-Kristallisationsexperimenten konnte die erfolgreiche Kristallisationsbedingung bestätigt werden. Keinen Einfluss auf den Kristallisationsprozeß, sowie die Kristallqualität schien zudem die Art der N-Glycosylierung des verwendeten ActR-II<sub>ec</sub> zu nehmen, da Kristalle sowohl für Komplexe mit N-glycosylierten, als auch vollständig N-deglycosylierten Rezeptor erhalten wurden.



**Abbildung III.68:** Kristalle des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes. **A)** Imidazol-Puffer pH7,0; 0,9M K,Na-Tartrat. **B)** SDS-PAGE dieses Kristalls *K*, sowie des Transfer-Loops *L* als Kontrolle (Silberfärbung, nichtreduzierenden Bedingungen).

Die kristallographische Charakterisierung dieser Kristalle ergab die Tabelle III.28 zusammenfassend dargestellten maximalen Auflösungen bis zu 3,5Å. Aus dem mit diesem Kristall aufgezeichnete Datensatz wurde die Raumgruppe P6<sub>5</sub> mit den Zellkonstanten  $a = b = 109,5\text{Å}$ ;  $c = 101,6\text{Å}$  und  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ;  $\gamma = 120^\circ$  ermittelt. Diese stimmte mit denen für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes überein, worauf eine Kristallisation des ternären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplexes unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden konnte.

**Tabelle III.28:** Zusammenfassung getesteter Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplexes.

Puffer	Fällungsmittel, Gefrierschutz	Größe [ $\mu\text{m}$ ] (LxBxH)	MT*	K <sup>†</sup>	maximale Auflösung
0,1M Na-Hepes pH7,5	20% PEG 8000	100x50x50	RT	1	keine
0,1M Imidazol pH7,0	0,9M K,Na-Tartrat	400x170x170	RT	1	3,5Å
0,1M Na-Hepes pH7,5	0,9M K,Na-Tartrat	200x100x100	RT	1	8Å
0,1M Na-Hepes pH8,0	0,8M K,Na-Tartrat	230x100x100	RT	1	7Å
0,1M Na-Hepes pH8,0	0,9M K,Na-Tartrat	200x100x100	RT	1	6Å

\* MT - Mess-Temperatur., <sup>†</sup> K - Anzahl getesteter Kristalle.

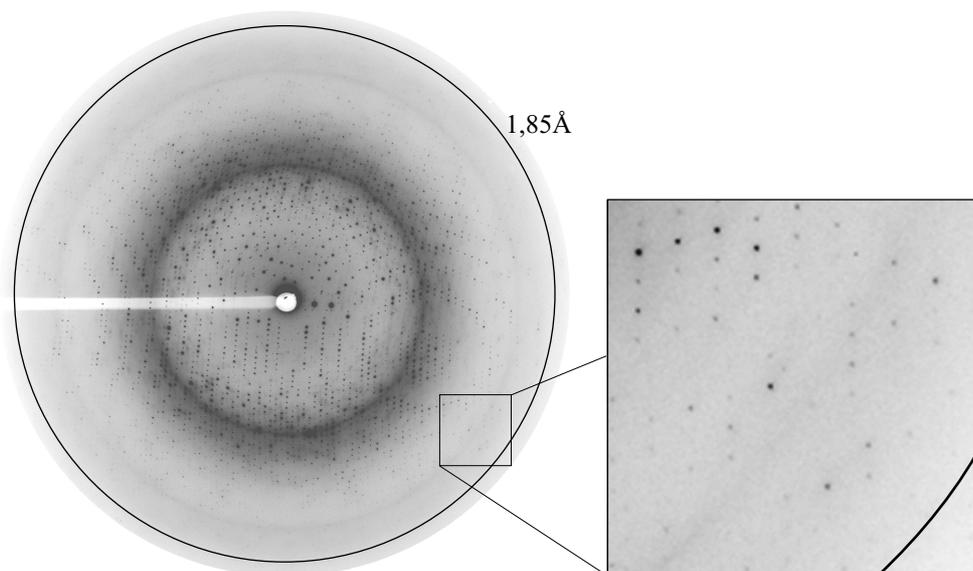
Als Ursache für den Zerfall des ternären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Komplexes während des Kristallisationsprozesses wurde die vergleichsweise geringe Affinität von ActR-II<sub>ec</sub> zum BMP-2 angenommen (siehe hierfür auch Kapitel III.3). Durch Zusatz von ActR-II<sub>ec</sub> im vierfachen stöchiometrischen Überschuss sollte daher der ternäre Komplex während der Kristallisation stabilisiert werden. Die so durchgeführten Kristallisationsexperimente führte jedoch zu keiner Kristallbildung. Auch konnten in einer Wiederholung des „Matrix-Screens“ keine Kristallisationsbedingungen für diese Probenzusammensetzung ermittelt werden.

## III.6 Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten

### III.6.1 Datensatz des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

Die Aufzeichnung der Datensätze für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex mit einer maximalen Auflösung von 1,86Å erfolgte an der Messeinrichtung PX06SA der Swiss Light Source (SLS) (siehe Kapitel II.15). Der dafür verwendete Kristall wurde mittels einer 0,7-1mm Nylon-Schleufe aus der Kristallisationsbedingung mit 0,1M Imidazol pH7,0; 0,75M NaOAc sowie 30% Glucose (10°C) (siehe Kapitel III.5.1 und Kapitel II.15) entnommen und vor der Montage auf dem Goniometerkopf in flüssigem Stickstoff eingefroren. Während der gesamten Messdauer wurde die Temperatur des Kristalls bei 100K gehalten, indem er permanent mit Stickstoff dieser Temperatur aus der Tiefkühl-System überspült wurde.

Der zu 96,8% Vollständigkeit (94,9% in der höchsten Auflösungsschale; für die vollständige Statistik der Prozessierung siehe Tabelle III.29) aufgenommene Datensatz wurde durch Kombination aus zwei Datensätzen, einem niedriger und einem hoher Auflösung gewonnen. Hierfür wurde der Kristall jeweils insgesamt um 90° um  $\phi$  ( $\phi$ -Scan, siehe Kapitel II.15) im Synchrotronstrahl gedreht und einzelne Beugungsbilder in einer Schrittweite von 1° aufgezeichnet. Abbildung III.69 zeigt das Beugungsbild aus dem hochauflösten Datensatz für eine 1° Rotation um  $\phi$ , bei einer Belichtungsdauer von 10s. Die Auflösungsgrenze ist durch den schwarzen Kreis gekennzeichnet und mit der Vergrößerung des Bildausschnitts im rechten unteren Bildteil verdeutlicht.



**Abbildung III.69:** Beugungsbild des Kristalls des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes (Aufnahme an der Synchrotron-Strahllinie PX06SA (SLS, Schweiz)).

Datensatz mit hoher Auflösung, Rotation: 1° um  $\phi$ , Exposition: 10s. Die ermittelte maximale Auflösung ist durch den schwarzen Kreis eingezeichnet. Im rechten unteren Bildteil ist ein quadratischer Ausschnitt aus dem Bereich hoher Auflösung in Vergrößerung dargestellt.

Die getrennten Aufnahme von Datensätzen mit niedriger und hoher Auflösung war aufgrund des verwendeten Detektors (Mar-CCD Kamera) notwendig. Dieser ermöglichte die Detektion von Reflexen im Auflösungsbereich  $<2\text{Å}$ , jedoch führte die Belichtungsdauer von 10s bei voller Strahlenintensität zur Überbelichtung intensiver Reflexe niedriger Auflösung. Um diese Reflexe nicht für die Auswertung

zu verlieren wurde die Aufnahme des Datensatzes mit einer Belichtungszeit von nur 1s, bei gleichzeitig mittels Filter abgeschwächter Synchrotronquelle wiederholt.

Beide Datensätze wurden anschließend zunächst getrennt unter Verwendung des Programmpaketes *MOSFLM* Version 6.2.1 [LESLIE, 1992] indiziert und integriert. Das Vereinigen beider Datensätze und die Skalierung erfolgte abschließend unter Verwendung von *SCALA* [EVANS, 1993] aus dem Programmpaket *CCP4* [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994]. Tabelle III.29 gibt die vollständige Statistik der Prozessierung der Beugungsdaten für den Kristall des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes wieder. In Übereinstimmung mit der von KIRSCH *et al.* [2000c] publizierten Struktur dieser Komplexes wurde die Raumgruppe P6<sub>5</sub> bestimmt. Weiterhin konnte die Zusammensetzung der asymmetrischen Einheit, bestehend aus je zwei Monomeren des Liganden und des Typ I Rezeptors, bestätigt werden.

**Tabelle III.29:** Statistik der Prozessierung der Beugungsdaten des Kristalls des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

Strahllinie	PX06SA (SLS, Scheiz)
Wellenlänge	0,918Å
Raumgruppe	P6 <sub>5</sub>
Elementarzelle	a = b = 107,49 Å, c = 102,28Å $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Auflösung (Å)	20,0 - 1,86 (1,91 - 1,86)
Anzahl der aufgezeichneten Reflexe	247.856 (21.558)
Anzahl der einzigartigen Reflexe	54.306 (7758)
Vollständigkeit	96,8 (94,9)
Multiplizität	4,6 (2,8)
R <sub>sym</sub> (%) aller Reflexe	8,3 (55,6)
< Intensität/σ >	4,4 (1,2)

() zeigt die entsprechenden Werte für die höchste Auflösungsschale.

Die so aufbereiteten Messdaten wurden anschließend zur Strukturlösung mittels molekularen Ersatzes verwendet.

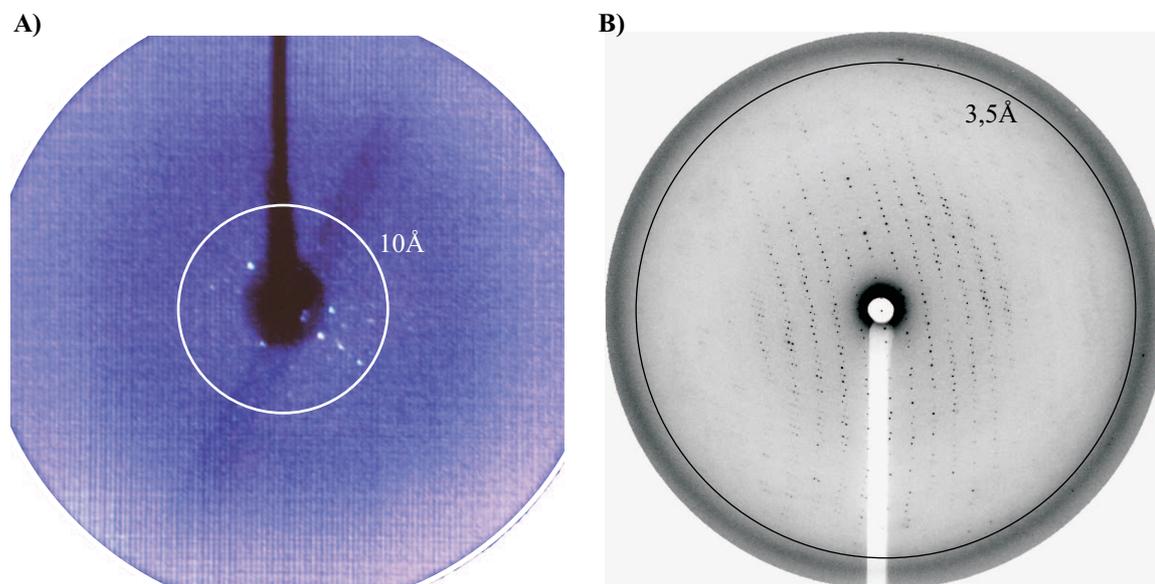
### III.6.2 Datensatz des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

Wie bereits in Abschnitt III.5.2 beschrieben, konnte die Kristallisation des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes in verschiedenen Bedingungen erzielt werden. Diese dort erhaltenen Kristalle wurden anschließend hinsichtlich ihres Beugungsverhaltens getestet.

Einzig für die Kristalle aus den Kristallisationsbedingungen mit PEG 20.000 als Fällungsmittel konnten an der Drehanoden-Messeinrichtung des Lehrstuhls so einzelne Beugungsbilder mit einer maximalen Auflösung von 10Å aufgezeichnet werden. Abbildung III.70 A) zeigt das entsprechende Beugungsbild eines dieser Kristalle für eine 0,5° Rotation um  $\omega$  mit einer Belichtungszeit von 5min. Der Kristall wurde für diese RT-Messung aus dem Kristallisationstropfen in ein Kapillarröhren überführt und auf dem Goniometerkopf montiert.

Da Beugungsdaten dieser Auflösung nicht zur Strukturlösung verwendet werden konnten wurden Kristalle auch an den Synchrotron-Strahllinien PX06SA der Swiss Light Source (SLS, Schweiz), sowie ID13 und ID14-4 der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Frankreich) vermessen. Aufgrund der deutlich erhöhten Strahlenintensität bei gleichzeitig empfindlicheren Detektoren konnte hier

Auflösungen bis zu  $3,5\text{\AA}$  ermittelt werden. In Abbildung III.70 B) ist das Beugungsbild für eine  $1^\circ$  Rotation um  $\phi$  bei einer Belichtungszeit von 1s wiedergegeben. Deutlich ist eine Anisotropie in der Beugungsfähigkeit des Kristalls zu erkennen, wobei die hohe Auflösung nur entlang der vertikalen Achse des Detektors hohe detektiert werden konnte. Entlang der horizontalen Achse waren dagegen Reflexe nur bis zu einer Auflösung von  $6\text{\AA}$  zu bestimmen.



**Abbildung III.70:** Beugungsbilder von Kristallen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes aus der Kristallisationsbedingung Cacodylat-Puffer pH7,0; 12% PEG 20.000.

**A)** Datenaufnahme mittels des Drehanoden-Messsystems:  $0,5^\circ$  Rotation um  $\omega$ , Belichtungszeit 5min, Fokus  $300\mu\text{m}$ ,  $2\Theta = 0^\circ$ , 100mm Detektorabstand. **B)** Datenaufnahme an der Mikrofokus-Strahllinie ID13 (ESRF):  $1^\circ$  Rotation um  $\phi$ , Belichtungszeit 1s, Fokus  $2\mu\text{m}$ , 180mm Detektorabstand.

Entsprechende Beugungsbilder wurden für alle getesteten Kristalle vergleichbarer Qualität erhalten. Tabelle III.30 gibt hierfür eine Zusammenstellung über alle für Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes aufgezeichneten Datensätze, deren Messparameter, die maximalen Auflösungen sowie die qualitative Bewertung der Daten wieder.

Wie aus Tabelle III.30 hervorgeht, konnte keiner der Datensätze zur Stukturlösung verwendet werden, da die im Programmpaket *MOSFLM* Version 6.2.1 [LESLIE, 1992] durchgeführten Indizierung kein sinnvolles Ergebnis für Raumgruppe und Zellkonstanten ergab. Ursache hierfür war offenbar eine unzureichende Ordnung innerhalb des Kristalls, welche bereits bei der Datenaufnahme beobachtet wurde. So konnten zunächst, von der Position des Primärstrahls am Kristall abhängig, unterschiedliches Beugungsvermögen detektiert werden, wobei die aufgelisteten maximalen Auflösungen zumeist in den Kristallkanten, sowie an der von der Verwachsung am weitesten entfernten Kristallspitze (siehe auch Abbildung III.60) erzielt wurden.

Besonders auffällig waren diese Beobachtungen an der Mikrofokus-Strahllinie ID13 (ESRF), wo aufgrund des hoch fokussierten Synchrotronstrahls (Fokus  $2\mu\text{m}$ ) sehr kleine Kristallvolumina auf ihr Beugungsverhalten getestet werden konnten. Dabei wurden, wie aus Tabelle III.30 ersichtlich hier die vergleichsweise höchsten maximalen Auflösungen bestimmt. Dennoch war auch hier die Unordnung innerhalb diese geringen Messvolumen so gravierend, dass mit der Rotation des Kristalls im resultierenden Datensatz kein einheitlicher Aufbau des Kristalls mehr detektiert werden konnte.

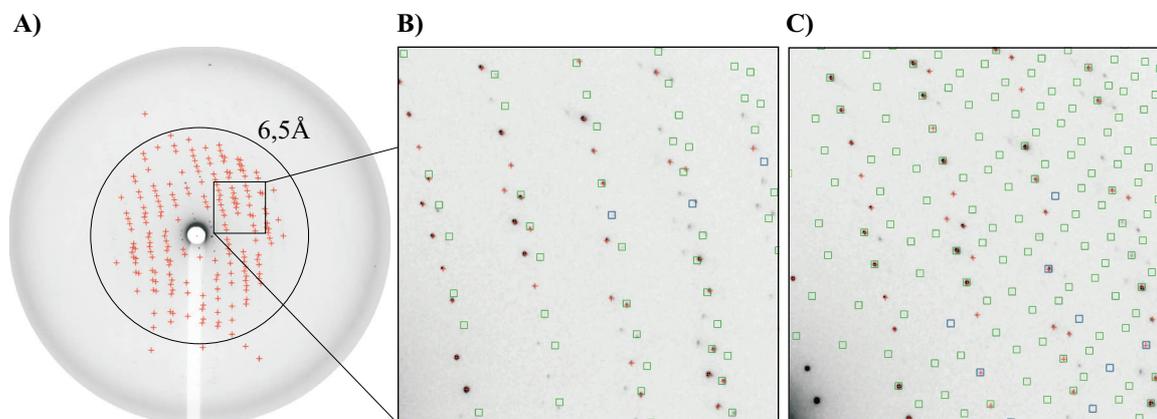
**Tabelle III.30:** Zusammenstellung der an den Synchrotronen aufgezeichneten Datensätze für Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes aus Kristallisationsbedingungen mit PEG 8.000 - 20.000 als Fällungsmittel.

Strahllinie	Bezeichnung des Datensatzes (Kristallnummer)	Anzahl der Beugungsbilder (frames)	Dauer der Belichtung	maximale Auflösung	Qualität des Datensatzes
PX06SA, (SLS)	A6B2_4	10 frames zu 1°	30s pro frame	9Å	Indizierung nicht möglich
PX06SA, (SLS)	A6B2_14/1	30 frames zu 1°	10s pro frame	3,7Å	Indizierung nicht möglich
PX06SA, (SLS)	A6B2_14/2	100 frames zu 1°	20s pro frame	3,7Å	Indizierung nicht möglich
PX06SA, (SLS)	A6B2_20	60 frames zu 1°	30s pro frame	5,5Å	Indizierung nicht möglich
PX06SA, (SLS)	A6B2_21	60 frames zu 1°	30s pro frame	4,5Å	Indizierung nicht möglich
PX06SA, (SLS)	A6B2_22	110 frames zu 1°	20s pro frame	4Å	Indizierung nicht möglich
PX06SA, (SLS)	A6B2_23	100 frames zu 1°	5s pro frame	3,5Å	Indizierung nicht möglich
ID13, (ESRF)	A6B2_1	60 frames zu 1°	1s pro frame, (3 Durchläufe)	3,5Å	Indizierung nicht möglich
ID13, (ESRF)	A6B2_2	90 frames zu 1°	1s pro frame, (3 Durchläufe)	3,5Å	Indizierung nicht möglich
ID13, (ESRF)	A6B2_5	90 frames zu 1°	1s pro frame, (3 Durchläufe)	3,5Å	Indizierung nicht möglich
ID13, (ESRF)	A6B2_7	40 frames zu 1°	1s pro frame, (3 Durchläufe)	3,5Å	Indizierung nicht möglich
ID14-4 (ESRF)	A6B2_3	20 frames zu 1°	10s pro frame, (3 Durchläufe)	8Å	Indizierung nicht möglich
ID14-4 (ESRF)	A6B2_8	25 frames zu 1°	3s pro frame, (3 Durchläufe)	7Å	Indizierung nicht möglich

Beleg hierfür waren auch die unterschiedlichen Versuche einer Indizierung dieser Datensätze. So konnten für ein einzelnes Beugungsbild oftmals die Raumgruppe  $P2_12_12_1$  mit jedoch stark variierenden Zellkonstanten bestimmt werden. Diese Variation wurden dabei nicht nur vom verwendeten Datensatz, sondern auch vom ausgewählten Beugungsbild innerhalb des gleichen Datensatzes bestimmt. Die so erhaltenen Lösungen waren stets mit schlechten Bewertungsfaktoren versehen und beschrieben unerwartet große Zellen, wobei eine der Zellachsen immer deutlich länger als 200Å war. Wurden diese initialen Zellparameter nachfolgend unter Verwendung weiterer Beugungsbilder zur Verfeinerung des gesamten Datensatzes angewandt, führte dies stets zum Abbruch des Vorgangs aufgrund zu großer Variation in den einzelnen Zellkonstanten.

In Abbildung III.71 sind die Zwischenergebnisse der Indizierung mit *MOSFLM* Version 6.2.1 [LESLIE, 1992] dargestellt. Ausgehend von dem unter III.71 A) dargestellten Beugungsbild wurden zunächst die erhaltenen Reflexe automatisch erfasst und durch rote Kreuze markiert. Anhand dieser erkannten Reflexe wurden vom Programm verschiedene Raumgruppen mit entsprechenden Zellkonstanten vor-

geschlagen, wobei die mit der höchsten Symmetrie und dabei niedrigsten Bewertungsfaktor ausgewählt wurden. Mit der Auswahl der Raumgruppe wurden automatisch alle erwarteten Reflexe als unterschiedlich gefärbte Quadrate auf das Beugungsbild projiziert. Für die richtige Lösung sollte sich dann eine hohe Übereinstimmung der vorhergesagten und detektierten Reflexe ergeben.



**Abbildung III.71:** Indizierung eines Datensatzes für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex. **A)** Beugungsbild nach Ermittlung der gemessenen Reflexe. Die zur Bestimmung der Raumgruppe verwendeten Reflexe wurden durch rote Kreuze markiert. **B)** Beugungsbild im Ausschnitt unter Annahme der Raumgruppe P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub>. Die theoretische Positionen der Reflexe für diese Lösung sind als farbige Quadrate dem gemessenen und markierten Beugungsbild überlagert dargestellt. **C)** Beugungsbild im Ausschnitt unter Annahme der Raumgruppe P1. Die theoretische Positionen der Reflexe für diese Lösung sind als farbige Quadrate dem gemessenen und markierten Beugungsbild überlagert dargestellt.

Die Indizierung der Datensätze für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes ergab zumeist die Raumgruppe P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub> als mögliche Lösung mit der höchsten Symmetrie bei noch ausreichend niedrigem Bewertungsfaktor. Wie aus Abbildung III.71 B) ersichtlich konnte mit dieser Lösung nur eine geringe Übereinstimmung mit den experimentellen Daten ermittelt werden. Die Übereinstimmung war sogar noch geringer, wenn zur Indizierung die Raumgruppe P1 verwendet (siehe Abbildung III.71 C)) und somit alle Symmetrieanforderungen aufgehoben wurden. In beiden Fällen war daher eine weitere Verfeinerung der Zellkonstanten und somit eine erfolgreich Indizierung und Prozessierung der Messdaten nicht möglich.

Als Schlussfolgerung wurde in der Folge versucht, wie bereits in Kapitel III.5.2.2 beschrieben, die Kristallqualität zu verbessern. Das optimierte Protokoll zum Einbringen der Glucose für den Gefrierschutz (siehe Kapitel II.14.3) hatte dabei nur geringen Einfluss, da alle in den Messungen am ESRF verwendet Kristalle entsprechend vorbereitet waren und die erhaltenen Daten keine Verbesserung gegenüber denen vom SLS darstellten.

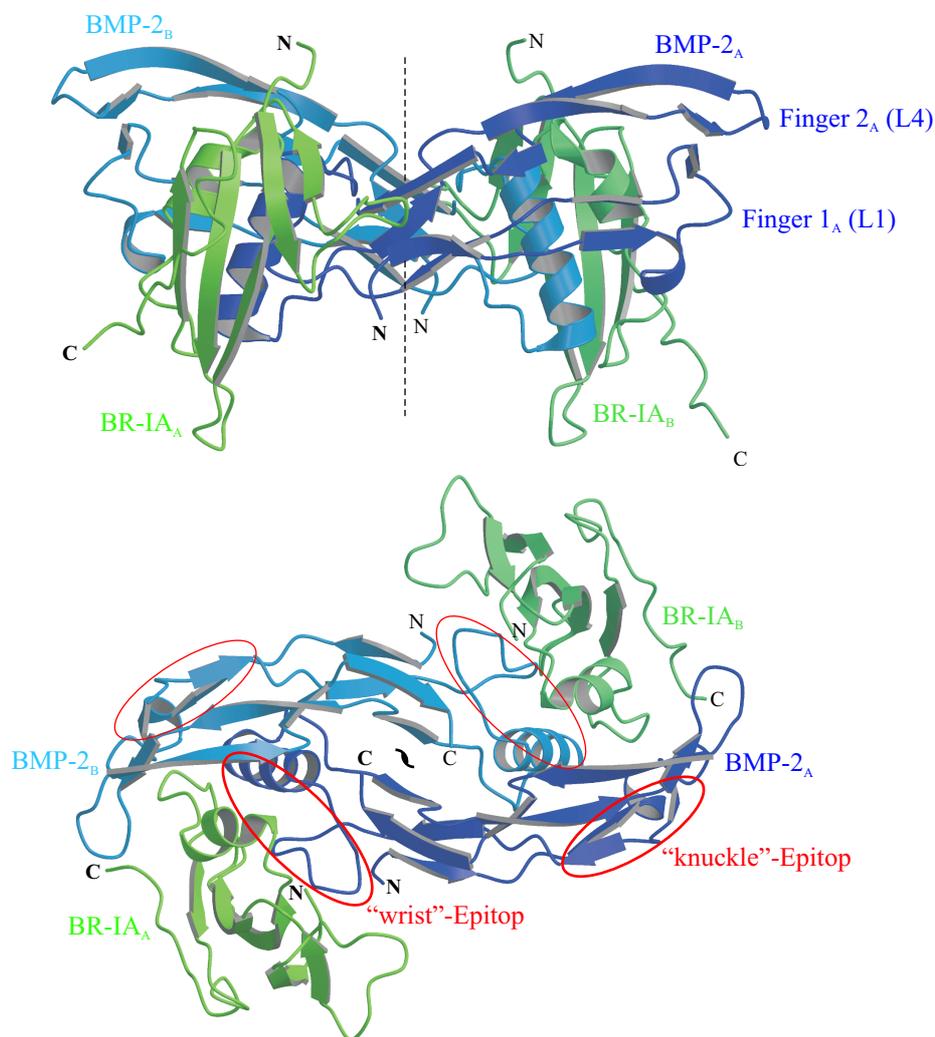
Ein Verschlechterung der Daten, verursacht durch das Einfrieren der Kristalle, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Die am leistungsstärkeren Drehanoden-Messsystem der Gesellschaft für Biologische Forschung (GBF) in Braunschweig (Deutschland) bei Raumtemperatur aufgezeichneten Beugungsbilder zeigten die gleichen Eigenschaften und waren ebenfalls nicht zu indizieren.

Eine Lösung der dreidimensionalen Struktur des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes war daher aus den aufgezeichneten Beugungsdaten nicht möglich. Als Ursache hierfür konnte eine unzureichende Qualität der Kristalle ermittelt werden, welche mit einem nur teilweise geordneten Kristallwachstum in der Kristallisationsbedingung mit PEG 20.000 als Fällungsmittel begründet wurde.

## III.7 Verfeinerung der Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes

### III.7.1 Die Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bei einer Auflösung von 1,9Å

Abbildung III.72 präsentiert die bei einer Auflösung von 1,9Å verfeinerte dreidimensionale Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes. Der als Sekundärstruktur-Darstellung abgebildete Komplex ist, in Übereinstimmung mit den von KIRSCH *et al.* [2000c] publizierten Daten, aus dem homodimeren Ligand BMP-2 (blau) und den beiden daran gebundenen extrazellulären Domänen des



**Abbildung III.72:** Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes (PDB-Eintrag: 1REW). Die beiden Monomere des Liganden BMP-2 sind in hellblau und dunkelblau gezeigt. Die beiden Rezeptorketten von BR-IA<sub>ec</sub> in grün.

**A)** Komplex in der Seitenansicht mit der der Membran zugewandten Seite nach unten. **B)** Komplex in der Draufsicht. Die Abbildung wurde unter Verwendung der Programme *MOLSCRIPT* [KRAULIS, 1991] und *Raster3D* [MERRITT and BACON, 1997] erstellt.

BMP Typ IA Rezeptors (grün) aufgebaut. Bildteil A) der Abbildung III.72 zeigt den Ligand-Rezeptor Komplex in seiner Seitenansicht mit der der Membran zugewandten Seite nach unten. Dahin gegen wird in Bildteil B) die Draufsicht auf den Komplex wiedergegeben.

Wie bereits durch SCHEUFLER *et al.* [1999] gezeigt, ist der Ligand BMP-2 aus zwei über eine intermolekulare Disulfidbrücke kovalent miteinander verbundenen Monomeren aufgebaut. Die räumliche Struktur jedes dieser Monomere lässt sich hierbei mit dem „open left hand“-Modell beschreiben, in dem die beiden gestreckten  $\beta$ -Faltblätter die Finger 1 und 2 und die zentrale  $\alpha$ -Helix die Handfläche repräsentieren. Die Anordnung der Monomere zueinander ist durch eine zweifache Drehachse im Dimer beschrieben, welche auch im Komplex erhalten bleibt. In Abbildung III.72 A) ist diese als gestrichelte Linie und in Bildteil B) mit dem entsprechenden Symbol dargestellt.

Die beiden extrazellulären Domänen des BMP Typ IA Rezeptors binden an den Liganden in den Finger-Helix Vertiefungen, wobei jeder Rezeptor mit beiden Monomeren in Kontakt steht. Für beide Rezeptorketten deuten die C-Termini zur membranständigen Seite wohingegen die N-Termini von der Zelloberfläche weg deuten.

In Anlehnung an das „open left hand“-Modell des Liganden wird das Bindungsepitop für den Typ I Rezeptor als das „wrist“-Epitop bezeichnet. Es ist in Abbildung III.72 B) rot umrandet hervorgehoben. Die zweifache Symmetrie des Liganden erzeugt dabei zwei sich gegenüber liegenden Bindungsepitope für den Typ I Rezeptor, sowie zwei für den Typ II. Diese befinden sich nach KIRSCH *et al.* [2000a] auf der konkave Seite des Liganden. Diese Bindungsepitope für den BMP Typ II Rezeptor wird daher als das „knuckle“-Epitop bezeichnet (siehe auch hier rote Kennzeichnung in Abbildung III.72 Bildteil B)).

### III.7.2 Strukturlösung unter Anwendung der Methode des Molekularen Ersatzes

Die Strukturlösung der bei 1,9Å verfeinerten Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes erfolgte unter Anwendung der Methode des Molekularen Ersatzes (für die Beschreibung und Durchführung dieser Methode zur Bestimmung der „Reflexphasen“ siehe Abschnitt II.16.1). Als Startmodell wurde die von KIRSCH *et al.* [2000c] publizierte Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes (PDB-Eintrag: 1ES7) mit einer Auflösung von 2,9Å verwendet.

Aufgrund geringfügig unterschiedlicher Zellkonstanten dieser beiden Datensätze wurde zunächst einer Rotations- und Translationssuche, sowie abschließend gefolgt von einem „rigid body refinement“ durchgeführt. Für diese drei Schritte wurde das Programmpaket *CNS1.1* [BRÜNGER *et al.*, 1998] verwendet (siehe auch Kapitel II.16.1).

Die anschließenden Rechnungen zur Verfeinerung wurden in REFMAC5 [MURSHUDOV *et al.*, 1997] aus dem Programmpaket *CCP4* [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994] durchgeführt (siehe Kapitel II.17). Um eine Anisotropie innerhalb der Daten zu berücksichtigen wurde dabei zu jeder Kette, d.h. jedem Monomer des BMP-2 sowie für die beiden BR-IA<sub>ec</sub>, eine TLS-Gruppe definiert [WINN *et al.*, 2001]. Jeder Verfeinerungsrechnung war jeweils ein manuelles Bauen der Koordinaten unter Verwendung der Software QUANTA2000 (Accelrys Inc.) angeschlossen.

Insgesamt wurden 13 dieser Zyklen ausgeführt und der Fortschritt der Verfeinerung anhand der  $R$ -Werte  $R$  und  $R_{free}$  verfolgt (für die Definition der  $R$ -Werte siehe Abschnitt II.17). Zur Berechnung des freien  $R$ -Wertes  $R_{free}$  wurde ein Testsatz von 5% der Daten angewendet [BRÜNGER, 1992].

Aufgrund des symmetrischen Aufbaus des Komplexes wurde versucht, die nichtkristallographische Symmetrie (NCS) im Verfeinerungsprozess anzuwenden. Diese zusätzliche Einschränkung führte jedoch zu keiner Verbesserung der  $R$ -Werte und musste im weiteren Verlaufe wieder aufgehoben werden. Während der Verfeinerung wurde die Differenzelektronendichtekarte  $F_{obs}-F_{calc}$  verwendet um 185

Wassermoleküle zu identifizieren und den Proteinketten in der Struktur hinzuzufügen.

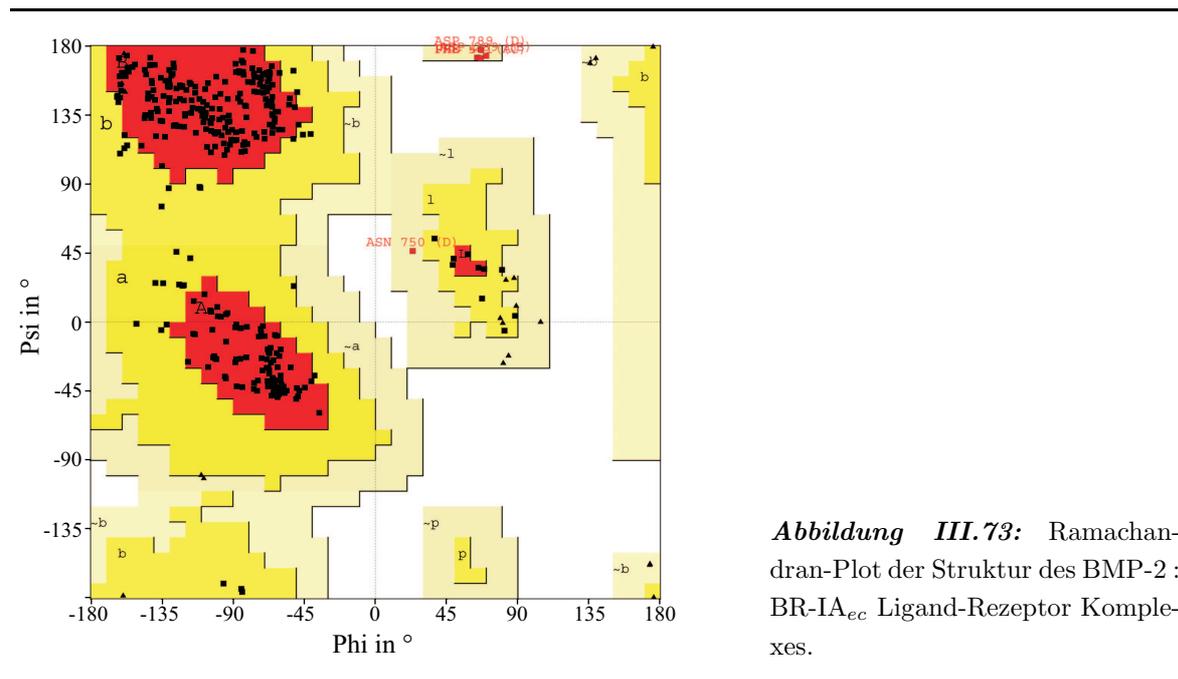
Die abschließende Rechnung zur Energieminimierung ergab einen  $R$ -Wert von 20,7% und einen freien  $R$ -Wert  $R_{free}$  von 22,9%. Eine Statistik der Verfeinerung für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex ist in Tabelle III.31 zusammengestellt.

**Tabelle III.31:** Statistik für die Verfeinerung der Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

R (%)	20,7 (36,6)
$R_{free}$ (%)	22,9 (39,6)
r.m.s. deviation:	
Bindungslänge (Å)	0,017
Bindungswinkel (°)	1,537
Dihedrals (°)	27.334
Impropers (°)	1,388
mittlere B-Wert	36,1
Coordinatenfehler (cross-validated sigma)(Å)	0,3 (0,3)
PROCHECK Analyse	
Reste in der am meisten favorisierten Region (%)	87,2
Reste in zusätzlich erlaubter Region (%)	11,3
Reste in generell erlaubter Region (%)	1,5
Reste in nicht erlaubter Region (%)	0,0

( ) zeigt die entsprechenden Werte für die höchste Auflösungsschale (1,91Å - 1,86Å).

Im unteren Teil der Tabelle III.31 ist zudem das Ergebnis der PROCHECK Analyse [LASKOWSKI *et al.*, 1993] aufgelistet. Die dem Ramachandran-Plot (Abbildung III.73) entnommenen Werte stellen ein Kriterium zur sterisch erlaubten Hauptketten-Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  für die einzelnen Reste innerhalb der Polypeptidketten dar. Bereiche der unerlaubten (weißen) Region stehen für sterisch Konformationen, bei denen sich Seitenketten- und Hauptkettenatome sehr nahe kommen und daher



**Abbildung III.73:** Ramachandran-Plot der Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes.

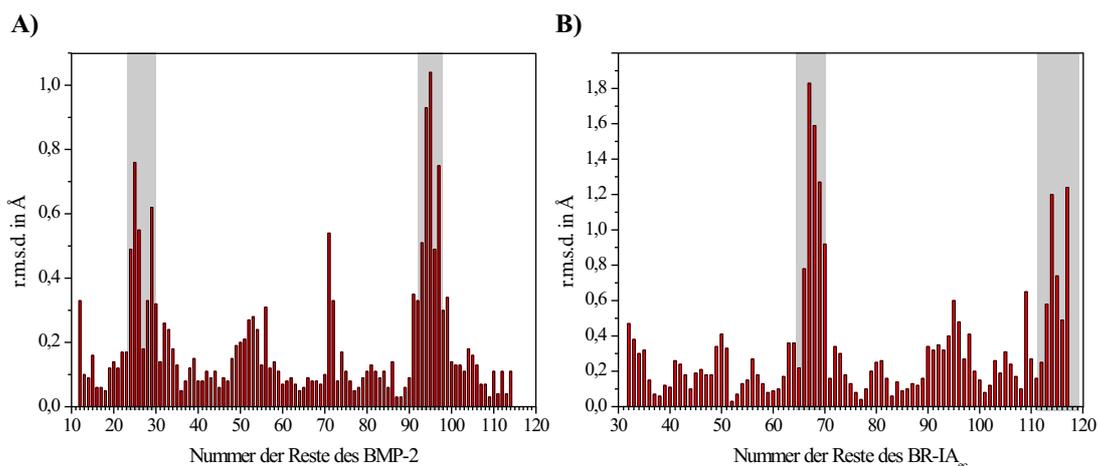


tronendichtekarten  $F_{obs}-F_{calc}$  und  $2F_{obs}-F_{calc}$  Dichte detektiert, die weder BMP-2 oder BR-IA<sub>ec</sub> noch, aufgrund ihrer Größe, Wassermolekülen zugeordnet werden konnten. Unter Berücksichtigung der Zusammensetzung der Kristallisationslösung (siehe Kapitel III.5.1) wurde daher angenommen, dass es sich hierbei um Glucosemoleküle handeln könnte, die während der Kristallisation an den Proteinketten gebunden hatten. Nacheinander wurden daher drei Glucosemoleküle der Struktur hinzugefügt und nachfolgend verfeinert. In Abbildung III.74 sind diese drei potentiellen Glucose-Bindungsstellen dargestellt. Ihre Positionen sind im oberen linken Bildteil in der Gesamtansicht des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes hervorgehoben und nummeriert. Dieser Nummerierung folgend sind die Glucosemoleküle in den vergrößerten Ausschnitten der jeweiligen Bindungsbereiche in grau dargestellt und zusätzlich mit einer Elektronendichtekarte von  $1\sigma$  umgeben.

In allen drei Fällen konnte die positive Dichte dieser Größe ausreichend mit einer Glucose ausgefüllt werden. Bemerkenswert war zudem, dass diese Glucosemoleküle trotz der hohen Symmetrie innerhalb des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes offenbar an drei verschiedenen Stellen gebunden hatten und an den symmetrie-äquivalenten Positionen keine derartige überschüssige Dichte detektiert werden konnte.

Nachdem jedoch in der Verfeinerung unter Berücksichtigung der Glucosemolekülen keine Verbesserung der *R*-Werte erzielt wurde. Und zudem keine Position dieser Glucosen mit einer OMIT-Karte bestätigt werden konnte, wurden alle drei Glucosemoleküle von der weiteren Verfeinerung wieder ausgeschlossen.

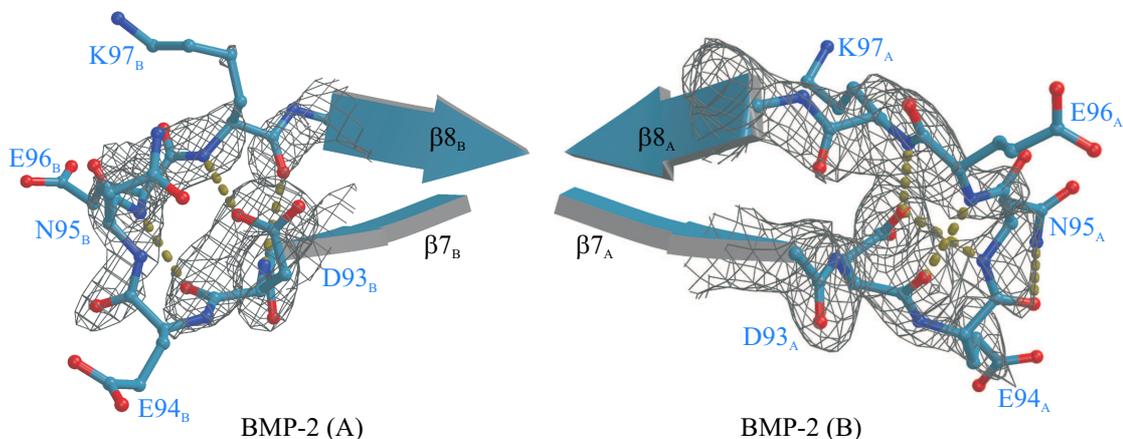
Der Mangel einer strikten nichtkristallographischen Symmetrie (NCS) für den gesamten BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex konnte mit der Gegenüberstellung der symmetrie-äquivalenten Bestandteile des Komplexes begründet werden. Hierbei hatte sich zunächst gezeigt, dass sich die beiden Segmente (BMP-2 Dimer und ein BR-IA<sub>ec</sub> Molekül) nur mit einer relativ geringen Abweichung von r.m.s.d. von 0,9Å für alle Atome und r.m.s.d. von 0,4Å für die C<sub>α</sub>-Atome voneinander unterscheiden. Eine detailliertere Analyse der Abweichung der C<sub>α</sub>-Atome einzelner Reste, wie sie in Abbildung III.75 als Darstellung der Quadratwurzel der mittleren Abweichung (r.m.s.d.) über der Nummer des jeweiligen Restes abgebildet ist, ergab hingegen sowohl innerhalb der Monomere von BMP-2 wie auch von BR-IA<sub>ec</sub> Bereiche mit größeren Abweichungen.



**Abbildung III.75:** Strukturelle Abweichung der C<sub>α</sub>-Position für die Gegenüberstellung der Monomeren des BMP-2 in Bildteil **A**) und der BR-IA<sub>ec</sub>-Ketten in Bildteil **B**). Darstellung als r.m.s.d. der C<sub>α</sub>-Atome über der Nummer des jeweiligen Restes. Bereiche besonderer Abweichung sind grau hinterlegt.

Im Vergleich der Monomere von BMP-2 (Abbildung III.75 Bildteil A)) konnten zwei Regionen wesentlicher Abweichung zueinander ermittelt werden. Bei beiden handelte es sich jeweils um die Schleifen-Regionen L1 (Reste Ser24 bis Val26 und Asn29) und L4 (Reste Asp93 bis Lys97) an den Spitzen der Finger 1 und 2 (siehe hierfür auch die Markierung in Abbildung III.72 Bildteil A)). Zusätzlich wies aber auch der Rest Asn71 in Schleife L3 am C-terminalen Ende der kurzen  $\alpha$ -Helix einen r.m.s.d.-Werte deutlich über dem durchschnittlichen r.m.s.d.-Wert von  $0,2\text{\AA}$  für die Abweichung der BMP-2 Monomere zueinander auf.

Abbildung III.76 zeigt hierfür beispielhaft eine Gegenüberstellung des Bereichs in Schleife L4 für beide Monomeren von BMP-2. Die hohe Flexibilität der Polypeptidkette zwischen den Resten Asp93 und Lys97 wird dabei durch die geringe zum Teil unterbrochene Elektronendichte für die  $C_\alpha$ -Kette verdeutlicht und durch hohe Temperaturfaktoren (Daten nicht gezeigt) belegt.



**Abbildung III.76:** Struktur von BMP-2 im Ausschnitt der Schleife L4 an der Spitze des Fingers 2. Der Bereich der Reste Asp93 bis Lys97 ist zur Beschreibung der Qualität der Struktur in diesem Bereich mit der einhüllenden Elektronendichtekarte  $2F_{obs} - F_{calc}$  bei  $1\sigma$  umgeben. Die Abbildung wurde unter Verwendung der Programme *BOBSCRIPT* [ESNOUF, 1997] und *Raster3D* [MERRITT and BACON, 1997] erstellt.

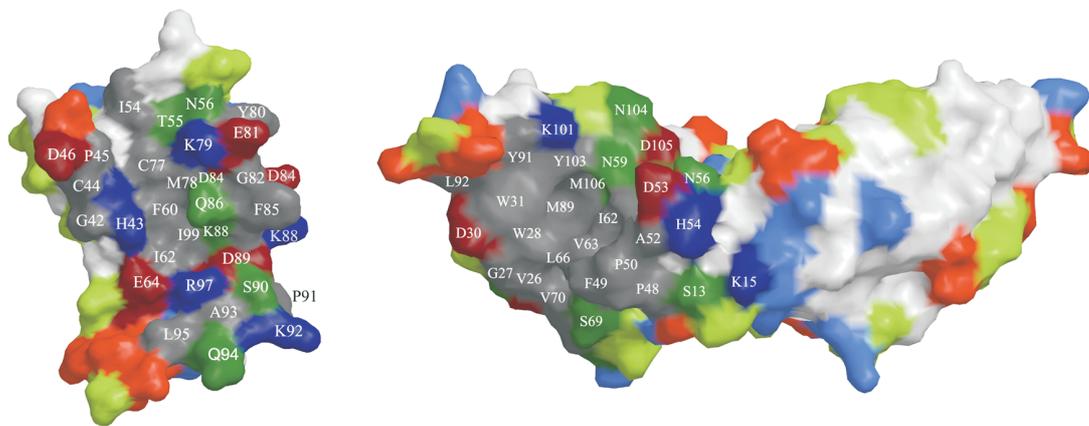
Die durchschnittliche Abweichung für die Position der  $C_\alpha$ -Atome beider extrazellulärer Domänen des BMP Typ IA Rezeptors wurde mit einem r.m.s.d.-Wert von  $0,46\text{\AA}$  bestimmt. Die größten strukturellen Unterschiede konnten hierbei in folgenden zwei Abschnitten ermittelt (siehe Abbildung III.73 Bildteil B)). Die Erste befand sich in Schleife L4 zwischen dem  $\beta$ -Strang  $\beta_4$  und der kurzen  $\alpha$ -Helix  $\alpha_1$  (Reste Glu65 bis Thr71). Innerhalb dieses Bereichs wies der Rest Asp67 mit einem r.m.s.d.-Wert von  $1,8\text{\AA}$  die größte strukturelle Abweichung in der  $C_\alpha$ -Position auf. Zusätzlich zu Schleife L4 zeigte auch der C-Terminus das BR-IA<sub>ec</sub> eine erhöhte dynamische Variabilität. So konnte für die erste BR-IA<sub>ec</sub>-Kette Elektronendichte nur bis zum Rest Pro117 beobachtet werden, wohingegen für die zweite BR-IA<sub>ec</sub>-Kette Elektronendichte bis zum Rest Ile120 sichtbar war.

Alle ermittelten Abweichungen innerhalb der über nichtkristallographische Symmetrie (NCS) verwandten Moleküle konnten auf deren jeweilige Umgebung aufgrund der Packung in Kristallgitter zurückgeführt werden. Die hohen Temperaturfaktoren dieser Reste belegten zudem, dass die beschriebenen Abweichungen auf eine erhöhte Flexibilität der Polypeptidkette in diesen Bereichen zurückzuführen waren.

### III.7.3 Das Ligand-Typ I Rezeptor Bindungsepitop

Im BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Bindungsepitop steht das homodimere BMP-2 über die Reste der Prä-Helix Schleife L2 und der  $\alpha$ -Helix  $\alpha 3$  des einen Monomers (BMP-2<sub>A</sub>), sowie den Reste der Innenseite der Schleife L1 und des  $\beta$ -Strangs  $\beta 8$  des zweiten Monomers (BMP-2<sub>B</sub>) in Kontakt mit einer Rezeptorkette von BR-IA<sub>ec</sub>. Dieses Epitop umfasst eine Fläche von 1150Å<sup>2</sup>, wobei 60% der Interaktionsfläche durch hydrophobe Reste von BMP-2 gebildet werden (siehe Abbildung III.77).

Auf Seiten von BR-IA<sub>ec</sub> wird der Kontakt zum Liganden BMP-2 über Reste von der Innenseite der konkav geformten extrazellulären Domäne hergestellt. Diese Reste sind in der Oberflächendarstellung von BR-IA<sub>ec</sub> in Abbildung III.77 ebenfalls über einen dunkleren Farbton hervorgehoben. An der Ausbildung dieser Interaktionsfläche auf dem BR-IA<sub>ec</sub> sind im Gegensatz zum BMP-2 30% hydrophobe Reste beteiligt. Dieser geringere Anteil ergibt sich hauptsächlich aufgrund des Bandes an geladenen Resten, welches sich ausgehend vom Lys79 über die Aminosäuren Gln86, Asp89 und Ser90 bis hin zum Lys92 vertikal durch das Bindungsepitop zieht (siehe Abbildung III.77).



**Abbildung III.77:** Oberflächendarstellung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Bindungsepitops in der „open book“ Ansicht (der BR-IA<sub>ec</sub> ist um 180° um die  $y$ -Achse gedreht abgebildet).

Die Farbgebung erfolgte entsprechend der Hydrophobizität bzw. Ladung, mit polaren Resten (N, Q, S, T) in grüner, positiv geladenen Aminosäuren (H, K, R) in blauer, negativ geladenen Aminosäuren (D, E) in roter und hydrophoben Resten (A, C, F, G, I, L, M, P, V, W, Y) in grauer Farbe. Die an der Bindung beteiligten Reste sind durch den jeweils dunkleren Farbton gekennzeichnet.

Die Abbildung wurde unter Verwendung der Programme *Grasp* [NICHOLLS *et al.*, 1991], *DINO* [<http://www.dino3d.org>] und *Raster3D* [MERRITT and BACON, 1997] erstellt.

Trotz des hohen Anteils an hydrophoben Resten im Bindungsepitop des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes konnte keiner dieser Reste als die Hauptbindungs determinante der Wechselwirkung ermittelt werden. Die jeweilige funktionelle Charakterisierung dieser Reste durch Mutationsanalyse wurde für BMP-2 von KIRSCH *et al.* [2000a] und für BR-IA<sub>ec</sub> von HATTA *et al.* [2000] durchgeführt. Sie ergaben bei Alanin-Substitution der entsprechenden Aminosäure-Seitenketten maximal eine zehnfach reduzierte Affinität (siehe hierfür auch Kapitel I.1, sowie Abbildung I.4 und Abbildung I.5).

Bereits in der Interpretation der Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bei 2,9Å Auflösung wurde auf die Bedeutung einzelner Wasserstoff-Brückenbindungen hingewiesen. Die niedrige Auflösung erlaubte jedoch keine genauere Analyse der geometrischen Parameter, welche nunmehr mit der bei 1,9Å Auflösung verfeinerten Struktur durchgeführt werden konnte.

Zur Analyse der Wasserstoff-Brückenbindungen wurde das Programm *HBPLUS* [MCDONALD *et al.*,

1993; McDONALD and THORNTON, 1994] verwendet. Es konnten so zehn intermolekulare Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen dem BMP-2 und dem BR-IA<sub>ec</sub> pro Interaktionsfläche ermittelt werden. Sie sind in Tabelle III.32 mit ihren geometrischen Parametern sowie einer Einteilung entsprechend der zur H-Brücke beitragenden Haupt- oder Seitenkettenatome zusammengestellt. Insgesamt sind bei sieben von zehn Wasserstoff-Brückenbindungen Atome der Hauptkette beteiligt, unter ihnen auch zwei ausschließlich auf Hauptkettenatome beschränkte H-Brücken (zwischen Asp53 (N) und Cys77 (O), sowie Ser69 (O) und Gln94 (N)). Drei der zehn H-Brücken werden dagegen nur zwischen Seitenkettenatome der entsprechenden Aminosäuren ausgebildet, zu diesen gehören die H-Brücken zwischen Asp53 (OD2) und Thr55 (OG1), Tyr103 (OH) und Asp84 (OD2), sowie Ser69 (OG) und Gln94 (N).

**Tabelle III.32:** Die Geometrie der Wasserstoff-Brückenbindungen im Bindungsepitop zwischen BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub>.

BMP-2	BR-IA <sub>ec</sub>	Abstand in Å	D-A-C <sub>(α)</sub> Winkel <sup>†</sup>	Typ der H-Brücke <sup>‡</sup>
Asp53 (OD2)	Thr55 (OG1)	2,73 (2,79)	127° (127°)	SK-SK
Asp53 (N)	Cys77 (O)	2,88 (2,86)	136° (131°)	HK-HK
<i>Asn59 (OD1)</i>	<i>Gly81 (N)</i>	<i>3,27 (3,30)</i>	<i>151° (152°)</i>	<i>HK-SK</i>
Tyr103 (OH)	Asp84 (OD2)	2,79 (2,64)	147° (155°)	SK-SK
Leu51 (N)	Gln86 (OE1)	2,75 (2,76)	127° (127°)	SK-HK
Leu51 (O)	Gln86 (NE2)	2,97 (3,02)	134° (133°)	SK-HK
Trp28 (NE1)	Asp89 (O)	2,88 (2,87)	135° (123°)	HK-SK
Val26 (O)	Ser90 (OG)	2,53 (2,62)	128° (134°)	SK-HK
Ser69 (O)	Gln94 (N)	2,87 (2,88)	151° (153°)	HK-HK
<i>Ser69 (OG)</i>	<i>Arg97 (NZ2)</i>	<i>3,01 (3,05)</i>	<i>90° (96°)</i>	<i>SK-SK</i>
Mittelwert*		2,80 (2,78)	130° (137°)	
Standardabweichung*		0,14 (0,14)	10° (13°)	

Die entsprechenden Werte für das zweite, über nichtkristallographische Symmetrie (NCS) verwandte Bindungsepitop sind in Klammern aufgelistet.

\* Die *Kursiv* dargestellten Werte wurde von der Statistikanalyse ausgeschlossen.

† D-A-C<sub>(α)</sub> beschreibt die Donor-Akzeptor-C<sub>(α)</sub> Atome; entsprechend der Statistik von XU *et al.* [1997] beträgt der Winkel zwischen diesen Atomen für die HK-HK Wasserstoff-Brückenbindung 149°±15° und für SK-HK sowie SK-SK Wasserstoff-Brückenbindung 129°±18°.

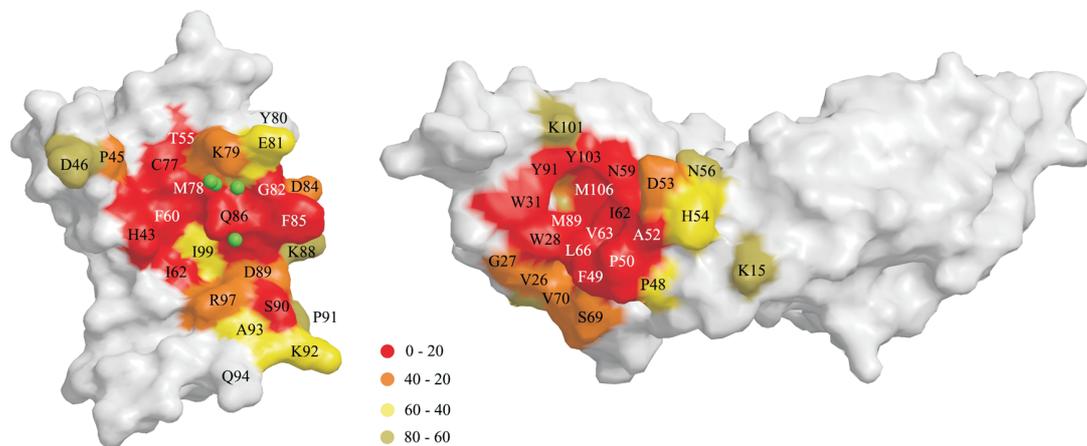
‡ HK (Hauptketten-) und SK (Seitenketten-) Donor- bzw. Akzeptoratome.

Die Analyse der Wasserstoff-Brückenbindung beschränkt sich im Wesentlichen auf die Ermittlung des Abstandes und der Winkel zwischen Donor- und Akzeptoratomen der jeweiligen an der Ausbildung der H-Brücke beteiligten Reste. Diese geometrischen Parameter weisen hierfür statistische Mittelwerte auf, welche nach XU *et al.* [1997] für den Abstand zwischen Donor- und Akzeptoratom bei  $2,92 \pm 0,24\text{Å}$ , sowie für den Winkel zwischen Donor-, Akzeptor- und dem daran gebundenen Kohlenstoffatom  $134,5 \pm 19,2^\circ$  betragen.

Von den zehn im Bindungsepitop ermittelten Wasserstoff-Brückenbindungen entsprachen acht diesen statistischen Vorgaben, wobei der durchschnittliche Abstand zwischen Donor- und Akzeptoratom  $2,8 \pm 0,14\text{Å}$  und der entsprechende Winkel zwischen diesen  $137 \pm 10^\circ$  beträgt. Die verbliebenen zwei H-Brücken wurden dabei von der Statistik ausgeschlossen, wenngleich deren geometrischen Parameter noch im Bereich einer putativen Wasserstoff-Brückenbindung liegen (siehe auch Kapitel I.2, sowie Kapitel II.17.3).

Trotz der detaillierten Information über die Geometrie und die Art der Wasserstoff-Brückenbindung erlaubten diese Informationen keine Aussage über die Stärke und daraus schlussfolgernd auch keine Vorhersage über deren Beitrag zur Bindungsenergie zwischen BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub>.

Die notwendige Diskriminierung der einzelnen H-Brücken konnte erst mit der Analyse ihrer Position in der Interaktionsfläche erzielt werden. Hierfür wurde zunächst die Oberflächenzugänglichkeit der einzelnen Reste nach Komplexbildung bestimmt. Das entsprechende Ergebnis ist in Abbildung III.78 dargestellt. Der Farbgebung auf der Oberfläche des BMP-2, sowie von BR-IA<sub>ec</sub> beschreibt dabei, wie stark der jeweilige Rest im Komplex eingeschlossen ist. Niedrige Werte für die Oberflächenzugänglichkeit („residual accessibility“) sind durch rote Färbung dargestellt und geben ein hohes Maß an Abdeckung durch die Komplexbildung wieder. Die verminderte Zugänglichkeit korrespondiert dabei nach CHAKRABARTI and JANIN [2002] mit einer zentralen oder peripheren Lokalisierung des jeweiligen Restes in einer Protein-Protein Interaktionsfläche.



**Abbildung III.78:** Oberflächendarstellung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Bindungssepitops in der „open book“ Ansicht (der BR-IA<sub>ec</sub> ist um 180° um die  $y$ -Achse gedreht abgebildet).

Die Farbgebung erfolgte entsprechend der Zugänglichkeit („residual fractional accessibility“) der Reste im Komplex. In rot sind diejenigen Reste abgebildet deren Oberfläche, verglichen mit der freien Form, weniger als 20% zugänglich sind. Die vier in der Bindungsfläche eingeschlossenen Wassermoleküle sind als grüne Kugeln dargestellt.

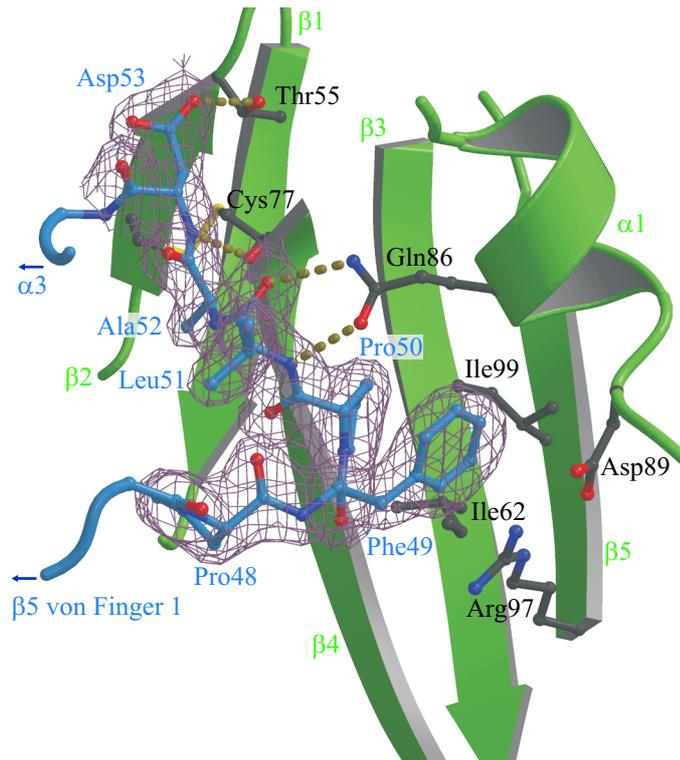
Die Abbildung wurde unter Verwendung der Programme *Grasp* [NICHOLLS *et al.*, 1991], *DINO* [<http://www.dino3d.org>] und *Raster3D* [MERRITT and BACON, 1997] erstellt.

Acht der zehn Wasserstoff-Brückenbindungen befinden sich demnach am Rand und nur zwei H-Brücken im Zentrum des Bindungssepitops. Bei diesen handelt es sich um die H-Brücken zwischen der Hauptkette des Restes Leu51 auf dem BMP-2 und der Seitenkette des Restes Gln86 von BR-IA<sub>ec</sub>. Sie sind im Zentrum der Abbildung III.79 dargestellt und mittels gelber gestrichelter Linien hervorgehoben. Die Bedeutung der Prä-Helix Schleife L2 des BMP-2 für die Interaktion zum Typ I Rezeptor wird zudem durch zwei weitere Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen dem Asp53 vom BMP-2 und den Resten Thr55, sowie Cys77 von BR-IA<sub>ec</sub> unterstrichen. Sie sind ebenfalls in Abbildung III.79 entsprechend hervorgehoben dargestellt. Ihr Lage am Rand des Bindungssepitops lässt jedoch auf eine geringere Bedeutung, im Vergleich zur vollständig in der Interaktionsfläche eingeschlossenen H-Brücken zwischen Leu51 und Gln86, schließen.

Eine zusätzliche Besonderheit der Wasserstoff-Brückenbindung zwischen den Resten Leu51 und Gln86 ist zudem durch die in Abbildung III.78 als grüne Kugeln eingezeichneten Wassermoleküle dargestellt. Diese vier einzig in der Interaktionsfläche verbliebenen Wasser befinden sich in unmittelbarer Nähe zur Seitenkette des Gln86. Sie sind dabei durch mit der Umgebung vergleichbaren Temperaturfaktoren (Werte zwischen  $40\text{\AA}^2$  und  $50\text{\AA}^2$ ) charakterisiert. Drei dieser Wassermoleküle füllen den

Hohlraum oberhalb der Seitenkette von Gln86, welcher durch die Reste Lys71 und Glu81 von BR-IA<sub>ec</sub> begrenzt und vom Lys97 (BR-IA<sub>ec</sub>) abgedeckt wird. Innerhalb dieses Hohlrums bilden sie ein H-Brücken-Netzwerk aus, das die Hauptkettenamide der Reste Asn56 und Ser57 vom BMP-2 mit der Aminogruppe der Seitenkette (NE2) des Gln86 (BR-IA<sub>ec</sub>) verbindet.

Das vierte Wasser befindet sich dagegen einzeln im Hohlraum unterhalb der Gln86 Seitenkette, wobei es ebenfalls über eine H-Brücke, jedoch an die Carbonylgruppe der Seitenkette (OE1) des Gln86 (BR-IA<sub>ec</sub>) gebunden ist. Es wird dort durch die Seitenketten der Reste Phe49 und Pro50 des BMP-2 in Position gehalten.



**Abbildung III. 79:** Das BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Bindungsepitop.

Vergrößerte Darstellung der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Interaktionsfläche, wobei die Prä-Helix Schleife (L2) des BMP-2 (blau) für die Reste P48 bis D53 in der „ball and stick“ Darstellung wiedergegeben und zur Verdeutlichung der Qualität der Struktur in diesem Bereich mit einer  $2F_{obs} - F_{calc}$  Elektronendichtekarte bei  $1,4\sigma$  umgeben ist. Die Sekundärstruktur von BR-IA<sub>ec</sub> ist in grün abgebildet, hier sind die an der Interaktion beteiligten Seitenketten mit der „ball and stick“ Darstellung hervorgehoben. Die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Leu51 und Gln86, Asp53 und Thr55 sowie Asp53 und Cys77 sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet.

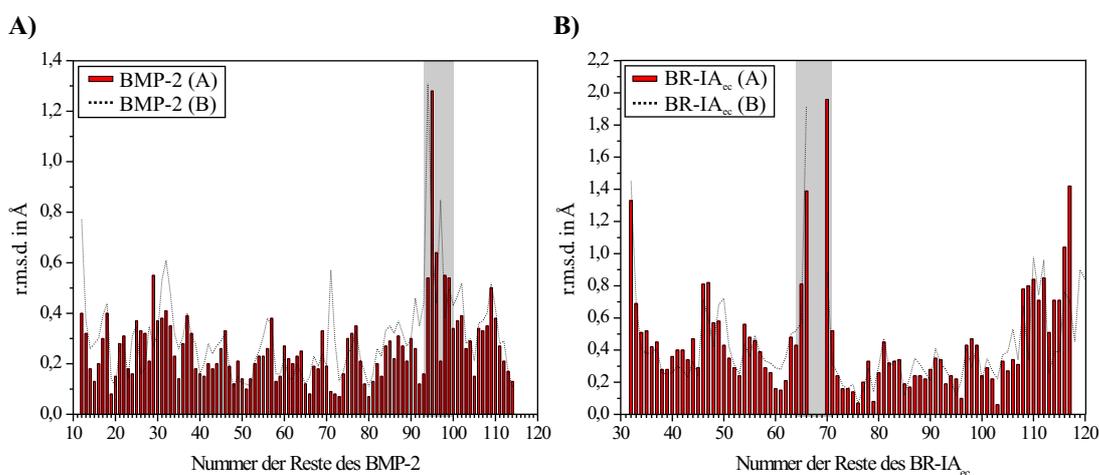
Die Abbildung wurde unter Verwendung der Programme *BOBSCRIPT* [ESNOUF, 1997] und *Raster3D* [MERRITT and BACON, 1997] erstellt.

Die besondere Position im Zentrum der Interaktionsfläche, sowie deren Lage in einem H-Brücken-Netzwerk mit Wassermolekülen in einer vorwiegend hydrophoben Umgebung machen diese Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Leu51 und Gln86 womöglich zur gesuchten Hauptdeterminate, dem so genannten „Hot Spot“ [BOGAN and THORN, 1998] der Wechselwirkung im BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex.

## IV Diskussion der Ergebnisse

### IV.1 Im Vergleich: Die Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes in 1,9Å und 2,9Å Auflösung

Der Vergleich der Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bei 1,9Å ergab keine wesentlichen Unterschiede zu der von KIRSCH *et al.* [2000c] mit einer Auflösung von 2,9Å gelösten Kristallstruktur dieses Komplexes. Dies konnte durch die Bestimmung des r.m.s.d-Werts von 0,43Å für die Abweichung aller Reste bei Überlagerung beider Komplexe belegt werden. Dennoch wurden mit einer detaillierten Analyse sowohl für die Monomere von BMP-2 als auch für die extrazellulären Domänen des BMP Typ IA Rezeptors Abschnitte ermittelt in den sich beide Strukturen deutlicher voneinander unterscheiden.

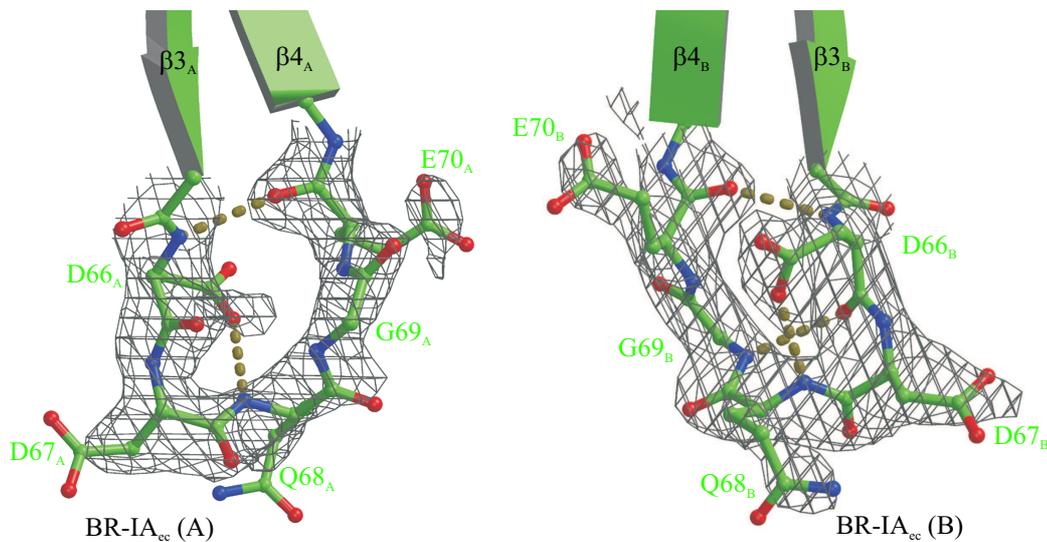


**Abbildung IV.1:** Vergleich der Kristallstrukturen des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bei 2,9Å [KIRSCH *et al.*, 2000c] und bei 1,9Å Auflösung. Darstellung als r.m.s.d.-Wert über der Nummer des jeweiligen Restes. **A)** Strukturelle Abweichung im BMP-2. **B)** Strukturelle Abweichung im BR-IA<sub>ec</sub>. Die Größe der Abweichung ist jeweils nur für ein Monomer als roter Balken (BMP-2(A) und BR-IA<sub>ec</sub>(A)) und für das zweite Monomer (BMP-2(B) und BR-IA<sub>ec</sub>(B)) als gepunktete schwarze Linie wiedergegeben. Bereich besonderer Abweichung sind jeweils grau hinterlegt.

Eine graphische Darstellung dieser Analyse ist mit Abbildung IV.1 wiedergegeben, wobei die Abweichung als r.m.s.d.-Wert über dem jeweiligen Rest aufgetragen und die Bereiche mit größeren Unterschieden jeweils grau unterlegt sind. Für das BMP-2 zeigen sich strukturellen Unterschiede hauptsächlich im Abschnitt zwischen den Resten Glu94 bis Val99 in Schleife L4 an der Spitze des

Fingers 2 (siehe hierfür auch Abbildung III.72 Bildteil A)). Die größte Abweichung mit einem r.m.s.d.-Wert von 1,3Å wies dabei der Rest Asn95, beziehungsweise der Rest Glu94 im zweiten Monomer des BMP-2 auf (siehe Abbildung IV.1, Darstellung der r.m.s.d.-Werte für das BMP-2(B) als gepunktete Linie).

Im Vergleich der Strukturen von BR-IA<sub>ec</sub> waren, wie aus Abbildung IV.1 Bildteil B) ersichtlich, neben den N- und C-Termini besonders der Abschnitt zwischen den Resten Glu65 bis Thr71 voneinander verschieden. Diese Abweichung resultierte aus der Abwesenheit struktureller Information für die Reste Asp67 bis Gly69 von BR-IA<sub>ec</sub> im BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex bei 2,9Å. Wie in Abbildung IV.2 dargestellt, konnten diese Reste jedoch in der bei einer Auflösung von 1,9Å verfeinerten Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes eindeutig bestimmt werden.



**Abbildung IV.2:** Struktur von BR-IA<sub>ec</sub> im Ausschnitt der Schleife L3.

Der Bereich der Reste Asp66 bis Glu70 ist in zusätzlich mit der einhüllenden Elektronendichtekarte  $2F_{obs}-F_{calc}$  bei  $1\sigma$  umgeben.

Die Abbildung wurde unter Verwendung der Programme *BOBSCRIPT* [ESNOUF, 1997] und *Raster3D* [MERRITT and BACON, 1997] erstellt.

Abbildung IV.2 zeigt hierfür den BR-IA<sub>ec</sub> im Ausschnitt der Schleife L3 zwischen den Resten Asp66 bis Glu70. Die Genauigkeit der Position der Aminosäuren wird dabei durch die Qualität der Elektronendichte bestimmt. Trotz einer erwarteten hohen Flexibilität innerhalb dieses Abschnitts war diese dennoch sehr präzise, was mit der in Abbildung IV.2 dargestellten einhüllende  $2F_{obs}-F_{calc}$  Elektronendichtekarte bei  $1\sigma$  belegt werden konnte.

Zusammenfassend besteht die bei einer Auflösung von 1,9Å verfeinerte Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes somit aus 381 Aminosäuren. Hierbei entfallen auf jedes Monomer von BMP-2 jeweils 103 Reste, da jeweils N-terminal die Sequenz des reifen Teils des BMP-2 strukturell erst ab dem Rest Ser12 definiert werden konnte. Die Elektronendichte für beide extrazellulären Domänen des BMP Typ IA Rezeptors startet N-terminal ab Rest Thr32. C-terminal endet sie für den BR-IA<sub>ec</sub>(A) bei Rest Pro117, wohingegen sie im BR-IA<sub>ec</sub>(B) bis zum Rest Ile120 verfolgt werden konnte. Die Länge des BR-IA<sub>ec</sub> in der Kristallstruktur umfasst daher einmal 86 (BR-IA<sub>ec</sub>(A)) und einmal 89 (BR-IA<sub>ec</sub>(B)) Aminosäuren.

## IV.2 Der „Hot Spot“ der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion

### IV.2.1 Die strukturelle und funktionelle Analyse des Netzwerkes von Wasserstoff-Brückenbindungen

Die strukturelle Interpretation des bei einer Auflösung von 1,9Å verfeinerten Modells des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes ermöglichte die Bestimmung eines Netzwerk aus zehn Wasserstoff-Brückenbindungen (siehe Kapitel III.7.3). Die von diesen H-Brücken getragene Wechselwirkung stellt dabei eine Ergänzung zu der von KIRSCH *et al.* [2000b] und KIRSCH *et al.* [2000b] bereits als überwiegend hydrophob charakterisierte BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion dar.

Das Netzwerk der Wasserstoff-Brückenbindungen erstreckt sich über die gesamte Interaktionsfläche, wobei durchschnittlich eine H-Brücke pro 115Å<sup>2</sup> auftritt. Sowohl die Anzahl [LO CONTE *et al.*, 1999; XU *et al.*, 1997] als auch deren Häufigkeit in der Kontaktfläche [JONES and THORNTON, 1996] entsprechen dabei Daten wie sie ebenfalls für andere Protein-Protein Kontaktflächen ermittelt werden konnten. Bemerkenswert erscheint dagegen die Verteilung in der Beteiligung von Haupt- und Seitenkettenatomen als Donor- bzw. Akzeptorgruppen dieser Wasserstoff-Brückenbindungen. Wie aus Tabelle III.32 in Kapitel III.7.3 hervor geht, sind an 70% aller H-Brücken in der Bindungsfläche Hauptkettenatome beteiligt. Die H-Brücken der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion erscheint daher als eine weitere Ausnahme des allgemeinen Aufbaus von Wasserstoff-Brückenbindungen in Protein-Protein Interaktionsflächen, welche nach VESELOVSKY *et al.* [2002] zu 76% von Seitenkettenatomen gebildet werden. Eine Erklärung für diese deutlich vom allgemeinen Aufbau abweichenden Zusammensetzung kann mit dem hohen Anteil von 50% an H-Brücken des Typs HK-SK (siehe Tabelle III.32) gegeben werden. Durchschnittlich stellt dieser Typ nur 35,4% der Wasserstoff-Brückenbindungen einer Interaktionsfläche [XU *et al.*, 1997]. Ebenfalls unterhalb des Mittelwerts von 39,3% liegt mit nur 30% der Anteil der SK-SK H-Brücke [XU *et al.*, 1997]. Lediglich die ausschliesslich von Hauptkettenatomen ausgehenden Wasserstoff-Brückenbindungen (HK-HK) treten mit 20% in durchschnittlicher Häufigkeit (22,6% entsprechend [XU *et al.*, 1997]) in der Interaktionsfläche auf.

Die weitere Analyse der geometrische Charakteristika, wie Abstand und Winkel der Donor- und Akzeptoratome zueinander, führte entgegen der Erwartung nicht zur Diskriminierung der Wasserstoff-Brückenbindungen hinsichtlich ihres Beitrags zur Bindungsenergie. So bestätigten, wie bereits in Kapitel III.7.3 beschrieben, der Donor-Akzeptor-Atomabstand, sowie der Winkel zwischen dem Donor-, Akzeptor- und dem C<sub>α</sub>-Atom (D-A-C<sub>α</sub> Winkel) lediglich die Mittelwerte für die entsprechenden Typ der H-Brücke (siehe Tabelle III.32 und [XU *et al.*, 1997]).

Die weiterführende Unterscheidung wurde hingegen mit der Analyse der Oberflächenzugänglichkeit der Donor- und Akzeptorgruppen im Komplex erreicht. Sie ermöglicht eine allgemeine Charakterisierung der Interaktionsfläche, indem die Reste mit niedriger Zugänglichkeit „residual accessibility“ dem Zentrum und diejenigen mit höherer Zugänglichkeit dem Rand der Kontaktfläche zugeordnet werden [LO CONTE *et al.*, 1999] können. Mit der Anwendung dieser Analyse auf die BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Interaktionsfläche wurde für die an der Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligten Reste Tyr103, Leu51 und Trp28 des BMP-2 und Thr55, Cys77, Gln86 und Ser90 von BR-IA<sub>ec</sub> eine Abschirmung vom Lösungsmittel nach Komplexbildung mit einem Wert >80% bestimmt (siehe Abbildung III.78 in Kapitel III.7.3). Aufgrund des von CHAKRABARTI and JANIN [2002] gezeigten Zusammenhangs zwischen der Lage eines Restes im Zentrum der Interaktionsfläche und dessen möglicher Eigenschaft als so genannter „Hot Spots“ der Bindungsenergie [BOGAN and THORN, 1998] konnte daher vermutet werden, dass zumindest den Wasserstoff-Brückenbindungen Leu51 (N) : Gln86 (OE1)

und Leu51 (O) : Gln86 (NE1) ein besondere Bedeutung für die BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Interaktion zukommt.

Der durch strukturelle Interpretation postulierte Einfluss von Wasserstoff-Brückenbindung auf die BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion kann jedoch nur mittels funktioneller Analysen bestätigt werden. Der Beitrag einzelner H-Brücken zur Bindungsaffinität des Komplexes wurde daher unter Verwendung der BIAcore-Interaktionsanalyse für zwei Arten von Varianten des BMP-2, wie auch des BR-IA<sub>ec</sub> ermittelt. Bei diesen Varianten handelte es sich um Alanin- bzw. Prolin-Substitutionen von entsprechenden Resten deren Seiten- bzw. Hauptkettenatome an der Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen in der Interaktionsfläche beteiligt waren. Eine Zusammenstellung der Bindungskonstanten dieser Varianten ist in Tabelle IV.1 wiedergegeben und wurden von Herrn Prof. Dr. W. Sebald für diese Diskussion zur Verfügung gestellt.

Der Verlust der Wasserstoff-Brückenbindungen am Rand der Interaktionsfläche, welche mit den Varianten W28F, D53A und Y103A erzielt werden konnte, zeigen erwartungsgemäß nur einen geringen Effekt auf die Bindungsaffinität. Demgegenüber wurde für die besondere Bedeutung der H-Brücken aus dem Zentrum der Bindungsfläche bestätigt. Beide Varianten D53P und L51P weisen eine deutlich verringerte Affinität zum Typ I Rezeptor auf, wobei die Dissoziationskonstante  $K_D$  für D53P 53-fach erhöht, und die für L51P sogar über 8000-fach erhöht ist im Vergleich zu der des wildtypischen BMP-2 (siehe Tabelle IV.1).

Die Wechselwirkung zu Typ II Rezeptoren wie ActR-II<sub>ec</sub>, ActR-IIB<sub>ec</sub> und BR-II<sub>ec</sub> blieb dagegen von den entsprechenden Mutationen unbeeinflusst (siehe Tabelle IV.1). Die  $K_D$ -Werte für die jeweiligen Varianten entsprechen denen von wildtypischem BMP-2 und belegen, dass mit dem Aminosäureaustausch die Gesamtstruktur des Liganden nicht wesentlich geändert wurde.

**Tabelle IV.1:** Bindungskonstanten  $K_D$  für Varianten von BMP-2 gegenüber dem wildtypischen BR-IA<sub>ec</sub>, sowie für die Varianten von BR-IA<sub>ec</sub> gegenüber BMP-2 (wt). (Daten wurden von Herrn Prof. Dr. W. Sebald zur Verfügung gestellt; siehe auch KELLER *et al.* [2004].)

Ligand	Apparente $K_D$ [nM] für immobilisierte extrazelluläre Rezeptordomänen:		
	BR-IA <sub>ec</sub>	BR-IB <sub>ec</sub>	ActR-II <sub>ec</sub>
BMP-2 (wt)	0,9 ± 0,1	3,6 ± 4	14 ± 2
BMP-2 W28F	2,8 ± 1	4,7 ± 2	23 ± 9
BMP-2 L51P †)	>7000	>4000	35 ± 8
BMP-2 D53A	0,8 ± 0,4	1,2 ± 0,7	17 ± 1
BMP-2 D53P	48 ± 3	37 ± 4	17 ± 6
BMP-2 S69R	15 ± 5	n.b.	13 ± 1
BMP-2 Y103A	7 ± 3	12 ± 5	20 ± 2
	BR-IA <sub>ec</sub> Q86A	BR-IA <sub>ec</sub> S90A	BR-IA <sub>ec</sub> Q94P
BMP-2 (wt)	80 ± 21	2,2 ± 0,7	2,8 ± 0,3

†) Die Dissoziationskonstante für BMP-2 L51P wurde aus der Bindung im Equilibrium unter Verwendung folgender Gleichung:  $K_D(\text{apparent}) = ((RU_{max} - RU)/RU) \cdot \text{Konzentration}$ ; mit  $RU$ , „resonance unit“ ermittelt.

Zur Ermittlung der Bindungsdeterminanten des BMP Typ IA Rezeptors wurden die Rezeptor-Varianten Q86A, S90A und Q94P unter Verwendung der BIAcore-Technik analysiert (siehe Tabelle IV.1). Die  $K_D$ -Werte für S90A und Q94P liegen hierbei nur ungefähr dreimal höher als die des wildtypischen BR-IA<sub>ec</sub>, was den geringeren Einfluss der peripheren H-Brücken auf die Bindungsaffinität der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion nochmals belegt. Für die Variante Q86A wurde dagegen ein 89-fach erhöhter  $K_D$ -Wert gemessen. Diese drastische Verringerung der Bindungsaffinität beruht hierbei auf dem Verlust zweier Wasserstoff-Brückenbindungen zum Leu51 des BMP-2, deren Bedeutung für

die Wechselwirkung bereits gezeigt werden konnte.

Der Beitrag der einzelnen Wasserstoff-Brückenbindungen zur Bindungsenergie lässt sich als Änderung der Freien Bindungsenergie entsprechend Gleichung IV.1 beschreiben.

$$\Delta\Delta G_0 = RT \ln \frac{K_D^{(Variante)}}{K_D^{(wt)}} \quad (\text{IV.1})$$

Reste, deren Anteil an der Bindungsenergie durch Mutation mit  $> 2\text{kcal mol}^{-1}$  bestimmt werden, stellen hierbei einen „Hot Spot“ der Bindung dar [BOGAN and THORN, 1998]. Die drei H-Brücken, BMP-2 Leu51 (N) : BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (OE1), BMP-2 Leu51 (O) : BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (NE1) und BMP-2 Asp53 (N) : BR-IA<sub>ec</sub> Cys77 (O) erfüllen dieses Kriterium. Den größten Effekt auf die freie Bindungsenergie zeigt hierbei mit  $\Delta\Delta G_0 = 5\text{kcal mol}^{-1}$  ( $= 21\text{kJ mol}^{-1}$ ) die BMP-2 Variante L51P. Im Vergleich mit Literaturdaten entspricht dieser Wert dem Verlust von zwei ungeladenen beziehungsweise einer geladenen Wasserstoff-Brückenbindung, welcher von FERSHT *et al.* [1985], SHIRLEY *et al.* [1992] und BYRNE *et al.* [1995] mit einer Verringerung der Bindungsenergie von durchschnittlich  $4\text{kcal mol}^{-1}$  angegeben ist. Gleichzeitig betrug der Verlust an freier Bindungsenergie nach Deletion beider zwischen BMP-2 Leu51 und BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 befindlicher Wasserstoff-Brückenbindungen (Variante BR-IA<sub>ec</sub> Q86A) mit  $\Delta\Delta G_0 = 2,5\text{kcal mol}^{-1}$  ( $= 10,5\text{kJ mol}^{-1}$ ) jedoch nur die Hälfte des für die Variante BMP-2 L51P ermittelten Wertes. Es ist daher denkbar, dass der Verlust der Donor- bzw. Akzeptorgruppe des Gln86 (BR-IA<sub>ec</sub>) für diese Wasserstoff-Brückenbindungen teilweise von benachbarten Seitenketten, wie denen des Lys79, Glu81 oder des Asp89 kompensiert werden kann. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass der Einbau eines Prolins an Position 51 in der Prä-Helix Schleife L2 des BMP-2 zu einer Beeinflussung der Konformation benachbarter Reste führt. In dessen Folge könnten benachbarte Wechselwirkungen, wie zum Beispiel die des Asp53 ebenfalls von dieser Mutation betroffen sein. Die stärkere Verringerung der Bindungsaffinität, wie sie für BMP-2 L51P beobachtet wurde, wäre dann als Folge des Verlustes einer Summe von Wechselwirkungen zu interpretieren.

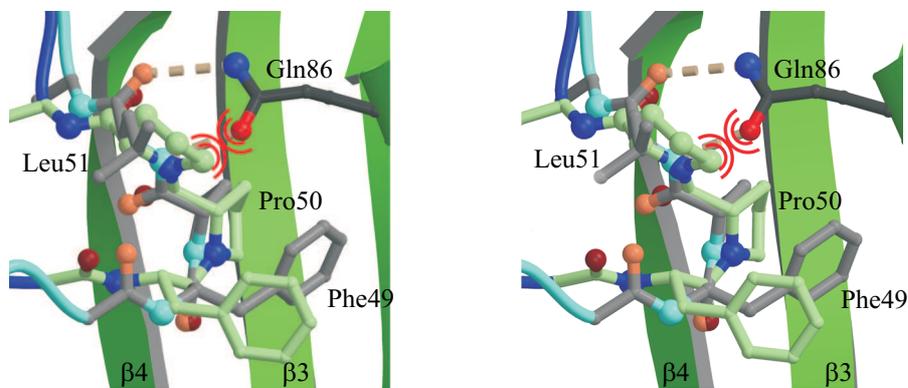
Mit der funktionellen Analyse des Netzwerkes von Wasserstoff-Brückenbindungen in der Interaktionsfläche des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bei  $1,9\text{\AA}$  Auflösung konnten die drei H-Brücken: BMP-2 Leu51 (N) : BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (OE1), BMP-2 Leu51 (O) : BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (NE1) und BMP-2 Asp53 (N) : BR-IA<sub>ec</sub> Cys77 (O) als die Hauptdeterminanten der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Wechselwirkung bestimmt werden. Ihre funktionelle Bedeutung für die Ligand-Rezeptor Interaktion deckt sich dabei mit der Position ihrer an den Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligten Donor- und Akzeptorgruppen im Zentrum der Protein-Protein Kontaktfläche. Zusätzlich ergab die Mutationsanalyse, dass sich die BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Wechselwirkung bestimmende Interaktion nicht, wie zunächst von KIRSCH *et al.* [2000a] und HATTA *et al.* [2000] angenommen, innerhalb der Gruppe von hydrophoben Interaktionen befindet. Vielmehr erzeugen die 15 hydrophoben Seitenketten in der Kontaktfläche eine mehrheitlich hydrophobe Umgebung, welche die Ausbildung des Netzwerkes von Wasserstoff-Brückenbindungen energetisch begünstigt.

## IV.2.2 Die Bedeutung der Prä-Helix Schleife L2 von BMP-2 für die Ligand-Rezeptor Interaktion

Der Einfluss der Prolin-Substitution an Position Leu51 für die allgemeine Struktur des BMP-2 konnte auch röntgenkristallographisch überprüft werden. Die entsprechende Kristallstrukturanalyse der Variante BMP-2 L51P wurde von Herrn Dr. T.D. Müller durchgeführt. Der Vergleich mit der Struktur des wildtypischen BMP-2 [SCHEUFLER *et al.*, 1999] ergab keine wesentlichen Unterschiede, was mit einem mittleren r.m.s.d.-Wert von  $0,6\text{\AA}$  für die überlagerten C<sub>α</sub>-Ketten belegt werden konnte. Die

größten Abweichungen befanden sich erwartungsgemäß im Bereich der Prä-Helix Schleife L2 zwischen den Resten Pro48 bis His54. Die maximale Differenz wurde für die Position des  $C_{\alpha}$ -Atoms des Restes Ala52 mit  $1,8\text{\AA}$  bestimmt (Dr. T.D. Müller, persönliche Mitteilung). Die Analyse, besonders der Seitenkettenkonformation, wurde jedoch durch die schwach ausgeprägte Elektronendichtekarte in diesem Bereich erschwert. So konnten für einige Seitenketten keine Elektronendichte für  $\leq 1\sigma$  beobachtet werden. Dies galt für entsprechende Reste sowohl in der Struktur des BMP-2 (wt), als auch der Variante BMP-2 L51P. Weiterhin war die  $C_{\alpha}$ -Kette in diesem Bereich für beide Strukturen durch die insgesamt höchsten Temperaturfaktoren gekennzeichnet, was auf eine hohe Flexibilität bzw. Dynamik der Prä-Helix Schleife L2 schließen lässt.

Vor dem Hintergrund dieser gezeigten Beweglichkeit der Prä-Helix Schleife L2 im BMP-2 erscheint eine schlüssige Begründung für den stärkeren Effekt der BMP-2 L51P Mutation auf die Bindungsenergie der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion schwierig. Die Überlagerung der Struktur der Variante des BMP-2 L51P mit der des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes, wie sie in Abbildung IV.1 dargestellt ist zeigt, dass die Seitenkette des Prolin in Position 51 das Volumen der Wasserstoff-Brückenbindung zwischen der Amidgruppe des BMP-2 Leu51(wt) und der Carbonylgruppe von BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 füllt. Aufgrund der räumlichen Größe des Prolin-Restes erzeugt sie jedoch eine sterische Behinderung für die Seitenkette von BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (siehe Abbildung IV.3). Um den Kontakt zu vermeiden, müsste der Prolin-Ring daher weiter zurück gedrückt werden. Dies würde jedoch, aufgrund der starren Verknüpfung des Prolin-Rings mit der Carbonylgruppe, die Carbonylgruppe von Pro50 zum Gln86 (BR-IA<sub>ec</sub>) hinbewegen und seinerseits eine neue Behinderung erzeugen. Die Struktur der Variante BMP-2 L51P kann daher durchaus als Modell zur Erläuterung des stärkeren Einfluss der Prolin-Substitution des Leu51 im BMP-2 gegenüber einer Alanin-Substitution des Gln86 im BR-IA<sub>ec</sub> verwendet werden.



**Abbildung IV.3:** Stereoabbildung der Prä-Helix Schleife L2 im BMP-2.

Überlagerte Darstellung der Kristallstrukturen der BMP-2 Variante L51P (Farbgebung: N, blau; O, rot; C, hellgrün) mit der im Komplex mit BR-IA<sub>ec</sub> gebundenen wildtypischen BMP-2 (Farbgebung: N, hellblau; O, orange; C, grau). Die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen BMP-2 Leu51 (wt) und BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 sind mit einer gelben gestrichelten Linie angedeutet. Eine möglich sterische Behinderung aufgrund der zum Gln86 (BR-IA<sub>ec</sub>) zugewandten Seitenkette des Pro51 nach Substitution des BMP-2 Leu51 (wt) ist mittels roter Ringe hervorgehoben. (Die Abbildung wurde von Herrn Dr. T.D. Müller zur Verfügung gestellt; siehe auch KELLER *et al.* [2004].)

Im Komplex mit dem BMP Typ IA Rezeptor wird die Flexibilität der Prä-Helix Schleife L2 dagegen eingeschränkt. Reduzierte Temperaturfaktoren, sowie eine sehr genaue Elektronendichtekarte für diese Region im BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex (siehe Abbildung III.79 in Kapitel III.7.3)

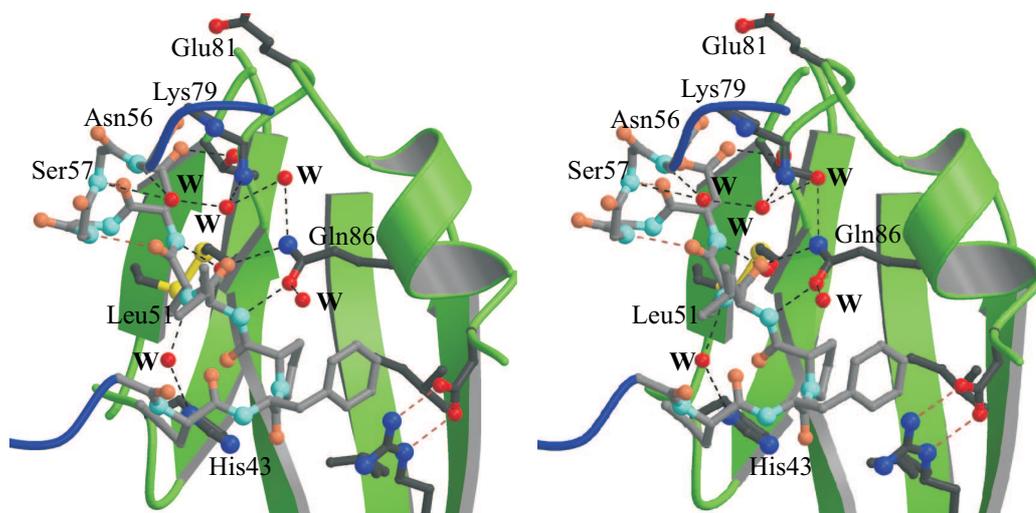
belegen die nunmehr starre Struktur der Schleife. Die strukturelle Änderung zwischen dem freien und dem gebundenen wildtypischen BMP-2 weist dabei die gleiche Größenordnung auf wie sie zwischen BMP-2(wt) und der Variante BMP-2 L51P beobachtet wurde.

Es kann daher angenommen werden, dass die Prä-Helix Schleife L2 im ungebundenen BMP-2 weder vorgeformt noch starr ist, sondern sich im Gegenteil der entsprechenden Rezeptor-Bindungsfläche anpassen kann. Diese Vermutung wird dabei durch die Tatsache gestützt, dass die Strukturdaten und Temperaturfaktoren entsprechender Schleifen-Regionen anderer Mitglieder der BMP-Familie, wie des freien BMP-7 [GREENWALD *et al.*, 2003; GRIFFITH *et al.*, 1996], des BMP-6 oder GDF-5 (Dr. T.D. Müller, persönliche Mitteilung) ähnlich hohe Mobilität erkennen lassen.

Des Weiteren lassen die kinetischen Daten der Komplexbildung eine durch die Rezeptorbindung induzierte Adaption des Liganden vermuten. So ist die Bindung des BMP-2 an den BR-IA<sub>ec</sub> mit einer Assoziationskonstanten von  $k_{on}$  zwischen  $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  eine im Vergleich zu anderen Ligand-Rezeptor-Interaktionen verhältnismäßig langsame Komplexbildung. Auch konnte gezeigt werden, dass die Alanin-Substitution der Reste Phe49 und Pro50 in der Prä-Helix Schleife L2 von BMP-2 ausschließlich die Assoziationsrate der Komplexbildung beeinflusst [KIRSCH *et al.*, 2000a]. Dagegen wird die Dissoziationsrate, welche mit der thermodynamischen Stabilität des Komplexes korreliert, von diesen Mutationen nicht beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass beide Reste welche in eine hydrophobe Spalte nahe den Resten Ile62 und Ile99 von BR-IA<sub>ec</sub> binden, dafür benötigt werden die Prä-Helix Schleife L2 in einer für die Ausbildung des H-Brückennetzwerkes richtigen Position zu fixieren.

### IV.2.3 Die Bedeutung von Wassermolekülen in der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Interaktionsfläche

Ein weiteres herausragendes Merkmal der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Interaktionsfläche besteht in der geringen Anzahl von Wassermolekülen. Lediglich vier Wassermoleküle sind zwischen BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub> eingeschlossen. Wie bereits in Kapitel III.7.3 beschrieben, befinden sie sich in Hohlräumen ober- und unterhalb der Seitenkette von BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (siehe auch Abbildung III.78 und insbesondere Abbil-



**Abbildung IV.4:** Stereoabbildung des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Bindungs epitops. Darstellung des Netzwerkes an Wasserstoff-Brückenbindungen unter Beteiligung der in der Interaktionsfläche eingeschlossenen Wasser (rote Kugeln).

Die Prä-Helix Schleife L2 des BMP-2 (blau) ist für die Reste Pro48 bis Asp53 in der „ball and stick“ Darstellung wiedergegeben. Die Sekundärstruktur von BR-IA<sub>ec</sub> ist in grün abgebildet und nur die Seitenketten der an der Interaktion beteiligten Reste in der „ball and stick“ Darstellung hervorgehoben. Die Wasserstoff-Brückenbindungen sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet.

Die Abbildung wurde unter Verwendung der Programme *MOLSCRIPT* [KRAULIS, 1991] und *Raster3D* [MERRITT and BACON, 1997] erstellt.

dung IV.4). Ihre Bedeutung für die Ligand-Rezeptor Interaktionen besteht dabei zunächst in der Stabilisierung der Wechselwirkung durch die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoff-Brückenbindungen [JANIN, 1999]. So zeigt Abbildung IV.4 wie über die drei Wassermoleküle oberhalb von BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 eine zusätzliche Verbrückung zwischen den Resten Asn56 und Ser57 des BMP-2 und der Seitenkette von BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 hergestellt wird.

Eine weitere Aufgabe von Wassermolekülen in Protein-Protein Interaktionsflächen besteht in der Modulation von Ladungs- und Oberflächenkomplementarität [LI *et al.*, 2000]. Aufgrund der Promiskuität der Ligand-Rezeptor Interaktion, wie sie in der TGF- $\beta$  Superfamilie beobachtet werden kann, bedeuten Wassermoleküle somit eine Möglichkeit für eine schnelle Anpassung an veränderte Zusammensetzungen in Bezug auf Ladung und Oberflächenstruktur für die verschiedenen beobachteten Ligand-Rezeptor Komplexe.

### IV.3 Die Präparation und Kristallisation weiterer binärer Ligand-Rezeptor Komplexe

Wie bereits dargestellt sind die Ligand-Rezeptor Interaktionen der einzelnen Mitglieder der Gruppe des BMPs und GDFs durch individuelle Spezifität und Affinität gekennzeichnet. So unterschieden sich diesbezüglich Ligand-Typ I und Ligand-Typ II Rezeptor Wechselwirkungen, aber auch die verschiedenen Kombinationen von Ligand-Typ I Rezeptor oder Ligand-Typ II Rezeptor Interaktionen. Sie bilden zudem die Grundlage für die Promiskuität, welche die Vielzahl der qualitativen, aber auch quantitativen Unterschiede in den zellulären Antworten erklären kann (siehe auch Kapitel I.1).

Trotz der großen Bedeutung dieser primären Schritte der Rezeptor-Aktivierung für das Verständnis der Signalvermittlung erscheinen die molekulare Grundlagen der Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen nach wie vor lückenhaft. Das molekulare Prinzip für die hochaffine Wechselwirkung zwischen einem BMP-Liganden und seinem Typ I Rezeptor konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand der Kristallstruktur- und Mutationsanalyse des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes vorgestellt werden. Es sollte darüber hinaus durch den Strukturvergleich mit weiteren Ligand-Rezeptoren Komplexen der BMP/GDF-Familie ergänzt und überprüft werden. Insbesondere die molekulare Basis für die unterschiedlichen Affinität der Liganden BMP-2, BMP-6 und GDF-5 zu den beiden BMP Typ I Rezeptoren BR-IA und BR-IB sollte im Mittelpunkt der Strukturanalyse stehen.

Die mittels BIAcore Interaktionsanalyse gemessenen Affinitäten sind in Tabelle III.10 des Kapitels III.3 für jeweils die entsprechenden Ligand : BR-IA<sub>ec</sub> oder Ligand : BR-IB<sub>ec</sub> Komplexe gegenübergestellt. BMP-2 bindet demnach, in Übereinstimmung mit den Literaturdaten bevorzugt an den BR-IA<sub>ec</sub> und mit verminderter Affinität an den BR-IB<sub>ec</sub> [KIRSCH *et al.*, 2000a; KOENIG *et al.*, 1994]. Im Fall von GDF-5 sind die Präferenzen in der Rezeptorbindung dagegen umgekehrt. Hier wird der BR-IB<sub>ec</sub> mit hoher und der BR-IA<sub>ec</sub> mit geringer Affinität gebunden. Dies bestätigt einerseits die Bedeutung von BR-IB<sub>ec</sub> als Signalrezeptor für das GDF-5, andererseits liefert der  $K_D$ -Wert von  $3,3\mu\text{M}$  für die GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Interaktion (in Lösung) eine mögliche Begründung weshalb der BMP-Typ

IA Rezeptor bisher in keinem Signalkomplex mittels Quervernetzungs-Experimenten nachgewiesen werden konnte [NISHITOH *et al.*, 1996]. Keine Bevorzugung für einen der beiden Typ I Rezeptoren zeigt hingegen das BMP-6. Es bindet an beide BMP Typ I Rezeptoren [EBISAWA *et al.*, 1999], wobei die vergleichsweise geringe Affinität dieser Typ I Rezeptor Wechselwirkung in der Größenordnung der der Typ II Rezeptor Interaktion entspricht (siehe ebenfalls Tabelle III.10 in Kapitel III.3).

Trotz unterschiedlicher Affinitäten verfügen alle drei Liganden über die Möglichkeit beide BMP Typ I Rezeptor zu binden, was auf einen für diese Rezeptoren spezifischen, gemeinsamen Erkennungsmechanismus hindeutet. Für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex konnte, wie bereits beschrieben die Hauptdeterminanten der Wechselwirkung in einem Netzwerk von zehn Wasserstoff-Brückenbindung ermittelt werden, wobei die von BMP-2 Leu51 ausgehenden H-Brücken den „Hot Spot“ der Bindung darstellen und in allen Liganden (BMP-2/4, GDF-5/6/7 und BMP-6/7) die mit den BMP Typ I Rezeptoren interagieren invariant erscheint. Deutlichere Unterschiede zeigen sich dagegen für BMP-2, GDF-5 und BMP-6 beim Vergleich der Aminosäuresequenz und der Kristallstrukturen (freie Liganden) für die Prä-Helix Schleifen (Dr. T.D. Müller, persönliche Mitteilung). Es ist daher denkbar, dass jeder dieser Liganden die BMP-Typ I Rezeptoren im „wrist“-Epitop über eine vom Rest Leu51 ausgehende primäre Interaktion bindet. Darüber hinaus resultieren die gezeigten individuellen Ligand-Rezeptor Affinitäten wahrscheinlich aus qualitativ und quantitativ voneinander verschiedenen sekundären Kontakten innerhalb des Bindungsepitops, wobei sowohl Wasserstoff-Brückenbindungen als auch hydrophobe Kontakte von Bedeutung sein dürften.

Das vorgestellte Modell der BMP/GDF : Typ I Rezeptor Interaktion kann zudem auch mit einem Sequenzvergleich der BMP-Typ I Rezeptoren weiter belegt werden (siehe hierfür auch Abbildung IV.5). Beide Rezeptoren BR-IA<sub>ec</sub> und BR-IB<sub>ec</sub> teilen in diesem Bereich 50% identische Aminosäuren, wobei der für die zentrale Wasserstoff-Brückenbindung wichtige Rest Gln86 ebenfalls invariant ist. Experimentelle Bestätigung für die Bedeutung des Netzwerks der Wasserstoff-Brückenbindung auch für die Interaktion zum BR-IB<sub>ec</sub> konnte zudem mit den BIAcore-Messungen der Varianten von BMP-2 erhalten werden. Wie in Tabelle IV.1 dargestellt, weisen diese Varianten trotz des Unterschieds im absoluten Wert der Affinität von BMP-2 zum BR-IB<sub>ec</sub> den gleichen Effekt auf die Bindungsaffinität auf. Damit wird die Interaktion von BMP-2 zum BR-IA<sub>ec</sub>, wie auch zum BR-IB<sub>ec</sub> von den gleichen Determinanten getragen.

Auf Grundlage der Bindungsstudien wurden alle weiteren Kombinationen an Typ I Rezeptorkomplexen für die Kristallstrukturanalyse präpariert (siehe Kapitel III.4). Die Bildung der entsprechenden Komplexe wurde dabei durch eine hohe Affinität zwischen Ligand und Rezeptor begünstigt. So konnten der BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub>, der BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub>, der GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> sowie der BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex unter identischen Bedingungen jeweils in MES<sub>700</sub>-Puffer pH6,0 gebildet werden. Dagegen machte die vergleichsweise geringe Affinität zwischen GDF-5 und BR-IA<sub>ec</sub> ein Modifikation der Puffer-Bedingungen hin zu Tris<sub>500</sub>-Puffer pH8,5 notwendig. Neben der Affinität hatte die gegensätzlichen Löslichkeitseigenschaften der einzelnen Liganden im Vergleich zu ihren Typ I Rezeptor Komplexen entscheidenden Einfluss auf die Komplexpräparation. Pufferbedingungen mit pH-Werten geringer als pH6,0 sowie der Zusatz von mehr als 0,7M NaCl oder 20%(v/v) Isopropanol konnte zwar die Löslichkeit der Liganden erhöhen, verhinderten jedoch grundsätzlich die Bildung der Komplexe sowohl zum BR-IA<sub>ec</sub> als auch zum BR-IB<sub>ec</sub>. Das Lösungsverhalten der einzelnen Ligand-Rezeptor Komplexe wurde hingegen von Puffern mit einem pH-Wert größer pH6,0 begünstigt. Dies zeigt sich besonders für die Präparation der beiden BMP-2 : BMP Typ I Rezeptor Komplexe, welche in verschiedenen Puffern im pH-Bereiche zwischen pH6,0 und pH8,0 und nur 150mM NaCl bis zu 20mg ml<sup>-1</sup> konzentriert werden konnten. Höhere NaCl-Konzentrationen waren dagegen für die Bildung des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub>, und bei einem pH-Wert > pH7,4 auch für den GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex notwendig. Keine Pufferbedingung konnte hingegen für die lösliche Präparation des BMP-6

: BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes ermittelt werden. Sowohl die Verwendung von Puffern mit pH-Werten bis pH9,5 als auch der Zusatz von 1M NaCl führte stets zur Präzipitation des Komplexes während der Konzentrierung des Ansatzes. Der BMP-6 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex war damit der einzige der sechs möglichen Ligand : BMP Typ I Rezeptor Komplexe, welcher nicht zur Kristallisation eingesetzt werden konnte.

Die Kristallisation der Ligand-Rezeptor Komplexe erfolgte nach der Dampfdiffusions-Methode im hängenden Tropfen (siehe auch Kapitel II.14). Die Ergebnisse der einzelnen initialen Kristallisations-Screens, sowie die Optimierung der so ermittelten Kristallisationsbedingungen sind in Kapitel III.5 zusammengestellt.

Die am Beginn der entsprechenden Abschnitte aufgeführten Tabellen zeigen jeweils das Resultat des initialen Kristallisations-Screens und belegen, dass für jeden der Ligand : BMP Typ I Rezeptor Komplexe mehrere unterschiedliche Kristallisationsbedingungen ermittelt werden konnten.

Eine vergleichbare hohe Anzahl unterschiedlicher Bedingungen wurde ebenfalls in der Kristallisation des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes beobachtet. Die systematische Optimierung ergab jedoch, dass lediglich mit Imidazol-Puffer pH7,0 und Azetat als Fällungsmittel röntgenbeugungsfähige Kristalle des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes erhalten werden konnten. Alle Kristalle der verschiedenen anderen Bedingungen zeigten dagegen geringe oder, wie die aus den PEG-Bedingungen stammenden Kristalle, gar keine Röntgenbeugung (Dr. M.K. Dreyer, persönliche Mitteilung).

Die eingeschränkte Verfügbarkeit der unterschiedlichen Komplex-Proteinlösungen für die Vielzahl möglicher Kristallisationsansätze machte daher eine sorgfältige Auswahl der „richtigen“ Bedingung notwendig. Die Reihenfolge mit der die Kristallisationsbedingungen für die weitere Optimierung aus gesucht wurden, richtete sich daher nach dem Ergebnis im initialen „Matrix-Screen“ und der Zusammensetzung der Bedingung. In der ersten Auswahl wurden Kristallisationsbedingungen mit Einzelkristallen somit gegenüber denen mit Nadeln, oder Mikrokristallen, und Salz-Bedingungen gegenüber den PEG-Bedingungen bevorzugt. Nicht weiter verfolgt wurden dagegen Bedingungen mit niedrigem pH-Wert und Alkoholen als Fällungsmittel, nachdem am Beispiel der Optimierung einer entsprechenden MPD-Bedingung im Kristallisationsexperiment des BMP-6 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes gezeigt werden konnte, dass unter diesen Vorgaben die Kristallisation der freien Liganden begünstigt ist (siehe Kapitel III.5.3).

Die kristallographische Charakterisierung der unter den verschiedenen Kristallisationsbedingungen der unterschiedlichen Ligand-Rezeptor Komplexe erhaltenen Kristalle ist ebenfalls tabellarisch am Ende jedes Abschnitts in Kapitel III.5 zusammengestellt. Erwartungsgemäß bestätigten die für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex aufgezeichneten Beugungsdaten die bereits von KIRSCH *et al.* [2000b] beschriebene Raumgruppe P6<sub>5</sub>, wobei sich die Zellparameter mit  $a = b = 107,43\text{\AA}$ ;  $c = 102,25\text{\AA}$  und  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ;  $\gamma = 120^\circ$  geringfügig von den bereits bekannten unterschieden. Deutlich verbessert werden konnte hingegen die Auflösung, wobei statistisch verwertbare Reflexe bis zu  $1,86\text{\AA}$  gemessen wurden.

Die kristallographische Charakterisierung der übrigen Komplexkristalle ergab hingegen, dass sie nicht die für eine Strukturlösung ausreichende Qualität aufwiesen. So zeigten zum Beispiel die aus drei verschiedenen Kristallisationsbedingungen stammenden Kristalle des GDF-5 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes trotz ausreichender Kristalldimensionen keine Röntgenbeugung (siehe Kapitel III.5.4 Tabelle III.24). Häufiger noch schlug die kristallographische Charakterisierung jedoch aufgrund der zu geringen Auflösung der aufgezeichneten Beugungsbilder fehl. Dies galt insbesondere für die Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes (siehe Kapitel III.5.2 und III.6.2), aber auch für die GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplex-Kristalle wie im Kapitel III.5.5 und in Tabelle III.26 wiedergegeben.

Eine Verbesserung der Kristallqualität sollte in erste Linie durch die Optimierung der Kristallisations-

bedingung zu erzielen sein. Dies bedeutet zunächst die Optimierung existierender Bedingungen, wie sie zum Beispiel für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex mit der Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, MgSO<sub>4</sub><sup>-</sup> und verschiedener PEG-Bedingungen durchgeführt wurde. Eine deutliche Verbesserung konnte jedoch so nicht erreicht werden, da sich die Daten auch bei verbesserter Auflösung nicht indizieren ließen (siehe Kapitel III.6.2). Bisher nicht optimiert wurden hingegen die K,Na-Tartrat-Bedingung (siehe Tabelle III.15), deren Bedeutung als potentiell erfolgreiche Kristallisationsbedingung für den BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex ergibt sich aus der Gegenüberstellung in Tabelle IV.2. Sie zeigt, dass die verschiedenen Ligand : BMP Typ I Rezeptor Komplexen durchaus über gemeinsame Kristallisationseigenschaften verfügen. Eine derartige Ähnlichkeit in den erfolgreichen Kristallisationsbedingungen konnte hierbei bereits für die freien Liganden BMP-2 [SCHEUFLER *et al.*, 1999], BMP-6 und GDF-5 (Dr. T.D. Müller, persönliche Mitteilung) beobachtet werden.

**Tabelle IV.2:** Zusammenstellung gemeinsamer Kristallisationsbedingungen für die unterschiedlichen Ligand : BMP Typ I Rezeptor Komplexe des BMP-2 und GDF-5.

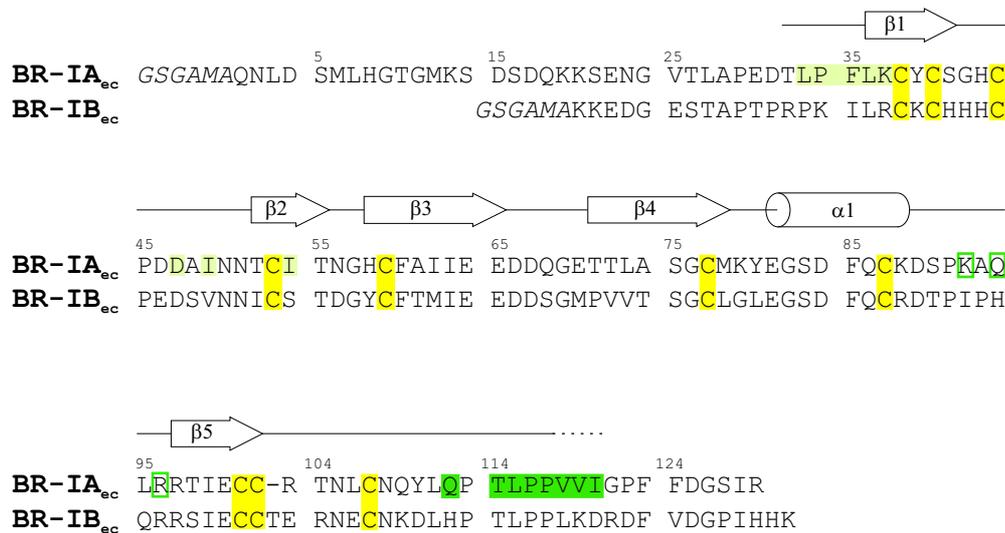
	<b>Azetat- Bedingung</b>	<b>Tartrat- Bedingung</b>	<b>PEG 8000- Bedingung</b>
BMP-2 : BR-IA <sub>ec</sub> Komplex	Imidazol pH7,0 0,9M NaOAc	Imidazol pH7,0 0,9M K,Na-Tartrat	Na-Hepes pH7,5 20% PEG 8000
BMP-2 : BR-IB <sub>ec</sub> Komplex	Na-Cacodylate pH6,5 1,4M NaOAc	Na-Hepes pH7,5 0,8M K,Na-Tartrat	Na-Hepes pH7,5 20% PEG 8000
GDF-5 : BR-IA <sub>ec</sub> Komplex	Imidazol pH7,0 1M NaOAc	kein 0,4M K,Na-Tartrat	Tris-HCl pH 8,2 5% PEG 8000
GDF-5 : BR-IB <sub>ec</sub> Komplex	Na-Cacodylate pH6,5 1,4M NaOAc	Na-Hepes pH7,5 0,8M K,Na-Tartrat	- -

Experimentell konnte eine Verbesserung der Kristallqualität mit der Anwendung der für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex erfolgreichen Azetat- und Tartrat-Bedingungen auf die Kristallisation der übrigen Ligand : BMP-Typ I Rezeptor Komplexe bisher nicht belegt werden. So wiesen die Kristalle der GDF-5 : BMP Typ I Rezeptor Komplexe aus den entsprechenden Bedingungen trotz Verfeinerung nur schlechte Beugungseigenschaften auf. Zudem konnten mit Azetat als Fällungsmittel keine Kristalle des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf*-9) Ligand-Rezeptor Komplex erhalten werden (siehe Kapitel III.5.2.1).

Eine mögliche Begründung für die unzureichende Qualität der Kristalle kann aus der Analyse der Beugungsbilder der verschiedenen Datensätze des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) Ligand-Rezeptor Komplexes abgeleitet werden. Wie im Kapitel III.6.2 dargestellt, schlug das Indizieren der Beugungsdaten fehl, da keine einheitliche Elementarzelle ermittelt werden konnte. Die Elementarzelle ergibt sich aus der symmetrisch wiederkehrenden Anordnung der Proteine im Kristallgitter, wobei die einzelnen Symmetrieäquivalente über spezifische Kristall-Kristall Kontakte in Verbindung stehen. Eine vereinzelte Variation innerhalb dieser Kontakte würde zu Fehlern im Kristallgitter führen, welche zunächst nur die Beugungsfähigkeit der entsprechenden Kristalle beeinflussen. Gravierendere Gitterfehler zerstören hingegen den regulären Aufbau der Kristalle nachhaltig womit auch eine einheitliche Elementarzelle nicht mehr möglich sein würde.

Unter der Annahme, dass die Ligand : BMP Typ IB Rezeptor Komplexe in der für den BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex gezeigten Raumgruppe P6<sub>5</sub> kristallisieren, kann die Kristallstruktur dieses Komplexes als Modell für die Beschreibung möglicher Kristall-Kristall Kontakte in den anderen Komplexen dienen. In Abbildung IV.5 ist der Sequenzvergleich der in den Komplexpräpa-

rationen und Kristallisationsexperimenten eingesetzten extrazellulären Rezeptordomänen dargestellt. Diejenigen Reste, welche an Kristall-Kristall Kontakten der Struktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Komplexes beteiligt sind, wurden hierbei in der Proteinsequenz grün hinterlegt und offene bzw. geschlossene Boxen, sowie verschiedene Farbtöne gewählt, um die unterschiedlichen Kontaktbereiche zu kennzeichnen. Zudem ist der strukturell definierte Bereich von BR-IA<sub>ec</sub> mit seinen Sekundärstrukturmerkmalen oberhalb des Sequenzvergleiches angegeben.



**Abbildung IV.5:** Aminosäure-Sequenzvergleich von rhBR-IA<sub>ec</sub> und rmBR-IB<sub>ec</sub>.

Die dargestellte Sekundärstruktur, sowie die Nummerierung der Reste beziehen sich auf die Sequenz von BR-IA<sub>ec</sub>. Die Cysteine sind gelb hinterlegt. Hellgrüne und dunkelgrüne Felder, sowie dunkelgrüne Rahmen markieren diejenigen Reste mit Beteiligung an Kristallgitterkontakten im BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex. Der kursiv dargestellte Sequenzabschnitt *GSGAMA* ist die N-terminal Verlängerung aufgrund der Expression der Rezeptordomänen als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E.coli* (siehe hierfür die entsprechenden Abschnitte in Kapitel III.1).

Im Kristallgitter des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes stehen die einzelnen Komplexmoleküle über sechs räumlich voneinander getrennten Flächen mit vier Symmetrieäquivalenten in Kontakt. Der erste Kontakt wird zwischen den Resten Leu33 bis Lys37, sowie Asp47, Ile49 und Ile54 im N-Terminus von BR-IA<sub>ec</sub>(A) und der konvexen Seite der Finger 1 und 2 des symmetrieäquivalenten BMP-2(B) (5: X-Y, X, Z+5/6; [+1A+1B-1C]) gebildet. Umgekehrt stehen entsprechende Reste des BMP-2(A) mit den genannten N-terminalen Resten von BR-IA<sub>ec</sub>(B) aus dem Symmetrieäquivalent 5: X-Y, X, Z+5/6; [+1A+1B-1C] in Kontakt. Auch an der Ausbildung des dritten und vierten Kristallkontakts ist der N-Terminus von BR-IA<sub>ec</sub> beteiligt, wobei sich hier die Monomere BR-IA<sub>ec</sub>(B) und BMP-2(B) mit denen des BMP-2(A) bzw. BR-IA<sub>ec</sub>(A) im Symmetrieäquivalent 4: Y, -X+Y, Z1/6 [-1A] berühren.

In Abbildung IV.5 sind die für diese vier Kristall-Kontaktflächen wichtigen Reste im N-Terminus von BR-IA<sub>ec</sub> der Sequenz hellgrün hinterlegt dargestellt. Von diesen acht Resten werden die für Stabilisierung des Kristall-Kristall Kontakts notwendigen so genannten nicht-gepaarten („nonpairwise“) aber auch gepaarten („pairwise“) Interaktionen ausgebildet DASGUPTA *et al.* [1997]. So ist jeweils Leu33 komplett im Kristall-Kontakt eingeschlossen, womit es wahrscheinlich den für die Ausbildung der Kristall-Kristall-Kontakts entscheidenden Rest darstellt. Ebenfalls von besonderer Bedeutung für die Kontakte sollte die Interaktion der Seitenkette von Lys37 mit Asp22 von BMP-2 im Symmetrieäqui-

valent sein. Sowohl der kurze Abstand von 2,89Å als auch die Wechselwirkung zwischen Lysin und Aspartat bedeuten nach DASGUPTA *et al.* [1997] auf einen favorisierten Kristall-Kristall Kontakt.

Im BR-IB<sub>ec</sub> unterscheidet sich dieser Sequenzabschnitt von dem von BR-IA<sub>ec</sub>, wie die Gegenüberstellung in Abbildung IV.5 belegt. Dabei würde im BR-IB<sub>ec</sub> mit dem Arginin in vergleichbarer Position zu Lys37 zwar ein für die Bildung von Kristall-Kontakten geeigneter Rest erscheinen, die Paarung zum Aspartat des BMP-2 wäre hingegen vergleichsweise geringer favorisiert [DASGUPTA *et al.*, 1997; DEREWENDA, 2004]. Auch ist anzunehmen, dass aufgrund der zusätzlichen Proline in den Position 12 und 14 von BR-IB<sub>ec</sub> (Position 31 und 34 im Vergleich zum BR-IA<sub>ec</sub>) der Verlauf der Hauptkette verändert, sowie weitere Wechselwirkungen innerhalb dieser Kontaktfläche, wie sie für den BR-IA<sub>ec</sub> gezeigt werden konnten, nicht mehr möglich wären.

Die Kristall-Kontakte fünf und sechs werden von den Resten des C-Terminus beider BR-IA<sub>ec</sub> gebildet. Dabei unterscheiden sich die daran beteiligten Reste in Abhängigkeit von der betrachteten BMP Typ IA Rezeptorkette (A) oder (B). Der BR-IA<sub>ec</sub>(A) steht dabei über die Reste Lys92, Gln94 und Arg96 mit denen von BR-IB<sub>ec</sub>(B) im Symmetrieäquivalent 3: -X, -Y, Z+1/2; [+1B] in Kontakt, welche in Abbildung IV.5 dunkelgrün hinterlegt abgebildet sind. Besonders die Interaktion zwischen den Seitenketten des Arg96 und Gln112 im symmetrieäquivalenten BR-IA<sub>ec</sub>(B) dürften zur Bildung dieses Kristall-Kristall Kontakts führen. Der Vergleich mit dem BR-IB<sub>ec</sub> lässt auch hier vermuten, dass die Sequenz in diesem Bereich einen möglichen Kontakt schwächen würde. So ist zwar ein Arginin in vergleichbarer Position konserviert, die weiteren Interaktionen wie die des Lysins fehlen dagegen.

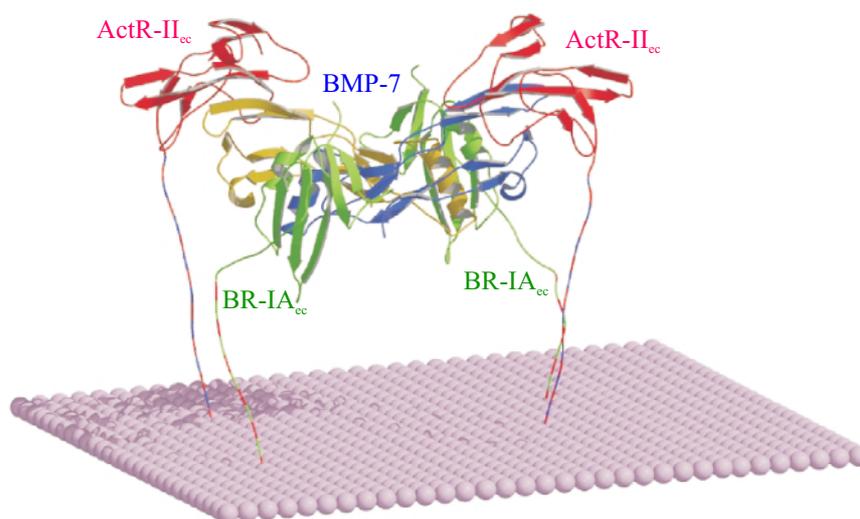
Der BR-IA<sub>ec</sub>(B) steht über die Reste Gln112 und Thr114 bis Ile120 (siehe Abbildung IV.5, mit dunkelgrünem Rahmen hervorgehoben) mit dem Symmetrieäquivalent 3: -X, -Y, Z+1/2; [+1B-1C] in Kontakt, wobei sie dort mit Resten von BR-IA<sub>ec</sub>(A), aber auch beider Monomere des BMP-2 interagieren. Innerhalb dieser Kontaktfläche wird das Ile120 vollständig von hydrophoben Resten eingeschlossen. Diese hydrophobe Umgebung dürfte die Ausbildung eines vergleichbaren Kontakts im Kristallgitter eines Ligand : BR-IB<sub>ec</sub> Komplexes erheblich behindern. Gleichzeitig wäre dagegen mit dem Aspartat (BR-IB<sub>ec</sub>) in entsprechender Position 120 eine gepaarte („pairwise“) Interaktion zum Asn71 des symmetrieäquivalenten BMP-2(A) möglich, welche wiederum die Kontaktbildung begünstigen könnte.

Insgesamt kann aus dem Modell der Kristall-Kristall Kontakte im BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes für einen vergleichbaren BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex geschlussfolgert werden, dass der Austausch der Rezeptoren zu einer Schwächung des Kristallgitters führen würde. Die Verbesserung der Kristallqualität eines BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes wäre dann jedoch nur in einer anderen Kristallgitterform oder bei gezielter Mutation entsprechender Reste in den Kontaktflächen zu erwarten. Besonders mit letztgenannter gezielter Veränderung der Sequenz sollte die Qualität von BR-IB<sub>ec</sub> für die Kristallisation entscheidend zu verbessern sein, da neben den Resten in den Kristall-Kontakten noch weitere Unterschiede zum BR-IA<sub>ec</sub> minimiert werden könnten. So ermöglicht diese Methode auch den Austausch der strukturell nicht definierten Bereiche am C- und N-Terminus der Rezeptorkette. Deren Bedeutung auf die Kristallisationseigenschaften der Ligand-Rezeptor Komplexe konnte bisher zwar nicht nachgewiesen werden, doch deuten unter anderem die unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen des BMP-2 : BR-IB<sub>ec</sub> (*Sf-9*) bzw. BMP : BR-IB<sub>ec</sub> (*E.coli*) indirekt auf einen Einfluss dieser Sequenzbereiche hin. Eine Modifikation im C- und N-Terminus des Rezeptors sollte zudem keine Auswirkung auf die Ligand-Rezeptor Interaktion haben und somit das eigentlich angestrebte Ergebnis, die Bestimmung der molekularen Grundlage für die veränderten Wechselwirkung der BMP- und GDF-Liganden zum BR-IB<sub>ec</sub>, nicht beeinträchtigen.

## IV.4 Die Kristallisation ternärer Ligand-Rezeptor Komplexe

Mit der Präparation (siehe Kapitel III.4.3) und Kristallisation von ternären Ligand-Rezeptor Komplexen (siehe Kapitel III.5.6) sollte erstmals die Strukturlösung eines vollständigen BMP-2 Signalkomplexes erreicht werden. Eine derartige Struktur könnte neben der strukturellen Bestätigung des „knuckle“-Epitops [KIRSCH *et al.*, 2000a] für die BMP-2 Typ II Rezeptor Interaktion, auch neue Erkenntnisse über die Grundlagen der niederaffinen Rezeptorinteraktion, ebenso wie über den Mechanismus der Rezeptor-Rekrutierung und -Aktivierung gewähren.

Die Lage des Typ II Rezeptor-Bindungs epitops wurde für das BMP-2 mittels Mutationsanalyse von KIRSCH *et al.* [2000a] auf der konkaven Seite der Finger beider Monomere des Liganden bestimmt und beschreibt eine Interaktionsfläche, welche keine Überschneidung zum „wrist“-Epitop der Typ I Rezeptor Wechselwirkung aufweist. Sie konnte bisher mit den Kristallstrukturen sowohl des Activin A : ActR-IIB<sub>ec</sub> [THOMPSON *et al.*, 2003] als auch des BMP-7 : ActR-II<sub>ec</sub> [GREENWALD *et al.*, 2003] Ligand-Typ II Rezeptor Komplex bestätigt werden. Im Unterschied dazu zeigt die Struktur des TGF- $\beta$ 3 : T $\beta$ R-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes [HART *et al.*, 2002] die Bindung der Rezeptorkette am so genannten „finger-tip“-Epitop des Liganden, wobei im resultierenden Modell eines ternären Signalkomplexes die Typ I und Typ II Rezeptoren in Kontakt stehen würden. Diese zusätzliche Interaktion des Typ I Rezeptors könnte den für die TGF- $\beta$ -Liganden gezeigten „sequenziellen Bindungsmodus“ belegen, welcher den hochaffinen Ligand-Typ II Rezeptor Komplex als Voraussetzung für die Bildung des TGF- $\beta$ -Signalkomplexes beschreibt.



**Abbildung IV.6:** Modell des ternären BMP-7 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Typ I und Typ II Rezeptor Komplexes [SEBALD and MUELLER, 2003].

An den in blau und gelb abgebildeten homodimeren Liganden BMP-7 binden jeweils die zwei extrazelluläre Domänen des Typ I (grün), sowie des Typ II (rot) Rezeptors. Das Modell wurde aus der überlagerten Darstellung der Strukturen des BMP-7 : ActR-II<sub>ec</sub> [GREENWALD *et al.*, 2003] und des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> [KIRSCH *et al.*, 2000c] Ligand-Rezeptor Komplexes gewonnen.

Die BMP/GDF-Liganden bilden ihren Signalkomplex hingegen über den „kooperativen Bindungsmodus“, wobei die Affinität des Typ II Rezeptors mit der Wechselwirkung zum Ligand-Typ I Rezeptor Komplex gesteigert wird [MASSAGUE, 1998]. Dieser kooperative Effekt auf die Rezeptor-Rekrutierung

wird hier jedoch offenbar nicht über direkte Kontakte der Rezeptoren vermittelt. Basierend auf dem aus der Kristallstruktur des BMP-7 : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Typ II Rezeptor Komplexes abgeleiteten Modells des ternären BMP-7 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Signal-Komplexes [GREENWALD *et al.*, 2003] wurde daher von [SEBALD and MUELLER, 2003] ein neuer Oligomerisierungs-Modus für die BMP-vermittelte Rezeptor-Aktivierung postuliert.

Abbildung IV.6 zeigt das Modell des ternären BMP-7 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Typ I und Typ II Rezeptor Komplexes nach SEBALD and MUELLER [2003]. Die beiden Typ II Rezeptoren binden an den jeweiligen konvexen Seiten des homodimeren BMP-7, wohingegen die Typ I Rezeptoren an der konkaven Seite im „wrist“-Epitop mit dem BMP-7 Dimer wechselwirken. Der so erhaltene Signalkomplex besteht damit aus dem homodimeren Liganden und jeweils zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptorketten. Die C-Termini aller Rezeptorketten deuten zur membranständigen Seite, wobei die in der Kristallstruktur nicht sichtbaren Reste der jeweiligen extrazellulären Domänen (16 Reste für den ActR-II<sub>ec</sub> und 9 Reste für den BR-IA<sub>ec</sub>) als „extended“ Konformation nachträglich in das Modell eingezeichnet wurden.

Das Modell weist hierbei auf keine zur Liganden-Rezeptor Interaktion zusätzlichen Kontakte zwischen den Domänen von ActR-II<sub>ec</sub> und BR-IA<sub>ec</sub> hin, wie sie entsprechend bisher gültiger Schemata der Rezeptor-Aktivierung [MASSAGUE, 1998; WRANA *et al.*, 1994] für die Rekrutierung eines niederaffinen Rezeptors als notwendig erachtet wurden [BERNAT *et al.*, 2003]. Dennoch zeigt der hochaffine ActR-II<sub>ec</sub> einen kooperativen Effekt auf die Bildung des BMP-Typ I Rezeptor Komplexes, wobei ein Einfluss der cytoplasmatischen Domäne auf die Dimerisierung ausgeschlossen werden konnten [GREENWALD *et al.*, 2003].

Nach SEBALD and MUELLER [2003] ergeben sich somit drei mögliche Mechanismen, über die sich die Bindung der niederaffinen Rezeptorkette in den Signalkomplex erklären lassen. In der Ersten wird angenommen, dass die bisher nicht gezeigte Interaktion zwischen den Rezeptoren im C-terminalen Bereich beider extrazellulärer Domänen liegt, welche in den Kristallstrukturen nicht sichtbar waren. Die zweite Möglichkeit beschreibt einen allosterischen Mechanismus, wobei ein durch die Bindung des hochaffinen Rezeptors erzeugte Konformationsänderung im Liganden die Bindung der niederaffinen Kette ermöglicht. Im Vergleich der Strukturen des freien Liganden BMP-7 [GRIFFITH *et al.*, 1996] mit der des entsprechenden Typ II Rezeptor Komplexes [GREENWALD *et al.*, 2003] konnten tatsächlich kleinere Unterschiede in den Bindungsepitopen aufgezeigt werden. Die Größenordnung der strukturellen Änderung entspricht jedoch der, wie sie auch für die Interaktion zwischen dem BMP-2 und seinem hochaffinen BMP Typ IA Rezeptor beobachtet wurde und ist wohl eher auf eine Anpassung der Bindungsflächen zurückzuführen. Demgegenüber gibt der Vergleich zweier Kristallstrukturen des Activin A : ActR-IIB<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes [THOMPSON *et al.*, 2003; GREENWALD *et al.*, 2004] einen deutlicheren Hinweis darauf, dass zumindest für die Activine die Liganden-Allosterie Voraussetzung für Aufbau des Signalkomplexes ist. Eine entsprechende Flexibilität wie sie hier für das Activin A beschrieben wurde, konnte jedoch für die BMPs oder GDFs bisher nicht beobachtet werden. Der dritte Mechanismus berücksichtigt dagegen die Lokalisierung des Komplexes in der Membran. Hierbei wurde bereits durch GRASBERGER *et al.* [1986] und LETZELTER *et al.* [1998] gezeigt, dass mit dem Verlust von Freiheitsgraden der Rotation und Translation, durch den Übergang vom dreidimensionalen Raum der Komponenten in Lösung zu einem zweidimensionalen System in einer Membran, niedrige Affinität in hohe Affinität gewandelt werden kann. Die für die niederaffinen Rezeptoren gezeigten Assoziationsraten  $k_{on}$  (siehe Tabelle III.10 in Kapitel III.3, sowie [GREENWALD *et al.*, 2003]) wären dann für die Oligomerisierung und Signalvermittlung ausreichend. Die daraus zu bestimmende Halbwertszeit eines Signalkomplexes würde bei 10ms bis 100ms liegen.

Für die Kristallisation ist die aus der niedrigen Halbwertszeit resultierende geringe Stabilität des Komplexes jedoch nicht ausreichend. Wie im Kapitel III.5.6 dargestellt, konnten Kristalle auch in

Gegenwart von ActR-II<sub>ec</sub> nur für den deutlich stabileren binären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex erhalten werden. Dass eine entsprechende Präparation des Komplexes, wie sie in Kapitel III.4.3 beschrieben ist, überhaupt möglich war, lag nur an der hohen Löslichkeit des binären Komplexes, sowie von ActR-II<sub>ec</sub> in entsprechender Konzentration. Dagegen konnten die niederaffinen Komplexe zwischen BMP-2 bzw. BMP-6 und dem ActR-II<sub>ec</sub> aufgrund der geringen Löslichkeit der Liganden nicht präpariert werden.

Mit dem Mangel an experimenteller Bestätigung für einen der möglichen Mechanismen der Rezeptor-Aktivierung müssen auch zukünftig weitere Kristallisationsexperimente mit vollständigen Signalkomplexen durchgeführt werden. Hierbei wird die gezielte Auswahl der einzelnen Komponenten, insbesondere der des niederaffinen Rezeptors, entscheidend für den Erfolg der Strukturlösung sein. Systematische Affinitätsmessung innerhalb der BMP/GDF Ligand-Rezeptor Komplexe (Dr. J. Nickel, zur Publikation eingereicht) weisen dabei darauf hin, dass die Kombination von BMP-7, BR-IB<sub>ec</sub> und ActR-II<sub>ec</sub> die individuell höchsten Affinitäten aufweisen, aber auch die Kombinationen aus BMP-2, BR-IA<sub>ec</sub> und ActR-IIB<sub>ec</sub> oder GDF-5, BR-IB<sub>ec</sub> und ActR-IIB<sub>ec</sub> möglich wären. Ebenfalls denkbar wäre die gezielte Mutation eines niederaffinen Rezeptors, um zum Beispiel über die Dissoziationsrate die Stabilität des ternären Komplexes zu erhöhen, wengleich bisher keine derartigen Varianten in Mutationsanalysen der Liganden oder der Rezeptoren ermittelt werden konnten [KIRSCH *et al.*, 2000a].

## V Zusammenfassung

Für BMPs wie auch die anderen Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie beginnt der Signalweg mit der Bindung des Liganden an zwei Typen transmembranärer Rezeptoren. Die Ligand-Rezeptor Interaktionen sind dabei durch unterschiedliche Affinität und Spezifität gekennzeichnet und bilden wahrscheinlich die Grundlage für das breite Spektrum biologischer Funktionen.

In dieser Arbeit wurde mittels einer Struktur- und Funktionsanalyse von BMP Ligand-Rezeptor Komplexen die molekulare Basis für die Affinität und Spezifität dieser Wechselwirkungen untersucht. Hierfür wurde die Kristallstruktur des BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes bei einer Auflösung von 1,9Å ermittelt. Mit der höheren Auflösung war die Charakterisierung der geometrischen Parameter eines Netzwerks von zehn Wasserstoff-Brückenbindungen in der Interaktionsfläche zwischen BMP-2 und BR-IA<sub>ec</sub> möglich. Deren zentrale Bedeutung für die Wechselwirkung konnte auch durch funktionelle Analyse bestätigt werden. So stellen die im Zentrum der Bindungsfläche liegenden Wasserstoff-Brückenbindungen BMP-2 Leu51 (N) : BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (OE1) und BMP-2 Leu51 (O) : BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (NE1), sowie die BMP-2 Asp53 (N) : BR-IA<sub>ec</sub> Cys77 (O) H-Brücke die Hauptdeterminanten der Ligand-Rezeptor Bindung dar. Darüber hinaus ließ sich aus der strukturellen Analyse des „wrist“-Epitops von BMP-2 eine besondere Bedeutung der Prä-Helix Schleife L2, sowie der im Kontakt eingeschlossenen Wassermoleküle für die Anpassung der Bindungsfläche an unterschiedliche Interaktionspartner ableiten.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für ein neues Modell zur Beschreibung von Affinität und Spezifität der hochaffinen BMP-Typ I Rezeptor Interaktion. Dabei stellen die Wasserstoff-Brückenbindungen den Hauptanteil zur Bindungsenergie, während die hydrophobe Umgebung in der Interaktionsfläche die Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen energetisch begünstigen und hydrophobe Wechselwirkungen nur geringfügigen Einfluss auf die Affinität nehmen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt zudem die Präparation und Kristallisation von binären Ligand-Typ I Rezeptor Komplexen für BMP-2, BMP-6 und GDF-5, sowie die der ternären Komplexe von BMP-2, BR-IA<sub>ec</sub> und ActR-II<sub>ec</sub> bzw. BR-II<sub>ec</sub>. Die extrazellulären Domänen der hierfür verwendeten Rezeptoren wurden durch Expression in *E.coli* oder *Sf-9* Insektenzellen erhalten. Ihre funktionelle Charakterisierung erfolgte durch BIAcore Interaktionsanalyse an immobilisierten Liganden, wobei in Abhängigkeit vom Ligand-Rezeptor Komplex unterschiedliche Affinitäten ermittelt werden konnten. In Übereinstimmung mit den hierbei erhaltenen Daten wurden die Ligand-BMP Typ IB Rezeptor Komplexe für BMP-2, BMP-6 und GDF-5, sowie der GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplex präpariert. Des Weiteren konnte die Bildung des ternären BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> Ligand-Rezeptor Komplexes in Lösung nachgewiesen werden. Für all diese Komplexe konnten Kristallisationsbedingungen ermittelt werden. Trotz Optimierung dieser Bedingungen reichte die Qualität der erhaltenen Kristalle nicht für eine Aufklärung der Struktur aus.

Für ein detailliertes Verständnis der Mechanismen der Rezeptoraktivierung muss die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von BMP Ligand-Rezeptor Komplexen fortgeführt werden. Die präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass über die Kenntnis der einzelnen Affinitäten und die gezielte Modifikation der Interaktionspartner eine erfolgreiche Strukturanalyse dieser Ligand-Rezeptor Komplexe möglich ist.

## VI Summary

BMPs, like other members of the TGF- $\beta$  superfamily initiate their signaling pathways through binding to two types of transmembrane receptors. These ligand-receptor interactions are characterized by different affinities and specificities that may in turn account for the variety of cellular responses.

The aim of this work was to examine the molecular basis for the affinities and specificities of these interactions using structural and functional analysis of BMP ligand-receptor complexes. Therefore, the crystal structure of the BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> ligand-receptor complex was determined at 1,9Å resolution. At this high resolution it was possible to characterize the geometrical parameters of a network of ten hydrogen bonds within the interface. Their particular importance for the interaction could be confirmed by functional analysis. The hydrogen bonds BMP-2 Leu51 (N) : BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (OE1) and BMP-2 Leu51 (O) : BR-IA<sub>ec</sub> Gln86 (NE1) which are located in the center of the interface, as well as the BMP-2 Asp53 (N) : BR-IA<sub>ec</sub> Cys77 (O) H-bond are the main binding determinants of the ligand-receptor interaction. Furthermore, the structural analysis of the 'wrist' epitope of BMP-2 revealed the importance of the pre-helix loop L2 and of the water molecules in the interface that are required for adaptation of the contact surface to different binding partners.

These results form the basis of a new model describing the affinity and specificity of the BMP-type I receptor interaction: hydrogen bonds contribute most of the binding energy, while the hydrophobic environment increases the strength of the hydrogen bonds. The hydrophobic interactions themselves have only a minor effect on the affinity.

Furthermore, this work presents the preparation and crystallization of the binary ligand-type I receptor complexes for BMP-2, BMP-6 and GDF-5, as well as the ternary complex of BMP-2 and BR-IA<sub>ec</sub> with either ActR-II<sub>ec</sub> or BR-II<sub>ec</sub>. The extracellular receptor domains have been expressed in *E.coli* or *Sf-9* insect cells. Their functional characterization has been carried out using BIAcore measurements with immobilized ligands that confirmed the differences in affinities depending on the particular ligand-receptor complex under study. In accordance with these data, the ligand-type IB receptor complexes of BMP-2, BMP-6 and GDF-5, as well as the GDF-5 : BR-IA<sub>ec</sub> ligand-receptor complex have been prepared. Additionally, the formation of the ternary BMP-2 : BR-IA<sub>ec</sub> : ActR-II<sub>ec</sub> ligand-receptor complex could be shown. Crystallization conditions have been obtained for all complexes. However, the quality of the crystals was not sufficient for structure determination, despite intensive optimization of these conditions.

For a detailed understanding in the mechanisms of receptor activation the structural and functional characterization of BMP ligand-receptor complexes should be continued. Therefore, the presented results suggest that, with knowledge of the individual affinities and the selective modification of the binding partners, a successful structure determination of these ligand-receptor complexes might be possible.

# Literaturverzeichnis

- Arakawa, M. and Muramatsu, T (1974). Endo-beta-N-acetylglucosaminidases acting on the carbohydrate moieties of glycoproteins. The differential specificities of the enzymes from *Streptomyces griseus* and *Diplococcus pneumoniae*. *J. Biochem.*, **76**: 307–317.
- Baixeras, E., Roman-Roman, S., Jitsukawa, S., Genevee, C., Mechiche, S., Viegas-Pequignot, E., Hercend, T., and Triebel, F. (1990). Cloning and expression of a lymphocyte activation gene (Lag-1). *Mol. Immunol.*, **27**: 1091–1102.
- Baker, E.N. and Hubbard, R.E. (1984). Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog. Biophys. molec. Biol.*, **44**: 97–179.
- Balemans, W. and Van Hul, W. (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.*, **250**: 231–250.
- Bernat, B., Pal, G., Sun, M., and Kossiakoff, A.A. (2003). Determination of the energetics governing the regulatory step in growth hormon-induced receptor homodimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**: 952–957.
- Boesen, C.C., Motyka, S.A., Patamawenu, A., and Sun, P.D. (2000). Development of a recombinant bacterial expression system for the active form of a human transforming growth factor  $\beta$  type II receptor ligand binding domain. *Protein Expr. Purif.*, **20**: 98–104.
- Bogan, A.A. and Thorn, K.S. (1998). Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.*, **280**: 1–9.
- Bricogne, G. (1997). Bayesian statistical viewpoint on structure determination: Basic concepts and examples. *Meth. Enzymol.*, **276**: 361–423.
- Brünger, A.T. (1990). Extension of molecular replacement: a new search strategy based on Patterson correlation refinement. *Acta Cryst.*, **A46**: 46–57.
- Brünger, A.T. (1992). Free  $R$  value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature (London)*, **355**: 472–475.
- Brünger, A.T. (1993). Assessment of phase accuracy by cross validation: the free  $R$  value. Methods and applications. *Acta Cryst.*, **D49**: 24–36.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.*, **D54**: 905–921.
- Brown, C.B., Boyer, A.S., Runyan, R.B., and Barnett, J.V. (1999). Requirement of the type III receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science*, **283**: 2080–2082.
- Byrne, M.P., Manuel, R.L., Lowe, L.G., and Stites, W.E. (1995). Energetic contribution of side chain hydrogen bonding to the stability of staphylococcal nuclease. *Biochem.*, **34**: 13949–13960.
- Chakrabarti, P. and Janin, J. (2002). Dissecting protein-protein recognition sites. *Proteins*, **47**: 334–343.

- Cheng, X., Cole, R.N., Zaia, J., and Hart, G.W. (2000). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Biochem.*, **39**: 11609–11620.
- Chothia, C. and Janin, J. (1975). Principles of protein-protein recognition. *Nature*, **256**: 705–708.
- Chou, T.-Y., Hart, G.W., and Dang, C.V. (1995). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.*, **270**: 18961–18965.
- Chu, F.K. (1986). Requirements of cleavage of high mannose oligosaccharides in glycoproteins by peptide N-glycosidase F. *J. Biol. Chem.*, **262**: 172–177.
- Chuva de Sousa Lopes, S.M., Roelen, B.A.J., Monteiro, R.M., Emmens, R., Lin, H.Y., Li, E., Lawson, K.A., and Mummery, C.L. (2004). BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.*, **18**: 1838–1849.
- Clackson, T. and Wells, J.A. (1995). A hot spot of binding in a hormon-receptor interface. *Science*, **267**: 383–386.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.*, **D50**: 760–763.
- Comer, F.I. and Hart, G.W. (2000). O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **275**: 29179–29182.
- Constam, D.B. and Robertson, E.J. (1999). Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J. Cell. Biol.*, **144**: 139–149.
- Crowther, R.A. and Blow, D.M. (1967). A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. *Acta Cryst.*, **23**: 544–548.
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., and McPhearson, A. (1994). Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Cryst.*, **D50**: 414–423.
- Daniel, T.O., Milfay, D.F., Escobedo, J., and L.T., Williams (1987). Biosynthetic and glycosylation studies of cell surface platelet-derived growth factor receptors. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9778–9784.
- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y., and Daevis, D.R. (1992). Crystal structure of transforming growth factor  $\beta$ 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*, **257**: 369–374.
- Dasgupta, S., Iyer, G.H., Bryant, S.H., Lawrence, C.E., and Bell, J.A. (1997). Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers. *Proteins*, **28**: 494–514.
- de Caestecker, M. (2004). The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **15**: 1–11.
- Derewenda, Z.S. (2004). Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure*, **12**: 529–535.
- Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D., and Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, **262**: 1744–1747.
- di Clemente, N., Josso, N., Gouédard, L., and Belville, C. (2003). Components of the anti-Müllerian hormon signaling pathway in gonads. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **211**: 9–14.
- Ebendal, T., Bengtsson, H., and Soderstrom, S. (1998). Bone morphogenetic proteins and their receptors: Potential functions in the brain. *J. Neurosci. Res.*, **51**: 139–146.
- Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T.K., Kawabata, M., Miyazono, K., and Imaura, T. (1999). Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J. Cell. Sci.*, **112**: 3519–3527.

- 
- Edge, A.S.B. (1981). Deglycosylation of glycoproteins by Trifluoromethanesulfonic Acid. *Analyt. Biochem.*, **118**: 131–137.
- Eigenbrot, C. and Gerber, N. (1997). X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9Å resolution and implications for receptor binding. *Nat. Struct. Biol.*, **4**: 435–438.
- Engh, R.A and Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.*, **A47**: 392–400.
- Esnouf, R.M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graphics*, **15**: 132–134.
- Evans, P.R. (1993). Data reduction. *Proceedings of CCP4 Study Weekend*, pages 114–122.
- Fersht, A.R. (1987). The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.*, **12**: 301–304.
- Fersht, A.R., Shi, J.-P., Knill-Jones, J., Lowe, D.M., Wilkinson, A.J., Blow, D.M., Brick, P., Carter, P., Waye, M.M.Y., and Winter, G. (1985). Hydrogen bonding biological specificity analysed by protein engineering. *Nature*, **314**: 235–238.
- Fisher, R.A. (1912). On an absolute criterion for fitting frequency curves. *Messenger of Mathematics*, **41**: 155–160.
- Garman, E.F. and Schneider, T.R. (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.*, **30**: 211–237.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y.I., and Knaus, P. (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serin/threonine kinase receptors. *Mol. Biol. Cell*, **11**: 1023–1035.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**: 319–326.
- Gilliland, G.L. and Ladner, J.E. (1996). Crystallization of biological macromolecules for X-ray diffraction studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**: 595–603.
- Glasgow, L.R., Paulson, J.C., and Hill, R.L. (1977). Systematic purification of five glycosidases from *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, **252**: 8615–8623.
- Graff, J.M. (1997). Embryonic patterning: To BMP or not BMP, that is the question. *Cell*, **89**: 171–174.
- Grasberger, B., Minton, A.P., DeLisi, C., and Metzger, H. (1986). Interaction between proteins localized in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 6258–6262.
- Gray, P.C., Greenwald, J., Blount, A.L., Kunitake, K.S., Donaldson, C.J., Choe, P.C., and Vale, W.W. (2000). Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin. *J. Biol. Chem.*, **275**: 3206–3212.
- Greenwald, J., Fischer, W.H., Vale, W.W., and Choe, S. (1999). Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nat. Struct. Biol.*, **6**: 18–22.
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., and Choe, S. (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol. Cell*, **11**: 605–617.
- Greenwald, J., Le, V., Corrigan, A., Fischer, W., Komives, E., Vale, W., and S., Choe (1998). Characterization of the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor. *Biochem.*, **37**: 16711–16718.
- Greenwald, J., Vega, M.E., Allendorph, G.P., Fischer, W.H., Vale, W.W., and Choe, S. (2004). A flexible Activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF- $\beta$  family receptors. *Mol. Cell*, **15**: 485–489.

- Griffith, D.L., Keck, P.C., Sampath, T.K., Rueger, D.C., and Carlson, W.D. (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor  $\beta$  superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 878–883.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Af-folter, M., Vale, W.W., Belmonte, J.C.I., and Choe, S. (2002). Struktural basis of BMP signalling inhibition by cystein knot protein Noggin. *Nature*, **420**: 636–642.
- Guimond, A., Sulea, T., Zwaagstra, J.C., Ekiel, I., and O’Conner-McCourt, M.D. (2002). Identification of a functional site on the type I TGF- $\beta$  receptor by mutational analysis of its ectodomain. *FEBS Letters*, **513**: 147–152.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557–580.
- Harker, D. and Kasper, J.S. (1948). Phases of Fourier coefficients directly from crystal diffraction data. *Acta Cryst.*, **1**: 70–75.
- Harrison, C.A., Gray, P.C., Koeber, S.C., Fischer, W.H., and Vale, W.W. (2003). Identification of a functional binding site for Activin on the type I receptor ALK4. *J. Bio. Chem.*, **278**: 21129–21135.
- Harrison, C.A., Wiater, E., Gray, P.C., Greenwald, J., Choe, S., and Vale, W.W. (2004). Modulation of activin and BMP signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **225**: 19–24.
- Hart, G.W. (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**: 315–335.
- Hart, P.J., Deep, S., Taylor, A.B., Shu, Z., Hinck, C.S., and Hinck, A.P. (2002). Crystal structure of the human T $\beta$ R2 ectodomain - TGF- $\beta$ 3 complex. *Nat. Struct. Biol.*, **9**: 203–208.
- Hatta, T., Konishi, H., Katoh, E., Natsume, T., Ueno, N., Kobayashi, Y., and Yamazaki, T. (2000). Identification of the ligand-binding site of the BMP type IA receptor for BMP-4. *Biopolymers (Peptide Science)*, **55**: 399–406.
- He, X.L. and Garcia, K.C. (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared p75 neurotrophin receptor. *Science*, **304**: 870–874.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, **390**: 465–471.
- Hinck, AP, Archer, S.J., Qian, S.W., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L.S., Lucas, R., Zhang, B.L., Wenker, J., and Torchia, D.A. (1996). Transforming growth factor  $\beta$ 1: three-dimensional structure in solution and comparison with X-ray structure of transforming growth factor  $\beta$ 2. *Biochemistry*, **35**: 8517–8534.
- Hogan, B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.*, **10**: 1580–1594.
- Hoppe, W. (1957). Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin. *Elektrochemie*, **61**: 1076–1083.
- Iwase, H. and Hotta, K. (1993). Release of O-linked glycoprotein glycans by endo-alpha-N-acetylglucosaminidase. *Methods Mol. Biol.*, **14**: 151–159.
- Jancarik, J. and Kim, S.H. (1991). Sparse Matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**: 409–411.
- Janin, J (1996). Protein-protein recognition. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **64**: 145–165.
- Janin, J. (1999). Wet and dry interfaces: the role of solvent in protein-protein and protein-DNA recognition. *Structure*, **7**: R277–R279.
- Janin, J. and Chothia, C. (1990). The structure of protein-protein recognition sites. *J. Biol. Chem.*, **265**: 16027–16030.

- 
- Jeffrey, G.A. and Saenger, W. (1994). *Hydrogen bonding in biological structures..* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.
- Jones, S. and Thornton, J.M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 13–20.
- Jones, S. and Thornton, J.M. (1997). Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. *J. Mol. Biol.*, **272**: 121–132.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.*, **26**: 795–800.
- Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **9**: 49–61.
- Keller, S., Nickel, J., Zhang, J.-L., Sebald, W., and Mueller, T.D. (2004). Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**: 481–488.
- Kelly, W.G., Dahmus, M.E., and Hart, G.W. (1993). RNA Polymerase II is a glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **268**: 10416–10424.
- Kingsley, D.M. (1994). What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet.*, **10**: 16–21.
- Kirsch, T., Nickel, J., and Sebald, W. (2000a). BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J.*, **19**: 3314–3324.
- Kirsch, T., Nickel, J., and Sebald, W. (2000b). Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. *FEBS Letters*, **468**: 215–219.
- Kirsch, T., Sebald, W., and Dreyer, M.K. (2000c). Crystal structure of the BMP-2 -BRIA ectodomain complex. *Nat. Struct. Biol.*, **7**: 492–496.
- Kleywegt, G.J. and Brünger, A.T. (1996). Checking your imagination: applications of the free *R* value. *Structure*, **4**: 897–904.
- Koenig, B.B., Cook, J.S., Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., P.E., Correa, Olson, C.A., Pecquet, A.L., Ventruea, F., Grant, R.A., Chen, G.-X., Wrana, J.L., Massague, J., and Rosenbaum, J.S. (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 5961–5974.
- Kraulis, P.J. (1991). MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **24**: 946–950.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680–685.
- Larsen, T.A., Olson, A.J., and Goodsell, D.S. (1998). Morphology of protein-protein interfaces. *Structure*, **6**: 421–427.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**: 283–291.
- Lee-Hoeflich, S.T., Causing, C.G., Podkowa, M., Zhao, X., Wrana, J.L., and Attisano, L. (2004). Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J.*, **23**: 4792–4801.
- Leslie, A.G.W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, **26**.
- Letzelter, F., Wang, Y., and Sebald, W. (1998). The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor  $\gamma$  chain. *Eur. J. Biochem.*, **257**: 11–20.

- Li, Y., Li, H., Smith-Gill, S.J., and Mariuzza, R.A. (2000). Three-dimensional structures of the free and antigen-bound Fab from monoclonal Antilysozyme antibody HyHEL-63. *Biochem.*, **39**: 6296–6309.
- Liu, F., Ventura, F., Doody, J., and Massague, J. (1995). Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 3479–3486.
- Liu, J.-P. and Jessel, T.M. (1998). A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development*, **125**: 5055–5067.
- Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. (1999). Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*, **283**: 987–990.
- Lo Conte, L., Chothia, C., and Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.*, **285**: 2177–2198.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**: 1912–1934.
- Massague, J. (1998). TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**: 753–791.
- Massague, J. and Chen, Y.-G. (2000). Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev.*, **14**: 627–644.
- Matzuk, M.M. and Bradley, A. (1992). Cloning of the human activin receptor cDNA reveals high evolutionary conservation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1130**: 105–108.
- McDonald, I.K., Naylor, D., Jones, D., and Thornton, J. (1993). *HBPLUS: Hydrogen Bond Calculator Version 2.25*. University College London, London.
- McDonald, I.K. and Thornton, J.M. (1994). Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J. Mol. Biol.*, **238**: 777–793.
- Merritt, E.A. and Bacon, D.J. (1997). Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics. *Meth. Enzymol.*, **277**: 505–524.
- Mittl, P.R.E., Pristle, J.P., Cox, D.A., McMaster, G., Cerletti, N., and Grutter, M.G. (1996). The crystal structure of TGF- $\beta$ 3 and comparison to TGF- $\beta$ 2: implications for receptor binding. *Prot. Sci.*, **5**: 1261–1271.
- Miyazono, K., Kusanagi, K., and Inoue, H. (2001). Divergence and convergence of TGF- $\beta$ /BMP signaling. *J. Cell. Physiol.*, **187**: 265–276.
- Muramatsu, T. (1971). Demonstration of an endo-glycosidase acting on a glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **246**: 5535–5537.
- Murry-Rust, J., McDonald, N.Q., Blundell, T.L., Hosang, M., Oefner, C., Winkler, F., and Bradshaw, R.A. (1993). Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure*, **1**: 153–159.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.*, **D53**: 240–255.
- Nicholls, A., Sharp, K., and Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **11**: 281–296.
- Nickel, J., Dreyer, M.K., and Sebald, W. (2002). Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction. In *Bone Morphogenetic Proteins.*, edited by S. Vukicevic and K.T. Sampath, pages 61–85. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Nishitoh, H., Ichijo, H., Kimura, M., Matsumoto, T., F., Makishima, Yamaguchi, A., H., Yamashita, Enomoto, S., and Miyazono, K. (1996). Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiations factor-5. *J. Biol. Chem.*, **271**: 21345–21352.

- 
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., and Petersen, N.O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell. Signal.*, **16**: 291–299.
- Norel, R., Perrey, D., Wolfson, H.J., and Nussinov, R. (1999). Examination of shape complementarity in docking of unbound proteins. *Proteins*, **36**: 307–317.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., and Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF- $\beta$  signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, **401**: 480–485.
- Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.-K., and Koshland Jr., D.E. (1999). A piston model for transmembran signaling of the aspartate receptor. *Science*, **285**: 1751–1754.
- Pajot-Augy, E., Bozon, V., Remy, J.-J., Couture, L., and Salesse, R. (1999). Critical relationship between glycosylation of recombinant lutropin receptor ectodomain and its secretion from baculovirus-infected insect cells. *Eur. J. Biochem.*, **260**: 635–648.
- Plummer, T.H., Elder, J.H., Alexander, S., Phelan, A.W., and Tarentino, A.L. (1984). Demonstration of peptide:N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations. *J. Biol. Chem.*, **259**: 10700–10704.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS*, **21**: 267–271.
- Rosenzweig, B.L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G.N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C., and K., Miyazono (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7632–7636.
- Rossmann, M. G. and Blow, D.M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.*, **15**: 24–31.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual, second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sayre, D. (1952). The squaring method: a new method for phase determination. *Acta Cryst.*, **5**: 60–65.
- Scheufler, C., Sebald, W., and Hülsmeier, M. (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2,7Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **287**: 103–115.
- Schlessinger, J. (1988). Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.*, **13**: 443–447.
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerisation and activation of EGF receptor. *Cell*, **110**: 669–672.
- Schlunegger, M.P. and Grutter, M.G.J. (1993). Refined crystal structure of human transforming growth factor  $\beta$ 2 at 1.95Å resolution. *Mol. Biol.*, **231**: 445–458.
- Sebald, W. and Mueller, T.D. (2003). The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly. *Trends Biochem. Sci.*, **28**: 518–521.
- Shah, P.K., Buslje, C.M., and Sowdhamini, R. (2001). Structural determinants of binding and specificity in transforming growth factor-receptor interactions. *Proteins*, **454**: 408–420.
- Sheinerman, F.B. and Honig, B. (2002). On the role of electrostatic interactions in the design of protein-protein interfaces. *J. Mol. Biol.*, **318**: 161–177.
- Shi, Y. and Massague, J. (2003). Mechanism of TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113**: 685–700.
- Shirley, B.A., Stanssens, P., Hahn, U., and Pace, C.N. (1992). Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochem.*, **31**: 725–732.
- Smith, G.E., Ju, G., Ericson, B.L., Moschera, J., Lahm, H-W., Chizzonite, R., and Summers, M.D. (1985). Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by baculovirus expression vector. *Meth. Enzymol.*, **185**: 60–89.

- Snow, D.M. and Hart, G.W. (1998). Nuclear and cytoplasmatic glycosylation. *Int. Rev. Cytol.*, **181**: 43–74.
- Sorensen, S.B., Sorensen, T.L., and Breddam, K. (1991). Fragmentation of proteins by *S. aureus* strain V8 protease. Ammonium bicarbonate strongly inhibits the enzyme but does not improve the selectivity for glutamic acid. *FEBS*, **294**: 195–197.
- Sowdhamini, R., Burk, J.F., D.F. und Huang, Mizuguchi, K., Nagarajaram, H.A., Srinivsan, N., Steward, R.E., and T.L., Blundell. (1998). CAMPASS: a database of structurally aligned protein superfamilies. *Structure*, **6**: 1087–1094.
- Stites, W.E. (1997). Protein-protein interaction: interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.*, **97**: 1233–1250.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polamerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.*, **185**: 60–89.
- Sugiyama, K., Ahorn, H., Maurer-Fogy, I., and Voss, T. (1993). Expression of human interferon- $\alpha$ 2 in Sf9 cells. *Eur. J. Biochem.*, **217**: 921–927.
- Sun, P.D. (2003). Conserved in structure but diverse in recognition. *Structure*, **11**: 362–363.
- Sun, P.D. and Davies, D.R. (1995). The cystine-knot growth-factor family. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**: 269–291.
- Tarentino, A.L. and Maley, G. (1974). Purification and properties of an endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.*, **249**: 811–817.
- Tarentino, A.L. and Plummer Jr., T.H. (1994). Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: Purification and properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Meth. Enzymol.*, **230**: 44–57.
- Tarentino, A.L., Plummer Jr., T.H., and Maley, F. (1974). The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.*, **249**: 818–824.
- ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1993). Activin receptor-like kionases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene*, **8**: 2879–2887.
- ten Dijke, P., Yamashita, H, Ichijo, H., Franzen, P., Laiho, M., Miyazono, K., and Heldin, C.H. (1994a). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science*, **264**: 101–104.
- ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., Riddle, D.L., Ichijo, H., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1994b). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.*, **269**: 16985–16988.
- Thompson, T.B., Woodruff, T.K., and Jardetzky, T.S. (2003). Structure of an ActRIIB: activin A complex reveal a novel binding mode for TGF- $\beta$  ligand:receptor interactions. *EMBO J.*, **22**: 1555–1566.
- Thorn, K.S. and Bogan, A.A. (2001). ASEdb: a database of alanine mutations and their effect on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics*, **17**: 284–285.
- Trimble, R.B., Trumbly, R.J., and Maley, F. (1987). Endo-beta-N-acetylglucosaminidase H from *Streptomyces plicatus*. *Meth. Enzymol.*, **138**: 763–770.
- Tsai, C.-J., Lin, S.L., Wolfson, H.J., and Nussinov, R. (1996). Protein-protein interfaces: architectures and interactions in protein-protein interfaces and in protein cores. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **31**: 127–152.
- Tsai, C.-J., Lin, S.L., Wolfson, H.J., and Nussinov, R. (1997). Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Sci.*, **6**: 53–64.

- 
- Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinductions. *Science*, **150**: 893–899.
- Veselovsky, A.V., Ivanov, Yu.D., Ivanov, A.S., Archakov, A.I., Lewi, P., and Janssen, P. (2002). Protein-protein interactions: mechanisms and modification by drugs. *J. Mol. Recognit.*, **15**: 405–422.
- Visser, J.A. (2003). AMH signaling: from receptor to target gene. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **211**: 65–73.
- von Bubnoff, A. and Cho, W.Y. (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev. Biol.*, **239**: 1–14.
- Wilson, A.J.C. (1942). Determination of absolute from relative X-ray data intensities. *Nature*, **150**: 151–152.
- Winn, M.D., Isupov, M.N., and Murshudov, G.N. (2001). Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Cryst.*, **D57**: 122–133.
- Wozney, J.M. (1998). The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and the adult. *J. Oral Sci.*, **106**: 160–166.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., and Wang, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*, **242**: 1528–1534.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature*, **370**: 341–347.
- Wuytens, G., Verschuere, K., de Winter, J.P., Gajendran, N., Beek, L., Devos, K., Bosman, F., de Waele, P., Andries, M., van den Eijnden-van Raaij, A.J., Smith, J.C., and Huylebroeck, D. (1999). Identification of two amino acids in activin A that are important for biological activity and binding to the activin type II receptor. *J. Biol. Chem.*, **274**: 9821–9827.
- Xu, D., Tsai, C.-J., and Nussinov, R. (1997). Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein Eng.*, **10**: 999–1012.
- Yanisch-Peron, C., Viera, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103–119.
- Young, L., Jernigan, R.L., and Covell, D.G. (1994). A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition. *Protein Sci.*, **3**: 717–729.

## Schriftenverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### Publikation

Keller, S., Nickel, J., Zhang, J.-L., Sebald, W. and Mueller, T.D. (2004)

„Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA.“ *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**: 481-488.

### Tagungsbeiträge

Nickel, J., Kirsch, T., Dreyer, M.K., Keller, S. and Sebald, W. (2000)

„Identification of receptor binding epitopes of BMP-2 and generation of variants with antagonistic characteristics.“, International Conference on Bone Morphogenetic Proteins 2000, Juni 2000, Granlibakken - Lake Tahoe, Kalifornien, USA.

Keller, S., Dreyer, M.K., Kirsch, T., Nickel J. and Sebald, W. (2001)

„Crystal structure of the BMP-2 - BRIA ectodomain complex and the preparation of the ternary BMP-2 - BRIA - ActRII complex for crystallization.“, 6<sup>th</sup> International School on the Crystallography of Biological Macromolecules, Mai 2001, Como, Italien.

Keller, S., Nickel J. and Sebald, W. (2001)

„From molecular recognition to drug design in growth factor receptor systems.“, GDCh-Jahrestagung Chemie 2001, September 2001, Würzburg, Deutschland.

Keller, S., Nickel J. and Sebald, W. (2002)

„BMP receptor complexes: Preparation for crystal structure analysis.“, 9<sup>th</sup> International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, März 2002, Jena, Deutschland.

Sebald, W., Knaus, P., Keller, S. and Nickel, J. (2002)

„Deciphering the receptor-binding code in the bone-morphogenetic-protein (BMP) family.“, 2<sup>nd</sup> European Conference on bone morphogenetic proteins, Mai 2002, Zagreb, Kroatien.

Keller, S., Nickel J. and Sebald, W. (2002)

„BMP receptor complexes: Preparation for crystal structure analysis.“, 2<sup>nd</sup> European Conference on bone morphogenetic proteins, Mai 2002, Zagreb, Kroatien.



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1999 bis September 2003 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Sebald am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II des Theodor-Boveri Instituts der Universität Würzburg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Sebald für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und die zu jeder Zeit gewährte großzügige Unterstützung. Sein großes Interesse und persönliches Engagement waren für mich Motivation und Hilfe gleichermaßen.

Herrn Prof. Dr. H.J. Gross danke ich für die Betreuung der Arbeit als Gutachter der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Zu sehr großem Dank bin ich Herrn Dr. Thomas Müller verpflichtet für seine besondere Unterstützung, die hilfreichen Ideen und Vorschläge und natürlich für seine Hilfe bei so manchem Computerproblem.

Herrn Dr. Joachim Nickel danke ich sehr für seine Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude bei allen Fragen der Proteinpräparation und der Auswertung der BIAcore Messungen.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Conzelmann und Herrn Dr. W. Schmitz möchte ich mich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen bedanken. Frau Dr. V. Hoppe danke ich für die Proteinsequenzierungen.

Ein ganz spezieller Dank geht an meine Denkraum-Kollegen Christian Söder, Dionys Weber und Nikolai Ivanov. Ihre tatkräftige Hilfe und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre haben dazu beigetragen, dass mir der Spaß am Laboralltag niemals verloren ging.

Darüber hinaus danke ich natürlich auch Wolfgang Hädelt, Nicole Hopf, Birgit Midloch und Jin-Li Zhang, sowie den ehemaligen LaborkollegInnen Alexandra Will und Dr. Thomas Kirsch für die gute Zusammenarbeit.

Bei Dr. Thomas Müller, Dr. Manfred Bühner, Markus Klein, Edwin Patino und Maike Gottermeier möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in der Röntgenstrukturabteilung bedanken. Besonders Maike und Markus bin ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und Geduld zu Dank verpflichtet.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Squash-Team, bestehend aus Joachim, Christian, Martin, Nicole, Nadine und Alex, die allwöchentlich für den notwendigen Ausgleich zur Laborarbeit gesorgt haben.

Schließlich möchte ich mich bei allen weiteren Kollegen des Lehrstuhls für Physiologische Chemie II für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Das größte Dankeschön gilt meinen Eltern und meinem Bruder. Eure Zuversicht und Unterstützung waren mein Rückhalt besonders dann, wenn gar nichts so laufen wollte wie ich es mir vorgestellt hatte.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Sascha Keller  
geboren am 08. Januar 1975 in Dresden  
ledig

### Schul Ausbildung

---

1981 - 1985	84. Oberschule, Dresden
1985 - 1988	Schule bei der Botschaft der DDR in der UdSSR, Moskau
1988 - 1991	22. Oberschule, Dresden
07/1991	Mittlere Reife
1991 - 1993	Gymnasium Dresden-Neustadt, Dresden
06/1993	Allgemeine Hochschulreife

### Wehr/Zivildienst

---

1993 - 1994	Zivildienst im Alten- und Pflegeheim Jochhöh-Schlösschen, Pesterwitz
-------------	--

### Hochschulausbildung

---

1994 - 1999	Studium der Chemie an der Technischen Universität Dresden Hauptfach: Biochemie
08/1996	Diplom-Vorprüfung
09/1998	Diplom-Hauptprüfung
1999	Diplomarbeit an der Technischen Universität Dresden, Institut für Biochemie bei Prof. Dr. K.-H. van Pée
	Thema der Diplomarbeit: „Reinigung und Charakterisierung der NADH-abhängigen Tryptophan-7-Halogenase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> .“
seit 08/1999	Dissertation an der Julius-Maximilians Universität Würzburg am Theodor-Boveri Institut für Biowissenschaften (Biozentrum), Lehrstuhl für Physiologische Chemie II bei Prof. Dr. W. Sebald
	Thema der Dissertation: „Struktur- und Funktionsanalysen an BMP Ligand-Rezeptor Komplexen.“

### Anstellungen

---

1999 - 2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Julius-Maximilians Universität Würzburg, Lehrstuhl für Physiologische Chemie II.
seit 12/2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter am John Innes Centre, Norwich, Großbritannien, Institut für Biologische Chemie.