



Twisted gastrulation - ein BMP-Modulatorprotein mit dualer Funktionalität

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

angefertigt am
Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik

vorgelegt von

Juliane Fiebig
geboren in Pößneck

Würzburg 2014



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Janzen

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

„Zweifel ist der Weisheit Anfang.“

René Descartes

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Knochenmorphogenetische Proteine und die TGF- β Superfamilie	7
1.2	Aufbau und Struktur der TGF- β Liganden	9
1.3	Die Rezeptoren der TGF- β Superfamilie	11
1.4	Signaltransduktion in das Zellinnere	14
1.5	Signalbildung durch Bindung eines TGF- β Liganden	16
1.6	Modulation der TGF- β induzierten Signalgebung	18
1.6.1	Intrazelluläre Regulation des Signalweges	19
1.6.2	Regulation des Signalweges auf Zellmembranebene	20
1.6.3	Signalmodulation durch extrazelluläre Modulatoren	23
1.6.3.1	Noggin	24
1.6.3.2	Die DAN Familie	26
1.6.3.3	Die Chordin Familie	29
1.6.3.4	Twisted gastrulation	33
1.7	Zielsetzung der Arbeit	36
2	Material und Methoden	37
2.1	Materialien	37
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	37
2.1.2	Bakterienstämme	37
2.1.3	Vektoren	38
2.1.4	Oligonukleotide	39
2.1.5	Kulturmedien und Zusätze	39
2.2	Molekularbiologische Arbeiten	41
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	41
2.2.2	Restriktionsreaktion	42
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.4	Ligation	43
2.2.5	DNA-Transformation in chemisch kompetente <i>E.coli</i> Zellen	44
2.2.5.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	44
2.2.5.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	45
2.2.6	Überprüfung von Vektoren und Insertion von Genfragmenten	45
2.2.6.1	Kolonie-PCR	45
2.2.6.2	Plasmid-DNA Isolierung und analytische Restriktionsanalyse	46

Inhaltsverzeichnis

2.2.7	Sequenzierung	47
2.2.8	Plasmid-Präparation	47
2.3	Allgemeine proteinchemische Methoden	48
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.3.1.1	Probenvorbereitung	49
2.3.1.2	Proteinfällung	49
2.3.1.3	Methoden zum Anfärben von SDS-Polyacrylamid-Gelen	50
2.3.2	Detektion von Proteinen mit His ₆ -Sequenz mittels Western Blot Analyse	51
2.3.3	Nachweis biotinylierter Proteine mittels Western-Blot-Analyse und Streptavidin-HRP	52
2.3.4	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	53
2.3.5	Thrombinspaltung	54
2.3.6	Nachweis der Glykosylierung von Proteinen mittels PAS-Reaktion	54
2.3.7	Deglykosylierung von Glykoproteinen	55
2.3.8	Biotinylierung von Proteinen mit der Biotin-Proteinligase BirA	55
2.3.9	Massenspektrometrie	56
2.4	Herstellung rekombinanter Proteine unter Verwendung des Baculovirus-Insektenzell-Expressionssystems	57
2.4.1	Kultivierung der Insektenzellen	57
2.4.2	Vitalitätsfärbung und Zellzahlbestimmung	58
2.4.3	Co-Transfektion	58
2.4.4	Plaque-Assay	59
2.4.5	Virenampifikation	60
2.4.6	Virentiterbestimmung	61
2.4.7	Expression rekombinanter Proteine in High-Five™ Zellen	62
2.5	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	63
2.5.1	Expression in Einschlusskörpern	63
2.5.2	Expression in löslicher Form	63
2.5.3	Expression in M9-Minimalmedium	64
2.5.4	Zellaufschluss nach Expression in Einschlusskörpern und Präparation	65
2.5.5	Renaturierung	66
2.5.6	Zellaufschluss nach Expression löslicher Proteine in <i>E.coli</i>	67
2.6	Expression rekombinanter Proteine in Freestyle™ 293 F-Zellen	68
2.6.1	Kultivierung der Freestyle™ 293 F-Zellen	68
2.6.2	Transfektion der Freestyle™ 293 F-Zellen mit PEI	68
2.7	Chromatographische Methoden zur Proteinaufreinigung	69
2.7.1	Metallchelate-Affinitätschromatographie	69
2.7.1.1	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie im „batch-Verfahren“	69
2.7.1.2	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen	70
2.7.1.3	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen	70

2.7.2	Größenausschlusschromatographie	71
2.7.2.1	Präparative Größenausschlusschromatographie	71
2.7.2.2	Analytische Größenausschlusschromatographie	71
2.7.2.3	Kalibrierung der Gelfiltrationssäule	72
2.7.3	Heparin-Affinitätschromatographie	73
2.7.4	Anionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung einer Q-Sepharose Säule	73
2.7.5	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie	74
2.8	Alkalische Phosphatase (ALP) Assay zur Aktivitätsbestimmung von Proteinen	75
2.8.1	Kultivierung von ATDC5 und C2C12-Zellen	75
2.8.2	Alkalische Phosphatase-Assay	76
2.9	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie	77
2.10	Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie	79
2.11	Präparation von binären und ternären Proteinkomplexen	80
2.12	Kernspinresonanz-Spektroskopie	80
3	Ergebnisse	81
3.1	Rekombinante Herstellung von Twisted gastrulation in verschiedenen Expressionssystemen	81
3.1.1	Expression und Aufreinigung von Twisted Gastrulation aus Insektenzellen	81
3.1.1.1	Klonierung und Expression	81
3.1.1.2	Metallchelat-Affinitätschromatographie	82
3.1.2	Herstellung von homogen glykosyliertem Twisted gastrulation in Insektenzellen durch Zugabe von Kifunensin	84
3.1.3	Expression und Aufreinigung von Twisted Gastrulation aus <i>E.coli</i> Zellen	85
3.1.3.1	Klonierung und Expression	85
3.1.3.2	Präparation der Einschlusskörper von Twisted gastrulation	86
3.1.3.3	Aufreinigung des Proteinextraktes mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen	87
3.1.3.4	Renaturierung von Twisted gastrulation	88
3.1.3.5	Anreicherung von Twisted gastrulation nach der Renaturierung	88
3.1.3.6	Isolierung der monomeren Proteinspezies mittels Größenausschlusschromatographie	89
3.1.4	Expression von Twisted gastrulation in Freestyle™ 293 F-Zellen	90
3.2	Untersuchung der Bindeeigenschaften und Charakterisierung der rekombinant hergestellten Proteine	92
3.2.1	In HighFive™-Zellen exprimiertes Twisted gastrulation ist N-glykosyliert	92
3.2.2	Analyse des Glykosylierungsmusters von Twisted gastrulation aus Insektenzellen	93
3.2.3	Die <i>in vitro</i> Bindeeigenschaften von Twisted gastrulation variieren in Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad	95
3.2.4	Twisted gastrulation bakteriellen Ursprungs zeigt im zellbasierten Assay eine geringere Aktivität	98

3.3 Twisted gastrulation beeinflusst die Interaktion zwischen BMP-2 und den Typ I-Rezeptoren	100
3.4 Mutagenesestudie zur Charakterisierung des BMP-2 – Binde-epitops von Twisted gastrulation	103
3.4.1 Auswahl und Expression der Einzelaminosäurevarianten	103
3.4.2 Herstellung des Twisted gastrulation-Biosensors für die Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie	105
3.4.3 Einige Twisted gastrulation-Varianten zeigen eine Veränderungen der <i>in vitro</i> Bindeeigenschaften gegenüber BMP-2	109
3.5 Präparation von binären und ternären Proteinkomplexen	113
3.5.1 Expression und Aufreinigung der extrazellulären Domäne des Activin Typ IIB-Rezeptors	115
3.5.1.1 Expression und Zellaufschluss	116
3.5.1.2 Aufreinigung des Thioredoxin-ActR-IIB-Fusionsproteins mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie	117
3.5.1.3 Proteolytische Abspaltung des Thioredoxin-Fusionsanteils	118
3.5.1.4 Auftrennung des Thioredoxin-Rezeptor-Gemischs mittels Anionenaustausch-Chromatographie	118
3.5.2 Aufreinigung von BMP-2 und dessen Varianten	120
3.5.2.1 Klonierung, Expression und Präparation der Einschlusskörper	120
3.5.2.2 Renaturierung von BMP-2 und dessen Varianten	121
3.5.2.3 Isolierung der dimeren Proteinspezies mittels Heparin-Affinitätschromatographie	122
3.5.2.4 Isolation der dimeren Proteinspezies mittels Umkehrphasen-HPLC	124
3.5.3 Bestimmung der Bindeeigenschaften der BMP-2 Variante L100K/N102D und der extrazellulären Domäne des ActR-IIB	124
3.5.4 Präparation der Proteinkomplexe	126
3.6 Charakterisierung der Sekundärstruktur von Twisted gastrulation aus <i>E.coli</i> mittels CD-Spektroskopie	132
3.7 Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie	135
4 Diskussion	139
4.1 Rekombinante Herstellung des BMP-Modulatorproteins Twisted gastrulation	140
4.1.1 Das Baculovirus-Expressionssystem ermöglicht die rekombinante Herstellung von nativem Twisted gastrulation	141
4.1.2 Die transiente Transfektion von Freestyle™ 293 F-Zellen ermöglicht die Herstellung von Proteinvarianten im Hochdurchsatzverfahren	145
4.1.3 Twisted gastrulation kann durch Renaturierung aus <i>E.coli</i> Zellen gewonnen werden	148
4.2 Charakterisierung der Struktur von Twisted gastrulation	151
4.2.1 Circular dichroismus-Spektroskopie lässt keine eindeutigen Aussagen über die Sekundärstruktur zu	151
4.2.2 Kernspinresonanz-Analyse weist auf Faltungsheterogenität des bakteriell erzeugten Twisted gastrulation hin	152
4.2.3 Strategien zur Strukturaufklärung von Twisted gastrulation mittels Röntgenbeugung	155
4.3 Die N-Glykosylierung von Twisted gastrulation beeinflusst die Bindung zu BMP-2	160

4.4	Mutagenesestudien grenzen ein mögliches Bindeepitop im N-terminalen Bereich von Twisted gastrulation ein	163
5	Zusammenfassung	175
6	Summary	177
7	Literaturverzeichnis	179
8	Anhang	197
8.1	Übersicht verwendeter cDNA- und daraus resultierender Aminosäuresequenzen für Twisted gastrulation	197
8.2	Übersicht der angefertigten Expressionskonstrukte für Twisted gastrulation	199
8.3	Abkürzungsverzeichnis	205
8.4	Publikationen	207
8.5	Lebenslauf	208
8.6	Danksagung	209
8.7	Eidesstattliche Erklärung	210

1 Einleitung

1.1 Knochenmorphogenetische Proteine und die TGF- β Superfamilie

Bereits im Jahre 1965 wurde von M. Urist beobachtet, dass in Muskelgewebe von Kaninchen und Ratten implantierte demineralisierte Knochenmatrix die Eigenschaft hat, ektopes Knochenwachstum zu induzieren, also Zellen aus dem umliegenden Gewebe einwandern und zu Osteoblasten differenzieren (Urist, 1965). Schon hier wurden erste Parallelen gezogen zu von A. Moscona 1960 beschriebenen Phänomenen, dass undifferenzierte bewegliche Zellen von gewebespezifischen Faktoren dazu veranlasst werden, zu migrieren und sich umzugruppieren (Moscona, 1960). Fünf Jahre später konnten die Differenzierung zu Chondrozyten postnatal isolierter mesenchymaler Muskelzellen auch außerhalb des lebenden Organismus in Zellkultur nachgewiesen werden, indem diese auf einer wie zuvor demineralisierten Knochenmatrix kultiviert wurden (Nogami & Urist, 1970). Das Vorhandensein eines sogenannten „Morphogens“ in der Knochenmatrix, also einem Signalmolekül, das das Schicksal einer Zelle während der Musterbildung in der Entwicklung vielzelliger Lebewesen festlegt, schien bestätigt (Wolpert, 1969).

1979 gelang es schließlich Knochenwachstumsfaktoren, die sogenannten **Bone Morphogenetic Proteins** oder kurz **BMPs**, aus demineralisierter Knochenmatrix zu isolieren. Dabei war noch unklar, ob es sich um einen einzelnen Faktor oder ein Gemisch mehrerer handelt (Urist et al., 1979). 1988 konnte von J. M. Wozney die cDNA von drei unterschiedlichen BMPs isoliert und die Proteine in Säuger- und *E.coli* Zellen rekombinant hergestellt werden (Wozney et al., 1988).

Im Zuge dessen erfolgte die Zuordnung der bekannten BMPs zur **Transforming Growth Factor β** (TGF- β) Superfamilie von extrazellulären multifunktionellen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Übersichtsartikel siehe: Massagué, 1987). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie zeigte eine große Übereinstimmung, wobei sieben Cysteine-Reste hoch konserviert sind. Auffällig war vor allem die hohe Sequenzidentität von BMP-2A und -2B zu Decapentaplegic (Dpp) aus *Drosophila melanogaster*, was darauf schließen

lässt, dass es sich dabei um Homologe handelt, wobei Decapentaplegic in die Ausbildung der dorsal-ventralen Achse während der Embryonalentwicklung involviert ist (Padgett et al., 1987; Wozney et al., 1988).

Schnell stieg die Zahl der zur TGF- β Familie gehörenden Proteine an und auch die Anzahl der zellulären Vorgänge, in die sie involviert sind. So finden sich BMPs in nahezu allen Spezies, von Würmern und Insekten über Reptilien bis hin zu Säugetieren und spielen entgegen ihrem Namen nicht nur bei der Bildung von Knochen und der Regulation des Knochenwachstums eine Rolle (Übersichtsartikel siehe: Reddi, 1997). So wurde in Maus-Modell-Studien auch der Einfluss verschiedener BMPs auf Monozyten, Epithelialzellen, mesenchymale und neuronale Zellen nachgewiesen (Übersichtsartikel siehe: Balemans & Van Hul, 2002). Sie sind bereits kurz nach der Befruchtung während der Gastrulation unerlässlich und in die Festlegung der Körperachsen, bei der Ausbildung der Organanlagen von Nieren, Darm, Lunge, Zähnen, Amnion und Hoden (Übersichtsartikel siehe: Hogan, 1996a, 1996b; Graff, 1997; Ebendal et al., 1998) sowie zahlreichen weiteren Prozessen während der frühen embryonalen Entwicklung involviert (Winnier et al., 1995) (Übersichtsartikel siehe: Hogan, 1996a). Nach der Geburt regulieren sie das Wachstum des Organismus und sind für die Gewebshomöostase und die Reparatur von Gewebeschäden verantwortlich. Mit der Komplexität des Organismus steigt dabei auch die Anzahl von Faktoren. Während bis zu einem Dutzend Mitglieder der TGF- β Superfamilie bei den Nicht-Vertebraten beschrieben wurden (Übersichtsartikel siehe: Attisano & Wrana, 2002), zählen inzwischen mehr als 30 Faktoren bei den Vertebraten zur TGF- β Superfamilie, die sich neben der Unterfamilie der BMPs/GDFs (**G**rowth and **D**ifferentiation **F**actors) weiter aufgliedert in die Activin/Inhibin Subfamilie, die TGF- β s und eine Gruppe heterogener Faktoren (Newfeld et al., 1999) (Übersichtsartikel siehe: Kingsley, 1994; Sebald et al., 2004; Mueller & Nickel, 2012).

1.2 Aufbau und Struktur der TGF- β Liganden

Die Expression aller Mitglieder erfolgt als Vorläuferproteine bestehend aus Signalpeptid, Pro-Domäne und reifer Domäne (Urist et al., 1979). Signalpeptid und Pro-Domäne sind notwendig für die Sekretion und Prozessierung des Proteins und werden von einer furin-ähnlichen Protease an einem -RXXR- Motiv proteolytisch von der 100 bis 140 Aminosäuren langen reifen Domäne abgespalten (Constam & Robertson, 1999) (Übersichtsartikel siehe: Massagué, 1990) (Abbildung 1).

Obwohl sich die einzelnen Faktoren der TGF- β Superfamilie auf molekularer Ebene unterscheiden und teilweise eine Aminosäuresequenz-Homologie von nur 32% aufweisen (Übersichtsartikel siehe: Sebald et al., 2004), haben sie doch ein auffälliges Strukturmerkmal gemeinsam. Ein Cystinknoten-Motiv, codiert durch die beiden Konsensus-Sequenzen Cys₂ - X - Gly - X - Cys₃ und Cys₅ - X - Cys₆, findet sich bei jedem der Mitglieder wieder (Daopin et al., 1992; Schlunegger & Grütter, 1992) (Übersichtsartikel siehe: McDonald & Hendrickson, 1993). Dabei entstehen durch kovalente Verknüpfung von Cys₂ und Cys₅ sowie Cys₃ und Cys₆ zwei Disulfidbrücken, die einen aus acht Aminosäuren bestehenden Ring bilden, durch den eine weitere Disulfidbrücke der Cysteine 1 und 4 hindurch ragt. Der letztlich aktive signalgebende Faktor entsteht, bis auf wenige Ausnahmen mit Lefty-1, -2, GDF-3, GDF-9 und BMP-15, durch die kovalente Verknüpfung zweier Monomere über eine intermolekulare Disulfidbrücke (Übersichtsartikel siehe: Mueller & Nickel, 2012).



Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Präpro-Proteins nach Müller & Nickel (Übersichtsartikel siehe: Mueller & Nickel, 2012). Cysteine sind als gelbe Balken dargestellt.

Trotz der bereits erwähnten teilweise geringen Sequenzhomologie der einzelnen Mitglieder der TGF- β Superfamilie, weisen die Tertiärstrukturen eine hohe Ähnlichkeit auf. In der Grundarchitektur besteht jedes Monomer aus zwei β -Faltblättern und einer langen α -Helix. Die Anordnung dieser Sekundärstrukturelemente lässt sich mit dem „Linke Hand-Modell“ beschreiben (Daopin et al., 1992). Dabei stellen die beiden β -Faltblätter jeweils einen Finger und der N-Terminus den Daumen dar. Die Knöchel (*knuckle*) bilden die Außenseiten der beiden β -Faltblätter und die α -Helix das Handgelenk (*wrist*). Die Handinnenseiten zweier Monomere schmiegen sich dabei, hydrophobe Bereiche einander zugewandt, ineinander (Abbildung 2).

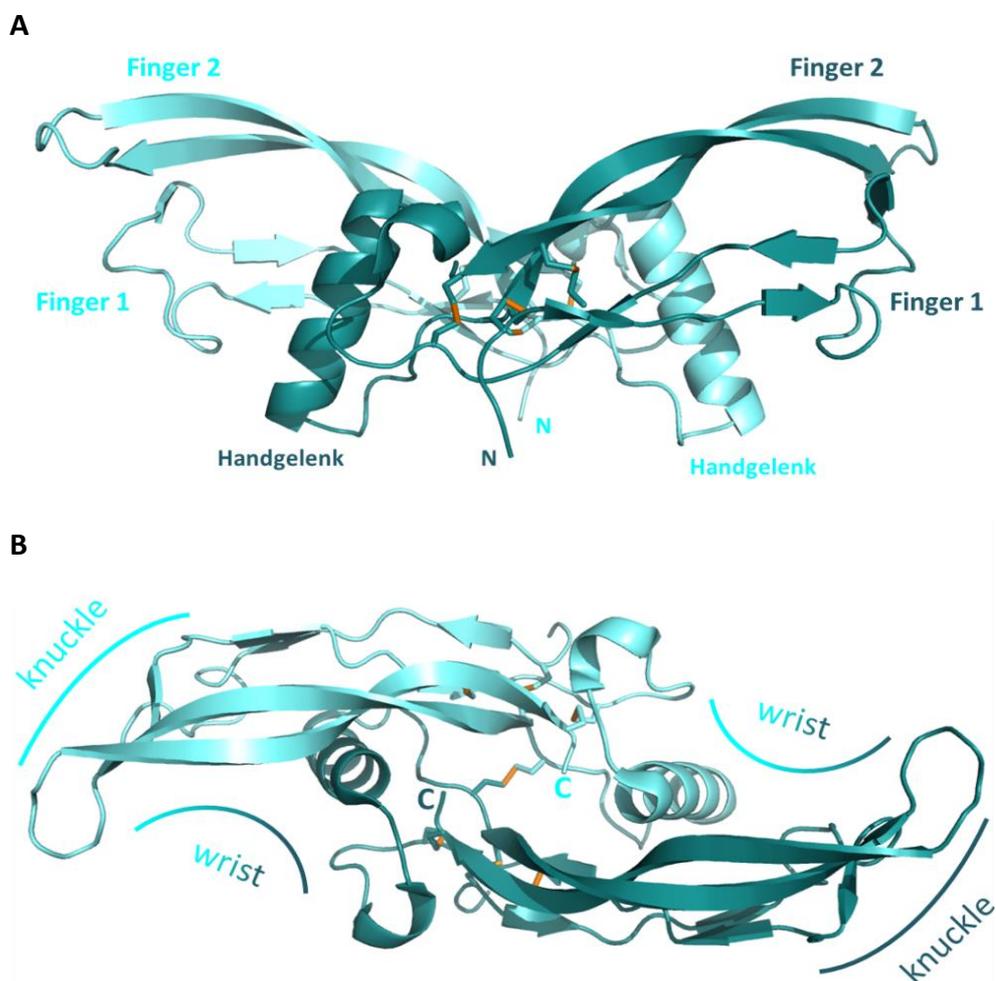


Abbildung 2: Darstellung der dreidimensionalen Struktur von BMP-2 aus verschiedenen Perspektiven (RCSB: 1ES7; Kirsch, Sebald, et al., 2000). Die beiden Monomere sind verschieden blau eingefärbt, C- und N-Termini sind entsprechend mit Großbuchstaben gekennzeichnet, Disulfidbrücken sind in orange dargestellt. **A** Frontalansicht mit Beschriftung der einzelnen Strukturelemente nach dem „Linke Hand-Modell“. **B** Aufsicht mit Kennzeichnung der *wrist*- und *knuckle*-Epitope.

Variationen in den Aminosäuresequenzen finden sich daher hauptsächlich in den weniger strukturierten Bereichen, wie den Schleifen der „Fingerspitzen“, vor der α -Helix und im N-terminalen Bereich, wie die Aufklärung der Struktur verschiedener Liganden wie TGF- β 2 (Daopin et al., 1992), TGF- β 1 (Hinck et al., 1996), TGF- β 3 (Mittl et al., 1996), BMP-7 (Griffith et al., 1996), GDNF (**G**lial-**D**erived **N**eurotrophic **F**actor) (Eigenbrot & Gerber, 1997), BMP-2 (Scheufler et al., 1999), GDF-5 (Nickel et al., 2005), BMP-9 (Brown et al., 2005), Activin A (Harrington et al., 2006), BMP-3 (Allendorph et al., 2007) und BMP-6 (Saremba et al., 2008) zeigt.

1.3 Die Rezeptoren der TGF- β Superfamilie

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie vermitteln Signale in das Zellinnere nach Bindung an Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren (H. Y. Lin et al., 1992; Franzen et al., 1993). Alle Rezeptoren dieser Familie sind aufgebaut aus einer N-terminalen extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer C-terminalen cytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinase-Domäne (Abbildung 3A). Die extrazellulären Domänen weisen bis auf konservierte Cysteinmuster nur eine geringe Sequenzhomologie auf (Newfeld et al., 1999) (Übersichtsartikel siehe: Kingsley, 1994).

Bisher wurden 12 humane Rezeptoren identifiziert, wobei sieben aufgrund ihrer Funktion zu den Typ I- und fünf zu den Typ II-Rezeptoren eingeteilt wurden (Newfeld et al., 1999) (Übersichtsartikel siehe: Manning et al., 2002) (Abbildung 3B). Durch die Liganden-vermittelte Interaktion von Typ I- und Typ II-Rezeptoren entstehen aktive Komplexe, die im Zellinneren eine Signalkaskade auslösen. Dabei involviert ist unter anderem die Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors an einer stark konservierten, unmittelbar vor der Kinase-Domäne befindlichen GS-Box durch einen Typ II-Rezeptor (Wrana et al., 1994; Wieser et al., 1995).

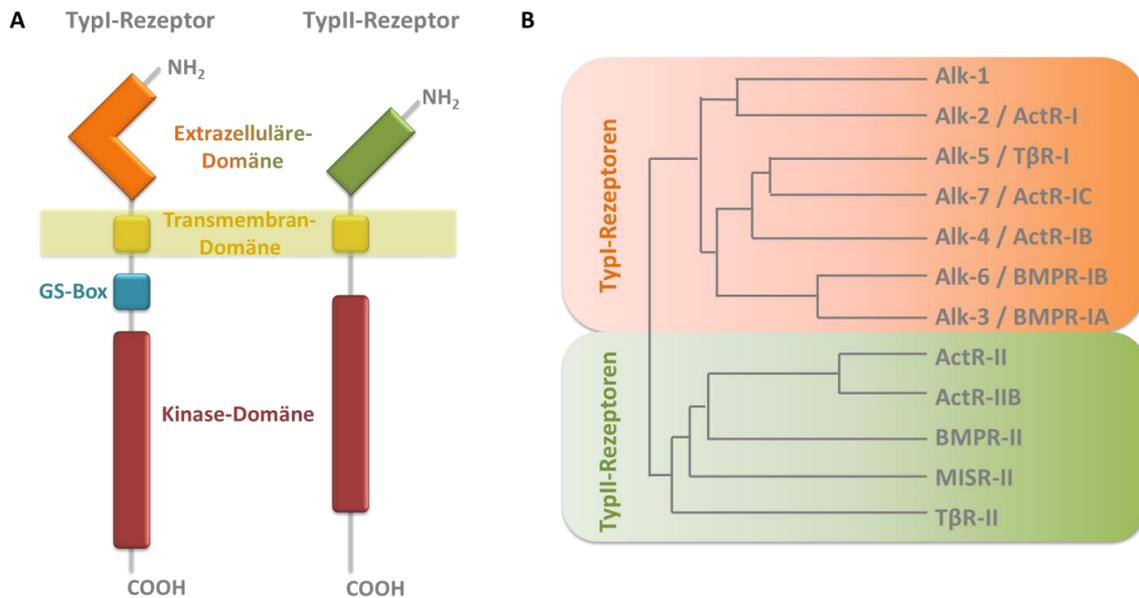


Abbildung 3: **A** Schematische Darstellung des Aufbaus der Typ I- und Typ II-Rezeptoren nach Kingsley (Übersichtsartikel siehe: Kingsley, 1994). **B** Einteilung der Rezeptoren nach der Sequenzähnlichkeit ihrer Ektodomänen.

Die Bindung der Typ I-Rezeptoren am Liganden erfolgt im zuvor beschriebenen *wrist*-Epitop, wobei beide Liganden-Monomere zur Bindung beitragen (Abbildung 4). Involviert in die Bildung des Bindepitops sind dabei der Prä-Helix-Bereich sowie die Helix des einen Monomers und die Innenseite der Finger des zweiten Monomers. Diese Bereiche sind innerhalb einer Subfamilie sehr ähnlich, allerdings gibt es zwischen den Subfamilien Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung, woraus die Erkennung der verschiedenen Typ I-Rezeptoren resultiert (Sebald et al., 2004).

Eine entscheidende Rolle bei der Erkennung des Typ I-Rezeptors BMPR-IA und BMP-2 spielt dabei ein sogenanntes „knob-into-hole“-Motiv, bei dem die große hydrophobe Seitenkette von Phe 85 des BMPR-IA, in die hydrophobe Tasche des Liganden bindet. Diese wird von den konservierten Aminosäuren Ile 62, Val 63 und Leu 66 des einen Monomers und Trp 28, Trp 31, Met 89, Tyr 103 und Met 106 des zweiten Monomers gebildet (Kirsch, Sebald, et al., 2000; Nickel et al., 2001). Weiterhin an der Ligand-Rezeptor-Bindung beteiligt sind zehn Wasserstoffbrücken, wovon zwei ausschließlich von Hauptkettenatomen, drei ausschließlich von Seitenketten und fünf sowohl von Haupt- als auch von Seitenkettenatomen ausgehen. Die Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette Gln 86 des Rezeptors und der Carbonyl- sowie Amid-

gruppe der Hauptkette an Leu 51 sind dabei ausschlaggebend für die hochaffine Bindung von Ligand und Rezeptor (Keller et al., 2004).

Wie die Aufklärung von Kristallstrukturen verschiedener Komplexe von TGF- β Liganden mit Typ II-Rezeptoren zeigt, beschränkt sich deren Bindepitop entweder auf das sogenannte *knuckle*-Epitop (Greenwald et al., 2003; Thompson et al., 2003; Allendorph et al., 2006; Weber et al., 2007) oder im Fall der TGF- β s die Fingerspitzen der Liganden (Eigenbrot & Gerber, 1997; Hart et al., 2002) (Abbildung 4). Das *knuckle*-Epitop besteht dabei fast ausschließlich aus hydrophoben Seitenketten über die die Bindung des Rezeptors erfolgt, wobei auch eine zentrale Wasserstoffbrücke und eine Salzbrücke konserviert sind.

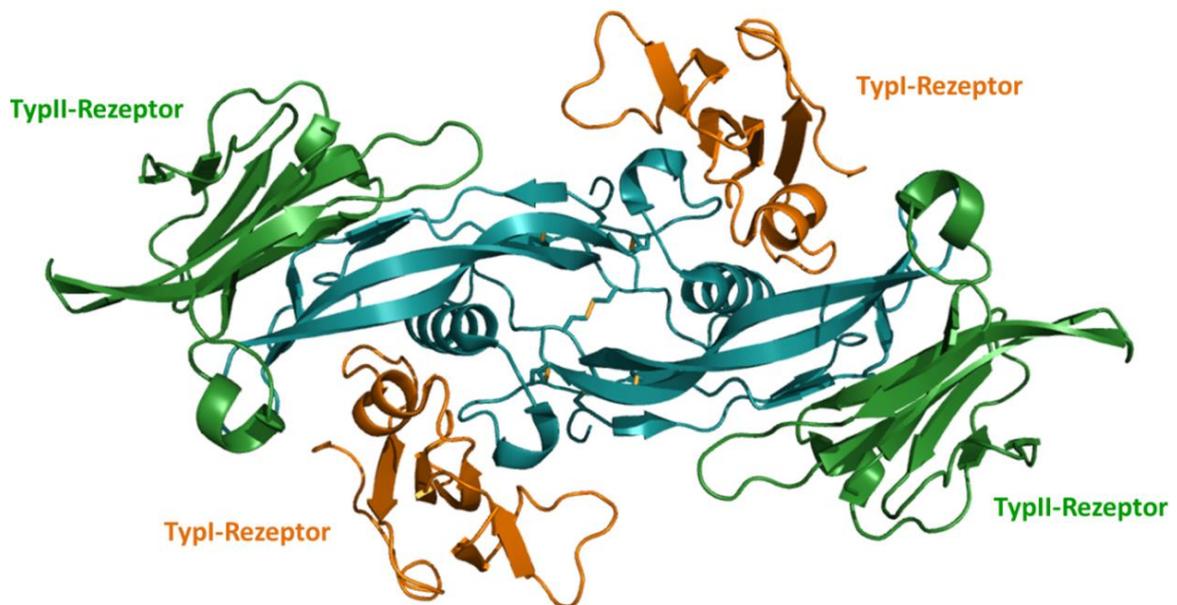


Abbildung 4: Darstellung der dreidimensionalen Struktur eines ternären Ligand-Rezeptor-Komplex (RCSB: 2G00; Allendorph et al., 2006). Das BMP-2 Homodimer ist in blau, die Ektodomänen des Typ I-Rezeptors BMPRI-A sind in orange und die Ektodomänen des Typ II-Rezeptors ActR-II sind in grün dargestellt.

1.4 Signaltransduktion in das Zellinnere

Nach der Aktivierung der Typ I-Rezeptor-Kinase-Domäne kann die Weiterleitung des durch einen Liganden induzierten Signals im Zellinneren über verschiedene Signalwege erfolgen (Übersichtsartikel siehe: Derynck & Zhang, 2003; Miyazono et al., 2005, 2010; Moustakas & Heldin, 2005).

So werden beispielsweise Signale weitergeleitet durch die Aktivierung der PI3-(Phosphatidyl-Inositol-3) Kinase, was vor allem zu einer Erhöhung des Signalbotenstoffs Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) im Zellinneren führt (Yi et al., 2005). Aber auch die Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras, von Mitgliedern der Rho-GTPase-Familie und der TAK1 (**TGF- β -Activated Kinase 1**) (Yamaguchi et al., 1999), die ihrerseits weitere Kinasen wie Erk (**Extracellular signal-regulated kinase**), Jnk (**c-Jun N-terminal kinase**) und p38-MAPK (**Mitogen-Activated Protein Kinase**) aktivieren, sind im Zusammenhang mit TGF- β Liganden beschrieben (Übersichtsartikel siehe: Massagué, 2000; Wakefield & Roberts, 2002).

Am besten verstanden ist allerdings die durch TGF- β Liganden aktivierte Smad (**Small Mothers Against Decapentaplegic**)-Signalkaskade (Übersichtsartikel siehe: Derynck et al., 1998) (Abbildung 5). In Folge der Transphosphorylierung des Typ I-Rezeptors kommt es zu Konformationsänderungen in der GS-Box, wodurch die rezeptorregulierten R-Smads 1, 2, 3, 5, 8 (Nakao, Röijer, et al., 1997) an den letzten beiden Serinen eines konservierten **-SSXS-** Motivs phosphoryliert werden können (Abdollah et al., 1997) (Übersichtsartikel siehe: Derynck et al., 1998). Nach der Phosphorylierung der R-Smads lösen sich diese vom Rezeptorkomplex und binden an Smad 4 (*Common mediator*-Smad, Co-Smad). Dieser heterotrimere Komplex kann nun in den Zellkern einwandern und dort als Transkriptionsfaktor agieren (Chacko et al., 2001) oder mit weiteren Transkriptionsfaktoren wechselwirken und so die Expression entsprechender Zielgene positiv oder negativ beeinflussen (Labbé et al., 1998) (Übersichtsartikel siehe: Attisano & Lee-Hoeflich, 2001).

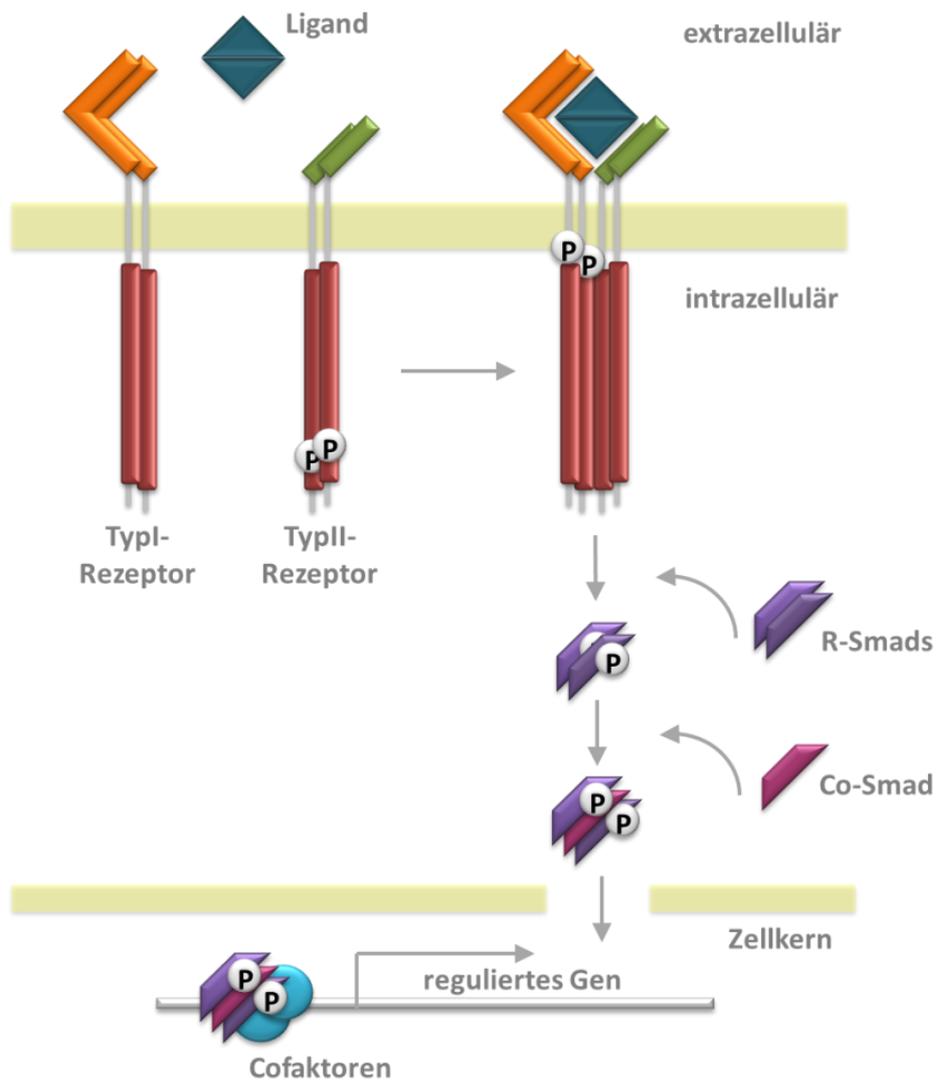


Abbildung 5: Schematische Darstellung der TGF-β Liganden induzierten Smad-Signalkaskade nach Balemans & Van Hul (Übersichtsartikel siehe: Balemans & Van Hul, 2002).

1.5 Signalbildung durch Bindung eines TGF- β Liganden

Für die Transphosphorylierung des Typ I-Rezeptors müssen beide Rezeptortypen in räumliche Nähe gelangen. Dies geschieht durch die Ausbildung heteromerer Komplexe, wobei ein dimerer Ligand wahrscheinlich jeweils zwei Typ I- und zwei Typ II-Rezeptoren rekrutiert (Yamashita et al., 1994; Kirsch, Nickel, et al., 2000b) und je nach Zusammensetzung des Komplexes verschiedene R-Smads adressiert werden (Abbildung 6) (Übersichtsartikel siehe: Miyazawa et al., 2002; Shi & Massagué, 2003). Durch Quervernetzungsexperimente wurden zwei prinzipielle Abläufe postuliert und die Mitglieder der TGF- β Superfamilie entsprechend eingeteilt (Übersichtsartikel siehe: Massagué, 1998):

Activine und TGF- β s binden demnach zuerst hochaffin an die extrazelluläre Domäne eines konstitutiv aktiven Typ II-Rezeptors, bevor eine Assemblierung mit dem Typ I-Rezeptor stattfindet. Eine Wechselwirkung der Liganden mit isolierten Typ I-Rezeptoren allein konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Attisano et al., 1993; Ebner et al., 1993; Franzen et al., 1993; Bassing et al., 1994).

Die Mitglieder BMP-Subfamilie weisen meist eine hohe Bindungsaffinität zu den extrazellulären Domänen der Typ I-Rezeptoren und eine niedrigere zu denen der Typ II-Rezeptoren auf. Hat jedoch ein BMP-Ligand an einen Typ I-Rezeptor gebunden, erhöht sich die Bindungsaffinität des Komplexes zu den Typ II-Rezeptoren. Durch die so entstehende räumliche Nähe, kann die Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors und anschließend eine Signalbildung erfolgen (Koenig et al., 1994; ten Dijke et al., 1994; Liu et al., 1995; Nohno et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995; Nishitoh et al., 1996; Natsume et al., 1997).

Welche Effekte schlussendlich für eine Erhöhung der Affinität des niederaffinen Rezeptors führen, wird auf verschiedenen Ebenen diskutiert, wobei eine Interaktion zwischen den Ektodomänen der verschiedenen Rezeptortypen zumindest bei den BMP- und Activin-Liganden aufgrund der Komplexstrukturen ausgeschlossen werden kann (Greenwald et al., 2003; Weber et al., 2007) (Abbildung 4). Da aber auch das Vorhandensein von heteromeren Rezeptorkomplexen ohne Bindung eines Liganden (sogenannte *Preformed Complexes*) auf Zelloberflächen beobachtet wurde

(Gilboa et al., 2000; Hassel et al., 2003), scheint eine Interaktion der Transmembran-Domänen oder Kinasedomänen wahrscheinlich.

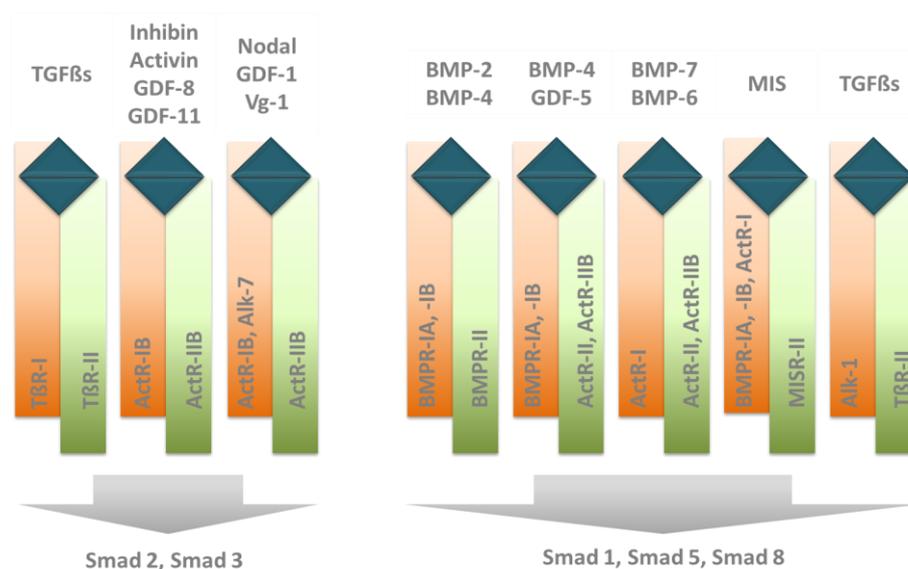


Abbildung 6: Darstellung einer Auswahl von möglichen Ligand-Rezeptor-Komplexen und Adressierung der verschiedenen Smads in Abhängigkeit von der Komplexzusammensetzung nach Shi & Massagué (Übersichtsartikel siehe: Shi & Massagué, 2003).

Aus der Übersicht in Abbildung 6 geht auch hervor, dass bei der hohen Anzahl von 30 Liganden und doch nur einer beschränkten Anzahl von Rezeptoren im menschlichen Organismus, keine strenge Spezifität herrschen kann und die Rezeptoren auch Subfamilien-übergreifend von Liganden gebunden werden. Diese Promiskuität zeigt sich mit dem größten Interaktionsspektrum bei den Rezeptoren ActR-IIB und ActR-II. So werden beispielsweise bei der Bindung von Activinen und Inhibinen (Attisano et al., 1992) sowie den Liganden GDF-1/-8/-11 (Oh et al., 2002; Cheng et al., 2003) und Nodal (Yeo & Whitman, 2001) die Typ I-Rezeptoren ActR-IB beziehungsweise Alk-7 in den signalisierenden Komplex rekrutiert und anschließend die R-Smads-2/-3 phosphoryliert. Interagiert hingegen ActR-II/-IIB mit BMP-2/-4 (Hoodless et al., 1996), GDF-5, BMP-6 (Ebisawa et al., 1999) und BMP-7 (Yamashita et al., 1995), wird über die Komplexbildung mit den Typ I-Rezeptoren BMPR-IA/-IB oder ActR-I der Smad-1/-5/-8 Signalweg aktiviert. Aber nicht nur die Rezeptoren binden mehrere Liganden, sondern auch ein Ligand kann in der Regel an verschiedene Rezeptoren binden (Übersichtsartikel siehe: Mueller & Nickel, 2012).

1.6 Modulation der TGF- β induzierten Signalgebung

Trotz der sich aus der Liganden- und Rezeptor-Promiskuität ergebenden Kombinationsmöglichkeiten, reicht dies allein nicht aus, das breite Spektrum der zahlreichen Prozesse in deren Steuerung die Mitglieder der TGF- β Superfamilie involviert sind, zu beschreiben. Inzwischen ist eine Vielzahl an Möglichkeiten bekannt, TGF- β vermittelte Signale zu modulieren (Abbildung 7) (Übersichtsartikel siehe: Miyazono, 2000; Balemans & Van Hul, 2002; Gazzerro & Canalis, 2006; Sieber et al., 2009; Bragdon et al., 2011).

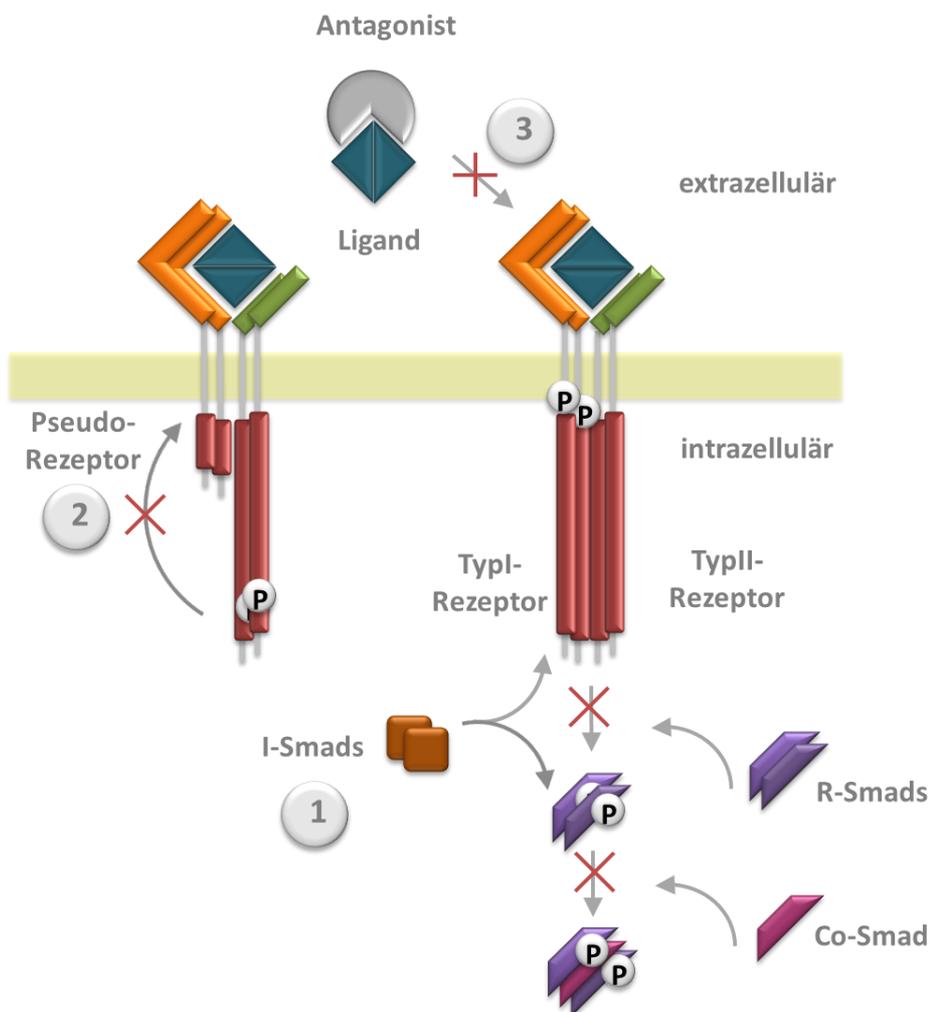


Abbildung 7: Schematische Darstellung der TGF- β Liganden induzierten Smad-Signalkaskade und Möglichkeiten deren Regulation nach Balemans & Van Hul (Übersichtsartikel siehe: Balemans & Van Hul, 2002).

1.6.1 Intrazelluläre Regulation des Signalweges

Ein Ansatzpunkt für die Regulation findet sich im Zytosol – hier können inhibitorische Smads (I-Smads), Smad-6 und -7 wie auch Smurfs (**Smad ubiquitin regulatory factors**) die Signalumsetzung beeinflussen (Imamura et al., 1997; Nakao, Afrakhte, et al., 1997) (Übersichtsartikel siehe: Miyazono et al., 2010). Die I-Smads binden dabei entweder an den aktivierten Rezeptorkomplex, werden aber selbst nicht aufgrund des fehlenden –SSXS– Motivs phosphoryliert und verhindern so die Phosphorylierung der R-Smads (Übersichtsartikel siehe: Attisano & Lee-Hoeflich, 2001) oder sie verhindern die Komplexbildung phosphorylierter R-Smads mit dem Co-Smad, Smad-4 (Itoh et al., 2001). Zusätzlich verfügt Smad-7 über die Eigenschaft Smurf-2 in den TGF- β Rezeptorkomplex zu rekrutieren und damit dessen Abbau zu initialisieren (Kavsak et al., 2000). Smurf1 ubiquitinyliert gezielt Smad-1 und -5, wodurch deren Degradierung eingeleitet und so die Signalweiterleitung gehemmt wird (Zhu et al., 1999; Ebisawa et al., 2001). Die Expression der I-Smads ist dabei abhängig von verschiedenen Faktoren, wovon ein Teil selbst zur TGF- β Superfamilie zählt wie TGF- β 1, Activin und BMP-7 und ist damit negativ rückgekoppelt (Nakao, Afrakhte, et al., 1997).

Für Smad-6 und -7 wurde in neuesten Untersuchungen, neben dem inhibierenden Einfluss auf eine bereits aktivierte Signalkaskade, auch die Interaktion mit BMP Typ I-Rezeptoren in Abwesenheit eines Liganden beobachtet (Xu et al., 2013). Da die verschiedenen BMP-Rezeptoren eine inhärente Affinität zueinander aufweisen und neben homomeren auch heteromere Komplexe ausbilden (Gilboa et al., 2000; Nohe et al., 2002), wird in diesem Zusammenhang die Unterdrückung einer dadurch hervorgerufenen unspezifischen Signalbildung durch inhibitorische Smads diskutiert. Dabei verhindert ein BMP Typ I-Rezeptor assoziiertes I-Smad eine mögliche, nicht-liganden-induzierte Phosphorylierung von R-Smads. Bindet ein Ligand an die Rezeptoren, gelangen das I-Smad und eine an den BMP Typ II-Rezeptor assoziierte Methyltransferase (PRMT1) in räumliche Nähe und es erfolgt die Methylierung des I-Smads (Xu et al., 2013). Dieses dissoziiert daraufhin vom BMP Typ I-Rezeptor und ermöglicht die ligandinduzierte Phosphorylierung von R-Smads (Xu et al., 2013).

1.6.2 Regulation des Signalweges auf Zellmembranebene

Ein weiterer Ansatz für die Regulation von TGF- β vermittelten Signalen findet sich auf der Zellmembranebene.

Ein Beispiel für ein negativ regulierendes Element ist der Pseudorezeptor BAMBI („**B**MP and **A**ctivin receptor **m**embrane **b**ound **i**nhibitor“) aus *Xenopus* beziehungsweise Nma aus Säugern. Die Aminosäuresequenz des Pseudorezeptors weist eine hohe Ähnlichkeit zur extrazellulären Domäne der Typ I-Rezeptoren auf und bildet laut Literaturdaten stabile Komplexe mit Typ II- und Typ I-Rezeptoren. Allerdings fehlt die intrazelluläre Kinase-Domäne, was dazu führt, dass die BMP-/TGF- β Signalingbildung im Zellinneren ausbleibt (Onichtchouk et al., 1999; Grotewold et al., 2001).

Weiterhin gibt es auch membranständige Effektoren, die die Signalwirkung positiv beeinflussen oder verstärken. Vornehmlich handelt es sich dabei um Proteoglykane, die selbst keine signalgebenden Eigenschaften aufweisen, aber die Ligand-Rezeptor-Komplexbildung unterstützen, indem sie den Liganden in räumliche Nähe zu ihrem Typ II-Rezeptor bringen (De Crescenzo et al., 2001). Die sogenannten Glypikane sind über einen Glykophosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker auf der extrazellulären Seite der Zellmembran verankert und verfügen über Heparan-Sulfat-Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten, über die sie Liganden der TGF- β Superfamilie binden können (Cheifetz et al., 1988). Endoglin, ein Glypikan in Säuger-Endothel-Zellen bindet beispielsweise TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2 und BMP-7 (Cheifetz et al., 1992) und wirkt als unterstützender Faktor bei der Vermittlung der Rezeptor-Ligand-Interaktion.

Betaglykan/TGF- β III-Rezeptor findet sich hingegen in nicht-endothelialen Zellen und bindet an TGF- β 1 bis 3 sowie Inhibin (Lewis et al., 2000; Mendoza et al., 2009). Die Ektodomäne von Betaglykan unterteilt sich in eine membran-distale und -proximale Hälfte, wobei beide Bereiche für die Bindung der Liganden essentiell sind (Mendoza et al., 2009). Eine Besonderheit der membran-proximalen Region von Betaglykan ist die *Zona pellucida*-Domäne (ZP), die wiederum aus einer N- und einer C-terminalen Subdomäne aufgebaut ist (Jovine et al., 2004). Der Aufbau der C-terminalen Subdomäne ähnelt dabei einer Immunglobulin-ähnlichen β -Faltblattstruktur, bestehend aus sieben β -Strängen (A-G). Der G-Strang enthält eine EHP (**e**xternal **h**ydrophobic **p**atch)-Domäne, die die ZP-Domäne mit der Transmembran-Domäne verbindet (S. Lin et al., 2011). In allen bisher beschriebenen Pro-

teinen, die eine ZP-Domäne enthalten, zeigt die EHP-Domäne eine wichtige regulatorische Funktion und steuert die Polymerisation dieser Proteine (Jovine et al., 2002; Schaeffer et al., 2009). Der Bereich für die Bindung der Liganden konnte durch neueste Untersuchungen von U. Diestel et al. (2013) auf die die β -Stränge F und G verbindende FG-Schleife ab der α -Helix und den sich anschließenden Teil des F-Stranges eingegrenzt werden (Abbildung 8). Die Seitenketten der Aminosäuren in dieser zum Teil flexiblen Region des Betaglykans sind so zur Oberfläche des Proteins hin ausgerichtet, dass sie leicht zugänglich für die Interaktion mit Liganden sind (Diestel et al., 2013).

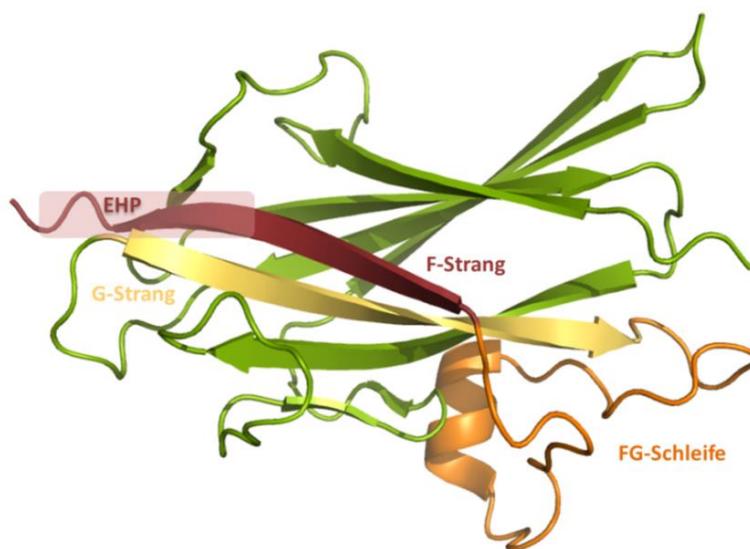


Abbildung 8: Darstellung der dreidimensionalen Struktur des C-terminalen Bereichs der *Zona pellucida* Domäne von Betaglykan (RCSB: 3QW9; S. Lin et al., 2011). Die für die Funktion und Regulation relevanten Elemente sind farblich hervorgehoben.

Eine weitere Familie der Proteoglykane wird definiert über ein EGF (epidermal growth factor)-Motiv, eine cystein-reiche CFC-Domäne sowie C-terminal GAG-Ketten (Saloman et al., 2000). Ein gut beschriebenes Mitglied dieser Familie ist der Nodal bindende Co-Rezeptor Cripto/TDGF-1 (teratocarcinoma-derived growth factor-1), dessen Fehlen einem Verlust von Nodal entspricht (Ding et al., 1998; Schier & Shen, 2000).

Die Familie der RGMs (repulsive guidance molecule) bildet eine weitere Gruppe GPI-verankerter Co-Rezeptoren. Bisher wurden vier Mitglieder in Vertebraten (RGMa, RGMb/DRAGON, RGMc/Hemojuvelin und RGMd) beschrieben (Übersichtsartikel siehe: Corradini et al., 2009), die alle aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer in

die Integrin-vermittelte Zelladhäsion involvierte Tripeptid-Sequenz (Arg-Gly-Asp), einer partiellen von Willebrand Faktor Typ D und einer hydrophoben Domäne aufgebaut sind (Monnier et al., 2002; Müller et al., 2006). Ursprünglich entdeckt wurden die RGMs während der Entwicklung von Neuronen. Durch die Bindung an den Rezeptor Neogenin und die dadurch vermittelte Zusammenführung von zwei Rezeptormolekülen, erfolgt eine signalbildende Ausrichtung dieser. In der Folge dessen findet die Aktivierung von kleinen GTPasen der Rho-Familie statt, wodurch es zu einer strukturellen Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts kommt und damit beispielsweise das Neuritenwachstum beeinflusst wird (Conrad et al., 2007). Die RGM-bindende Region in Neogenin wird von den Fibronectin Typ III-Domänen 5 und 6 gebildet (Yang et al., 2008). Im Komplex mit diesen beiden Domänen gelang Bell et al. (2013) die nahezu vollständige Aufklärung der Kristallstruktur der Ektodomäne von RGMb (C. H. Bell et al., 2013). Die mittlere Domäne ist ausschließlich aus dicht gepackten β -Faltblättern aufgebaut, an die sich C-terminal vier kurze α -Helices anschließen. Sowohl der C-terminale als auch der N-terminale Bereich sind zwar über insgesamt drei Disulfidbrücken mit den β -Strängen verbunden, scheinen aber in der Konstellation mit den Fibronectin Typ III-Domänen von Neogenin recht flexibel zu sein (C. H. Bell et al., 2013).

Neben der Beteiligung an der Entwicklung und Reparatur des zentralen Nervensystems zusammen mit Neogenin, konnten die RGMs inzwischen in verschiedensten Geweben auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Im Zusammenwirken mit den BMPs wird beispielsweise eine Rolle im Reproduktionssystem, sowie die Regulation des Eisenmetabolismus diskutiert (A.-S. Zhang et al., 2009; Lee et al., 2010) (Übersichtsartikel siehe: Corradini et al., 2009). Die spezifische Bindung von RGMs an BMPs wurde mit nanomolaren Affinitäten nachgewiesen (Babitt et al., 2005; Samad et al., 2005). Bei der Eisenstoffwechsel-Regulation wird aktuell der Einfluss auf die Hcpidin-Expression über ternäre Neogenin-BMP-RGMc-Komplexe diskutiert (A.-S. Zhang et al., 2009; Lee et al., 2010). In wie weit die RGMs einen positiven oder negativen Einfluss auf die BMP-Signalgebung haben, ist möglicherweise auch davon abhängig, ob sie über den GPI-Anker an die Zellmembran assoziiert sind oder ungebunden im extrazellulären Raum vorkommen (L. Lin et al., 2005; Babitt et al., 2006).

1.6.3 Signalmodulation durch extrazelluläre Modulatoren

Wie bereits zuvor beschrieben, spielen die Mitglieder der TGF- β Superfamilie eine unerlässliche Rolle während zahlreichen Prozessen der frühen Embryonalentwicklung. Dabei wirken sie als „Morphogene“, also Signalmoleküle, die das Schicksal der Zellen während der Musterbildung steuern und somit maßgeblich an der Festlegung der Körperachsen und Ausbildung der Organanlagen beteiligt sind (Übersichtsartikel siehe: Hogan, 1996a, 1996b; Reddi, 1997). Neben den bisher beschriebenen Möglichkeiten der Feinregulation der TGF- β Signalbildung und -weiterleitung, besteht weiter die Möglichkeit der extrazellulären Modulation, wobei der sogenannte Spemann Organisator hierbei eine Schlüsselrolle spielt (Spemann & Mangold, 1924) (Abbildung 9).

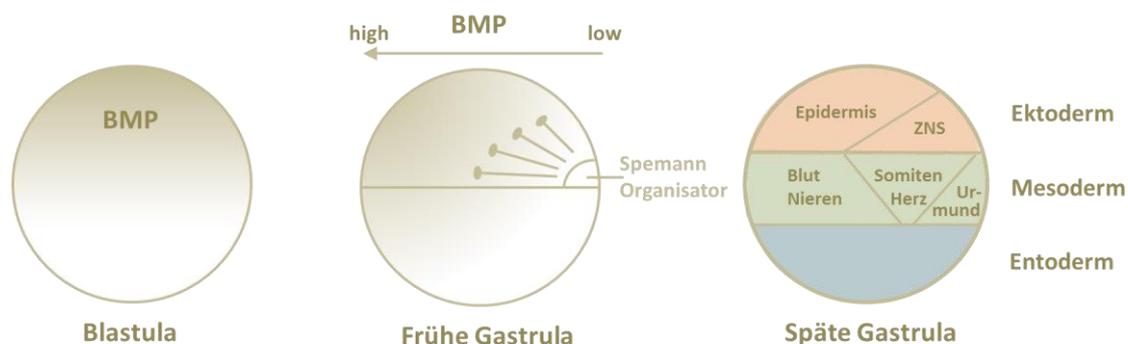


Abbildung 9: Schematische Darstellung zum Ablauf der Gastrulation bei *Xenopus* ausgehend von der Blastula bis zur Ausbildung der Keimblätter nach Little & Mullins (Übersichtsartikel siehe: Little & Mullins, 2006). Während der frühen Phase werden vom Spemann Organisator BMP Antagonisten synthetisiert, welche zur Ausbildung von BMP-Gradienten führen, die wiederum für die Ausbildung der Körperachsen und Musterbildung notwendig sind.

Inzwischen ist eine Vielzahl extrazellulärer Regulatoren beschrieben, bei denen es sich meist um Glykoproteine handelt. Diese binden hochaffin an entsprechende Liganden und inhibieren so in der Regel deren Wirkung, indem sie die Wechselwirkung mit Rezeptoren verhindern. Dabei bilden sich Konzentrationsgradienten aus, die über die Differenzierung von Zellen und damit die Entwicklung eines Organismus entscheiden (Übersichtsartikel siehe: Gazzero & Canalis, 2006).

Ähnlich wie bei den Liganden der TGF- β Familie finden sich bei den Modulatorproteinen auch bestimmte Strukturmerkmale wieder – sogenannte Cystein-reiche Domänen (CR), ähnlich den Cystinknoten-Strukturen der Liganden, anhand deren sie in verschiedene Untergruppen eingeteilt wurden (Übersichtsartikel siehe: Vitt et al., 2001; Avsian-Kretchmer & Hsueh, 2004).

1.6.3.1 Noggin

Noggin ist eines der ersten Modulatorproteine, die im Zusammenhang mit der Regulation induktiver Aktivitäten während der frühen Embryonalentwicklung in *Xenopus laevis* entdeckt wurden. Hier wird Noggin in der Blastula zunächst im Bereich des vorläufigen dorsalen Mesoderm exprimiert und erreicht seine höchste Konzentration im Spemann Organisator der Gastrula (Smith & Harland, 1992; Slack & Tannahill, 1993). Noggin bindet und inhibiert BMP-2, -4 und -7, wodurch es zur Ausbildung des Kopfes und dorsaler Strukturen kommt (Smith & Harland, 1992; Zimmerman et al., 1996). Experimente mit homozygoten Noggin *knock-out* Mäusen zeigen, dass sich ohne Noggin keine lebensfähigen Organismen entwickeln, da die Bildung des Neuralrohrs und der Somiten ausbleibt (McMahon et al., 1998) und zudem die Ausbildung des axialen Skeletts gestört ist (Wijgerde et al., 2005). Aber auch im adulten Organismus spielt Noggin eine wichtige Rolle. So führen dominant-negative Mutationen der Gensequenz zu Proteinen, deren Faltung und Stabilität beeinträchtigt ist, wodurch verschiedene Gelenke verknöchern (Gong et al., 1999; Marcelino et al., 2001).

Eine Überexpression von Noggin hingegen inhibiert die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten, beziehungsweise wird hierdurch die Funktion bereits differenzierter Zellen gehemmt, so dass es zu spontanen Knochenbrüchen kommt und die Knochendichte abnimmt (Abe et al., 2000; Devlin et al., 2003).

Noggin ist, wie die Liganden der TGF- β Superfamilie, ein kovalent verknüpftes Homodimer. Es besteht aus einer sauren N-terminalen Region, einer Cystein-reichen C-terminalen Domäne und einer diese beiden Bereiche verbindende basische Heparin-Bindestelle (Paine-Saunders et al., 2002). Noggin allein vermag sowohl die Bindung des Liganden an seinen Typ I-Rezeptor wie auch an den Typ II-Rezeptor verhindern, wobei der Ligand spangenartig umspannt wird. Das N-terminale *Clip*-Segment windet sich dabei so um den Liganden, dass das Bindeepitop des Typ I-Rezeptors vollständig sterisch blockiert wird. Die C-terminale Hälfte des *Clip*-Segments sowie die Fingerspitzen 1 und 2 eines Noggin-Monomers bedecken das Bindeepitop für die Typ II-Rezeptoren (Groppe et al., 2002) (Abbildung 10).

Bisher wurde gezeigt, dass BMP-2, -4, -5, -6, -7, -14 (GDF-5) und -13 (GDF-6) von Noggin gebunden werden, wohingegen die kein Einfluss auf die Aktivität von BMP-3, -6, -9 (GDF-2), -10, -11, -15 (GDF-9) und TGF- β 1 beobachtet wurde (Zimmerman et al., 1996) (Übersichtsartikel siehe: Bragdon et al., 2011; Krause et al., 2011).

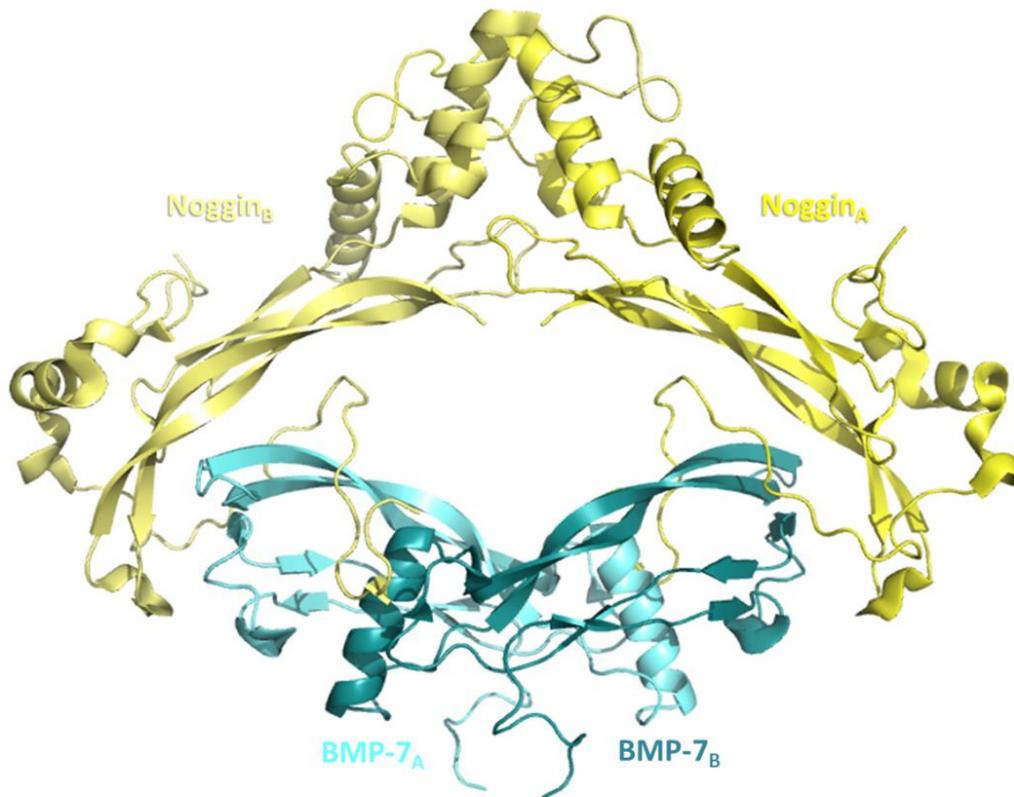


Abbildung 10: Darstellung der dreidimensionalen Struktur des Komplexes von BMP-7 und Noggin (RCSB: 1M4U; Groppe et al., 2002).

1.6.3.2 Die DAN Familie

Zur DAN (**D**ifferential screening-selected gene **a**berrative in **N**euroblastoma)-Familie zählen mehrere Proteine, die zwar zueinander insgesamt eine geringe Sequenzhomologie, aber alle ein ähnliches Cystein-Muster bestehend aus neun Cysteinen aufweisen, wobei die Abfolge –CXGXC– und –CXC– konserviert ist (Pearce et al., 1999). Wie auch Noggin wirken Dan (Stanley et al., 1998; Dionne et al., 2001), Cerberus (Shawlot et al., 1998; Piccolo et al., 1999), Caronte (Rodríguez-Esteban et al., 1999; Yokouchi et al., 1999), Coco (E. Bell et al., 2003) und Dante/Dte (Yokouchi et al., 1999) vornehmlich während der frühen Embryonalentwicklung und Ausbildung des Skeletts.

Gremlin spielt auch postnatal im adulten Organismus eine wichtige Rolle bei der Knochen-Homöostase (Pereira et al., 2000; Sun et al., 2006), wobei es ausschließlich mit BMP-2, -4 und -7 interagiert (Hsu et al., 1998).

USAG-1/Ectodin (**u**terine **s**ensitization-**a**ssociated **g**ene-1) wurde zunächst in der Gebärmutter entdeckt (Simmons & Kennedy, 2002). Inzwischen wird diesem Modulatorprotein eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung der Zahnanlagen zugeschrieben; ein Fehlen des Proteins führt zum Auftreten einer erhöhten Anzahl von Zähnen (Kassai et al., 2005; Murashima-Suginami et al., 2007). Daneben ist USAG-1 unerlässlich bei der Entwicklung der Nieren und dem Erhalt der Nierenfunktion im adulten Organismus während pathologischem Stress (Yanagita et al., 2004; Tanaka et al., 2008).

Die Expression von PRDC (**p**rotein **r**elated to **D**AN and **c**erberus) konnte in Ovarien, Hirn und Milz nachgewiesen werden (Minabe-Saegusa et al., 1998). Die Aufklärung der Struktur dieses Mitglieds der DAN-Familie gibt einen Einblick, wie vielfältig der Einfluss extrazellulärer Modulatoren auf die Wirkung von TGF- β Liganden ist, zumal diese selbst zusätzlich noch reguliert werden können (Hinck & Huang, 2013; Nolan et al., 2013).

Wie von Nolan et al. (2013) beschrieben, kommt PRDC in seiner biologisch aktiven Form als Homodimer vor, analog zu den TGF- β Liganden selbst und dem zuvor beschriebenen Inhibitor Noggin (Abbildung 11A). Jedes Monomer ist aufgebaut aus einer N-terminalen α -Helix, gefolgt von vier β -Strängen, die ähnlich wie bei den TGF- β Liganden zwei Finger ausbilden. Zusätzlich zu dieser Ähnlichkeit bildet der die β -Stränge 2 und 3 verbindende Bereich und jeweils ein Teil der Stränge selbst ein *wrist*-Epitop aus (Nolan et al., 2013) (Abbildung 11B). Die sehr stabile Interaktion zweier Monomere erfolgt nicht-kovalent durch die Ausbildung von zehn Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren C97–Y105 der β 2-Stränge jeden Monomers. Ebenfalls ist der Bereich von N102 bis Y105 des *wrist*-Epitops durch van-der-Waals Interaktionen mit den Fingerspitzen des zweiten Monomers an der Ausbildung eines stabilen Dimers beteiligt (Nolan et al., 2013). Weitere Wasserstoffbrücken bildet die *wrist*-Schleife des einen Monomers mit dem Rückgrat von Finger 1 des zweiten Monomers aus. Für die Verbindung der beiden Monomere irrelevant scheinen die N-terminalen α -Helices, da diese eine hohe konformationelle Flexibilität aufweisen. Möglicherweise spielen diese aber eine Rolle bei der BMP-Bindung (Nolan et al., 2013). Durch von Nolan et al. (2013) durchgeführte Mutagenesestudien wurden fünf Aminosäuren identifiziert, die in räumlicher Nähe zu den α -Helices liegen und aus deren Substitution gegen Alanin eine Verminderung der BMP-Affinität resultiert (Abbildung 11B). Die flexiblen α -Helices können zum Teil mit diesen Seitenketten interagieren oder diese abschirmen und so eventuell als Schalter für die Zugänglichkeit dieser Seitenketten den Liganden gegenüber fungieren (Nolan et al., 2013). Als zusätzlicher Regulationsmechanismus wirkt offenbar auch die Bindung von Heparin. Ebenso wie die für die BMP-Bindung essentiellen Aminosäuren befindet sich ein Großteil der positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin, die für die Heparin-Bindung notwendig sind, in der konvexen Region des PRDC. Interaktionsanalysen zeigten, dass die vorherige Inkubation des PRDC mit Heparin, die Bindung an BMP-2 konzentrationsabhängig hemmt (Nolan et al., 2013).

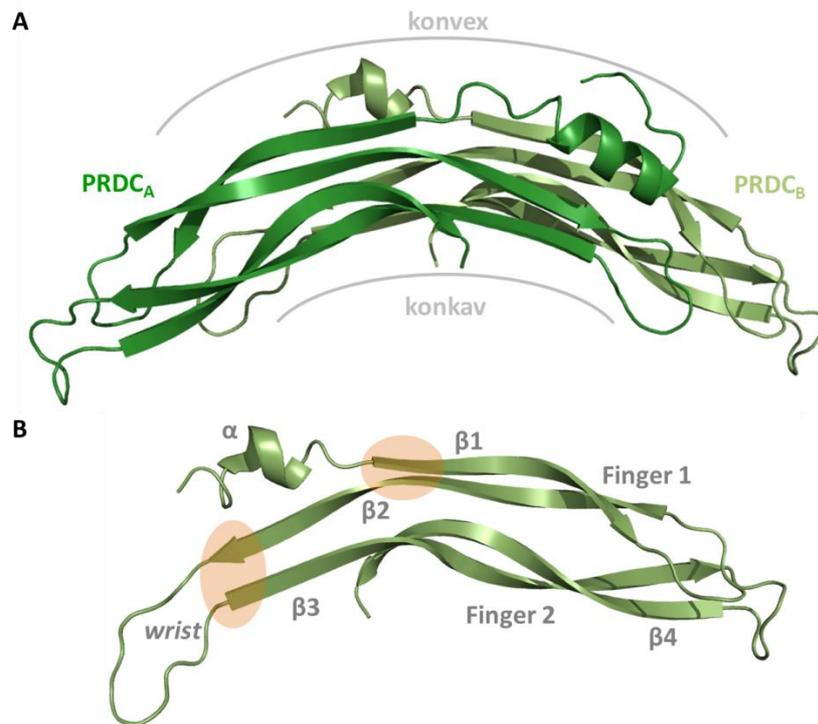


Abbildung 11: Darstellung der dreidimensionalen Struktur von PRDC (RCSB: 4JPH; Nolan et al., 2013). A Anordnung der Monomere zum Dimer. B Kennzeichnung der einzelnen Strukturelemente an einem PRDC-Monomer und Markierung der Bereiche, die möglicherweise in die BMP-Bindung involviert sind (orange hinterlegt).

Eine Sonderstellung in der DAN-Familie nimmt Sclerostin ein, das aufgrund der Aminosäuresequenz und dem Cystein-Muster dieser Familie zugeordnet wurde (Brunkow et al., 2001). Allerdings wirkt Sclerostin dabei nicht als klassischer BMP-Antagonist, sondern hat einen regulierenden Einfluss auf den Wnt-Signalweg (van Bezooijen et al., 2004). Wird Sclerostin in Osteozyten nicht exprimiert, führt dies zu Krankheiten wie Sclerosteose oder van Buchem, die in einer vermehrten Bildung der Knochensubstanz und/oder verwachsenen Zehen/Fingern resultieren (Übersichtsartikel siehe: Moester et al., 2010).

1.6.3.3 Die Chordin Familie

Chordin wurde, wie Noggin, zunächst im Spemann Organizer entdeckt, wo es die Aktivität von BMP-2, -4 und -6 inhibiert (Piccolo et al., 1996). Damit spielt es eine ähnlich wichtige Rolle während der Gastrulation, der Ausbildung der Körperachsen und neuronaler Gewebe (Sasai et al., 1994; Miller-Bertoglio et al., 1997; Bachiller et al., 2000). Charakteristisch für dieses Modulatorprotein sind vier Cystein-reiche Domänen bestehend aus 50 – 70 Aminosäuren, wovon eine im N-terminalen Bereich zu finden ist und die weiteren drei im C-Terminus lokalisiert sind (Sasai et al., 1994). Von Zhang et al. (2007) durchgeführte Analysen der separaten CR-Domänen oder auch Von Willebrand Faktor Type C Domänen (VWC) zeigten, dass sie in Abhängigkeit vom Liganden diesen auch einzeln binden. BMP-2 und BMP-7 binden das Gesamtprotein beispielsweise mit gleicher Affinität, die isolierten VWC-Domänen hingegen weisen Unterschiede in den Affinitäten auf. Während die VWC1-Domäne ähnlich hohe Affinitäten den beiden Liganden gegenüber zeigt, bindet die VWC2-Domäne keinen der Liganden nachweisbar. Die VWC3-Domäne hingegen bindet nur BMP-2 selektiv mit hoher Affinität, die VWC4-Domäne interagiert wiederum nur mit BMP-7 hochaffin (J.-L. Zhang et al., 2007). Da die Bereiche zwischen den einzelnen Domänen keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften haben, wird ein kooperatives Zusammenwirken der VWC-Domänen für die Bindung der Liganden und Inhibition der Ligand-Rezeptor-Interaktion vorgeschlagen (J.-L. Zhang et al., 2007).

Weiterhin gibt es eine Vielzahl an extrazellulären Proteinen, die VWC-Domänen enthalten, deren Cystein-Muster dem von Chordin gleicht. Die Abfolge der zehn konservierten Cysteine einer Domäne in den Motiven –CXXCXC– und –CCXC– ist beispielsweise wiederzufinden bei den den BMP-Signalweg antagonistisch beeinflussenden Proteinen wie Procollagen Typ II, Nel (Matshuhashi et al., 1995; Watanabe et al., 1996), Chordin like-1/Neuralin (Nakayama et al., 2001), Chordin like-2, Crim-1 (Kolle et al., 2000), Kielin (Matsui et al., 2000), Amnionless (Kalantry et al., 2001) und Mitgliedern der CCN-Familie (Garcia Abreu et al., 2002).

Auch Crossveinless-2, ein Modulatorprotein, das das BMP-Signal unterschiedlich beeinflussen kann, weist fünf VWC-Domänen und eine partielle VWD- sowie eine TIL-Domäne auf (Conley et al., 2000). Entdeckt wurde es während der Adermuster-

bildung bei *Drosophila*, die ausbleibt, wenn keine Expression von Crossveinless-2 stattfindet (Conley et al., 2000).

Untersuchungen zeigen, dass die VWC-Domänen verschiedener Proteine auf unterschiedliche Art und Weise mit BMPs wechselwirken - zum einen gibt es Unterschiede in der Stöchiometrie, zum anderen variieren die Bindeepitope. So können VWC-Domänen enthaltende Proteine entweder das Typ I- oder Typ II-Bindeepitop oder aber beide simultan blockieren (J.-L. Zhang et al., 2007). Letzteres trifft für Crossveinless-2 zu, wobei *in vitro* ausschließlich die erste N-terminale VWC-Domäne für die BMP-2 Bindung verantwortlich ist. Die VWC-Domänen 2-5 und auch aus diesen Domänen bestehende Fragmente zeigten keine Bindungsaffinität gegenüber den untersuchten Liganden BMP-2, BMP-7 und GDF-5 (J.-L. Zhang et al., 2007). Im Zellaassay zeigte sich allerdings, dass die VWC1-Domäne allein eine geringere inhibitorische Wirkung als das Gesamtprotein aufweist. Grund hierfür ist möglicherweise das Fehlen einer sterischen Hinderung, die im Gesamtprotein durch die anderen Domänen von Crossveinless-2 hervorgerufen wird (J.-L. Zhang et al., 2007).

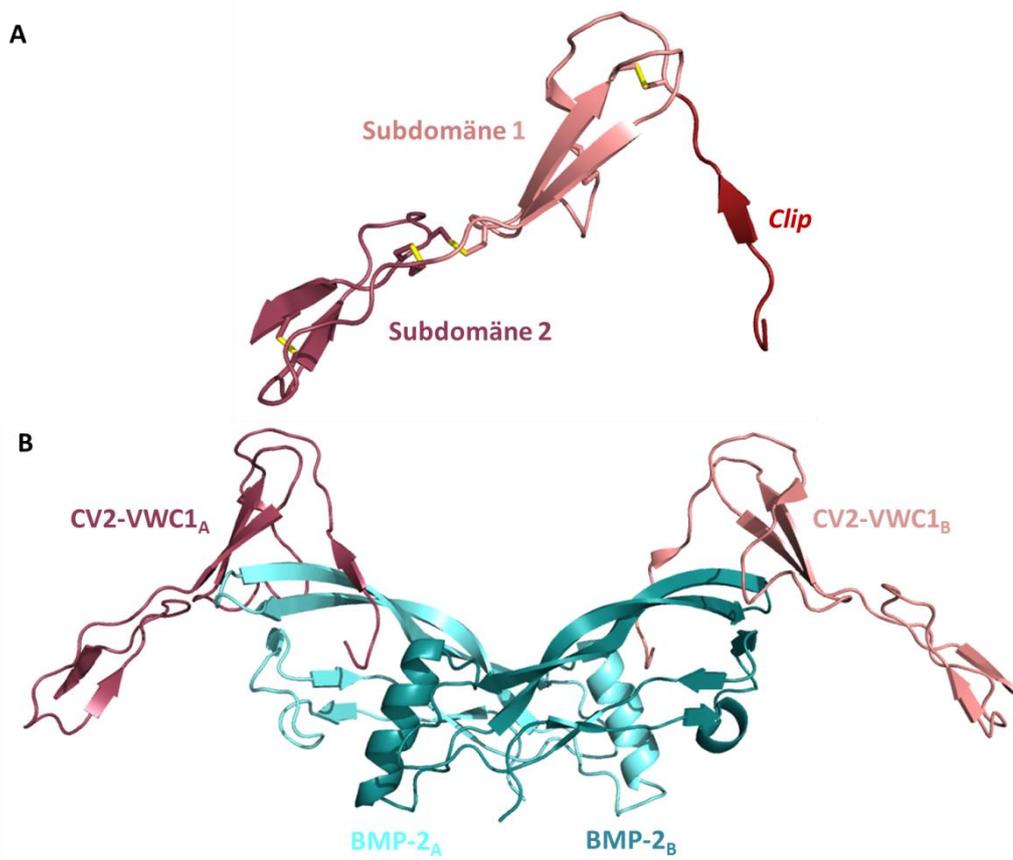


Abbildung 12: Darstellung der dreidimensionalen Struktur der VWC1-Domäne von Crossveinless-2 (A) und des Komplexes von BMP-2 und der VWC1-Domäne von Crossveinless-2 (B) (RCSB: 3BK3; J.-L. Zhang et al., 2008).

Die von Zhang et al. (2008) beschriebene Kristallstruktur der ersten VWC-Domäne von Crossveinless-2 im Komplex mit BMP-2 zeigt deren modularen Aufbau und wie die Bindeepitope für beide Rezeptoren auf molekularem Niveau blockiert werden. Die N-terminalen ersten acht Aminosäuren bilden dabei den sogenannten *Clip*, die Aminosäuren 9-42 die N-terminale Subdomäne 1 (SD1) und die Aminosäuren 43-66 die C-terminale Subdomäne 2 (SD2) (J.-L. Zhang et al., 2008). Das Gesamtprotein weist nur wenige Sekundärstrukturelemente auf, wobei vier Disulfidbrücken für eine rigide Struktur sorgen und eine Disulfidbrücke zwischen Cys 9 und Cys 31 das *Clip*-Segment an der Subdomäne 1 fixiert (Abbildung 12A).

Die Bindung von BMP-2 erfolgt kooperativ über das *Clip*-Segment und die Subdomäne 1 (Abbildung 12B). Letztere bindet hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen an die Aminosäuren im β -Faltblatt von Finger 2 von BMP-2 und blockiert damit das Bindeepitop für den Typ II-Rezeptor (J.-L. Zhang et al., 2008). Das *Clip*-Segment bindet, ähnlich wie der N-Terminus von Noggin, in das *wrist*-Epitop des Liganden. Die Bindung erfolgt in erster Linie über fünf Wasserstoffbrücken mit der Besonderheit, dass die involvierten Atome alle von der Hauptkette ausgehen (J.-L. Zhang et al., 2008). Daraus ergibt sich, dass die N-Termini von VWC-Domänen keine konservierten Sequenzen aufweisen müssen, da keine Seitenketten an der Bindung beteiligt sind. Allerdings ist an Position 2 ein Isoleucin oder Leucin in verschiedenen Spezies hochkonserviert, was direkt in die hydrophobe Tasche von BMP-2 bindet, in der normalerweise die Seitenkette der Aminosäure Phe 85 des Rezeptors BMPRIIA wechselwirkt (Kirsch, Sebald, et al., 2000; J.-L. Zhang et al., 2008). Zusätzlich spielt Gly 4 eine tragende Rolle bei der Interaktion des CV2-VWC1-Clips mit BMP-2, da aufgrund der Orientierung dieser Seitenkette zum Liganden hin, die Seitenkette jeder anderen Aminosäure diese Interaktion stören würde. Untersuchungen von Deletionsmutanten zeigten, dass die hochaffine Bindung der VWC1-Domäne von Crossveinless-2 an BMP-2 aus dem Zusammenspiel von Subdomäne 1 und *Clip*-Segment resultieren, da beide Elemente separat lediglich schwache Affinitäten aufweisen. Dabei wurde auch nachgewiesen, dass die Subdomäne 2 nicht in die Interaktion mit BMP-2 involviert ist (J.-L. Zhang et al., 2008).

Wie bereits zuvor erwähnt, kann Crossveinless-2 das BMP-Signal in Abhängigkeit vom Gesamtkontext unterschiedlich beeinflussen (Kamimura et al., 2004). Die Inhibition der durch BMP-Bindung induzierten Signalbildung, beispielsweise durch Ver-

hinderung der Bindung der BMPs an ihre Rezeptoren, wird als anti-BMP-Aktivität bezeichnet. Von Rentzsch et al. (2006) wurde nachgewiesen, dass Crossveinless-2 über eine Heparin-Bindestelle verfügt, worüber es mit an der Zelloberfläche lokalisierten Heparansulfat-Proteoglykanen interagieren kann. Über diese Interaktion besteht die Möglichkeit, die zuvor frei im extrazellulären Raum befindliche BMPs an der Zellmembran zu immobilisieren und so die Bindung an deren Rezeptoren zu verhindern (Rentzsch et al., 2006).

Als pro-BMP-Aktivität wird die Eigenschaft von Modulatorproteinen beschrieben, die Interaktion von BMPs mit ihren Rezeptoren zu vermitteln oder nach einer Inhibition wieder herzustellen. Für Crossveinless-2 wurde dies im Zusammenhang mit der Inhibition von Chordin durch Crossveinless-2 beobachtet (J.-L. Zhang et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass Chordin über seine VWC2-Domäne mit der VWC1-Subdomäne 2 sowie den VWC-Domänen 2-4 von Crossveinless-2 interagiert. Ein Modell diskutiert eine Konformationsänderung in Chordin, die aus der Bindung von Crossveinless-2 resultiert, wodurch die Affinität von Chordin gegenüber den BMP-Liganden sinkt. Diese werden aus dem Komplex entlassen und stehen wieder für die Bindung an die BMP-Rezeptoren zur Verfügung (J.-L. Zhang et al., 2010).

1.6.3.4 Twisted gastrulation

Bereits 1985 wurde beschrieben, dass Mutationen in *twisted gastrulation (tsg)* zu Veränderungen in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* bei der Festlegung der dorso-ventralen Körperachse führen (Zusman & Wieschaus, 1985). Später zeigte sich, dass vor allem die Ausbildung der dorsalen Mittellinie abhängig ist von Twisted gastrulation und es dabei vornehmlich mit Decapentaplegic interagiert (Mason et al., 1994, 1997). Aber auch in Vertebraten von *Danio rerio* über *Xenopus* bis hin zum Menschen wurde die essentielle Funktion von Twisted gastrulation bei der Regulation des BMP-Signals nachgewiesen (Scott et al., 2001). Zwischen den verschiedenen Spezies wurde ein hoher Konservierungsgrad der Sequenz festgestellt (Graf et al., 2001).

Twisted gastrulation nimmt eine Sonderstellung unter den Modulatorproteinen ein, da es zwar auch zwei Cystein-reiche Domänen mit insgesamt 24 Cysteinen aufweist, allerdings zeigen diese nur geringe bis keine Homologie zu bereits beschriebenen Domänen anderer Modulatorproteine auf. Lediglich die N-terminale Cystein-reiche Domäne hat eine geringe Homologie zu den VWC-Domänen von Chordin (Oelgeschläger et al., 2000; Vilmos et al., 2001). Ähnlich wie Crossveinless-2 hat Twisted gastrulation sowohl eine das BMP-Signal verstärkende (pro-BMP) Aktivität (Ross et al., 2001), kann aber in Abhängigkeit vom zellulären Kontext die BMP-Wirkung auch inhibieren (anti-BMP) (Oelgeschläger et al., 2000). Dabei ist entscheidend, dass Twisted gastrulation nicht alleine wirkt, sondern im Zusammenspiel mit Chordin und der Protease Xolloid das BMP-Signal moduliert.

Wie zuvor beschrieben, ist Chordin aus vier VWC-Domänen aufgebaut, wobei sich eine im N-terminalen Bereich befindet und durch eine lange Schleife von den weiteren drei im C-terminalen Bereich getrennt ist. Die Bindung und Inhibition des BMP-Liganden wird dabei hauptsächlich durch VWC1 und VWC3 vermittelt (Larraín et al., 2000; J.-L. Zhang et al., 2007). Twisted gastrulation kann diese Bindung und somit auch Inhibition durch die Bildung eines ternären Komplexes verstärken (C. Chang et al., 2001) (Abbildung 13).

Um die Inhibition der BMPs durch Chordin aufzuheben, besteht die Möglichkeit der proteolytischen Spaltung von Chordin durch die Metalloprotease Xolloid an zwei Schnittstellen jeweils unmittelbar nach den VWC-Domänen 1 und 3 (Piccolo et al., 1997). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass auch die einzelnen VWC-Domänen weiterhin BMPs binden und damit die Bindung an die Rezeptoren weiter verhindern können (Larraín et al., 2000; J.-L. Zhang et al., 2007). Hier wiederum führt das Vorhandensein von Twisted gastrulation dazu, dass sich die einzelnen VWC-Domänen vom Liganden lösen und degradiert werden, wodurch BMP wieder an die Rezeptoren binden kann (Oelgeschläger et al., 2000). Für die Steuerung der verschiedenen Funktionen von Twisted gastrulation ist dabei die Konzentration der beteiligten Faktoren verantwortlich (Larraín et al., 2001) (Übersichtsartikel siehe: Little & Mullins, 2006).

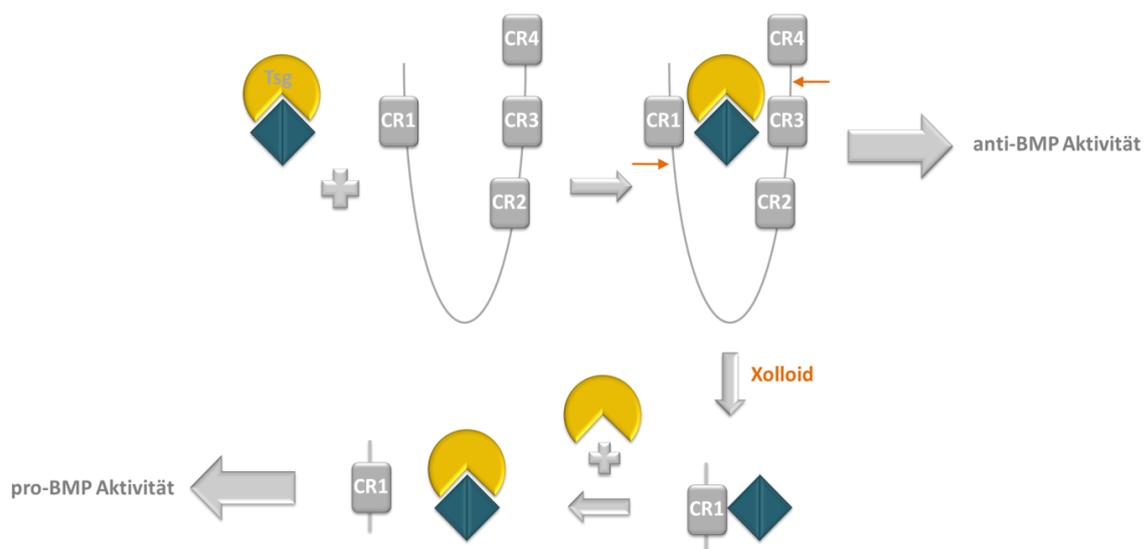


Abbildung 13: Schematische Darstellung der verschiedenen Einflüsse von Twisted gastrulation auf die BMP-Aktivität durch die Interaktion mit BMP-2/-4 und Chordin beziehungsweise den einzelnen VWC/CR-Domänen nach der Spaltung von Chordin durch die Protease Xolloid (Übersichtsartikel siehe: Dale, 2000; Garcia Abreu et al., 2002).

Einen detaillierteren Einblick bezüglich der Bindung von BMP und Chordin an Twisted gastrulation geben Untersuchungen von Oelgeschläger et al. (2000). Mittels Immunopräzipitation konnte die spezifische Bindung von Twisted gastrulation an BMP-2 und -4 nachgewiesen und durch Expression der isolierten N- und C-terminalen Domänen das Bindepitop zu BMPs im N-terminalen Bereich lokalisiert werden. Für die hochaffine Bindung von Chordin scheint hingegen das vollständige

Protein nötig zu sein, da für die einzelnen Fragmente keine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Oelgeschläger et al., 2000). Die darauffolgende Untersuchung von Punktmutationen rückt die Aminosäure Trp 67 in den Fokus der BMP-Bindung, da die Variante W67G von Twisted gastrulation keine ternären Komplexe mit BMP-4 und Chordin bildet, aber weiterhin die Interaktion von Cystein-reichen Domänen mit BMP-4 beeinflussen kann (Oelgeschläger et al., 2003).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie sind in unzählige zelluläre Vorgänge involviert. Dabei reicht das Spektrum von der Ausbildung der Körperachsen und Organanlagen während der frühen Embryonalentwicklung über die postnatale Wachstumsregulation des Organismus bis hin zum Erhalt der Gewebshomöostase und Reparatur von Gewebeschäden im adulten Organismus. Das Fehlen oder die Fehlfunktion eines Faktors führt in der Regel zu Missbildungen und Krankheitsbildern. Aber nicht nur allein das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines Faktors entscheidet über die entsprechende Funktion, sondern ein komplexes System von Regulationsmechanismen ist involviert, um das breite Wirkspektrum der Mitglieder der TGF- β Superfamilie zu ermöglichen. Neben der Regulation im Zellinnern oder auf der Membranebene, wurden im Laufe der Zeit eine stetig zunehmende Anzahl extrazellulärer, meist antagonistisch wirkender, Modulatorproteine beschrieben. Während einige inzwischen sehr gut *in vivo* und auch biophysikalisch charakterisiert sind, ist für eine Großzahl von Modulatorproteinen der molekulare Mechanismus noch nicht bekannt.

Twisted gastrulation kommt hierbei eine besondere Rolle zu, da neben der beschriebenen dualen Funktion, wie sie auch bei Crossveinless-2 beobachtet wurde, vor allem das Zusammenspiel mit einem weiteren Modulatorprotein und einer Protease bisher einmalig ist.

Um das Verständnis der Wirkung von Twisted gastrulation auf die Aktivität von BMP zu verbessern, sollte das Protein im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellt und anschließend strukturell und funktionell analysiert werden. In Hinblick auf die starke Disulfidverbrückung und die damit eventuell einhergehenden Schwierigkeiten bei der Expression des Proteins, stand zunächst die Etablierung der Expression in verschiedenen Systemen im Fokus, bevor Bindungseigenschaften, der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen und strukturelle Aspekte untersucht wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle nicht separat aufgeführten Chemikalien und Enzyme wurden in höchster Reinheit und Qualität von den Firmen Carl Roth GmbH und Co. KG, AppliChem GmbH, Sigma-Aldrich Chemie, Fermentas/ThermoScientific, New England Biolabs, Finnzymes/Biozym, Roche und QA-Bio GmbH bezogen.

2.1.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm für allgemeine molekularbiologische Arbeiten:

Escherichia coli

NovaBlue™ (Novagen): *endA1 hsdR17* ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* F'[*proA+B+lacI^qZΔM15::Tn10*] (Tet^R)

Bakterienstämme für Proteinexpression:

Escherichia coli

BL21 (DE3)* (Novagen): F⁻*ompT hsdS_B* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm rne131* (DE3)

Escherichia coli

Origami B (DE3) (Novagen): F⁻ *ompT hsdS_B* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm lacY1 ahpC* (DE3) *gor522::Tn10 trxB* (Kan^R, Tet^R)

2.1.3 Vektoren

pET28b (Novagen):

E.coli-Expressionsvektor, T7lac-Promotor, Kan^R, N- oder C-terminale Hexa-Histidin-Fusionssequenz (His₆), N-terminale His₆-Sequenz abspaltbar durch die Protease Thrombin

pET28b_BamHI (Novagen, pET28b-Derivat):

s. pET28b

zusätzliche *BamHI*-Restriktionsschnittstelle in der Sequenz für Thrombin-Schnittstelle

pET32b_mod (Novagen; modifiziert nach Kirsch, Nickel, et al., 2000b):

E.coli-Expressionsvektor, T7lac-Promotor, Amp^R, N-terminale Thioredoxin- und His₆-Sequenz, C-terminale His₆-Sequenz, N-terminale His₆-Sequenz abspaltbar durch die Protease Thrombin

Modifikation: durch Deletion der Basenpaare 223-297 ist das Einfügen des Zielgens über die *NcoI*-Schnittstelle (bp 216-211) direkt im Anschluss an die Thrombin-Schnittstelle möglich

pMK1 (Novagen, pBAC3-Derivat):

Baculovirus-Transfer- und Expressionsvektor zur Expression in *Sf-9*-Insektenzellen, polh-Promotor, Amp^R, N- oder C-terminale His₆-Fusionssequenz, N-terminale His₆-Sequenz abspaltbar durch die Protease Thrombin, gp64-Signalsequenz für Sekretion

Modifikation: zusätzliche BamHI-Schnittstelle in Sequenz für Thrombin-Schnittstelle

pHLsec (Aricescu et al., 2006):

Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen, Amp^R, Chicken β -Actin-Promotor, optimierte Signal-Sequenz für Sekretion, C-terminale His₆-Fusionssequenz

2.1.4 Oligonukleotide

für Sequenzierung:

Vektor	Oligonukleotid	Oligonukleotidsequenz
pET28b,	T7 Promotor	5`-TAATACGACTCACTATAGGG-3`
pET28b_BamHI	T7 Terminator	5`-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3`
pET32b_mod	T7 Promotor	5`-TAATACGACTCACTATAGGG-3`
	pet32PA_seq_rev	5`-CCCTCAAGACCCGTTTAG-3`
pMK1	pBAC3_s (gp64 Signal Primer)	5`-AGCGCTATTGTTTTATATGTGC-3`
	pBAC3_as (1629DWN Primer)	5`-CTGTAAATCAACAACGCACAG-3`
pHLsec	pCAG-F	5`-GCAACGTGCTGGTTATTGTG-3`
	Bglob-pA-R	5`-TTTTGGCAGAGGGAAAAAGA-3`

2.1.5 Kulturmedien und Zusätze

Medien

SOB-Medium:	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl
SOC-Medium:	autoklaviertes SOB-Medium plus 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 0.4% Glucose (Stammlösungen steril filtriert)
LB-Medium:	granuliertes Fertigmmedium (Melford), 25 g gelöst in 1 l ddH ₂ O ergeben folgende Zusammensetzung: 10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7.0
LB-Agar-Platten:	Fertigmischung (Roth), 35 g gelöst in 1 l ddH ₂ O ergeben folgende Zusammensetzung: 10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Agar-Agar, pH 7.0
Kulturmedium für <i>Sf-9</i> /	
TriEx-Insektenzellen:	InsectXpress (LONZA)

Material und Methoden

Kulturmedium für High-Five™-Insektenzellen:	IPL-41-Pulvermedium mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃ (Genaxxon); pro 1 l gebrauchsfertigem Medium werden 25.63 g Pulvermedium, 4 g Hefeextrakt, 0.35 g NaHCO ₃ gelöst, der pH-Wert auf 6.1 eingestellt und steril filtriert
Kulturmedium für C2C12-Zellen:	DMEM + GlutaMAX™, high glucose, pyruvate (Gibco)
Kulturmedium für ATDC5-Zellen:	DMEM + Ham`s F-12 (1:1) (Biochrome)
Kulturmedium für FreeStyle™ 293-Zellen:	FreeStyle™ 293 Expression Medium (Gibco)

Zusätze

Lipid Medium Supplement:	gebrauchsfertige Lösung (Sigma)
FCS für Insektenzellen:	Charge 0991L (Biochrome)
FCS für Säugerzellen:	Charge 0027S (Biochrome)
Penicillin/Streptomycin (P/S):	gebrauchsfertige Lösung mit je 10.000 U/ml (Lonza)
Ampicillin:	Stocklösung: 100 mg/ml in ddH ₂ O Arbeitskonzentration: 100 µg/ml
Kanamycin:	Stocklösung: 100 mg/ml in ddH ₂ O Arbeitskonzentration: 30 µg/ml
Tetracyclin:	Stocklösung: 5 mg/ml in Ethanol reinst. Arbeitskonzentration: 12.5 µg/ml

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten werden die in Tabelle 1 angegebenen Komponenten pipettiert.

Tabelle 1: Pipettierschema für einen PCR-Ansatz

Komponente	Konzentration	Volumen für einen Ansatz von 50 μl
DNA-Matritze	0.2 ng/ μl	x μl
dNTP-Mix (2.5 mM)	0.25 mM	5 μl
Primer sense (10 μM)	0.4 μM	2 μl
Primer antisense (10 μM)	0.4 μM	2 μl
Phusion HF-Puffer (5x)	1x	10 μl
Phusion-Polymerase (2 U/μl)	0.02 U/ μl	0.5 μl
ddH₂O		ad 50 μl

Der PCR-Ansatz wird zunächst im Thermocycler (labcyler, Sensoquest) für 2 min auf 98°C erhitzt, um die enthaltene DNA initial zu denaturieren. Anschließend startet das Programm, während dem die DNA denaturiert wird (1 min, 98°C), anschließend die Oligonukleotidprimer für 30 sec mit den komplementären Einzelsträngen der DNA hybridisieren und schließlich die Synthese der DNA-Fragmente bei 72°C erfolgt. Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotidprimer variiert dabei sequenzabhängig und die Dauer der Synthesephase ist abhängig von der Größe des zu amplifizierten DNA-Fragments und der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase. Nach 30 Zyklen schließt eine 5-minütige finale Synthesephase die Reaktion ab.

Das Einfügen von Mutationen in DNA-Bereiche erfolgte durch eine zweistufige PCR. Dabei werden zunächst Oligonukleotidprimerpaare synthetisiert, die die gewünschte Mutation enthalten, wobei diese zu beiden Seiten der Mutation über 12-15 Basen komplementär zur DNA-Matritze sind. Im ersten Schritt erfolgt die Synthese von im Mutationsbereich überlappenden Teilfragmenten. Dabei werden in zwei getrennten Reaktionsansätzen jeweils ein „sense“ Mutageneseprimer mit einem das DNA-Fragment extern flankierenden „antisense“ Oligonukleotidprimer und ein „antisen-

se“ Mutageneseprimer mit einem externen „sense“ Oligonukleotidprimer kombiniert. Für den zweiten Syntheseschritt werden die Produkte des ersten Schrittes 1:100 verdünnt und jeweils 1 µl als neue DNA-Matrize in den Reaktionsansatz gegeben. Durch Verwendung der externen Primer werden die Teilfragmente kombiniert.

2.2.2 Restriktionsreaktion

Die aus der PCR erhaltenen DNA-Fragmente werden mittels Restriktionsendonukleasen enzymatisch geschnitten, um sie gerichtet in den Zielvektor einfügen zu können.

Tabelle 2: Pipettierschema für eine Restriktionsreaktion

Komponente	PCR-Produkt	Vektor
DNA	25 µl	3-5 µg
Restriktionsenzym 1	1 µl (10U)	1-1.5 µl (10-15 U)
Restriktionsenzym 2	1 µl (10U)	1-1.5 µl (10-15 U)
Puffer (10x)	4 µl	4 µl
Wasser	ad 40 µl	ad 40 µl

Für eine Reaktion in der zwei verschiedenen Enzymen gleichzeitig eingesetzt werden, wird der Ansatz, wie in Tabelle 2 angegeben, pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die angegebene Menge der Restriktionsenzyme kann variieren, je nachdem wie verschieden deren Aktivitäten im gewählten Puffer sind.

Nach dem Schneiden von Vektoren, werden diese zusätzlich durch die Zugabe von 2 µl alkalischer Phosphatase (FastAP, Fermentas) und Inkubation für 10 min bei 37°C dephosphoryliert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt bei 65°C für die Dauer von 15 min. Dadurch soll eine Selbstligation des Vektors ohne einzufügendes DNA-Fragment vermieden werden.

Geschnittene DNA-Fragmente und Vektoren werden im Anschluss an die Restriktionsreaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.3) aufgetrennt und anschließend unter Verwendung eines PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit (Süd-Laborbedarf) isoliert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer:	40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8.5
6x DNA-Ladepuffer:	0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0,025% (w/v) Xylen-CyanolFF, 30% (v/v) Glycerin
DNA-Größenstandard:	MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas #SM0403) vor Anwendung mit 1 VT 6x DNA-Ladepuffer und 4 VT ddH ₂ O verdünnt

Für die Analyse der Größe von PCR-Produkten und die Auftrennung von DNA-Fragmenten und Vektoren aus Restriktionsreaktionen werden 1%ige (w/v) TAE-gepufferte Agarosegele in einem horizontalen Elektrophoresesystem (PerfectBlue Mini S/M, Peqlab) verwendet. Zur Visualisierung der DNA-Banden in einem Geldokumentationssystem wird die noch flüssige Agarose mit dem Fluoreszenz-Farbstoff *GelGreen Nucleic Acid Stain* (BIOTIUM) (0.35x) versetzt. Dieser erlaubt die Detektion durch den Dark Reader® Transilluminator (Clare Chemical) bei einer Wellenlänge von 500 nm.

Die zu analysierenden Proben werden vor dem Beladen auf das Gel mit 6x Ladepuffer versetzt. Für die Abschätzung der Größe der DNA-Banden werden 6 µl des Größenstandards aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgt für 30 – 40 min bei einer Spannung von 120 V in TAE-Puffer.

2.2.4 Ligation

Für die Insertion eines DNA-Fragments in den Zielvektor wird der in Tabelle 3 angegebene Reaktionsansatz pipettiert.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für Ligation

Komponente	Menge/Volumen
DNA-Fragment	variabel
Vektor	100 ng
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	0.5 µl (2.5 U)
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	2 µl
Wasser	ad 20 µl

Die einzusetzende Fragment-Menge wird anhand der photometrisch bestimmten Konzentration und der unten angegebenen Formel berechnet.

$$ng \text{ Fragment} = \frac{ng \text{ Vektor} \times kb \text{ Fragment}}{kb \text{ Vektor}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Fragment}}{\text{Vektor}}$$

Das molare Verhältnis von DNA-Fragment zu Vektor beträgt 3:1.

Der Ligationsansatz wird für 10 min bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert, bevor 10 µl für die Transformation chemisch-kompetenter Zellen verwendet werden.

2.2.5 DNA-Transformation in chemisch kompetente *E.coli* Zellen

2.2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

Tfbl-Puffer: 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin; mit 0.1 M Essigsäure auf pH 5.8 einstellen

TfbII-Puffer: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin; mit 0.1 M NaOH-Lösung auf pH 6.5 einstellen

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode werden 50 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur des gewünschten Stammes, bei vorhandener Resistenz unter Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums, inokuliert und bei 37°C unter Schütteln (130 rpm, Multitron Standard, INFORS HT) inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.4 werden die Zellen für 15 min auf Eis gekühlt und anschließend mittels Zentrifugation (5 min, 4°C, 4500xg) pelletiert. Das Medium wird verworfen und die Zellen werden in 20 ml TfbI-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Inkubation der Zellsuspension für 5 min auf Eis und Zentrifugation (siehe oben), erfolgt die Aufnahme der Zellen in 4 ml TfbII-Puffer. Nach einem weiteren 15-minütigen Inkubationsschritt auf Eis, wird die Zellsuspension in 50 µl-Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

Für die Transformation wird ein auf Eis aufgetautes Aliquot der Zellen mit 10 – 50 ng Vektor-DNA versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt das Einbringen der DNA in die Zellen mittels 90-sekündigem Hitzeschock bei 42°C. Nach kurzem Abkühlen der Zellsuspension auf Eis wird diese mit 300 µl SOC-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss daran werden 50-200 µl der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.6 Überprüfung von Vektoren und Insertion von Genfragmenten

2.2.6.1 Kolonie-PCR

Um nach Ligation und Transformation Aufschluss über das Vorhandensein des Vektors und den Erfolg der DNA-Insertion zu erhalten, wird jeweils 1 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einem Einzelklon der LB-Agarplatte inokuliert. Nach Schütteln bei 37°C für 3-4 h (130 rpm), werden die Zellen pelletiert (5 min, RT, 13.000xg), in 50 µl Wasser resuspendiert und für 5 min bei 95°C lysiert. Nach der Abtrennung von Zellfragmenten (siehe oben), dienen 2 µl des Überstands als DNA-Matrize für die folgende PCR entsprechend der Tabelle 4.

Tabelle 4: Pipettierschema für Ansatz einer Kolonie-PCR.

Komponente	Konzentration im Ansatz	Volumen für einen Ansatz von 25 µl
DNA-Matrize		2 µl
MgCl₂ (25 mM)	2 mM	2 µl
dNTP-Mix (2.5 mM)	0.25 mM	2.5 µl
Primer sense (10 µM)	0.4 µM	1 µl
Primer antisense (10 µM)	0.4 µM	1 µl
TrueStart <i>Taq</i> Buffer (10x)	1x	2.5 µl
TrueStart Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0.03 U/µl	0.15 µl
ddH₂O		ad 25 µl

Sequenzier-Oligonukleotidprimer, die 5`und 3`-terminal des eingefügten DNA-Fragments binden, werden zur Überprüfung eingesetzt. Der Programmverlauf gleicht dem in 2.2.1 beschriebenen, wobei die Denaturierungstemperatur nur 95°C betrug, bedingt durch die Verwendung der TrueStart Hot Start *Taq* DNA Polymerase. Im Anschluss erfolgt die Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.6.2 Plasmid-DNA Isolierung und analytische Restriktionsanalyse

Lösung I: 50 mM Glucose, 25 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA

Lösung II: 0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS

Lösung III: 3 M Kaliumacetat pH 4.8

Wird das Vorhandensein eines DNA-Fragments mittels analytischem Restriktionsverdau geprüft, werden zunächst 3-5 ml einer mit einer Einzelkolonie beimpften Übernachtskultur zentrifugiert (10 min, 4°C, 4500xg). Im Anschluss folgt die Plasmid-Präparation mittels „alkalischer Lyse“. Hierfür wird das Zellpellet in 200 µl Lösung I unter Zugabe von 100 µg RNase resuspendiert, anschließend werden 200 µl Lösung II hinzugegeben und das Reaktionsgefäß sechsmal invertiert. Nach der Lyse, erfolgt die Fällung von Proteinen und genomischer DNA durch Zugabe von Lösung III und wiederholtem Invertieren. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (10 min, RT, 13.000xg) werden 600 µl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wird durch Zugabe von 600 µl Isopropanol, 2-minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (15 min, RT, 13.000xg) präzipitiert. Der Überstand wird verworfen, die DNA mit 1 ml 70%igem kalten Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Nach dem Lösen des Pellet in 20 µl Wasser werden 5 µl für einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt.

Dieser wird wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, unter Verwendung von 0.5 U jedes Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Aufschluss über das Vorhandensein des eingefügten DNA-Fragments gibt die Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.7 Sequenzierung

Für die Überprüfung der DNA-Sequenz werden zuvor positiv getestete Plasmide von der Firma GATC unter Verwendung der vom Plasmidhersteller angegebenen Vektorspezifischen Oligonukleotidprimer (siehe 2.1.4) analysiert. Die erhaltene Sequenz wurde mit dem Programm *ApE* auf Richtigkeit überprüft.

2.2.8 Plasmid-Präparation

Die Vermehrung von Plasmid-DNA kann in verschiedenen Maßstäben durchgeführt werden. Für die Präparation von bis zu 20 µg Plasmid-DNA werden 3-5 ml Übernachtskultur in LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Selektionsantibiotikums verwendet und die DNA mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben isoliert.

Für DNA-Mengen bis zu 250 µg werden 50-100 ml Übernachtskultur eingesetzt und unter Verwendung des Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen) aufgereinigt.

2.3 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Rotiphorese Gel 40 (29:1):	40% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1 (Roth)
4x Upper Tris Puffer:	0.5 M TrisHCl pH 6.8, 0.4 % (w/v) SDS
4x Lower Tris Puffer:	1.5 M TrisHCl pH 8.8, 0.4 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris, 0.19 M Glycin, 0.15% (w/v) SDS
6x Protein-Probenpuffer:	375 mM TrisHCl pH 6.8, 9% (w/v) SDS, 60% (v/v) Glycerin (87%), 0.015% (w/v) Bromphenolblau, gegebenenfalls 12% (v/v) β -Mercaptoethanol
2x Protein-Probenpuffer:	125 mM TrisHCl pH 8.6, 3% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0.005% (w/v) Bromphenolblau, gegebenenfalls 4% (v/v) β -Mercaptoethanol

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) wird zur Auftrennung von Proteinproben in einem elektrischen Feld und Bewertung dieser hinsichtlich Qualität und Quantität genutzt. Hierzu werden Gele, deren Zusammensetzung in Tabelle 5 angegeben ist, in einem vertikalen Elektrophoresesystem (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) verwendet. Der Vernetzungsgrad der verwendeten Gele ist abhängig vom Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine.

Tabelle 5: Pipettierschema für Sammel- und Trenngel der Gele für die SDS-PAGE, Mengenangaben für 2 Gele (10x10 cm) mit 0,75 mm Dicke

Komponente	Trenngel (12%)	Trenngel (16%)	Sammelgel (4%)
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	3.0 ml	4 ml	0.5 ml
4x Upper Tris Puffer	-	-	1.25 ml
4x Lower Tris Puffer	2.5 ml	2.5 ml	-
87 % Glycerol	2.0 ml	2.0 ml	-
ddH ₂ O	2.5 ml	1.5 ml	3.2 ml
TEMED	20 μ l	20 μ l	15 μ l
40 % APS	20 μ l	20 μ l	15 μ l

2.3.1.1 Probenvorbereitung

Die zu analysierenden Proben werden je nach enthaltener Proteinmenge 1:1 mit 2x oder 1:5 mit 6x PPP (reduzierend/nicht-reduzierend) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. In die Probentaschen des Gels werden bis zu 20 µl Proteinprobe gefüllt. Die Auftrennung dieser erfolgt in SDS-Laufpuffer bei 280 V, bis die Lauffront das untere Gelende erreicht hat. Zur Abschätzung des apparenten Molekulargewichts fokussierter Proteinbanden werden 5 µl eines geeigneten Größenstandards in eine Probentaste des Gels aufgetragen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Größenstandards der Firma Fermentas

Größenstandard	Molekulargewichtsbereich	Anwendung
Unstained Protein Molecular Weight Marker (#26610)	14.4 bis 116 kDa	12% SDS-PAGE
PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder (#26632)	3.4 bis 100 kDa	16% SDS-PAGE
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (#26619)	10 bis 250 kDa	SDS-PAGE mit anschl. WesternBlot

2.3.1.2 Proteinfällung

Sind Proteinproben stark verdünnt oder befindet sich das Protein in einem Puffer, der nicht kompatibel ist mit der SDS-PAGE, können die Proteine mittels TCA/Ethanol-Fällung angereichert werden. Hierzu wird je nach enthaltener Proteinmenge ein entsprechendes Volumen der zu analysierenden Proteinlösung abgenommen und mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt, mit jeweils 250 µl 100%igem (v/v) Ethanol und 250 µl 50%iger (v/v) TCA-Lösung versetzt und gut gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis, wird das präzipitierte Protein 10 min bei 16000xg pelletiert, mit 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 50 µl 2x PPP und 10 µl 1 M TrisHCl pH 8.0 gelöst und für 5 min bei 95°C erhitzt.

2.3.1.3 Methoden zum Anfärben von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Coomassie-Färbung

- Coomassie-Färbelösung: 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Ethanol, 50% (v/v) Wasser, 0.12% (w/v) Brilliant Blue R250, 0.12% (w/v) Brilliant Blue G250
- Entfärberlösung: 30% (v/v) Ethanol, 6% (v/v) Essigsäure, 64% (v/v) Wasser

Für den Nachweis von Proteinmengen > 1 µg wird im Anschluss an die SDS-PAGE das Gel in der Färbelösung für 20 s in der Mikrowelle erhitzt und für 15 min unter Schwenken inkubiert. Überschüssige Färbelösung wird durch Waschen mit Wasser entfernt, bevor das Gel so lange in Entfärberlösung inkubiert wird, bis blaue Proteinbanden vor vollständig entfärbtem Hintergrund sichtbar sind.

Silberfärbung

Sollen Proteinmengen < 1µg nachgewiesen werden, findet die Silberfärbung Verwendung. Hierfür werden im Anschluss an die SDS-PAGE die Proteine für 5 min in Lösung 1 im Gel fixiert und die Färbung, wie in Tabelle 7 beschrieben, fortgeführt. Das Gel wird hierbei unter stetigem Schwenken in den angegebenen Lösungen inkubiert.

Tabelle 7: Protokoll zur Durchführung einer Silberfärbung, alle verwendeten Stammlösungen werden in ddH₂O angesetzt, Waschstschritte sind als „W“ gekennzeichnet

Lösung	Zusammensetzung	Inkubationsdauer
1	30 ml 50% (v/v) Aceton, 0.75 ml 50% (w/v) TCA, 12.5 µl, 37%(w/v) Formaldehyd	5 min + W
2	30 ml ddH ₂ O	5 min + W
3	30 ml 50% (v/v) Aceton	5 min
4	30 ml dH ₂ O, 50 µl 10% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃	1 min + W
5	30 ml ddH ₂ O, 0.4 ml 20% (w/v) AgNO ₃ , 0.3 ml 37% (w/v) Formaldehyd	8 min + W
6	30 ml ddH ₂ O, 0.6 g (w/v) NaCO ₃ , 12.5 µl 37% (w/v) Formaldehyd, 25µl 10% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃	bis Banden sichtbar werden
7	1% (v/v) Essigsäure	15 min

Im Anschluss an die Färbung eines Gels kann dieses nach 30 min Inkubation in Trocknerlösung (30% Methanol, 6% Glycerin) zwischen Cellophanfolie auf einem Rahmen zur langfristigen Aufbewahrung getrocknet werden.

2.3.2 Detektion von Proteinen mit His₆-Sequenz mittels Western Blot Analyse

Blot-Puffer:	24 mM Tris, 200 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol
TBS-Puffer:	10 mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl
TBST/T-Puffer:	20 mM TrisHCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20, 0.2% (v/v) Triton X-100
<i>Blocking</i> -Puffer (5prime):	0.5% (w/v) <i>Blocking Reagent</i> werden unter Rühren bei 70°C in 1x <i>Blocking Reagent Buffer (10x)</i> gelöst, nach Abkühlen der Lösung werden 0.1% (v/v) Tween20 hinzu gegeben
Antikörper-Lösung:	<i>Penta·His HRP Conjugate (5prime)</i> 1:2000 verdünnt in <i>Blocking-Puffer</i>
Entwickler-Lösung:	20% (v/v) Kodak LX24 Röntgenentwickler
Fixier-Lösung:	20% (v/v) Kodak AL4 Röntgenfixierbad

Für die Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper werden diese im Anschluss an die SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran 0.45 µm, Whatman) übertragen. Hierfür wurde das Nass-Blot-Verfahren verwendet (Rotiphorese® PROclamp MINI Tank-Blotting-System, Carl Roth). Das Gel wird hierfür zunächst für 10 min in Blot-Puffer äquilibriert und alle weiteren Bestandteile der Transfereinheit (Blot-Matten, Filterpapiere, Membran) in Blot-Puffer eingelegt. Nach dem Zusammenbau der Transfereinheit, erfolgt die Übertragung der Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Spannung von 60 V für 1 h in der mit Puffer gefüllten Blot-Kammer.

Der Nachweis von Proteinen mit His₆-Sequenz erfolgt unter Verwendung des *Penta·His HRP Conjugate Kits (5prime)*. Durch die direkte Kopplung der für die Chemolumineszenz-Detektionsreaktion benötigten *Horseradish*-Peroxidase (HRP) an den primären Antikörper entfällt die Verwendung eines sekundären Antikörpers.

Um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen, wird diese nach zweimaligem Waschen für 10 min in TBS-Puffer für 1 h in 5 ml Block-Puffer bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBST/T- und einmaligem Waschen in TBS-Puffer für je 10 min, erfolgt die Bindung des Antikörpers an die auf der Membran immobilisierten Proteine durch Inkubation der Membran in der Antikörperlösung unter Schütteln bei RT für 1 h oder 4°C über Nacht. Nach Wiederholung der vorherigen 3 Waschschritte folgt die Detektionsreaktion.

Hierfür wird die Membran mit je 300 µl der Luminol- und Wasserstoffperoxid-Lösung (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) für 3 min inkubiert, anschließend in Folie eingeschlagen und in einer Röntgenkassette ein Röntgenfilm (Cronex 5, AGFA) für die Dauer von 1-10 min exponiert. Anschließend erfolgt die Entwicklung des Films bis Banden sichtbar werden.

2.3.3 Nachweis biotinylierter Proteine mittels Western-Blot-Analyse und Streptavidin-HRP

Waschpuffer:	1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4) + 0.05% Tween20
<i>Blocking</i> -Puffer:	5% (w/v) BSA in Waschpuffer
Streptavidin-Lösung:	Streptavidin-HRP (<i>High Sensivity</i> , PIERCE) 1:10.000 verdünnt in <i>Blocking</i> -Puffer

Biotinylierte Proteine können durch die hochaffine Bindung von Streptavidin an Biotin nachgewiesen werden. Hierzu wird die Probe zunächst mittels SDS-PAGE (siehe 2.3.1) aufgetrennt und auf die Nitrozellulose-Membran übertragen (siehe 2.3.2).

Die Nachweisreaktion wird, wie in 2.3.2 beschrieben, durchgeführt und unterscheidet sich durch die Verwendung der angegebenen Puffer. Zusätzlich wird nach einer 30-minütigen Inkubation der Membran in der Streptavidin-Lösung stringenter gewaschen, indem der Waschpuffer fünfmal im Abstand von 5 min gewechselt wird.

2.3.4 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration (c) nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz wird ein UV-Absorptionsspektrum im Bereich von 250 – 320 nm aufgenommen (Evolution300, Thermo Electron Corporation).

$$c = \frac{A_{280} - A_{320}}{\epsilon_{280} \cdot d} \quad (\text{Schichtdicke } d = 1 \text{ cm})$$

Die dabei für Proteine charakteristischen Spektren mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm (A_{280}) resultieren hauptsächlich aus der chromophoren Wirkung der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein (Galla & Müller, 1988). Die Messung der Absorption bei 320 nm (A_{320}) dient dem Abzug von Streulichteffekten. Der von der Protein-Zusammensetzung abhängige spezifische Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) wird mit Hilfe des Programms ProtParam ermittelt (Edelhoch, 1967; Gill & von Hippel, 1989; Pace et al., 1995).

Tabelle 8: Übersicht der mittels ProtParam berechneten molaren Extinktionskoeffizienten und molaren Massen der in der Arbeit verwendeten Proteine

Protein	Molekulargewicht (Da)	Extinktionskoeffizient ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
His₆_xTsg (<i>E.coli</i>)	23.927	23.960
His₆_xTsg (H5)	23.510	23.960
BMP-2_wt (dimer)	26.214	37.650
BMP-2_KD_His₆ (dimer)	29.894	37.650
ActR-IIB_{ecd}_trx_His₆	27.004	39.410
ActR-IIB_{ecd}	12.810	25.350

2.3.5 Thrombinspaltung

Reaktionspuffer:	50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl ₂ , pH 8.0
Dialysepuffer für ActR-IIB _{ecd} :	20 mM TrisHCl, 35 mM NaCl, pH 8.0

Für die proteolytische Spaltung der Thioredoxin- und His₆-Sequenz von ActR-IIB_{ecd} wird die Proteinkonzentration, falls notwendig, mit Reaktionspuffer auf 2.5 mg/ml verdünnt und 0.15 U Thrombin/mg Fusionsprotein hinzugegeben.

Für die Abspaltung der His₆-Sequenz von Twisted gastrulation aus *E.coli* wird die Proteinkonzentration in Reaktionspuffer auf 0.25 mg/ml eingestellt und 0.5 U Thrombin/mg Fusionsprotein zugesetzt. Der Reaktionsansatz wird für 3-4 h bei 30°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Verlauf der Spaltung wird mittels SDS-PAGE überprüft.

Anschließend wird zweimal gegen das zehnfache Volumen Dialysepuffer dialysiert und das Dialysat 6 – 8 Tage bei 4°C inkubiert.

2.3.6 Nachweis der Glykosylierung von Proteinen mittels PAS-Reaktion

Die PAS-Reaktion (engl. *Periodic acid-Schiff reaction*) ermöglicht das Anfärben von Kohlenhydratketten an Proteinen. Durch die Periodsäure werden freie Hydroxylgruppen der Oligo-/Polysaccharide zu Aldehydgruppen oxidiert. Die anschließende Behandlung mit fuchsin-schwefliger Säure (Schiffs Reagenz) führt zu einer roten bis violetten Färbung (Zacharius et al., 1969; Jay et al., 1990).

Für das Anfärben glykosylierter Proteine werden diese mittels SDS-PAGE (siehe 2.3.1) aufgetrennt und anschließend unter Verwendung des „Glycoprotein Detection Kit“ (Sigma) nach vorgegebenem Protokoll gefärbt.

2.3.7 Deglykosylierung von Glykoproteinen

Reaktionspuffer: 10 mM TrisHCl pH 6.8

Für die Abspaltung der Kohlenhydratketten von Glykoproteinen wurden verschiedene Enzyme, die sich in ihrer Spezifität unterscheiden, verwendet.

Für analytische Versuche wurden jeweils 5 µg Twisted gastrulation aus High-Five™-Insektenzellen mit 75 U Endoglykosidase H (NEB), 75 U Endoglykosidase H (NEB) und 0.025 U Endoglykosidase F3 (QA-BIO) oder 5 U Peptid-N-Glykosidase F (Roche) in 25 µl Gesamtvolumen für 3 h bei 37°C inkubiert. Da sich durch Veränderungen im Glykosylierungsmuster auch das Laufverhalten der Proteine verändert, erfolgt die Analyse mittels SDS-PAGE (siehe 2.3.1).

2.3.8 Biotinylierung von Proteinen mit der Biotin-Proteinligase BirA

Proteine, die mit einer avi-Sequenz (GLNDIFEAAQKIEWHE) fusioniert sind, können spezifisch unter Verwendung der Biotin-Protein-Ligase BirA biotinyliert werden (Beckett et al., 1999; Chapman-Smith & Cronan Jr, 1999).

Für die Reaktion werden die in Tabelle 9 angegebenen Komponenten direkt zum Expressionsüberstand transfizierter HEK293 Zellen gegeben und der Reaktionsansatz 3 h bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Die verwendete BirA-Ligase wurde in der Arbeitsgruppe nach dem Protokoll von Chen et al. hergestellt (Chen et al., 2005).

Tabelle 9: Reaktionsansatz für eine Biotinylierungsreaktion

Komponente	Konzentration im Ansatz	Volumen pro 1 ml Reaktionsansatz
BirA (1 mg/ml in PBS)	125 ng/ml	0.125 µl
Biotin (500 µM)	3 µM	6.25 µl
MgCl₂ (100 mM)	10 µM	0.1 µl
ATP (100 mM)	10 µM	0.1 µl

2.3.9 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen oder Peptiden wurden an einem Elektrospray-Ionisations-(ESI) Massenspektrometer (MS) (Mann & Wilm, 1995) von Werner Schmitz (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Biozentrum der Universität Würzburg) durchgeführt.

Die Proben wurden hierzu mittels Umkehrphasen-HPLC entsalzt, für die Messung in 50% Methanol und 1% Ameisen-/Essigsäure gelöst und nach Ionisierung mittels einer Apollo Elektrospray-Elektronenquelle im Positiv-Ionen-Modus detektiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem APEX II Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-(FTICR-) Massenspektrometer der Firma Bruker, ausgestattet mit einem 7.5T Magneten.

2.4 Herstellung rekombinanter Proteine unter Verwendung des Baculovirus-Insektenzell-Expressionssystems

Für die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen wurden, je nach Anwendung, aus verschiedenen Ovariengeweben isolierte Zelllinien verwendet (Tabelle 10) (Hink, 1970; Vaughn et al., 1977). Allen gemeinsam ist, dass sie durch *Autographa californica* Baculoviren infiziert werden können und biologisch aktive Proteine exprimieren, da sie fast alle posttranslationalen Modifikationen durchführen können und über ein eukaryotisches Chaperonsystem verfügen, das korrekte Faltung, Disulfidverbrückung und Oligomerisierungsgrad garantiert.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Insektenspezies	Anwendung	Medium
Sf-9 (Novagen)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Co-Transfektion	InsectXpress + 1% P/S + 5% FCS
TriEx™ Sf-9 (Novagen)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Virenamplifikation	InsectXpress + 1% P/S +/- 5% FCS
High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (R. Grabherr, VIBT, Wien)	<i>Trichoplusia ni</i>	Proteinexpression	IPL-41+ 1% P/S + 1% Lipid Medium Supplement

2.4.1 Kultivierung der Insektenzellen

Alle verwendeten Zelllinien werden adhärent in 75 cm² oder 175 cm²-Zellkulturflaschen (Greiner BioOne) in entsprechendem Medium (Tabelle 10) bei 27°C im Brutschrank (Mettler) kultiviert. Das Passagieren erfolgt alle 3-4 Tage, sobald die Zellen konfluent sind. Hierfür wird das verbrauchte Medium abgesaugt, 10 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben, diese mechanisch vom Zellenboden gelöst und anschließend im Verhältnis 1:4 passagiert. Im Anschluss wird die Zellsuspension auf 15 ml (75 cm²) beziehungsweise 30 ml (175 cm²) mit frischem Medium aufgefüllt.

Für die Kultivierung größerer Volumina werden adhärente Zellen aus mehreren Zellkulturflaschen, wie zuvor beschrieben, abgelöst, mit entsprechendem Medium auf eine Konzentration von $5,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und anschließend in Er-

lenmeyerkolben mit Schraubverschluss (Isolab) bei 27°C und 80 rpm geschüttelt (Multitron Standard, INFORS HT). Alle 3-4 Tage werden die Zellen ausgezählt und mit frischem Medium entsprechend ihrer Dichte auf eine Konzentration von $5,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt, bis das gewünschte Volumen erreicht ist.

2.4.2 Vitalitätsfärbung und Zellzahlbestimmung

Trypanblau-Lösung: 0.5% (w/v) Trypanblau, 0.9% (w/v) NaCl in ddH₂O

Für die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen werden 20 µl Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau-Lösung versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen färben sich hierbei auf Grund der Durchlässigkeit ihrer Zellmembran blau. Die Konzentration der Zellen berechnet sich wie folgt:

$$\text{Zellkonzentration} \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen} \cdot 10^4}{\text{Anzahl Großquadrate}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

10^4 = Zählkammer abhängiger konstanter Multiplikationsfaktor

2.4.3 Co-Transfektion

Bei der Co-Transfektion linearisierter Viren-DNA und eines Baculovirusexpressionsvektors entstehen durch homologe Rekombination Viren, welche die DNA-Sequenz des rekombinant herzustellenden Proteins enthalten. Für die Herstellung genomisch veränderter Viren, wurde das *BacVector®-3000 Transfection Kit* (Novagen) in Kombination mit einem Derivat des pBAC3 Vektors (Novagen) verwendet.

Im ersten Schritt werden *Sf-9* Zellen in frischem Medium abgeschlagen und $1.25 \cdot 10^6$ Zellen in 5 ml Medium in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Während die Zellen im Brutschrank am Flaschenboden anhaften, werden in ein Reaktionsgefäß 20-x µl zusatzfreies Medium, x µl Vektor-DNA (500 ng) und 5 µl *Triple cut* Virus-DNA (100 ng) pipettiert sowie in ein weiteres Reaktionsgefäß 20 µl steriles Wasser und 5 µl *Insect GeneJuice® Transfection* Reagenz. Der Inhalt der beiden Reaktionsgefäße wird vereinigt, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Die adhärenen Zellen werden zweimal mit Medium ohne P/S und FCS gewaschen, anschließend wird 1 ml zusatzfreies Medium zu den Zellen gegeben. Der Transfektionsmix wird mit 450 µl

Medium ohne Zusätze aufgefüllt, zu den Zellen gegeben und diese 1 h bei RT inkubiert, bevor 6 ml Vollmedium zu dem Ansatz gegeben werden und dieser weitere 5 Tage bei 27°C inkubiert. Anschließend wird der Überstand steril abzentrifugiert (3 min, 1500xg, 4°C), in ein frisches 15 ml-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung dunkel bei 4°C gelagert.

2.4.4 Plaque-Assay

Der Plaque-Assay dient der Vereinzelung der aus der Co-Transfektion erhaltenen rekombinanten Viren. Hierzu werden *Sf-9* Zellen in frischem Medium abgeschlagen, pro Vertiefung einer 6-Lochplatte $1.5 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Medium ausgesät und für 30 min bei 27°C inkubiert. Haben sich die Zellen abgesetzt, wird das Medium abgesaugt und 1 ml der Viruslösung beziehungsweise einer vorher davon angesetzten Verdünnung von 1:10 bis 1:10000 hinzugegeben. In eine Vertiefung wird als Negativkontrolle nur Medium gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 27°C werden die Viruslösungen abgesaugt und die Zellen mit jeweils 1.5 ml des Agarose-Gemischs überschichtet. Hierfür wird 2.7%ige (w/v) *Sea Plaque Agarose* zuvor verflüssigt und auf 60°C temperiert. Zu 6.6 ml 1.3x Medium werden 700 µl FCS gegeben und direkt vor dem Überschichten mit 3.3 ml Agarose gemischt. Ist das Agarose-Gemisch erstarrt, werden in den Außenraum der 6-Lochplatte 2 ml steriles Wasser zur Befeuchtung zum Schutz vor Austrocknung gegeben, die Platte wird in Folie eingeschweißt und 4 Tage bei 27°C inkubiert.

Das Anfärben des Assays erfolgt durch Zugabe von 1 ml MTT-Lösung (1 mg/ml in ddH₂O, Applichem) pro Vertiefung und Inkubation für 1 h bei 27°C. Nach Absaugen der Lösung erscheinen infizierte und damit lysierte Zellen als weiße Flecken (Plaques) auf sonst blauem Hintergrund. Von den so vereinzelteten Viren kann nun eine beliebige Anzahl mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen, in je 1 ml Medium überführt und nach 2 h Inkubation bei 27°C für die erste Virenamplifikation verwendet werden.

2.4.5 Virenamplifikation

In einer 6-Lochplatte werden pro Vertiefung $1.5 \cdot 10^6$ TriEx Zellen in 2 ml serumhaltigem Medium ausgesät und bei 27°C inkubiert, bis die Zellen an den Boden angehaftet sind. Anschließend wird das Medium abgesaugt, 1 ml des Virenüberstandes zu den Zellen pipettiert, in den Zwischenraum der 6-Lochplatte 2 ml steriles Wasser zur Befeuchtung zum Schutz vor Austrocknung gegeben und die Platte in Folie eingeschweißt. Nach 4-tägiger Inkubation im Brutschrank wird der Überstand abzentrifugiert (3 min, 1500xg, 4°C).

Die zweite Virenamplifikation wird wie zuvor beschrieben durchgeführt, pro Vertiefung wird jedoch neben 1 ml Virenüberstand zusätzlich noch 1 ml serumhaltiges Medium hinzugegeben. Die erhaltenen Überstände werden mittels Western Blot (siehe 2.3.2) auf Vorhandensein des rekombinanten Proteins untersucht. Der Virenüberstand mit dem stärksten Signal wird für weitere Virenamplifikationen eingesetzt.

Für die dritte Virenamplifikation werden $8.25 \cdot 10^6$ TriEx Zellen in 15 ml serumhaltigem Medium in einer 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät, die Zellen im Brutschrank bis zur Adhäsion inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und 1 ml des Überstands der zweiten Virenamplifikation hinzugegeben. Nach 5 Tagen Inkubation bei 27°C wird der Überstand steril zentrifugiert und in einem neuen 15 ml-Röhrchen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Für die Virentiterbestimmung (siehe 2.4.6) werden 200 µl vom Überstand abgenommen.

Werden mit der vierten Virenamplifikation Viren für eine Expression hergestellt, empfiehlt sich hierfür die Verwendung serumfreier TriEx Zellen. Die Amplifikation kann in einer 175 cm² Flasche mit $1.65 \cdot 10^7$ Zellen in 30 ml oder einer Suspensionskultur mit $5.5 \cdot 10^5$ Zellen/ml durchgeführt werden. Das Verhältnis von Viren zu Zellen, die *Multiplicity of Infection* (MOI) kann durch die erfolgte Virentiterbestimmung genau eingestellt werden und sollte für eine effiziente Virenamplifikation 0.1 betragen. Nach Inkubation für 5 Tage bei 27°C gegebenenfalls unter Schütteln, wird mit dem Überstand, wie oben geschrieben, verfahren.

2.4.6 Virentiterbestimmung

Für die Virentiterbestimmung werden 200 µl Überstand einer Virenamplifikation steril entnommen und die enthaltene Viren-DNA unter Verwendung des *NucleoSpin Tissue Kits* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben präpariert. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*quantitative real-time-PCR*, qRT-PCR) erfolgt die quantitative Bestimmung des Virentiters. Je qRT-PCR-Ansatz werden die in Tabelle 11 aufgeführten Komponenten pipettiert und das in Tabelle 12 angegebenen Programm für Vervielfältigung und Analyse der Viren-DNA an einem *LightCycler* (Roche) verwendet.

Tabelle 11: Pipettierschema für einen qRT-PCR-Ansatz

Komponente		Volumen
Absolute qPCR SYBR® Green Capillary Mix (Thermo Scientific)		10 µl
ie1-Oligonukleotidprimer Mix (0.75 µM)		8 µl
ie1-Promotor	TGGATATTGTTTCAGTTGCAAG	
ie1-Terminator	CAACAACGGCCCCTCGATA	
Viren-DNA/ddH ₂ O		2 µl

Tabelle 12: Programm für die Virentiterbestimmung mittels qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	
initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	15 s	} 40 Zyklen
Anlagerung der Oligonukleotidprimer	60°C	20 s	
DNA-Synthese	72°C	20 s	
Detektion	79°C	5 s	
	95°C	5 s	
Analyse-Schmelzen	95°C	5 s	
	75°C	30 s	
Kühlung	40°C	10 s	

Die aus der Auswertung mit der *LightCycler* Software (Version 3.5) erhaltenen *Crossing Points* (CP) ergeben über eine zuvor ermittelte Eichgerade den Virentiter.

$$10^{\left(\frac{CP-38.5}{-3.2}\right)} = c_{\text{Virus}} \left(\frac{\text{Viren}}{\text{ml}}\right)$$

2.4.7 Expression rekombinanter Proteine in High-Five™ Zellen

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden High-Five™ Zellen in Suspensionskultur verwendet, da diese eine deutlich höhere Expressionsrate im Vergleich zu anderen Insektzelllinien aufweisen und zusätzlich durch die mögliche Kultivierung ohne fetales Kälberserum, den Vorteil bieten, dass der das rekombinante Protein enthaltende Überstand kein Rinderserumalbumin enthält, wodurch die Aufreinigung vereinfacht wird.

Die Zelldichte wird auf $5.5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und entsprechend dem Expressionsvolumen und Virentiter so viel vom Überstand einer serumfreien Virenamplifikation hinzugegeben, dass eine MOI von 5 erreicht wird. Nach 5-tägiger Expression bei 27°C werden die Zellen mittels Zentrifugation (6.000xg, 4°C, 15 min) vom Überstand abgetrennt und verworfen. Der Überstand wird entsprechend der sich anschließenden Aufreinigungsstrategie dialysiert.

Für die Herstellung von Endoglykosidase H-sensitiven Proteinen wird dem Expressionsansatz 5 µM Kifunensine zugesetzt (Stammlösung: 2.15 mM beziehungsweise 0.5 mg/ml in ddH₂O, steril filtriert, Cayman Chemical) (V. T. Chang et al., 2007).

2.5 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

TBSE-Puffer: 10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8.0

Für die Herstellung von rekombinanten Proteinen in *E.coli* werden Zellen eines Expressionsstammes zunächst mit 10 ng des gewünschten Plasmids transformiert und ausplattiert (siehe 2.2.5). Anschließend wird eine Übernachtskultur eines Einzelklons in LB-Medium mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum angezogen (20 ml Übernachtskultur/1 l Expressionsansatz). Die Expressionskultur wird 1:50 mit der Übernachtskultur inokuliert und zu 800 ml auf 2-Liter-Schikane-Kulturkolben aufgeteilt.

2.5.1 Expression in Einschlusskörpern

Für die Expression rekombinanter Protein in sogenannten Einschlusskörpern wird die Expressionskultur bei 37°C und 130 rpm inkubiert bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0.6 erreicht ist. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Nach weiterer Inkubation für 4 h unter Schütteln wird die Zellsuspension zentrifugiert (20 min, 4°C, 6000xg), der Medienüberstand verworfen, die Zellen in TBSE-Puffer resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Anschließend wird das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt und diese bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.5.2 Expression in löslicher Form

Für die lösliche Expression rekombinanter Proteine als Thioredoxin-Fusionsproteine wird die Expressionskultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 bei 37°C inkubiert, anschließend werden die Kolben in einen auf 18°C temperierten Schüttler gestellt und nach 30 min die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgt bei 18°C über Nacht für circa 18 h, bevor die Zellen vom Medium abgetrennt werden (20 min, 4°C, 6000xg) und, wie oben beschrieben, Verfahren wird.

2.5.3 Expression in M9-Minimalmedium

10x M9-Medium:	42 mM Na ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , 8.6 mM NaCl, pH 7.2-7.4 autoklaviert
200x Spurenelementelösung:	5 g/l EDTA, 0.8 g/l FeCl ₃ , 0.05 g/l ZnCl ₂ , 0.01 g/l CuSO ₄ , 0.01 g/l CoCl ₂ , 0.01 g/l H ₃ BO ₃ , 1.6 g/l MnCl ₂ , 0.01 g/l Na ₂ WO ₄ , pH 7.0 mit 2 M NaOH einstellen, steril filtriert
MgSO ₄ -Lösung:	1 M MgSO ₄ , steril filtriert
CaCl ₂ -Lösung:	1 M CaCl ₂ , steril filtriert
Glucoselösung:	20% (w/v) Glucose, steril filtriert
Thiaminhydrochlorid-Lösung:	50 mg/ml Thiamin-HCl, frisch angesetzt und steril filtriert
NH ₄ Cl-Lösung:	20% (w/v) NH ₄ Cl oder ¹⁵ NH ₄ Cl (CK Gas Products)

Für gebrauchsfertiges Minimalmedium werden pro 1 Liter zunächst 100 ml M9-Medium in 500 ml ddH₂O vorgelegt, bevor nacheinander jeweils 1 ml MgSO₄-Lösung, 1 ml CaCl₂-Lösung, 5 ml 200x Spurenelementelösung, 30 ml Glucose-Lösung, 2 ml Thiaminhydrochlorid-Lösung und 5 ml NH₄Cl-Lösung hinzu gegeben werden. Anschließend wird mit ddH₂O aufgefüllt und das entsprechende Selektionsantibiotikum zugesetzt.

Für die Expression in Minimalmedium im 5-Liter-Maßstab werden von *E.coli*-Zellen eines Expressionsstammes, die mit dem gewünschten Plasmid transformiert wurden (siehe 2.2.5), zunächst 5 ml Übertag-Kultur in LB-Medium angesetzt. Mit 1 ml der Übertagkultur wird im Anschluss die Übernachtskultur in 200 ml Minimalmedium ohne isotopenmarkierte Chemikalien inokuliert und bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Für die Hauptkultur wird isotopenhaltiges Medium 1:25 mit der Übernachtskultur versetzt und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.65 im Schüttler bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden zusätzlich 2 g/l Glucose supplementiert und die Proteinexpression wird durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgt für circa 18 h bei 37°C bevor die Zellen, wie in 2.5.1 beschrieben, geerntet werden.

2.5.4 Zellaufschluss nach Expression in Einschlusskörpern und Präparation

TBSE-Puffer:	10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8.0
TBST-Puffer:	10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 1% (v/v) Triton X-100

verwendete Extraktionspuffer:

für Twisted

gastrulation: 6 M GuHCl, 100 mM Na-Phosphat, 10 mM TrisHCl pH 8.0

für BMP-2: 20 mM Na-Acetat pH 5.5, 2 M GuHCl

Bis zu 10 g *E.coli* Zellen einer Expression werden in 200 ml TBSE-Puffer resuspendiert, mit 3.5 mg Lysozym/100 ml Zellsuspension versetzt und für 30 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Danach erfolgt der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall für 15 min auf Eis (30 s an/30 s aus, 65% Amplitude, Sonopuls Ultraschall Homogenisator (Bandelin)) und die Abtrennung der Einschlusskörper durch Zentrifugation (25 min, 4°C, 25.000xg). Für einen vollständigen Zellaufschluss wird das Pellet erneut in 200 ml TBSE-Puffer resuspendiert und wie zuvor beschallt und zentrifugiert. Um das Protein von Zellorganellen und Membranfragmenten zu lösen, wird das Pellet in TBST-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift in TBSE-Puffer werden die gereinigten Einschlusskörper pelletiert und das Feuchtgewicht bestimmt.

Die Extraktion der rekombinanten Proteine aus den Einschlusskörpern erfolgt über Nacht bei RT im zehnfachen Volumen des Extraktionspuffers (w/v) unter Zusatz von 1/1000 Volumenteil β -Mercaptoethanol zur Reduktion von Disulfidverbrückungen. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wird die Lösung zentrifugiert (25 min, 15°C, 25000xg).

2.5.5 Renaturierung

Renaturierungspuffer für

Twisted gastrulation: 2 M LiCl, 30 mM CHAPS, 50 mM TrisHCl, 2 mM GSH,
1 mM GSSG, 500 mM Arginin, pH 8.0

Renaturierungspuffer für
BMP-2 und Varianten

(nach Hillger et al., 2005): 100 mM TrisHCl, 5 mM EDTA, 2 M LiCl, 25 mM
CHAPS, 2 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8.0

Vor der Renaturierung wird die Proteinlösung mittels Ultrafiltration möglichst weit aufkonzentriert, um so wenig Extraktionspuffer wie möglich in den Renaturierungsansatz zu verschleppen.

Das Volumen des Puffers wird so gewählt, dass die Konzentration des Proteins 50-100 µg/ml (Tsg) beziehungsweise 100-150 µg/ml (BMP-2) darin beträgt. Der Rückfaltungspuffer wird zuvor entgast und auf 4°C gekühlt. Anschließend wird das Konzentrat langsam unter zügigem Rühren in den Renaturierungspuffer eingetroppt.

Der Renaturierungsansatz mit Twisted gastrulation wird im Dunkeln bei RT inkubiert, der Ansatz mit BMP-2 bei 10°C. Die Inkubationsdauer richtet sich nach dem Verlauf der Renaturierung, der durch tägliche Probenentnahme mittels SDS-PAGE verfolgt wird. Ist die gewünschte Proteinspezies im Überschuss vorhanden, wird der Ansatz mit Twisted gastrulation dreimal gegen das zehnfache Volumen 20 mM HEPES pH 8.0, 300 mM NaCl und einmal gegen das zehnfache Volumen 20 mM HEPES pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol dialysiert und eventuell vorhandenes Präzipitat abzentrifugiert (25 min, 4°C, 25.000xg).

Der BMP-Ansatz wird mit 2 M HCl auf einen pH-Wert von 5.5 eingestellt, mittels Ultrafiltration (Amicon Rührzelle, Sartorius Ultrafiltrationsmembran 5kDa) auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt und zweimal gegen das zehnfache Volumen Niedrigsalz-Puffer für die Heparin-Affinitätssäule (siehe 2.7.3) dialysiert.

2.5.6 Zellaufschluss nach Expression löslicher Proteine in *E.coli*

Aufschlusspuffer: 20 mM TrisHCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0

Bis zu 10 g *E.coli* Zellen einer Expression werden in 150 – 200 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, mit 3.5 mg Lysozym/100 ml Zellsuspension versetzt und für 30 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Danach erfolgt der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall in einer Rosettenzelle für 15 min auf Eis (30 s an/30 s aus, 65% Amplitude, Sonopuls Ultraschall Homogenisator (Bandelin)) und die Abtrennung von Zelltrümmern durch Zentrifugation (25 min, 4°C, 25.000xg). Gegebenenfalls wird das Pellet erneut in Aufschlusspuffer resuspendiert und die Suspension wiederholt beschallt und zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt.

2.6 Expression rekombinanter Proteine in Freestyle™ 293 F-Zellen

Freestyle™ 293 F-Zellen (Invitrogen) sind an Suspensionskultur adaptierte HEK (*human embryonal kidney*) 293-Zellen. Die Zellen wachsen in serumfreiem Medium, was die Aufreinigung von Proteinen aus dem Expressionsüberstand erleichtert.

2.6.1 Kultivierung der Freestyle™ 293 F-Zellen

Kultur- und Expressionsmedium: Freestyle™ 293-Medium + 1% P/S

Die Zellen werden in belüfteten 125 ml Polykarbonat-Erlenmeyerkolben (BD Biosciences) bei 37°C, 150 rpm, 8% CO₂ und 65% relativer Luftfeuchte im Inkubator (C200, Labotec) in 25-30 ml Medium kultiviert. Nach jeweils 3-4 Tagen, wenn eine Zelldichte von 2-3*10⁶ Zellen/ml erreicht ist, werden die Zellen passagiert. Hierzu wird die Zelldichte in einem Volumen von 25-30 ml mit frischem Medium auf 5.5*10⁵ Zellen/ml eingestellt.

2.6.2 Transfektion der Freestyle™ 293 F-Zellen mit PEI

Für die Expression des Zielproteins muss zunächst das die cDNA enthaltene Plasmid in die Freestyle™ 293 F-Zellen eingebracht werden. Dies erfolgt unter Verwendung des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI, linear, 25.000 kDa, Polysciences Inc.), das die negative Eigenladung der DNA maskiert und so deren Aufnahme mittels Endocytose ermöglicht (Boussif et al., 1995; Luo & Saltzman, 2000).

Für eine Transfektion werden pro 1 ml Expressionskultur in einem Reaktionsgefäß 1 µg DNA in 35 µl Opti-MEMI (GIBCO) und in einem weiteren Reaktionsgefäß 2 µg PEI in 35 µl Opti-MEMI verdünnt und gut gemischt. Anschließend wird die PEI-Verdünnung zur DNA-Verdünnung gegeben, intensiv gemischt und bei RT für 25 min inkubiert. Währenddessen wird die Zelldichte auf 5.5*10⁵ Zellen/ml mit frischem Medium eingestellt und die Zellsuspension entsprechend dem Expressionsvolumen in 6-Loch-Platten oder Kolben überführt. Der DNA-PEI-Komplex wird anschließend tropfenweise unter Schütteln zu den Zellen gegeben. Nach 4-5 Tagen Expression werden die Zellen mittels Zentrifugation (6.000xg, 15 min, 4°C) abgetrennt und der das Protein enthaltende Überstand wird bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.7 Chromatographische Methoden zur Proteinaufreinigung

2.7.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Verfügt das exprimierte Protein über eine His₆-Sequenz, kann dies dazu genutzt werden, andere in der Lösung befindlichen Proteinen und Verunreinigungen abzutrennen. Dabei bindet die His₆-Sequenz an die an der Säulenmatrix (in der Regel Nitrilotriessigsäure-Agarose, kurz NTA) immobilisierten Ni²⁺-Ionen. Unspezifisch gebundene Bestandteile werden durch Spülen mit Binde- oder Waschpuffer entfernt und anschließend das Protein mit imidazol-haltigem Puffer eluiert.

2.7.1.1 Ni²⁺-Affinitätschromatographie im „batch-Verfahren“

Dialysepuffer I:	20 mM TrisHCl pH 7.9, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA
Dialysepuffer II:	20 mM TrisHCl pH 7.9, 300 mM NaCl
Bindepuffer:	20 mM TrisHCl pH 7.9, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Elutionspuffer:	20 mM TrisHCl pH 7.9, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol
Dialysepuffer III (HBSE ₅₀₀):	10 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA

Der Expressionsüberstand oder die Proteinlösung wird zunächst jeweils gegen das zehnfache Volumen einmal gegen Dialysepuffer I und zweimal gegen Dialysepuffer II dialysiert (VISKING Typ 36/32, Roth).

In Bindepuffer äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose (Amocol) wird zu einer geklärten (25.000xg, 4°C, 25 min) Proteinlösung hinzu gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Die Menge der hinzugegebenen Agarose richtet sich nach Expressionsvolumen und -rate, die Kapazität des Säulenmaterials beträgt 10 mg Protein/1 ml Agarose.

Anschließend wird die Proteinlösung mit der Ni²⁺-NTA-Agarose in eine ECONO-Glassäule (Ø = 2.5cm, l = 10 cm, Bio-Rad) gegeben und der Durchlauf gesammelt. Das sich in der Glassäule angesammelte Säulenmaterial wird fünfmal mit dem zehnfachen Säulenvolumen Bindepuffer gespült. Schließlich wird das Protein in zehn Fraktionen in je einem Säulenvolumen mit Elutionspuffer eluiert. Proteinenthaltende

Fraktionen werden mittels SDS-PAGE bestimmt, vereinigt und zweimal gegen das zehnfache Volumen Dialysepuffer III (HBSE₅₀₀) dialysiert (VISKING Typ 36/32, Roth).

2.7.1.2 Ni²⁺-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Bindepuffer:	6 M GuHCl, 100 mM Na-Phosphat, 10 mM TrisHCl pH 8.0
Waschpuffer:	6 M GuHCl, 100 mM Na-Phosphat, 10 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM Imidazol
Elutionspuffer:	6 M GuHCl, 100 mM Na-Phosphat, 10 mM TrisHCl pH 8.0, 500 mM Imidazol
Dialysepuffer:	6 M GuHCl, 5 mM EDTA, 50 mM TrisHCl pH 8.0

Die Proteinlösung wird bei RT unter Verwendung einer Spritze über eine mit Bindepuffer äquilibrierte 1 oder 5 ml Ni²⁺-Affinitätssäule (HisTrap FF crude, GE) gegeben. Anschließend erfolgt durch Spülen mit dem zehnfachen Säulenvolumen Waschpuffer die Entfernung unspezifisch gebundener Verunreinigungen. Im Anschluss erfolgt die Elution in 1 oder 5 ml Fraktionen mit Elutionspuffer und die Analyse dieser mittels SDS-PAGE. Proteinenthaltende Fraktionen werden vereinigt und zweimal gegen das zwanzigfache Volumen dialysiert.

2.7.1.3 Ni²⁺-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

Puffer für ActR-IIB_{ecd}

Bindepuffer:	20 mM TrisHCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer:	20 mM TrisHCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol
Dialysepuffer I:	50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0
Dialysepuffer II:	50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl ₂ pH 8.0

Puffer für Twisted gastrulation

Bindepuffer:	20 mM HEPES pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Waschpuffer:	20 mM HEPES pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1% Tween20
Elutionspuffer:	20 mM HEPES pH 8.0, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol

Die Proteinlösung wird auf die mit Bindepuffer äquilibrierte Säule (5 ml HisTrap FF, GE) gegebenenfalls bei 4°C aufgetragen (FPLC-System: ÄKTA prime, GE) und mit Bindepuffer und/oder Waschpuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreicht hat. Danach erfolgt die Elution, indem direkt 50 ml 100% Elutionspuffer über die Säule geleitet werden. Dabei werden Fraktionen zu je 3 ml gesammelt. Nach Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE werden proteinhaltende Fraktionen vereinigt und gegebenenfalls dialysiert.

2.7.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie wird der umgekehrte Siebeffekt für die Auftrennung von Proteingemischen genutzt. Während große Moleküle nur in die Zwischenräume der Säulenmatrix gelangen und diese dadurch schnell passieren, gelangen kleine Moleküle in die Poren des Säulenmaterials. Dadurch steht ihnen ein größeres Diffusionsvolumen zur Verfügung und sie verbleiben länger auf der Säule.

2.7.2.1 Präparative Größenausschlusschromatographie

Laufpuffer: 10 mM HEPES, 500 mM NaCl pH 7.4

Die für die Auftrennung verschiedener Oligomerspezies während der Aufreinigung in dieser Arbeit verwendete Säule (Superdex 75 16/60 prep grade, GE) hat einen Trennbereich von 3.000 bis 70.000 Da. Für eine hinreichende Auftrennung werden maximal 3 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgetragen. Die Auftrennung der verschiedenen Proteinspezies nach ihrer Größe erfolgt mit einer Flussrate von 1 ml/min. Die Fraktionsgröße beträgt 1 ml.

2.7.2.2 Analytische Größenausschlusschromatographie

Laufpuffer: 10 mM HEPES, 500 mM NaCl pH 7.4, 0.005% Tween20

Die Größenausschlusschromatographie ist auch geeignet für die Analyse und Isolierung von Proteinkomplexen. Hierfür wird die entsprechende Säule zunächst kalibriert (siehe 2.7.2.3) und das Proteingemisch unter identischen Bedingungen aufgetrennt.

Für die zu analysierenden Proteingemische wurde eine Superdex 200 (16/60 prep grade, GE) Säule mit einem Trennbereich von 10.000 bis 600.000 Da verwendet. Das Proteingemisch wird zuvor eingeeengt oder mit Laufpuffer auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und über eine 1 ml Auftragsschleife injiziert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min, Fraktionen wurden zu 1.3 ml gesammelt.

2.7.2.3 Kalibrierung der Gelfiltrationssäule

Laufpuffer: 10 mM HEPES, 500 mM NaCl pH 7.4, 0.005% Tween20

Für die Kalibrierung einer Gelfiltrationssäule werden verschiedene Proteine, deren Molekulargewicht bekannt ist, auf die Säule aufgetragen und deren Elutionsvolumen V_I bestimmt. Nach Ermittlung des totalen Säulenvolumens V_t durch Perfusion einer 10%igen Acetonlösung und Bestimmung des Ausschlussvolumens V_0 durch Injektion von 500 μ g Dextranblau2000 kann nach der Gleichung

$$K_{av} = \frac{V_I - V_0}{V_t - V_0}$$

das relative Elutionsvolumen K_{av} berechnet werden. Durch Auftragen der so bestimmten relativen Elutionsvolumen K_{av} gegen den dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte wird eine Eichgerade erhalten. Nach der Bestimmung des relativen Elutionsvolumens des zu untersuchenden Proteins lässt sich anhand der Geradengleichung das apparente Molekulargewicht berechnen.

Für das Eichen der Säule werden in zwei separaten Läufen je 250 μ g Aprotinin (6.500 Da), Carboanhydrase (29.000 Da) und Conalbumin (75.000 Da), sowie je 500 μ g RNaseA (13.700 Da) und Ovalbumin (43.000 Da) in 1 ml Laufpuffer verdünnt und über eine 1 ml Auftragsschleife injiziert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei einer Flussrate von 1 ml/min.

2.7.3 Heparin-Affinitätschromatographie

Niedrigsalzpuffer:	6 M Harnstoff, 125 mM Essigsäure, 100 mM Tris, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl pH 5.5
Hochsalzpuffer:	6 M Harnstoff, 125 mM Essigsäure, 100 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 M NaCl pH 5.5
Dialysepuffer:	1 mM HCl

Die Heparin-Affinitätschromatographie ist eine Ionenaustausch-Chromatographie bei der die hauptsächlich aus basischen Aminosäuren bestehende Heparin-Bindestelle an die Sulfonsäuregruppen des Heparins bindet.

Nach Klärung des Dialysats durch Zentrifugation erfolgt das Auftragen der Proteinlösung mit einer Flussrate von 2 ml/min (FPLC-System: Bio-Rad BioLogic DuoFlow) auf die mit Niedrigsalzpuffer äquilibrierte Heparin-Sepharose-Säule (HiTrap FF, 5 ml, GE). Nach dem Waschen mit Niedrigsalzpuffer bis die Absorption bei 280 nm den Ausgangswert erreicht hat, erfolgt die Elution über einen linearen Salzgradient zu 100% Hochsalzpuffer über zehn Säulenvolumen.

Nach Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE werden Fraktionen, die das entsprechende Protein enthalten, vereinigt und dreimal gegen das 100fache Volumen Dialysepuffer dialysiert.

2.7.4 Anionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung einer Q-Sepharose Säule

Niedrigsalzpuffer:	20 mM TrisHCl, 35 mM NaCl pH 8.0
Hochsalzpuffer:	20 mM TrisHCl, 1 M NaCl pH 8.0
Dialysepuffer:	1 mM HCl

Das Proteingemisch wird mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit Niedrigsalzpuffer äquilibrierte Q-Sepharose Säule (5 ml, GE) aufgetragen und mit Niedrigsalzpuffer gewaschen (3 ml/min), bis die Absorption bei 280 nm den Ausgangswert erreicht hat. Die Elution der Proteine erfolgt nach dem angegebenen Schema (Tabelle 13). Nach Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE werden die proteinenthaltenden Fraktionen vereinigt, dialysiert (dreimal, 100faches Volumen) und photometrisch die Konzentration bestimmt.

Tabelle 13: Elutionsschema für die Anionenaustausch-Chromatographie von ActR-IIB_{ecd}

Anteil Hochsalzpuffer (%)	Volumen (ml)	Flussrate (ml/min)	Fraktionsgröße (ml)
0 – 50	200	2.5	2
50 – 100	100	3	4.5
100	15	3	4.5

2.7.5 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie

TFA-Lösung:	0.1 % (v/v) TFA in ddH ₂ O
Elutionspuffer:	100% Acetonitril
analytische Säule:	Phenomenex Jupiter C4, 250x4.6 mm, 5 µm, 300 Å
semipräparative Säule:	Phenomenex Jupiter C4, 250x10 mm, 10 µm, 300 Å
HPLC-System:	BioLogic DuoFlow (Bio-Rad)

Die Umkehrphasen-HPLC wird hauptsächlich zum Entsalzen von Proteinproben vor der massenspektrometrischen Analyse genutzt (analytischer Maßstab), aber auch als finaler Schritt bei der Proteinaufreinigung (präparativer Maßstab).

Die Proteinlösung wird vor der Injektion mit 10%iger TFA-Lösung (v/v) auf eine Endkonzentration von 0.1% (v/v) eingestellt und gegebenenfalls enthaltene unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation (25 min, 25.000xg, 4°C) abgetrennt. Im Anschluss wird die Proteinlösung über eine Injektionsschleife auf die Säule geleitet und diese mit 0.1%iger TFA gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreicht hat. Die Elution erfolgt mittels eines Acetonitril-Gradienten.

Tabelle 14: Acetonitril-Gradient für die Elution von BMP-2

Anteil Acetonitril (%)	Volumen (ml)	Flussrate (ml/min)	Fraktionsgröße (ml)
0 – 30	40	2	4
30 – 50	70	2	2
50 – 100	20	2.5	2
100	20	2.5	4

2.8 Alkalische Phosphatase (ALP) Assay zur Aktivitätsbestimmung von Proteinen

2.8.1 Kultivierung von ATDC5 und C2C12-Zellen

Vollmedien:

C2C12-Zellen: DMEM + GlutaMAX™ + 10% FCS + 1% P/S

ATDC5-Zellen: DMEM + Ham's F-12 (1:1) + 10% FCS + 1% P/S

Hungermedium: DMEM + GlutaMAX™ + 1% FCS + 1% P/S

1x PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4

1x Trypsin: (10x) Trypsin (1:250)/EDTA (0.5 %/0.2 %) (Biochrom) in 10x PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ 1/10 verdünnt in 1x PBS

Sowohl ATDC5- (Teratokarzinom-Knorpelzelllinie aus Maus, abgeleitet von AT805) als auch C2C12-Zellen (Myoblastenzelllinie aus Maus, abgeleitet von C3H) sind adhären wachsende Ziellinien, die durch Stimulation mit BMP-2 zu Chondrozyten beziehungsweise Osteoblasten differenzieren (Katagiri et al., 1994; Shukunami et al., 1998). Typisch für diese Differenzierung ist die Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP). Bei Zugabe von p-Nitrophenylphosphat, wird dieses durch die Alkalische Phosphatase zu p-Nitrophenol umgesetzt, welches anschließend photometrisch nachgewiesen werden kann.

Beide Zelllinien werden bei 37°C, 5%CO₂ und 85% relativer Luftfeuchte im Inkubator (C200, Labotec) im jeweiligen Vollmedium in 75 cm² – Gewebekulturflaschen (Greiner) kultiviert und passagiert, bevor sie konfluent sind. Hierzu wird das verbrauchte Vollmedium abgesaugt, die am Boden haftenden Zellen werden mit 10 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1x Trypsinlösung für 3 min bei 37°C inkubiert. Haben sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst, werden 8 ml 1x PBS hinzugegeben, 1/10 bis 1/50 der Zellsuspension in der Kulturflasche belassen und mit Vollmedium auf 15 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

2.8.2 Alkalische Phosphatase-Assay

Lysepuffer: 0.1 M Glycin pH 9.6, 1% NP-40, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂
pNPP-Lösung
(Pierce): 10 mg p-Nitrophenylphosphat in 10 ml 1x Diethanolamin-Substrat-Puffer (1 M Diethanolamin pH 9.8)

Für die Durchführung eines Alkalische Phosphatase-Assays werden die Zellen, wie in 2.8.1 beschrieben, trypsinisiert, anschließend in einem sterilen 15 ml-Röhrchen (Sarstedt) bei 180xg und 20°C für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5 ml Vollmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe 2.4.2) wird diese im benötigten Volumen auf 4.0×10^4 Zellen/ml eingestellt und es werden jeweils 100 µl pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte (Greiner) pipettiert. Nach circa 16 h wird das Vollmedium von den Zellen abgesaugt, diese mit je 100 µl 1x PBS gewaschen und anschließend für 4 h mit je 100 µl Hungermedium versetzt. Im Anschluss erfolgt die Stimulation der Differenzierung durch Zugabe von rekombinanten Proteinen in den angegebenen Konzentrationen.

Nach 72 h Inkubation wird das Medium von den Zellen abgesaugt und jede Vertiefung mit je 100 µl 1x PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer und Inkubation für 1 h unter Schütteln bei RT lysiert. Für den photometrischen Nachweis der Bildung der Alkalischen Phosphatase werden 100 µl pNPP-Lösung hinzugegeben und die Absorption an einem ELISA-Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

2.9 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie

Messpuffer: 10 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% Tween20

Für die quantitative Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* dient die Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR). Diese erlaubt es, die Interaktion von Proteinen in Echtzeit zu verfolgen und deren Bindungskinetik zu bestimmen. Während ein Interaktionspartner (Ligand) auf der Matrix eines mit Gold beschichteten Glasprismas (Biosensor) immobilisiert ist, wird der zweite, in Messpuffer gelöste Interaktionspartner (Analyt) in verschiedenen Konzentrationen darüber geleitet. Die Bindung der Interaktionspartner und die damit einhergehende Massenzunahme an der Oberfläche des Biosensors während dieser Assoziationsphase wird über die Veränderung des Brechungsindex detektiert und in sogenannten *resonance units* (RU) angegeben. 1 RU entspricht dabei einer Massenzunahme von 1 pg/mm². Durch Perfusion von reinem Messpuffer wird die Dissoziationsphase eingeleitet, während der sich der Analyt vom immobilisierten Interaktionspartner löst, was wiederum mit einer Veränderung des Brechungsindex einhergeht. Aus dem so erhaltenen Sensorgramm lassen sich anschließend die kinetischen Parameter k_a (Assoziations-) und k_d (Dissoziationsgeschwindigkeit) bestimmen, sowie daraus die Gleichgewichtskonstante K_D berechnen. Die Interaktionsanalysen wurden an dem Oberflächen-Plasmonresonanz-System ProteOn™ XPR 36 (Bio-Rad) durchgeführt.

Zunächst wird einer der zu analysierenden Interaktionspartner an der Alginate-Matrix eines Biosensors immobilisiert. Dies kann kovalent durch die sogenannte Amino-Kopplung erfolgen, wobei die Immobilisierung über ϵ -Aminogruppen von Lysin erfolgt oder nicht-kovalent durch Bindung biotinylierter Liganden an eine mit Neutravidin beschichtete Biosensoroberfläche.

Die Aktivierung der Matrix eines ProteOn™ GLC Biosensors (Bio-Rad) erfolgt durch Perfusion einer EDC/sulfo-NHS-Lösung (100 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid, 25 mM N-Hydroxysulfosuccinimid) für 120 s und mit einer Flussrate von 100 μ l/min. Anschließend wird der Ligand oder Neutravidin, verdünnt in 10 mM Na-Acetat Puffer pH 4.0, über die aktivierte Biosensorober-

fläche geleitet, bis die gewünschte Beladungsdichte erreicht ist (100 $\mu\text{l}/\text{min}$). Freie aktivierte Carboxylgruppen der Biosensoroberfläche werden anschließend durch Überleiten von Ethanolamin abgesättigt (300 s, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Beladung mit biotinylierten Liganden erfolgt in Messpuffer mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, bis die entsprechende Beladungsdichte erreicht ist.

Für die Interaktionsanalyse werden verschiedene Verdünnungen des Analyten in Messpuffer hergestellt und über den Liganden geleitet (300 s, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Auswertung der Kinetik erfolgt über ein Langmuir 1:1 Interaktionsmodell mit den in Tabelle 15 zusammengefassten Einstellungen.

Die Regeneration des Liganden für einen weiteren Messzyklus erfolgt durch Waschen mit 4 M MgCl_2 (18 s, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$) und anschließend mit 10 mM Glycin pH 1.5 (18 s, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Tabelle 15: Zusammenfassung der verwendeten Parametereinstellungen des Langmuir-1:1-Interaktionsmodell

Parameter	Einheit	Einstellungen	
Konzentration	M	lokal	konstant
k_a	1/Ms	gruppiert	angepasst
k_d	1/s	lokal	angepasst
K_D	M	lokal	berechnet
R_{\max}	RU	lokal	angepasst
t_0 Assoziation	s	gruppiert	konstant
t_0 Dissoziation	s	gruppiert	konstant
RI	RU	lokal	konstant
χ^2	RU	lokal	berechnet
Beginn Assoziation	s	gruppiert	konstant
Ende Assoziation	s	gruppiert	konstant
Beginn Dissoziation	s	gruppiert	konstant
Ende Dissoziation	s	gruppiert	konstant

2.10 Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht setzt sich zusammen aus gleichen Anteilen links- und rechts-zirkular polarisierter Komponenten. Trifft dieses Licht auf optisch aktive Moleküle (Chirale), die eine der beiden Komponenten verstärkt absorbieren, resultiert daraus elliptisch polarisiertes Licht. Bei der CD-Spektroskopie (*circular dichroism*) wird diese Absorptionsdifferenz (Elliptizität θ) für eine Substanz über einen bestimmten Wellenlängenbereich gemessen und so ein CD-Spektrum erhalten.

Da es sich bei Proteinen um chirale Moleküle handelt und die Sekundärstrukturelemente aufgrund der unterschiedlichen Absorption der Peptidbindungen zu einem charakteristischen Spektrenverlauf im Wellenlängenbereich von 170-250 nm (ferner UV-Bereich) führen, erlaubt die CD-Spektroskopie, Aussagen über die strukturelle Zusammensetzung zu treffen. Zusätzlich erhält man bei 250 nm Signale von Disulfidbrücken und im nahen UV-Bereich von 250-300 nm Signale von aromatischen Aminosäuren (Übersichtsartikel siehe: Kelly et al., 2005).

Für die Aufnahme von CD-Spektren werden die gefriergetrockneten Proteine zu einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ in 200 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.4 gelöst. Die Messung erfolgt in einer 1 mm Quartzglasküvette (Hellma) an einem Jasco J-810 Spektrometer mit folgenden Einstellungen:

Temperatur:	20°C
Scan-Geschwindigkeit:	20 nm/min
Bandweite:	2 nm

Für die Untersuchung der thermischen Stabilität wird die Messtemperatur in 10°C-Schritten erhöht und jeweils ein separates Spektrum aufgenommen, um gegebenenfalls Änderungen in der Sekundärstrukturzusammensetzung festzustellen.

2.11 Präparation von binären und ternären Proteinkomplexen

2x HBSE: 20 mM HEPES, 1 M NaCl, 6.8 mM EDTA, pH 7.4

Für die Untersuchung der Komplexbildung von Ligand, Rezeptor und Modulatorprotein, werden 10 nmol des Liganden in 7.5 ml ddH₂O und 20 nmol des Modulatorproteins und/oder der Rezeptors in zweifach konzentriertem HBSE-Puffer vorgelegt. Anschließend werden beide Verdünnungen unter Rühren zusammen gegeben und mittels Zentrifugal-Filtration (Vivaspin 4, PES, 5.000 MWCO, Sartorius Stedim) eingeeengt (4°C, 4.000xg). Die Analyse erfolgt mittels Größenausschlusschromatographie wie in 2.7.2.2 beschrieben, zuvor wird die Probe mit 0.005% Tween20 versetzt.

2.12 Kernspinresonanz-Spektroskopie

Messpuffer: 20 mM Na-Phosphat pH 6.0, 5% (v/v) D₂O

Die ¹⁵N-markierten Proteine werden nach Abspaltung der His₆-Sequenz an einer Thrombin-Schnittstelle (siehe 2.3.5) mittels Umkehrphasen-HPLC aus dem Reaktionsansatz isoliert (siehe 2.7.5) und anschließend lyophilisiert.

Für die Messung werden die Proteine zu einer Konzentration von 140 µM in Messpuffer gelöst und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (4°C, 13.000xg, 10 min). Danach erfolgt die Überführung der Proben in Shigemi-Röhrchen (Shigemi Corp., Japan).

Die Messung wurde anschließend von Dr. Peter Schmieder oder Monika Beerbaum durchgeführt (Leibnitz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hartmut Oschkinat).

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Herstellung von Twisted gastrulation in verschiedenen Expressionssystemen

Für die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Twisted gastrulation ist es zunächst notwendig, ausreichende Mengen von biologisch aktivem Protein zu gewinnen. Hierzu wurden verschiedene Expressionssysteme für die rekombinante Herstellung von Twisted gastrulation etabliert.

Twisted gastrulation ist ein circa 23.000 Da großes, aus zwei Domänen aufgebautes Protein mit insgesamt 24 Cysteinen. Der hohe Gehalt an Cysteinen und die damit einhergehende wahrscheinlich komplexe Disulfidverbrückung stellen dabei eine Herausforderung an die rekombinante Expression dar.

3.1.1 Expression und Aufreinigung von Twisted Gastrulation aus Insektenzellen

Zunächst wurde die Herstellung von Twisted gastrulation in Insektenzellen etabliert. Da Insektenzellen über ähnliche posttranslationale Modifikationsmechanismen verfügen wie Säugerzellen und über ein Chaperonsystem, das korrekte Disulfidverbrückung und Oligomerisierungsgrad garantieren soll, ist zu erwarten, dass so gewonnenes Protein biologische Aktivität aufweist.

3.1.1.1 Klonierung und Expression

Für die Expression von Twisted gastrulation in Insektenzellen wurden die cDNA-Sequenzen von *Mus musculus* (cDNA BC004850, imaGenes) und *Xenopus leavis* (cDNA BC056070, imaGenes) ohne die proteineigenen Sekretionssignalsequenzen so in den Baculovirus-Expressionsvektor pMK1 kloniert, dass das Protein mit einer durch die Protease Thrombin abspaltbaren N-terminalen Hexahistidin-Sequenz exprimiert wird. Die cDNA-Sequenzen wurden über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* in den Expressionsvektor eingefügt und anschließend die Co-

Transfektion und Virenamplifikation, wie in Kapitel 2.4.3 und 2.4.5 beschrieben, durchgeführt.

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MKPSFLHIPA	AALLLCSLWI	LPIHCCNKAL	CASDVSKCLI	QELCQCRPTD	GNCSCCKECM
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LCLGTLWDEC	CDCVGMNPR	NYS DTPPTSK	STVEELHEPI	PSLFRALTEG	DTQLNWNIVT
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
FPVVEELSHH	ENLVSFLETV	NQPQQQNSV	QVSHSNEKEH	MCTVVYFDDC	MSIHQCKVSC
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>			
ESMGASKYRW	FHNACCECVG	PECIDYGSKT	VKCVNCMV		

Abbildung 14: Aus der verwendeten cDNA-Sequenz (BC056070) resultierende Proteinsequenz für Twisted gastrulation von *Xenopus leavis*. Grün Sekretionssignalsequenz, Blau Sequenz des reifen Proteins, Orange potentielle N-Glykosylierungsstellen

Die Expression erfolgte, wie in Abschnitt 2.4.7 beschrieben, in serumfreien High-Five™-Insektenzellen in Suspensionskultur. Die Insektenzellichte wurde hierfür auf $5.5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und so viel vom Überstand einer serumfreien Virenamplifikation hinzugegeben, dass eine MOI von 5 erreicht wurde. Bis zu 400 ml Expressionsansatz wurden pro 2-Liter-Kulturkolben für 5 Tage bei 27°C unter Schütteln inkubiert. Aufgrund der im Vektor enthaltenen gp64-Signalsequenz gelangt nativ gefaltetes und posttranslational modifiziertes Protein über den sekretorischen Weg aus den Zellen in den Expressionsüberstand. Dieser wurde nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation ausgiebig dialysiert, um im Medium enthaltene Inhaltsstoffe zu entfernen, die den folgenden Aufreinigungsschritt beeinträchtigen können.

3.1.1.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurde das Protein im „batch-Verfahren“ angereichert und aufgereinigt (siehe 2.7.1.1). Zu 400 ml dialysiertem Expressionsüberstand wurden 2 ml in Bindepuffer äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose hinzugegeben und das Gemisch über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Nach der Abtrennung der Ni²⁺-NTA-Agarose vom Expressionsüberstand unter Verwendung einer ECONO-Glassäule, wurde das Säulenmaterial fünfmal mit 20 ml Bindepuffer gespült. Die Elution des Proteins erfolgte anschließend in zehn Fraktionen zu je 2 ml mit Elutionspuffer.

Die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen in Abbildung 15 zeigt, dass das Protein aus *Xenopus leavis* als Monomer exprimiert und angereichert werden kann. Es ist eine diffuse Bande oberhalb der 25 kDa Bande des Größenstandards zu erkennen. Dass das apparente Molekulargewicht größer ist, als das theoretisch berechnete Molekulargewicht mit 23.510 kDa, kann in der Hexahistidin-Sequenz begründet sein. Bei genauerer Betrachtung des SDS-Gels sind auf den weniger stark beladenen Spuren zwei bis drei nahe beieinander liegende Proteinbanden zu erkennen, wodurch das diffuse Laufverhalten erklärt werden kann. Twisted gastrulation enthält drei putative N-Glykosylierungsstellen (Abbildung 14), die scheinbar nicht in gleichem Maß genutzt werden. Durch unterschiedliche Glykosylierungsgrade ergeben sich so Proteinspezies, die sich in ihrem Laufverhalten unterscheiden.

Während bis zu 20 mg Twisted gastrulation pro einem Liter Suspensionskultur unter Verwendung der cDNA von *Xenopus leavis* aufgereinigt werden konnten, konnte eine Expression des murinen Proteins in Insektenzellen nicht nachgewiesen werden.

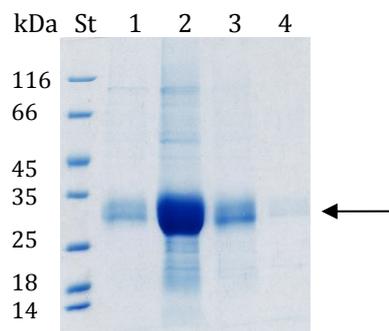


Abbildung 15: SDS-PAGE Analyse der Elutionsfraktionen der Metallchelate-Affinitätschromatographie von Twisted gastrulation. St Größenstandard, 1 – 4 Elutionsfraktionen, der Pfeil markiert die Proteinbande von Twisted gastrulation aus *Xenopus leavis*.

3.1.2 Herstellung von homogen glykosyliertem Twisted gastrulation in Insektenzellen durch Zugabe von Kifunensin

Das Alkaloid Kifunensin hemmt die Fukosylierung des protein-gebundenen N-Acetylglucosamins (Crispin et al., 2006) und erhöht so die Sensitivität gegenüber der Endoglykosidase H. Dadurch kann ein Hauptteil der Glykosylierung entfernt und homogen glykosyliertes Protein erhalten werden. Der nach der Spaltung mit der Endoglykosidase H verbleibende N-Acetylglucosamin-Rest reicht in der Regel aus, um einen gegebenenfalls für die Stabilität oder Funktion essentiellen Effekt der Glykosylierung aufrecht zu erhalten und hat den Vorteil, dass hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche bedeckt werden (Petrescu et al., 2004). Die vollständige Abspaltung der Glykosylierungen unter Verwendung der Peptid-N-Glykosidase F kann daher die Löslichkeit des Proteins verschlechtern (Davis et al., 1995).

Um eine homogene Glykosylierung ohne Fukosylierung von Twisted gastrulation für spätere Untersuchungen zu erreichen, wurde dem Expressionsansatz Kifunensin hinzu gesetzt. Der Zusatz des Alkaloids zeigte keinen Einfluss auf die Expressionsrate und auch das Verhalten von Twisted gastrulation während der Aufreinigung war unverändert. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, scheint das unbehandelte Protein zwar etwas inhomogener, aber die Sensitivität gegenüber der Endoglykosidase H hat sich im Vergleich deutlich erhöht. Auch massenspektrometrisch konnte der Verbleib von jeweils einem N-Acetylglucosamin an drei beziehungsweise zwei Glykosylierungsstellen nachgewiesen werden. So wurden zu einer theoretischen Masse von 23965.53 Da zwei Spezies mit Massen von 23964.36 Da und 23762.32 Da im Verhältnis von 4 zu 1 bestimmt.

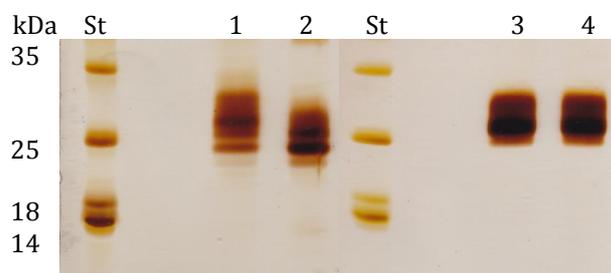


Abbildung 16: SDS-PAGE Analyse verschieden glykosylierter Twisted gastrulation Spezies vor und nach Verdau mit Endoglykosidase H. St) Standard, 1) unbehandeltes Twisted gastrulation aus Expression mit Kifunensin, 2) Twisted gastrulation aus Expression mit Kifunensin nach Behandlung mit Endoglykosidase H, 3) unbehandeltes Twisted gastrulation aus Expression ohne Kifunensin, 4) Twisted gastrulation aus Expression ohne Kifunensin nach Behandlung mit Endoglykosidase H

3.1.3 Expression und Aufreinigung von Twisted Gastrulation aus *E.coli* Zellen

Alternativ wurde auch die Expression von Twisted gastrulation in *E.coli* Zellen etabliert, da mit diesem Expressionssystem höhere Proteinausbeuten erreicht werden können und sich beispielsweise Isotopenmarkierungen des Proteins für Kernspinresonanz-Untersuchungen besser durchführen lassen.

Ein großer Nachteil bei der Expression in *E.coli* Zellen besteht allerdings darin, dass das Zytoplasma dieser Zellen stark reduzierend ist und eine Ausbildung von Disulfidbrücken unter normalen Umständen nicht zulässt. Aufgrund der komplexen Disulfidverbrückung von Twisted gastrulation wurde daher die bakterielle Expression in sogenannten Einschlusskörpern durchgeführt. Dabei reichert sich ungefaltetes Protein in kompakter Form im Zytoplasma an, wird nach der Isolation aus den Zellen gelöst und anschließend mittels Rückfaltung die biologisch aktive Form überführt.

3.1.3.1 Klonierung und Expression

Für die Expression des Proteins Twisted Gastrulation in *E.coli* wurden die cDNA-Sequenzen von *Mus musculus* (cDNA BC004850, imaGenes) und *Xenopus leavis* (cDNA BC056070, imaGenes) für den reifen Teil des Proteins in den Vektor pET28b über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* kloniert. C-terminal wurde über den Oligonukleotidprimer ein Stop-Codon eingefügt, so dass das Protein mit einer N-terminalen Hexahistidin-Sequenz exprimiert wird, die über eine Thrombinschnittstelle abspaltbar ist.

Die Expression erfolgte im 5-Liter-Maßstab in *E.coli* BL21(DE3)* Zellen in Form von Einschlusskörpern (siehe 2.5.1). Hierfür wurden pro 2-Liter-Kulturkolben 800 ml Expressionskultur bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.6 kultiviert und die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 4 Stunden Expressionsdauer wurden die Zellen pelletiert. Es wurden 2-3 g Zellen pro Liter Expressionskultur geerntet. Die SDS-PAGE in Abbildung 17 zeigt eine deutliche Induktionsbande auf der zu erwartenden Laufhöhe des Proteins.

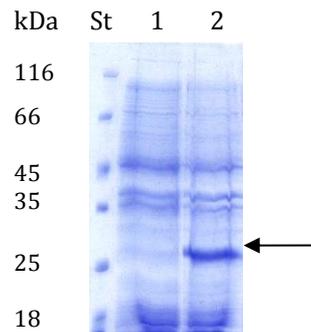


Abbildung 17: SDS-PAGE Analyse der Expression von Twisted gastrulation. Vergleich des Proteinmusters der *E.coli* Zellen vor der Induktion mit IPTG (**1**) und 4 Stunden danach (**2**). Der Pfeil markiert die Proteinbande von Twisted gastrulation, die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.1.3.2 Präparation der Einschlusskörper von Twisted gastrulation

Für die Isolierung der Einschlusskörper wurden bis zu 10 g *E.coli* Zellen in 200 ml TBSE-Puffer aufgenommen und mit der Zellsuspension wie in Abschnitt 2.5.4 verfahren. Nach zweimaliger Zellyse mittels Ultraschall und zwei anschließenden Waschschritten, wurden etwa 0.2 g Einschlusskörper pro Gramm *E.coli* Zellen erhalten. Der Verlauf der Extraktion wurde mittels SDS-PAGE verfolgt und zeigt, dass das Protein im Pellet vorzufinden war.

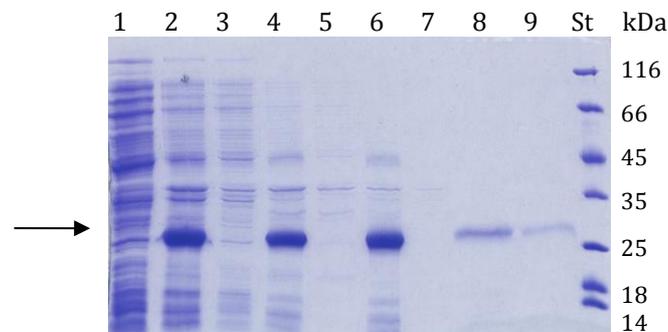


Abbildung 18: SDS-PAGE Analyse zum Verlauf der Präparation der Einschlusskörper von Twisted gastrulation. **St)** Größenstandard, **1)** Überstand nach erstem Aufschluss und Zentrifugation, **2)** resuspendiertes Pellet nach erstem Aufschluss, **3)** Überstand nach zweitem Aufschluss und Zentrifugation, **4)** resuspendiertes Pellet nach zweitem Aufschluss, **5)** Überstand nach Waschen mit TBST-Puffer und Zentrifugation, **6)** Pellet nach Waschen mit TBST-Puffer, **7)** Überstand nach Waschen mit TBSE-Puffer und Zentrifugation, **8)** Proteinsuspension der Hauptextraktion vor Zentrifugation, **9)** Überstand nach Zentrifugation der Hauptextraktionssuspension. Der Pfeil markiert die Proteinbande von Twisted gastrulation, die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

Die Einschlusskörper wurden in Extraktionspuffer gelöst, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und schließlich unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Spur 9 in Abbildung 18 zeigt, dass sich Twisted gastrulation gelöst hat und nach der Zentrifugation im Überstand befand.

3.1.3.3 Aufreinigung des Proteinextraktes mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Da das Protein N-terminal eine Hexahistidin-Sequenz trägt, wird als Aufreinigungsschritt vor der Renaturierung eine Ni²⁺-Affinitätssäule unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. So können noch in der Proteinlösung enthaltene Nukleinsäuren oder andere Zellbestandteile, die die Rückfaltung gegebenenfalls stören, entfernt werden.

Die nach der Extraktion der Einschlusskörper erhaltene Proteinlösung wurde hierfür bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Spritze über eine mit Bindepuffer äquilibrierte 5 ml Ni²⁺-Affinitätssäule gegeben (siehe 2.7.1.2). Die Entfernung unspezifisch gebundener Verunreinigungen erfolgte durch Spülen mit 50 ml Waschpuffer und die Elution in Fraktionen zu 5 ml mit Elutionspuffer. Die SDS-PAGE in Abbildung 19 zeigt, dass das Protein an die an der Säulenmatrix immobilisierten Ni²⁺-Ionen gebunden hat und durch die Zugabe von imidazolhaltigem Puffer eluiert werden konnte. Proteinenthaltende Fraktionen wurden vereinigt und dialysiert, um Imidazol und Ni²⁺-Ionen zu entfernen.

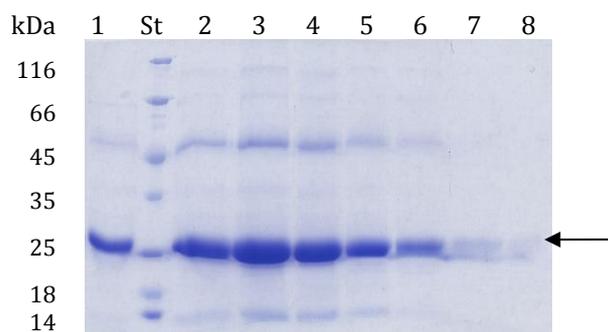


Abbildung 19: SDS-PAGE Analyse zum Verlauf der denaturierenden Metallchelate-Affinitätschromatographie von Twisted gastrulation. St Größenstandard, 1 – 8 Elutionsfraktionen; der Pfeil markiert die Proteinbande von Twisted gastrulation. Die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.1.3.4 Renaturierung von Twisted gastrulation

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung mittels Ultrafiltration bis zu einer Proteinkonzentration von 5 bis 10 mg/ml eingeeengt und anschließend langsam unter schnellem Rühren in den vorgekühlten und entgasten Rückfaltungspuffer eingetropft. Dabei wurde das Volumen so gewählt, dass die Proteinkonzentration 50 bis 100 µg/ml betrug. Der Verlauf der Renaturierung wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Wenn keine Zunahme der monomeren Proteinspezies mehr verzeichnet werden konnte, weil sich das thermodynamische Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Proteinspezies eingestellt hat, wurde die Renaturierung beendet und der Ansatz dialysiert. Die Renaturierungsdauer variierte zwischen 7 und 10 Tagen. Abbildung 20 zeigt, dass neben der monomeren Proteinspezies auch dimere und höheroligomere Spezies enthalten sind und deren Verhältnis zueinander über den Renaturierungszeitraum variiert.

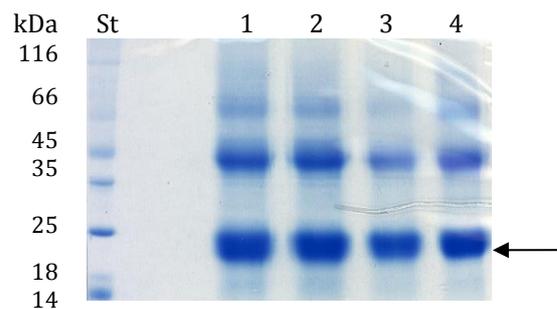


Abbildung 20: SDS-PAGE Analyse des Renaturierungsverlaufs von Twisted gastrulation. 1) Tag 1, 2) Tag 2, 3) Tag 5, 4) Tag 7; der Pfeil markiert die monomere Proteinbande von Twisted gastrulation. Die Proben wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.1.3.5 Anreicherung von Twisted gastrulation nach der Renaturierung

Um das im Renaturierungsansatz stark verdünnt vorliegende Protein wieder zu konzentrieren und das Detergenz CHAPS zu entfernen, wurde erneut die Hexahistidin-Sequenz in Verbindung mit einer 5 ml Ni²⁺-Affinitätssäule (HisTrap FF crude, GE) unter nativen Bedingungen genutzt (siehe 2.7.1.3).

Die Proteinlösung wurde über die Säule geleitet und das am Säulenmaterial gebundene Protein zunächst mit dem zehnfachen Säulenvolumen Tween20-haltigem Waschpuffer gewaschen, um daran anhaftendes CHAPS zu entfernen. Anschließend wurde mit zehn Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen und das Protein mit Elutionspuffer in Fraktionen zu 5 ml eluiert.

3.1.3.6 Isolierung der monomeren Proteinspezies mittels Größenausschlusschromatographie

Für die Abtrennung dimerer und oligomerer Proteinspezies hat sich die Größenausschlusschromatographie als beste Trennmöglichkeit erwiesen.

Hierfür wurde eine Säule mit einem Trennbereich von 3.000 bis 70.000 Da (Superdex 75 16/60 prep grade, GE) verwendet, wobei für eine hinreichende Auftrennung maximal 3 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgetragen wurden. Die Auftrennung der verschiedenen Proteinspezies erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min.

Wie in den Abbildung 21 und Abbildung 22 zu erkennen, eluieren höheroligomere Spezies zuerst von der Säule und das monomere Protein wird ab einem Elutionsvolumen von circa 63 ml separat erhalten.

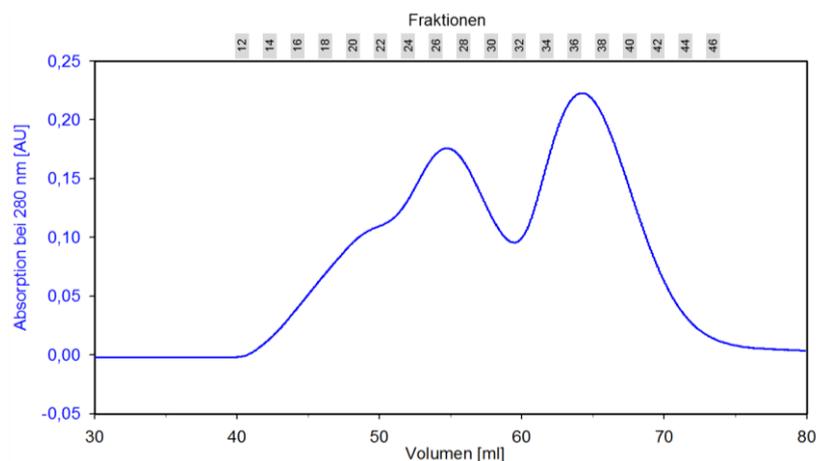


Abbildung 21: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie von Twisted gastrulation. Dargestellt ist der Bereich des Elutionsprofils von 30 – 80 ml.

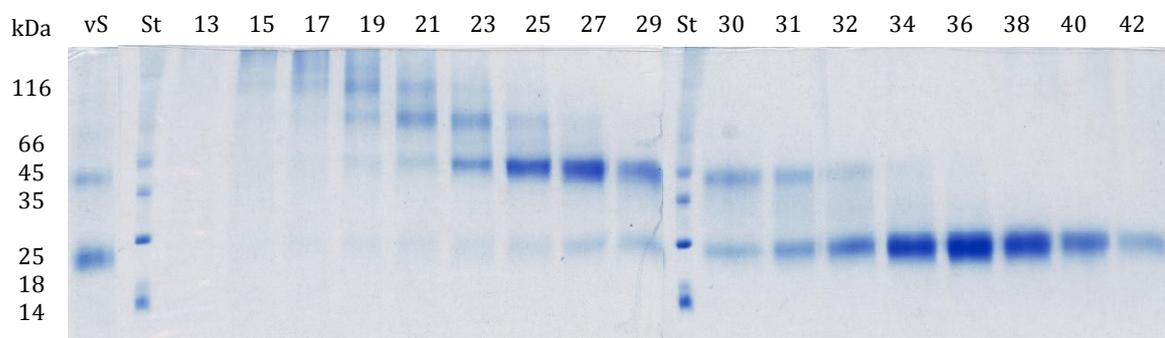


Abbildung 22: SDS-PAGE Analyse der Größenausschlusschromatographie von Twisted gastrulation. St Standard, vS Probe vor Auftrennung, 13 – 42 Proben ausgewählter Fraktionen; die Proben wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

Anhand der SDS-PAGE Analyse wurden die Fraktionen ermittelt und vereinigt, die lediglich die monomere Spezies enthielten und gegebenenfalls mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Nach der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Proteinlösung bei -20°C gelagert. Sowohl unter Verwendung der murinen cDNA wie auch der cDNA aus *Xenopus laevis* wurden etwa 3 mg rückgefaltetes Protein pro Gramm *E.coli* Zellen gewonnen.

3.1.4 Expression von Twisted gastrulation in Freestyle™ 293 F-Zellen

Die Expression in Säugerzellen stellt ebenso wie die Expression in Insektenzellen eine Möglichkeit dar, rekombinante Proteine zu herzustellen, die vollständig post-translational modifiziert sind und aufgrund eines komplexen Chaperonsystems mit hoher Wahrscheinlichkeit die biologisch aktive Proteinspezies darstellen. Ein weiterer Vorteil der Expression in Säugerzellen ist der geringere Zeitaufwand, da die Plasmid-DNA direkt in die Zellen eingebracht werden kann und das im Überstand enthaltene Protein nach einer Expressionsdauer von 3 – 5 Tagen sofort für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht. Die Methode eignet sich daher für Untersuchungen in denen eine hohe Zahl von Proteinvarianten charakterisiert werden soll und geringe Proteinmengen aus kleinen Kulturvolumina ausreichend sind.

Für die Expression von Twisted gastrulation in Freestyle™ 293 F-Zellen wurden die Zellen, wie in 2.6.1 beschrieben, kultiviert. Die transiente Transfektion der Zellen und Expression der Proteine erfolgte in 6-Loch-Platten. Hierfür wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine Dichte von $5.5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und 5 ml der Zellsuspension pro Vertiefung vorgelegt. In separaten Reaktionsgefäßen wurden pro Expressionsansatz 5 µg DNA in 175 µl Opti-MEM1 und 10 µg PEI in 175 µl Opti-MEM1 verdünnt. Nachdem die PEI-Verdünnung intensiv mit DNA-Verdünnung gemischt und bei Raumtemperatur für 25 min inkubiert wurde, erfolgte die tropfenweise Zugabe der DNA-PEI-Komplexe zu den Zellen. Nach 4-5 Tagen Expression wurde das Protein im Expressionsüberstand erhalten.

Zunächst wurden verschiedene Expressionsvektoren und Derivate derer getestet (pcDNA3.1, pcDNA3.3, pCAGEN, pHLsec). Die höchste Expressionsrate konnte unter Verwendung des Vektors pHLsec erzielt werden (Aricescu et al., 2006). Dieser basiert auf dem Säugerzell-Vektor pLEXm, welcher mit einem optimierten Sekretions-

signal versehen wurde und über eine C-terminale Hexahistidin-Sequenz verfügt. Die cDNA von Twisted gastrulation aus *Xenopus leavis* wurde in Kombination mit zusätzlichen C-terminal flankierenden avi- und V5-Sequenzen über die Restriktionsschnittstellen *AgeI* und *KpnI* eingefügt. Zusätzlich wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* ein Konstrukt angefertigt, das anstelle des optimierten, im Vektor bereits vorhandenen Sekretionssignals, die proteineigene Signalsequenz von Twisted gastrulation trägt. Auch hier wurden C-terminal flankierend eine V5-, avi- und Hexahistidin-Sequenz angefügt.

Die nach Transfektion und Expression erhaltenen Überstände wurden mittels Western-Blot-Analyse über die angefügte Hexahistidin-Sequenz auf das Vorhandensein von Twisted gastrulation hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zu anderen Expressionsvektoren der Vektor pHLsec in Kombination mit dem für Twisted gastrulation spezifischen Signalpeptid die höchste Expressionsrate aufweist (Abbildung 23). Während die Proteinbanden von Twisted gastrulation in den Vektoren pcDNA3.3 und pHLsec mit optimiertem Sekretionssignal nur schwach zu erkennen sind, ist eine ähnlich starke Bande von Twisted gastrulation zu erkennen, wie bei dem als Positivkontrolle dienenden Konstrukt mit der cDNA-Sequenz von Ephrin-B2. Auch bei der Expression in Freestyle™ 293 F-Zellen ist das apparente Molekulargewicht von Twisted gastrulation höher als das theoretisch berechnete, was auf die Glykosylierung des Proteins zurückzuführen ist. Für weitere Untersuchungen wurde daher das pHLsec-Konstrukt mit dem proteineigenen Sekretionssignal verwendet.

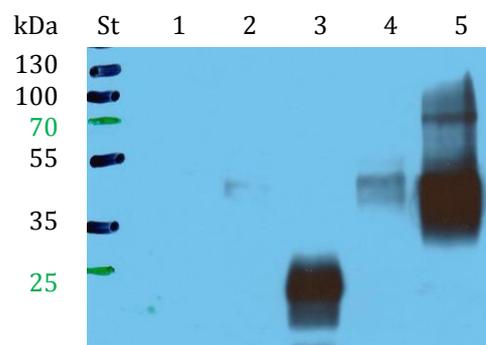


Abbildung 23: Western-Blot-Analyse von Überständen der Expression von Twisted gastrulation in Freestyle™ 293 F-Zellen. St) Standard, 1) Vektor pcDNA3.3 ohne eingefügte cDNA-Sequenz, 2) Vektor pcDNA3.3 mit cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation mit spezifischem Sekretionssignal, 3) Vektor pHLsec mit cDNA-Sequenz von Ephrin-B2, 4) Vektor pHLsec mit cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation und optimiertem Sekretionssignal, 5) Vektor pHLsec mit cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation und proteineigenem Sekretionssignal. Für die Detektion wurde ein gegen die Hexahistidin-Sequenz gerichteter Antikörper verwendet, die Belichtungsdauer betrug 15 s.

3.2 Untersuchung der Bindeeigenschaften und Charakterisierung der rekombinant hergestellten Proteine

3.2.1 In HighFive™-Zellen exprimierte Twisted gastrulation ist N-glykosyliert

Wie bereits erwähnt enthält Twisted gastrulation drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen mit dem Sequenzmotiv Asn-Xxx-Ser/Thr, wobei Xxx eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin oder Asparaginsäure sein kann (Marshall, 1972). Zwei der Glykosylierungsstellen liegen dabei in der N-terminalen Domäne (Asn 52 und Asn 81) und eine im C-terminalen Bereich (Asn 147) des Proteins (Abbildung 14).

Bei der Expression von Proteinen mit potenziellen Glykosylierungsstellen in Insektenzellen werden diese in der Regel erkannt, wobei sich die angehängten Glykanstrukturen beispielsweise von denen von Säugern in ihrer Zusammensetzung unterscheiden (Jarvis & Finn, 1995), was jedoch in der Regel keinen Einfluss auf die biologische Aktivität hat.

Zum qualitativen Nachweis der Glykosylierung wurde im Anschluss an die Auftrennung der Proteinprobe durch SDS-PAGE die Färbung mittels Perjodsäure-Reaktion durchgeführt. Abbildung 24 zeigt, dass sich zwei Twisted gastrulation Banden violett färben, was belegt, dass das aufgereinigte Protein während der Expression variabel glykosyliert wird.

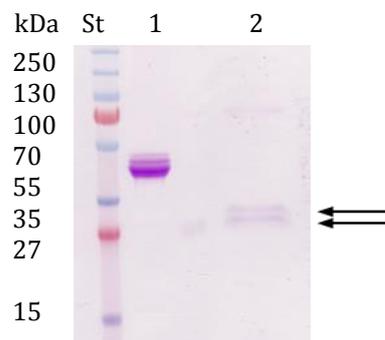


Abbildung 24: SDS-PAGE Analyse und anschließende PAS-Färbung zum Nachweis von Glykosylierungen. St) Größenstandard, 1) 3 ng Peroxidase als positiv Kontrolle, 2) 10 ng Twisted gastrulation; die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, der Pfeil markiert die Bande von Twisted gastrulation.

3.2.2 Analyse des Glykosylierungsmusters von Twisted gastrulation aus Insektenzellen

Alle N-Glykosylierungen haben eine sogenannte Grund-Struktur gemeinsam (Abbildung 25). Dieses Pentasaccharid besteht aus zwei N-Acetylglucosamin-Resten, wovon einer mit der Amidgruppe von Asparagin verknüpft ist, und drei Mannose-Resten Kornfeld & Kornfeld, 1985). Bei den verwendeten Insektenzelllinien beschränkt sich das Glykosylierungsmuster auf diese Pentasaccharidstruktur, eine mögliche Variation besteht in der Verknüpfung einer Fukose am proteinständigen N-Acetylglucosamin (Jarvis & Finn, 1995; Contreras-Gómez et al., 2013).



Abbildung 25: Darstellung des N-Glykosylierungsmusters von Insektenzellen nach Kornfeld & Kornfeld und Contreras-Gómez (Übersichtsartikel siehe: Kornfeld & Kornfeld, 1985; Contreras-Gómez et al., 2013). **Man** Mannose, **Fuc** Fukose, **GlcNAc** N-Acetylglucosamin, **Asn** Asparagin.

Für die Entfernung N-glykosidisch verknüpfter Kohlenhydratketten von Proteinen stehen verschiedene Enzyme zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Spezifität unterscheiden, wobei die in der Folge verwendeten Enzyme alle in der Grund-Struktur schneiden.

Die Endoglykosidasen H und F3 schneiden zwischen den beiden N-Acetylglucosamin-Resten, so dass der am Asparagin gebundene N-Acetylglucosamin-Rest dort verbleibt. Während die Endoglykosidase F3 auch schneidet, wenn der erste N-Acetylglucosamin-Rest zusätzlich fukosyliert ist, ist die Endoglykosidase H-Aktivität durch das Vorhandensein einer α -1,6-gebundenen Fukose deutlich niedriger.

Die Peptid-N-Glykosidase F trennt Kohlenhydratketten hingegen vollständig von der Aminosäure ab, wobei Asparagin zu Aspartat desaminiert wird (Tarentino et al., 1985).

Da inhomogene Glykosylierungen oder Glykosylierungen generell bei weiteren Untersuchungen von Nachteil sein können, wurden zunächst analytische Deglykosylierungsversuche durchgeführt (siehe 2.3.7). Jeweils 5 µg Twisted gastrulation aus High-Five™-Insektenzellen wurden mit 75 U Endoglykosidase H, 75 U Endoglykosidase H und 0.025 U Endoglykosidase F3 oder 5 U Peptid-N-Glykosidase F deglykosyliert.

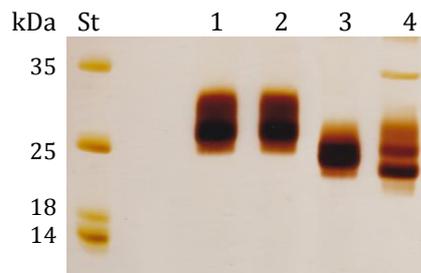


Abbildung 26: SDS-PAGE Analyse der analytischen Deglykosylierungsversuche. 1) Twisted gastrulation unverdaut, 2) Twisted gastrulation nach Zusatz von Endoglykosidase H, 3) Twisted gastrulation nach Zusatz von Endoglykosidase H/F3, 4) Twisted gastrulation nach Zusatz von Peptid-N-Glykosidase F; die Auftrennung der Proben erfolgte unter reduzierenden Bedingungen.

Abbildung 26 zeigt die verschiedenen Effekte nach Inkubation von Twisted gastrulation mit den beschriebenen (Endo-) Glykosidasen. Die Behandlung mit Endoglykosidase H allein hat scheinbar keinen Einfluss auf die Glykosylierung, da das Laufverhalten im Vergleich zu unbehandeltem Protein unverändert ist. Grund hierfür ist scheinbar die auch in Insektenzellen vorkommende Fukosylierung des direkt an das Asparagin geknüpften N-Acetylglukosamin-Restes. Die zusätzliche Zugabe der Endoglykosidase F3 zeigt hingegen eine deutliche Verringerung des apparenten Molekulargewichts. Dies bestätigt die obige Vermutung, dass der erste N-Acetylglukosamin-Rest fukosyliert ist, denn während ein α -1,6-verknüpfter Fukose-Rest die Aktivität der Endoglykosidase F3 steigert, inhibiert er die Aktivität der Endoglykosidase H. Auch mit der Zugabe der Peptid-N-Glykosidase F kann eine deutliche Deglykosylierung nachgewiesen werden. Allerdings sind scheinbar nicht alle Glykosylierungen für die Peptid-N-Glykosidase F vollständig zugänglich, da noch zwei deutlich voneinander getrennte Banden zu erkennen sind. Trotz dessen ist durch die Behandlung mit der Peptid-N-Glykosidase F die deutlichste Veränderung im Laufverhalten und, daraus abgeleitet, die effektivste Deglykosylierung zu beobachten. Dies bestätigt die Beschreibung, dass durch Peptid-N-Glykosidase F das Oligosaccharid vollständig vom Protein abgetrennt wird.

3.2.3 Die *in vitro* Bindeeigenschaften von Twisted gastrulation variieren in Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden rekombinant hergestelltes Twisted gastrulation aus *E.coli* und die Glykosylierungsvarianten aus Insektenzellen mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht.

Hierfür wurden nach Aktivierung der Biosensoroberfläche mit einer EDC/sulfo-NHS-Lösung (100 mM/25 mM) etwa 260 RU BMP-2 direkt durch Aminokopplung auf der Biosensoroberfläche immobilisiert. Verbleibende freie aktivierte Carboxylgruppen wurden durch Überleiten von Ethanolamin abgesättigt. Anschließend wurde renaturiertes Protein aus *E.coli* und in HighFive™ Zellen exprimiertes Twisted gastrulation in verschiedenen Konzentrationen (250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM, 15.6 nM) über die Biosensoroberfläche geleitet. Die Interaktionsanalysen wurden mit einer Flussrate von 100 µl/min durchgeführt, die Assoziationsphase betrug 240 s, die Dissoziationsphase 420 s. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgten nach dem Langmuir-1:1-Interaktionsmodell mit den in Tabelle 15 angegebenen Einstellungen.

Wie in Abbildung 27 dargestellt und Tabelle 16 zusammengefasst, weisen sowohl das renaturierte als auch das aus Insektenzellen erhaltene Protein Bindungsaffinitäten für BMP-2 auf, die vergleichbar sind mit bisher veröffentlichten Daten (J.-L. Zhang et al., 2007). Jedoch zeigt sich ein Unterschied zwischen beiden Proteinspezies; neben einer geringeren erreichten maximalen Bindung ist die Dissoziationskonstante von Twisted gastrulation aus *E.coli* signifikant höher. Vergleicht man den Verlauf der normierten Sensorgramme, liegt die Ursache dafür in der schnelleren Dissoziationsrate (Abbildung 27). Ursache hierfür kann zum einen sein, dass das aus der Rückfaltung erhaltene Protein nicht zu 100% renaturiert ist oder aber posttranslationale Modifikationen eine Rolle bei der Interaktion spielen. Letztere Vermutung wird verstärkt durch die vergleichende Messung von mit Peptid-N-Glykosidase F verdautem Protein.

Wie in 3.2.2 beschrieben, kann ein Großteil der Glykosylierung durch Verwendung der Peptid-N-Glykosidase F enzymatisch abgespaltet werden. Bei der Interaktionsanalyse zeigt diese Glykosylierungsvariante die gleiche Assoziationsgeschwindigkeit, wie die anderen beiden Proteinvarianten, die Dissoziationsgeschwindigkeit liegt hingegen zwischen den zuvor ermittelten Werten für Twisted gastrulation aus *E.coli*

und Insektenzellen. Daraus ergibt sich auch eine Dissoziationskonstante, die niedriger ist, als die für unglykosyliertes Protein aus *E.coli*, aber höher als für nativ glykosyliertes Protein aus Insektenzellen.

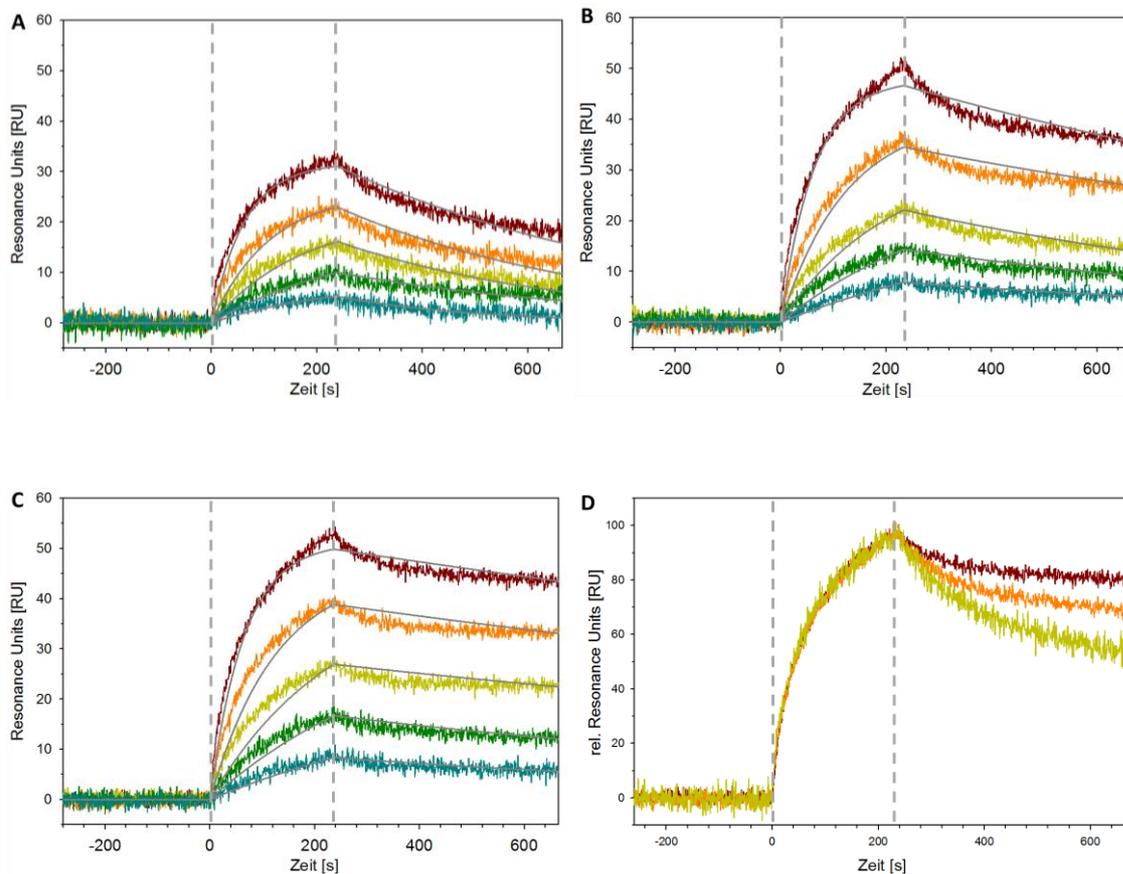


Abbildung 27: Sensorgramme der Aktivitätsbestimmung von Twisted gastrulation aus verschiedenen Expressionssystemen. BMP-2 wurde direkt auf dem Biosensor immobilisiert, Twisted gastrulation wurde als Analyt in den Konzentrationen **250 nM**, **125 nM**, **62.5 nM**, **31.25 nM** und **15.625 nM** eingesetzt. **A** Interaktion von Twisted gastrulation präpariert aus *E.coli*. **B** Interaktion von Twisted gastrulation exprimiert in HighFiveTM-Zellen und anschließendem Verdau mit Peptid-N-Glykosidase F. **C** Interaktion von Twisted gastrulation exprimiert in HighFiveTM-Zellen. **D** Vergleichende Darstellung normalisierter Sensorgramme der verschiedenen Proteinspezies (*E.coli*, HighFiveTM/Peptid-N-Glykosidase F, HighFiveTM) bei einer Konzentration von 250 nM. Die Assoziationsphasen beginnen zum Zeitpunkt 0 s (erste gestrichelte Linie) und haben eine Dauer von 240 s, danach (zweite gestrichelte Linie) beginnt die Dissoziationsphase für eine Dauer von 420 s. Die Flussrate beträgt 100 μ l/min.

Die Charakterisierung des unter Zugabe von Kifunensine exprimierten Proteins mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie zeigt, dass eine Modifikation der Glykosylierung keinen Effekt auf die Aktivität des Proteins hat (Abbildung 28). So wurden nahezu identische kinetische Parameter erhalten, wie für Twisted gastrulation, welches ohne Zusatz des Alkaloids produziert wurde (Tabelle 16).

Lediglich nach der enzymatischen Entfernung der Glykosylierung bis auf den direkt mit dem Protein verbundenen Zuckerrest unter Verwendung der Endoglykosidase H war die Dissoziationskonstante etwas erhöht, jedoch ähnlich der Dissoziationskonstante die mit Peptid-N-Glykosidase F behandeltem Protein erhalten wird. Die Änderung ist auch hier durch eine höhere Dissoziationsrate bedingt.

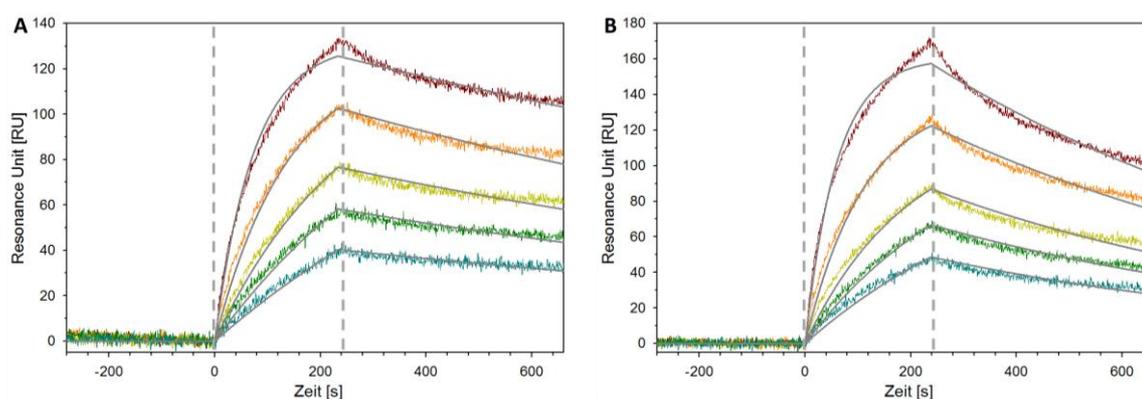


Abbildung 28: Sensorgramme der Aktivitätsbestimmung von Twisted gastrulation aus High-Five™-Zellen exprimiert unter der Zugabe von Kifunensine. BMP-2 wurde direkt auf dem Biosensor immobilisiert, Twisted gastrulation wurde als Analyt in den Konzentrationen **200 nM**, **100 nM**, **50 nM**, **25 nM** und **12.5 nM** eingesetzt. **A** Interaktion von unbehandeltem Twisted gastrulation. **B** Interaktion von Endoglykosidase H-behandeltem Twisted gastrulation und mittels Thrombin abgespaltener Hexahistidin-Sequenz. Die Assoziationsphasen beginnen zum Zeitpunkt 0 s (erste gestrichelte Linie) und haben eine Dauer von 240 s, danach (zweite gestrichelte Linie) beginnt die Dissoziationsphase für eine Dauer von 420 s. Die Flussrate beträgt 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Tabelle 16: Zusammenfassung der mit dem Langmuir-1:1-Interaktionsmodell ermittelten Dissoziationskonstanten, Assoziations- und Dissoziationsraten und maximalen Bindungskapazitäten für Twisted gastrulation verschiedenen Expressionsursprungs.

	R_{max}	k_a ($10^3/\text{Ms}$)	k_d ($10^{-4}/\text{s}$)	K_D (nM)
Tsg <i>E.coli</i>	36	57 ± 0.7	23 ± 0.7	40 ± 15
Tsg HighFive™ (PNGaseF)	45	61 ± 0.6	9 ± 0.3	14 ± 3
Tsg HighFive™	49	61 ± 0.6	6 ± 0.2	9 ± 4
Tsg HighFive™ (Kifunensin)	174	66 ± 0.5	6 ± 0.1	9 ± 1
Tsg HighFive™ (Kifunensin/EndoH/ Thrombin)	194	78 ± 0.6	13 ± 0.2	16 ± 1

3.2.4 Twisted gastrulation bakteriellen Ursprungs zeigt im zellbasierten Assay eine geringere Aktivität

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität der rekombinant hergestellten Proteine, wurde die Eigenschaft von C2C12- und ATDC5-Zellen genutzt, durch die extrazelluläre Stimulation mit BMP-Liganden zu differenzieren und Alkalische Phosphatase (ALP) zu synthetisieren. Hierfür wurde zunächst die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) für BMP-2 bestimmt, um anschließend dessen stimulierenden Effekt durch die Zugabe von Twisted gastrulation zu inhibieren.

Die Zellen wurden hierfür, wie in 2.8.1 und 2.8.2 beschrieben, kultiviert und der Assay in einer 96-Loch-Platte vorbereitet. Nach der Inkubation mit Hungermedium wurden die Zellen mit BMP-haltigem Hungermedium, entsprechend der bestimmten halbmaximalen effektiven Konzentration, versetzt. Je nach gewünschter Verdünnungsreihe wurde das Modulatorprotein in 50 μ l (log3) oder 100 μ l (log2) in dreifacher oder doppelter Startkonzentration vorverdünnt und anschließend das entsprechende Volumen in die jeweils erste Vertiefung einer Zellreihe gegeben. Für die Verdünnungsreihe wurde dieses Volumen in die jeweils nächste Vertiefung übertragen und gemischt.

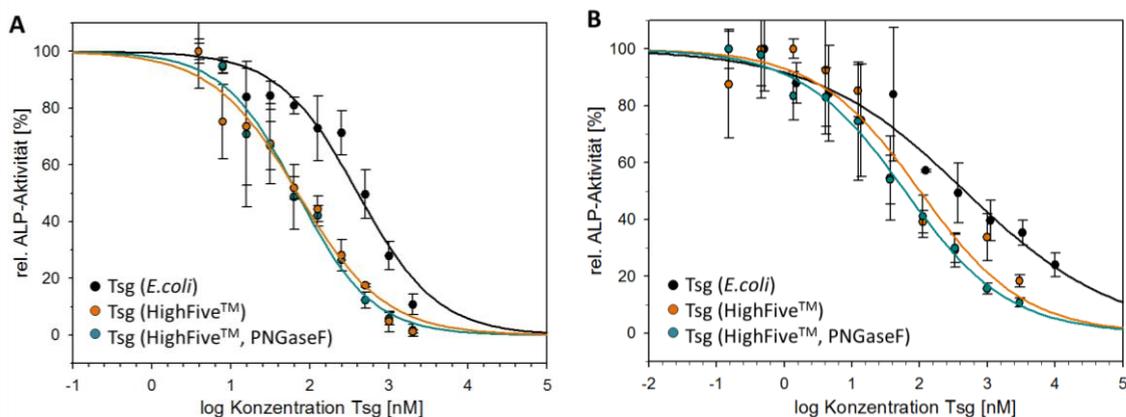


Abbildung 29: ALP-Assays in C2C12- (A) und ATDC5-Zellen (B) zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration von rekombinant hergestelltem Twisted gastrulation. A) Für die Bestimmung der IC_{50} in C2C12-Zellen, wurde Twisted gastrulation mit einer Startkonzentration von 2 μ M eingesetzt und in einer log2-Reihe verdünnt. Die im Hungermedium enthaltene BMP-2 Konzentration betrug 30 nM. B) Für die Bestimmung der IC_{50} in ATDC5-Zellen wurde Twisted gastrulation mit einer Startkonzentration von 10 μ M (*E.coli*) beziehungsweise 3 μ M (HighFive™-Zellen, HighFive™-Zellen/PNGaseF) eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in einer log3-Reihe. Die im Hungermedium enthaltene BMP-2 Konzentration betrug 5 nM. Die erhaltenen Daten wurden halblogarithmisch aufgetragen und unter Verwendung des „sigmoidal dose-response“-Fit angepasst (SigmaPlot).

Tabelle 17: Zusammenfassung der in den ALP-Assays ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) für Twisted gastrulation verschiedenen Expressionsursprungs.

	IC_{50} (nM) bestimmt in C2C12-Zellen	IC_{50} (nM) bestimmt in ATDC5-Zellen
Tsg HighFive™	69 ± 1	62 ± 1
Tsg HighFive™ (PNGaseF)	71 ± 2	100 ± 3
Tsg <i>E.coli</i>	398 ± 3	467 ± 8

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich wird, zeigte unterschiedlich hergestelltes Twisted gastrulation auch im Zellaassay unterschiedliche Effekte. Passend zu den erhaltenen Interaktionsdaten hat Twisted gastrulation aus *E.coli* die geringste inhibitorische Wirkung auf die Stimulation mit BMP-2. Bei Betrachtung der IC_{50} -Werte wird dies deutlich (Tabelle 17). Während bei den C2C12-Zellen von Twisted gastrulation aus *E.coli* die halbmaximale Inhibition erst mit dem 13fachen Überschuss an Modulatorprotein erreicht wird, genügt für Protein aus HighFive™-Zellen bereits ein zweifacher Überschuss für die gleiche Hemmwirkung. Dabei scheint es allerdings keine Rolle zu spielen, ob das Protein deglykosyliert wurde, da der IC_{50} -Wert für Protein, das mit Peptid-N-Glykosidase F behandelt wurde, nur geringfügig erhöht ist. Auch die Untersuchung der Aktivität mit ATDC5-Zellen spiegelt dies wieder. Während Twisted gastrulation aus HighFive™-Zellen bei 12-20fachen Überschuss eine halbmaximale Inhibition zeigt, muss das Modulatorprotein aus *E.coli* in mehr als 90fachem Überschuss eingesetzt werden. Allgemein wird also bei ATDC5-Zellen eine höhere Modulatorproteinmenge benötigt, allerdings ist der Faktor zwischen den verschiedenen Zelllinien und Proteinen ähnlich.

3.3 Twisted gastrulation beeinflusst die Interaktion zwischen BMP-2 und den Typ I-Rezeptoren

Die Untersuchung, ob Twisted gastrulation einen Einfluss auf die Interaktion von BMP-2 mit dessen Rezeptoren ausübt oder selbst mit diesen interagiert, wurden mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie durchgeführt.

BMP-2 interagiert hoch- bis mittelaffin mit den Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB, sowie niederaffin mit BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB (Heinecke et al., 2009) (Übersichtsartikel siehe: Sebald et al., 2004). Die extrazellulären ligandenbindenden Domänen der Rezeptoren wurden zunächst biotinyliert (durchgeführt von T. Hellmann) und über Neutravidin auf der Biosensoroberfläche immobilisiert. Hierfür wurde die Biosensoroberfläche durch Perfusion einer EDC/sulfo-NHS-Lösung (100 mM/25 mM) aktiviert und Neutravidin (0.1 mg/ml, verdünnt in 10 mM Na-Acetat Puffer pH 4.0) bis zum Erreichen der Sättigungsphase darüber geleitet. Eventuell noch freie aktivierte Carboxylgruppen wurden durch Überleiten von Ethanolamin abgesättigt. Für die Immobilisierung der biotinylierten Rezeptoren wurden diese in Messpuffer verdünnt (200-400 nM) und bis zu einer Beladungsdichte von je 100-200 RU perfusioniert.

Für die Interaktionsanalyse wurde zunächst Twisted gastrulation separat in verschiedenen Konzentrationen (500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM, 15.6 nM) über die Rezeptoren geleitet. Hierbei konnte keine direkte Interaktion zwischen den Rezeptoren und Twisted gastrulation beobachtet werden.

Um anschließend vergleichen zu können, welchen Einfluss Twisted gastrulation auf die Ligand-Rezeptor-Interaktionen hat, wurde die Interaktion von BMP-2 mit den verschiedenen Rezeptoren gemessen.

Im Anschluss wurden Twisted gastrulation und BMP-2 im molaren Verhältnis von 4:1 in verschiedenen Konzentrationen in Messpuffer vorinkubiert und anschließend die Interaktionsanalyse durchgeführt. Alle Messungen erfolgten mit einer Flussrate von 100 μ l/min, wobei die Assoziationsphase bei allen Messungen 240 s und die Dissoziationsphase 420 s betrug.

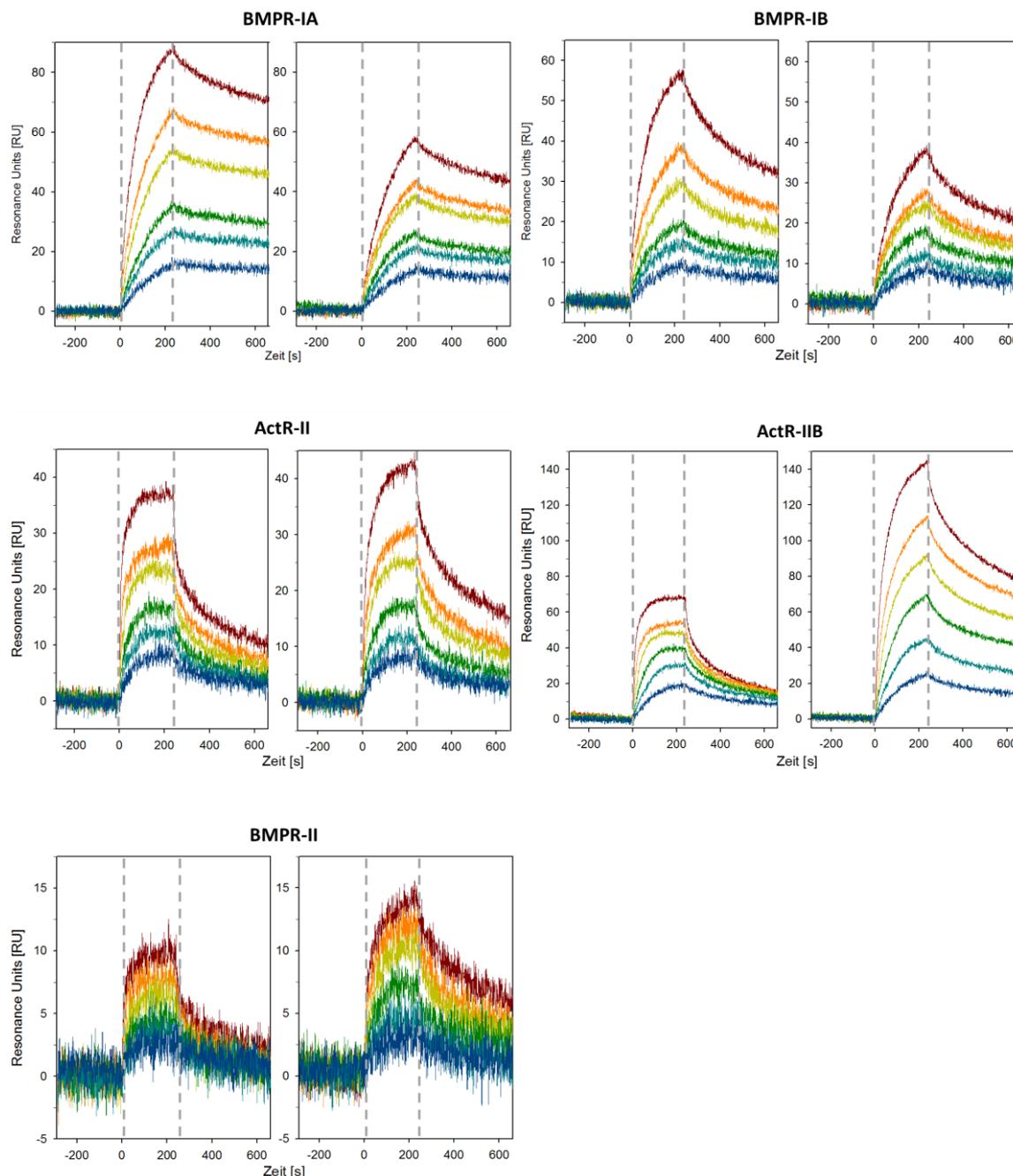


Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der Sensorgramme der Interaktion von BMP-2 sowie BMP-2 und Twisted gastrulation im Gemisch mit den Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-II, ActR-IIB und BMPR-II. Im jeweils linken Sensorogramm ist die Interaktion von BMP-2 (Analyt) mit dem entsprechenden Rezeptor (Ligand) dargestellt. BMP-2 wurde in den Konzentrationen **200 nM**, **100 nM**, **50 nM**, **25 nM**, **12.5 nM** und **6.3 nM** verwendet. Im jeweils rechten Sensorogramm ist die Interaktion des BMP-2- Tsg - Gemischs (Analyt) mit dem entsprechenden Rezeptor (Ligand) dargestellt. Es wurden verschiedene Konzentrationen analysiert **200 nM BMP-2 + 800 nM Tsg**, **100 nM BMP-2 + 400 nM Tsg**, **50 nM BMP-2 + 200 nM Tsg**, **25 nM BMP-2 + 100 nM Tsg**, **12.5 nM BMP-2 + 50 nM Tsg** und **6.3 nM BMP-2 + 25 nM Tsg**. Die Assoziationsphasen beginnen zum Zeitpunkt 0 s (erste gestrichelte Linie) und haben eine Dauer von 240 s, danach (zweite gestrichelte Linie) beginnt die Dissoziationsphase für eine Dauer von 420 s. Die Flussrate beträgt 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die vergleichende Darstellung der erhaltenen Sensorgramme in Abbildung 30 zeigt deutlich, dass verschiedene Effekte in Abhängigkeit vom Rezeptor-Typ eintreten. Die Interaktion von BMP-2 mit den Typ-I Rezeptoren wird offensichtlich durch die Anwesenheit von Twisted gastrulation eingeschränkt, da die erzielten Signaleinheiten deutlich reduziert sind. Das heißt, dass Twisted gastrulation mit den Typ-I Rezeptoren BMPR-IA und -IB um eine gemeinsame oder überlappende Bindestelle konkurriert.

Die Interaktion von BMP-2 mit den Typ-II Rezeptoren wird hingegen nicht beeinflusst. So werden besonders bei der Interaktion von BMP-2 mit dem Rezeptor ActR-IIB erheblich höhere Signalamplituden erreicht, was darauf schließen lässt, dass bereits an Twisted gastrulation gebundenes BMP-2 weiterhin auch an die Typ II-Rezeptoren binden kann und sich die Bindesteppen von Twisted gastrulation und den Typ II-Rezeptoren nicht überschneiden.

3.4 Mutagenesestudie zur Charakterisierung des BMP-2 – Bindeepitops von Twisted gastrulation

Für die Eingrenzung und Charakterisierung des BMP-2-Bindeepitops von Twisted gastrulation wurden die in Tabelle 18 aufgeführten Mutationen mittels zweistufiger PCR eingefügt (siehe 2.2.1) und die Proteinvarianten anschließend in Freestyle™ 293 F-Zellen exprimiert (siehe 2.6.2). Anschließend wurde deren Affinität zu BMP-2 mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie bestimmt. Die Fusion an verschiedene Erkennungssequenzen diente neben der Detektion der Proteine mittels Western Blot auch für verschiedene Strategien zur Immobilisierung der Varianten von Twisted gastrulation auf der Biosensoroberfläche.

3.4.1 Auswahl und Expression der Einzelaminosäurevarianten

Die Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren erfolgte zum einen auf der Analyse von mehr als 2000 Alanin-Mutanten verschiedener Protein-Protein-Interaktionspaare durch Andrew A. Bogan und Kurt S. Thorn, die ergab, dass vor allem die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Arginin eine wichtige Rolle in Protein-Protein-Interaktionen spielen (Bogan & Thorn, 1998). Aminosäuren dieses Typs wurden daher im gesamten Twisted gastrulation-Protein durch gerichtete Mutagenese variiert. Zum anderen erfolgte die Auswahl mit Hinblick auf die Untersuchungen von Oelgeschläger et al. (2000, 2003), die zeigten, dass sich die Interaktion von Twisted gastrulation mit BMP-4 auf die N-terminale Domäne von Twisted gastrulation beschränkt (Oelgeschläger et al., 2000, 2003). Zusammen mit den Ergebnissen der Untersuchung zur Bindung der Rezeptoren und der Schlussfolgerung, dass sich das Bindeepitop von Twisted gastrulation mit dem des Rezeptors BMPR-IA überschneidet (siehe 3.3), sowie den Erkenntnissen von Keller et al. (2004), dass neben den hydrophoben Wechselwirkungen bei der Bindung von BMP-2 und BMPR-IA auch Wasserstoffbrücken einen entscheidenden Beitrag leisten (Keller et al., 2004), wurde die Auswahl auf die Aminosäuren Glutamat und Aspartat im N-terminalen Teil des Proteins erweitert.

10
20
30
40
50
60
MKPSFLHIPA
AALLLCSLWI
LPIHCNKAL
CASDVSKCLI
QELCQCRPTD
GNCSCCKECM
70
80
90
100
110
120
LCLGTLWDEC
CDCVGM CNPR
NYSDFPPTSK
STVEELHEPI
PSLFRALTEG
DTQLNWNIVT
130
140
150
160
170
180
FPVVEELSHH
ENLVSFLETV
NQPQQQNVSV
QVSHSNEKEH
MCTVVYFDDC
MSIHQCKVSC
190
200
210
ESMGASKYRW
FHNACCECVG
PECIDYGSKT
VKCVNCMV

Abbildung 31: Lokalisation der Aminosäure-Substitutionen in der Proteinsequenz für Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis*. Grün Sekretionssignalsequenz, Blau Sequenz des reifen Proteins, Orange Substitutionen der ungeladenen Aminosäuren, Rot Substitutionen der geladenen Aminosäuren im N-terminalen Bereich.

Tabelle 18: Übersicht zu den durchgeführten Aminosäure-Substitutionen in Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis*

Aminosäure-Substitution	Position	Bezeichnung
Tryptophan → Alanin	67, 116, 190	W67A, W116A, W190A
Arginin → Glutamat	47, 80, 105, 189	R47E, R80E, R105E, R189E
Tyrosin → Alanin	82, 166, 188, 206	Y82A, Y166A, Y188A, Y206A
Aspartat → Arginin	68, 72	D68R, D72R
Glutamat → Arginin	69, 94, 95	E69R, E94R, E95R

Der Austausch der hydrophoben Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin erfolgte dabei im gesamten Protein gegen die ungeladene aber kleinere Aminosäure Alanin. Die geladenen Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Arginin wurden jeweils gegen Aminosäuren mit gegenteiliger Ladung ausgetauscht, um für die Interaktionsanalyse möglichst große Änderungen zu erzielen, falls diese Aminosäuren an Interaktionen beteiligt sind. Der Austausch von Glutamat- und Aspartatresten beschränkte sich dabei auf den N-terminalen Bereich von Twisted gastrulation.

Die Expression der Twisted gastrulation-Varianten erfolgte wie in 3.1.4 beschrieben. Wie in Abbildung 32 exemplarisch dargestellt, konnte die Expression unter Verwendung eines gegen die Hexahistidin-Sequenz gerichteten Antikörpers nachgewiesen werden. Zwar variierten die Expressionsraten der einzelnen Twisted gastrulation-Varianten, jedoch wurden alle 16 Proteinvarianten in ausreichenden Mengen exprimiert. Dies lässt gleichzeitig darauf schließen, dass die Aminosäureaustausche zu keinen globalen Entfaltungen der Proteinvarianten geführt haben, da sonst keine Sekretion zu erwarten gewesen wäre.

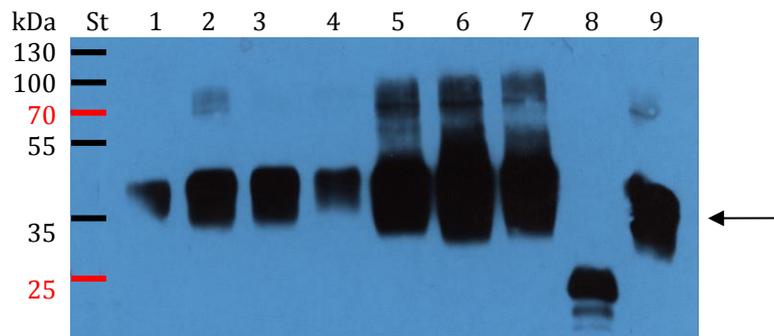


Abbildung 32: Western-Blot-Analyse einer exemplarischen Auswahl von Überständen der Freestyle™ 293-Expression von Twisted gastrulation-Varianten im Vektor pHLsec mit proteineigenem Sekretionssignal. St) Standard, 1) W67A, 2) D68R, 3) E69R, 4) D72R, 5) Y82A, 6) W116A, 7) Y206A, 8) Ephrin-B2, 9) Twisted gastrulation WT. Für die Detektion wurde ein gegen die Hexahistidin-Sequenz gerichteter Antikörper verwendet, die Belichtungsdauer betrug 2 min. Der Pfeil markiert die Proteinbande der Twisted gastrulation-Varianten.

3.4.2 Herstellung des Twisted gastrulation-Biosensors für die Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie

Für die Immobilisierung der Twisted gastrulation Varianten sollte zunächst die Hexahistidin-Sequenz nach dem Prinzip der Metallchelate-Affinitätschromatographie verwendet werden. Hierfür stand ein HTG-Biosensor (Bio-Rad) zur Verfügung, der mit tris-NTA und darüber gebundenen Ni^{2+} -Ionen beschichtet ist. Die an das Zielprotein fusionierte Hexahistidin-Sequenz sollte eine Immobilisierung direkt aus dem Expressionsüberstand ermöglichen. Versuche in der Arbeitsgruppe zu dieser Vorgehensweise zeigten jedoch, dass Messungen unter Verwendung von BMP-2 als Analyt keine verwertbaren Daten lieferten. Ursächlich hierfür war die starke direkte Interaktion von BMP-2 mit der Oberfläche des Biosensors. Durch verschiedene Pufferzusätze konnte die unerwünschte Bindung zwar verringert werden, allerdings war unter diesen Bedingungen eine hohe Dissoziation des Liganden von der Biosensoroberfläche zu beobachten, die weitere Messungen ausschloss.

In den weiteren Expressionskonstrukten, basierend auf den Expressionsvektoren pcDNA3.1 und pcDNA3.3, stand neben der Hexahistidin- auch eine C-terminal angefügte V5-Sequenz zur Verfügung. Für die Nutzung dieser wesentlich spezifischeren und höheraffinen Interaktion wurde ein α -V5-Antikörper kovalent mittels Amino-kopplung auf einem GLC-Sensorchip immobilisiert und anschließend die Twisted gastrulation-Varianten durch Überleiten der Expressionsüberstände direkt gebunden. Aufgrund der geringen Expressionsraten bei der Verwendung pcDNA3-

basierter Konstrukte erwies sich allerdings bereits die Immobilisierung als sehr ineffizient, so dass häufig mehrere Perfusionen mit Expressionsüberständen nötig waren, um eine für nachfolgende Messungen ausreichende Beladung zu erreichen. In Abbildung 33A ist die Beladung des Biosensors mit der Twisted gastrulation-Variante E94R unter Verwendung der V5-Sequenz beispielhaft dargestellt. Nach drei Beladungsphasen zu je 400 s mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ gelang es, lediglich 40-60 RU an der Sensoroberfläche zu binden. Die sich anschließenden Messungen zeigten zudem, dass aufgrund der nicht-kovalenten Immobilisierung durch den Antikörper eine fortwährende Dissoziation des immobilisierten Proteins von der Biosensoroberfläche stattfindet. So wurde schon, wie in Abbildung 33B am Beispiel der Twisted gastrulation-Variante W116A, vor dem Beginn der Interaktionsanalyse eine stetige Abnahme der Resonanzeinheiten detektiert. Zwar konnte eine Bindung und Dissoziation von BMP-2 entsprechend dem Messprotokoll beobachtet werden, jedoch lässt die überlagernde Dissoziation des Liganden von der Sensoroberfläche keine zuverlässige Auswertung der erhaltenen Sensorgramme zu. Ebenfalls in Abbildung 33B dargestellt, führt dies dazu, dass beispielsweise bei der Analyse niedriger Analytkonzentrationen nach Beendigung der Dissoziationsphase negative Messwerte erhalten werden. Auch ist die Reproduzierbarkeit der Messungen unter gleichen Bedingungen nicht gegeben, da die Beladungsdichte nicht konstant gewährt werden kann.

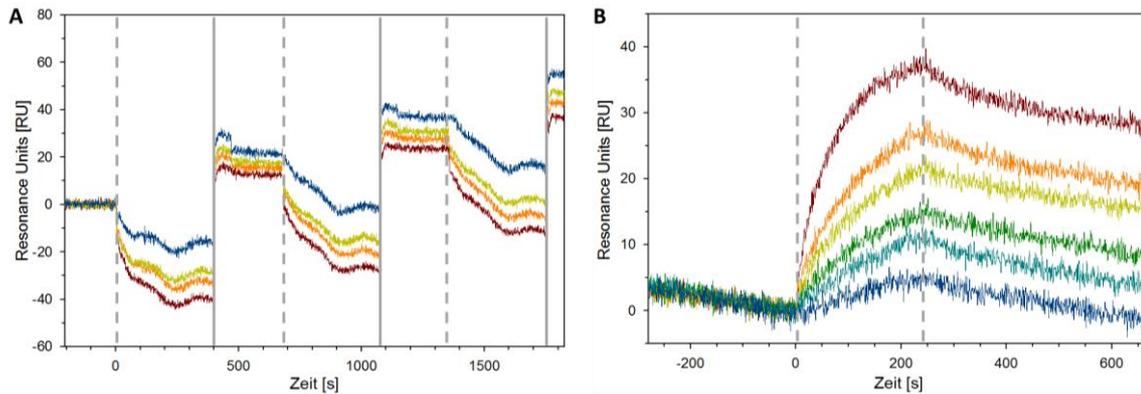


Abbildung 33: Sensorgramm zur Beladung der Biosensoroberfläche mit Twisted gastrulation E94R unter Verwendung der V5-Sequenz (A) und Verlauf der Interaktion von Twisted gastrulation W116A mit dem Analyt BMP-2 (B). **A)** Darstellung von drei aufeinanderfolgenden Beladungsphasen von Twisted gastrulation-Variante E94R; voneinander getrennt mit durchgehenden Linien. Jede Phase ist durch gestrichelte Linien unterteilt in einen Schritt während dem Messpuffer über die Biosensoroberfläche geleitet wird und einen Schritt, während dem die Überleitung des Expressionsüberstandes stattfindet. Nach der dritten Beladungsphase ist die tatsächliche Beladungsdichte dargestellt. **B)** Sensorgramm der Interaktion von BMP-2 (Analyt) und der Twisted gastrulation-Variante W116A (Ligand). Die Messung beginnt mit der Überleitung von Messpuffer; zum Zeitpunkt 0 s beginnt die Assoziationsphase mit Injektion des Analyt, ab 240 s beginnt die Dissoziationsphase durch Perfusion von Messpuffer. Die Unterteilung der Phasen erfolgt durch gestrichelte Linien.

Im weiteren Verlauf wurde daher die Verwendung einer Fusion mit einer sogenannten avi-Sequenz etabliert. Die Sequenz mit der Aminosäureabfolge GLNDIFEAQKIEWHE kann *in vitro* durch die Biotin-Protein-Ligase BirA gerichtet an der ϵ -Aminogruppe des Lysins biotinyliert werden (Beckett et al., 1999; Chapman-Smith & Cronan Jr, 1999). Hierfür wurden jeweils 4 ml eines Expressionsüberstandes von Freestyle™ 293 F-Zellen mit 500 ng der Biotin-Protein-Ligase BirA versetzt, sowie 3 μ M Biotin und jeweils 10 μ M MgCl₂ und ATP hinzugegeben. Die Inkubation des Biotinylierungsansatzes erfolgte in einem 15 ml-Reaktionsgefäß unter Schwenken bei 37°C für 3 Stunden. Zum Abstoppen der Biotinylierungsreaktion und dem Entfernen von überschüssigem Biotin, wurde der Reaktionsansatz zweimal gegen das 100fache Volumen Messpuffer dialysiert. Für den Nachweis einer erfolgreichen Biotinylierung wurde anschließend eine Western-Blot Analyse mit HRP-gekoppeltem Streptavidin durchgeführt (siehe 2.3.3). Wie in Abbildung 34 zu erkennen, ist die Biotinylierung der avi-Sequenz mit der Biotin-Protein-Ligase BirA direkt im Expressionsüberstand ohne vorherige Aufreinigung des Proteins durchführbar. Die Proben aus den *in vitro* Biotinylierungsansätzen zeigten im Western Blot deutliche Signale auf der erwarteten Höhe für Twisted gastrulation. Auf Höhe der 70 kDa Bande des Molekulargewichtsstandard wurde jedoch ein zusätzliches Signal detek-

tiert, allerdings fand sich dieses, wie auch die unscharfe Schwärzung des Röntgenfilms darüber, auch in den Proben von nicht-biotinylierten Überständen wieder. Hier bindet entweder das für den Nachweis verwendete Streptavidin unspezifisch an endogene Proteine oder es handelt sich um zellendogene biotinylierte Proteine, die ebenfalls in den Medienüberstand gelangt sind.

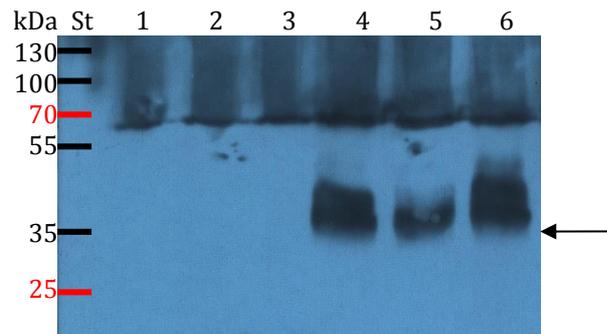


Abbildung 34: Western-Blot-Analyse von Überständen der Freestyle™ 293-Expression von Twisted gastrulation-Varianten im Vektor pHlsec mit proteineigenem Sekretionssignal nach Biotinylierungsreaktion. St) Standard, 1) WT, 2) R80E, 3) Y188A, 4) WT, 5) R80E, 6) R105E. Die Proben der Spuren 1-3 wurden von nicht biotinylierten Überständen entnommen; die Proben der Spuren 4-6 wurden aus Biotinylierungs-Ansätzen entnommen. Für die Detektion wurde an Biotin bindendes HRP-gekoppeltes Straptavidin verwendet, die Belichtungsdauer betrug 1 min. Der Pfeil markiert die Proteinbande der biotinylierten Twisted gastrulation-Varianten.

Die Immobilisierung der biotinylierten Proteinvarianten erfolgte schließlich an einem Biosensor auf dem zuvor Neutravidin kovalent gekoppelt wurde. Sowohl Streptavidin als auch Neutravidin binden nahezu irreversibel an Biotin (Chaiet & Wolf, 1964; Green, 1966). Die Biosensoroberfläche wurde nach Aktivierung mit einer EDC/sulfo-NHS-Lösung (100 mM/25 mM) bis zur Sättigung mit Neutravidin (0.1 mg/ml, verdünnt in 10 mM Na-Acetat Puffer pH 4.0) beladen und eventuell noch aktivierte Stellen mit Ethanolamin inaktiviert. Anschließend wurden die Proteinvarianten einzeln mit einer Flussrate von 30 μ l/min über den Sensor perfundiert, bis eine möglichst einheitliche Beladungsdichte von 250-300 RU erreicht wurde. Nach beendeter Beladung wurde die Biosensoroberfläche zur Entfernung unspezifisch gebundener Bestandteile aus dem Expressionsüberstand mit 4 M $MgCl_2$ gespült (Flussrate 100 μ l/min, 18 s).

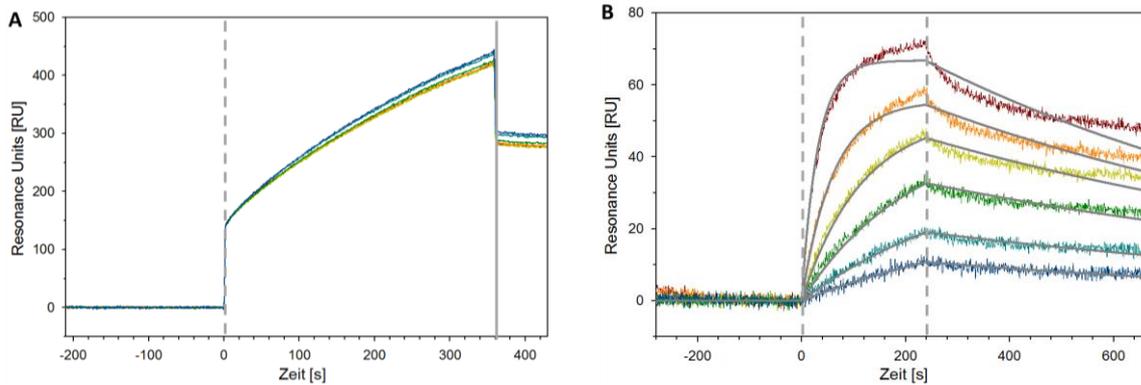


Abbildung 35: Sensorgramm zur Beladung der Biosensoroberfläche mit Twisted gastrulation W116A unter Verwendung der biotinylierten avi-Sequenz (A) und Verlauf der Interaktion von Twisted gastrulation WT mit dem Analyt BMP-2 (B). **A)** Darstellung der Beladungsphase von der Twisted gastrulation-Variante W116A. Den Beginn der Beladungsphase markiert die gestrichelte Linie, das Ende markiert die durchgehende Linie. Im Bereich ab 360 s ist die tatsächliche Beladungsdichte dargestellt. **B)** Sensorgramm der Interaktion von BMP-2 (Analyt) und wildtypischem Twisted gastrulation (Ligand). Die Messung beginnt mit der Überleitung von Messpuffer; zum Zeitpunkt 0 s beginnt die Assoziationsphase mit Injektion des Analyt, ab 240 s beginnt die Dissoziationsphase durch Perfusion von Messpuffer. Die Abtrennung der Phasen erfolgt durch gestrichelte Linien.

Diese Variante der Immobilisierung hat sich als sehr effizient erwiesen. So gelang die Beladung von bis zu 300 RU innerhalb eines Schrittes (Abbildung 35A) und es konnte auch bei den sich anschließenden Interaktionsmessungen keine Dissoziation des immobilisierten Liganden beobachtet werden (Abbildung 35B), so dass erstmals eine vollquantitative Auswertung der Messdaten möglich war.

3.4.3 Einige Twisted gastrulation-Varianten zeigen eine Veränderungen der *in vitro* Bindeeigenschaften gegenüber BMP-2

Für die Bestimmung der BMP-2 Bindungseigenschaften der Einzelaminosäurevarianten von Twisted gastrulation wurde BMP-2 als Analyt in sechs verschiedenen Konzentrationen über die, wie oben beschrieben, vorbereitete Biosensoroberfläche geleitet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einem Langmuir-1:1-Interaktionsmodell unter den in Tabelle 15 angegebenen Voreinstellungen. Die so erhaltenen Bindungsdaten für Assoziation und Dissoziation sowie die daraus berechnete Dissoziationskonstante K_D sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Betrachtet man nun zunächst die Dissoziationskonstanten K_D für die einzelnen Proteinvarianten, so hat es den Anschein, als ob die Aminosäureaustausche keinen Einfluss auf das Bindeverhalten von Twisted gastrulation gegenüber BMP-2 haben. Die Dissoziationskonstanten unterscheiden sich lediglich geringfügig voneinander und die Unter-

schiede sind nicht statistisch signifikant. Die maximalen Bindekapazitäten R_{\max} weisen allerdings trotz ähnlicher Beladungsdichte der Biosensoroberfläche deutliche Unterschiede auf und die Assoziationsphasen zeigen unterschiedliche Verläufe. Während die Varianten D68R, W67A, Y166A und D72R bereits nach einer kurzen Assoziationsdauer in die Sättigung übergehen, aber nicht annähernd die erwartete maximale Bindekapazität erreichen, zeigt die Variante W116A eine höhere Bindekapazität wie wildtypisches Protein. Diese Beobachtung zusammen mit dem Verhältnis aus Beladungsdichte und den berechneten maximalen Bindekapazitäten ergab eine qualitative Einteilung der Aminosäureaustausche nach ihrem Einfluss auf die Interaktion zu BMP-2 (Tabelle 19). Eine mögliche Verstärkung der Interaktion konnte dabei nur bei zwei Proteinvarianten (W116A, E105R) festgestellt werden, wobei diese im C-terminalen Bereich lagen. Einen negativen Einfluss hingegen zeigten neben den Varianten Y166A und Y188A, drei Aminosäureaustausche im N-terminalen Bereich (W67A, D68R, D72R) und damit in der von Oelgeschläger et al. (2000, 2003) postulierten Region für die BMP-4 Bindung (Oelgeschläger et al., 2000, 2003). Allerdings zeigten alle Varianten nur eine verminderte Bindung und es konnte keine Hauptdeterminante der Interaktion bestimmt werden, deren Austausch zu einem vollständigen Verlust der BMP-2 Bindung führt.

Tabelle 19: Übersicht der mit einem Langmuir-1:1-Interaktionsmodell ermittelten Parameter aus der Oberflächen-Plasmonresonanz-Analyse der Einzelaminosäurevarianten von Twisted gastrulation

Protein-variante	Beladungsdichte (RU)	Dissoziationskonstante K_D (nM)	maximale Bindekapazität R_{max} (RU)	Verhältnis Beladungsdichte/ R_{max}
Gruppe I				
R80E	215	7	26	0.12
E69R	235	15	22	0.09
W67A	270	10	14	0.05
D68R	252	16	13	0.05
W116A	270	9	43	0.16
Gruppe II				
Y82A	258	9	55	0.21
W116A	360	6	95	0.26
R105E	260	8	65	0.25
Y166A	267	4	36	0.13
WT	299	10	60	0.20
Gruppe III				
D72R	278	24	10	0.04
E94R	291	15	51	0.18
E95R	294	15	38	0.13
W190A	302	9	25	0.08
WT	428	23	69	0.16
Gruppe IV				
R47E	346	5	92	0.27
Y188A	267	5	74	0.28
R189E	234	4	57	0.24
Y206A	283	5	71	0.25
WT	269	6	66	0.25

Ergebnisse

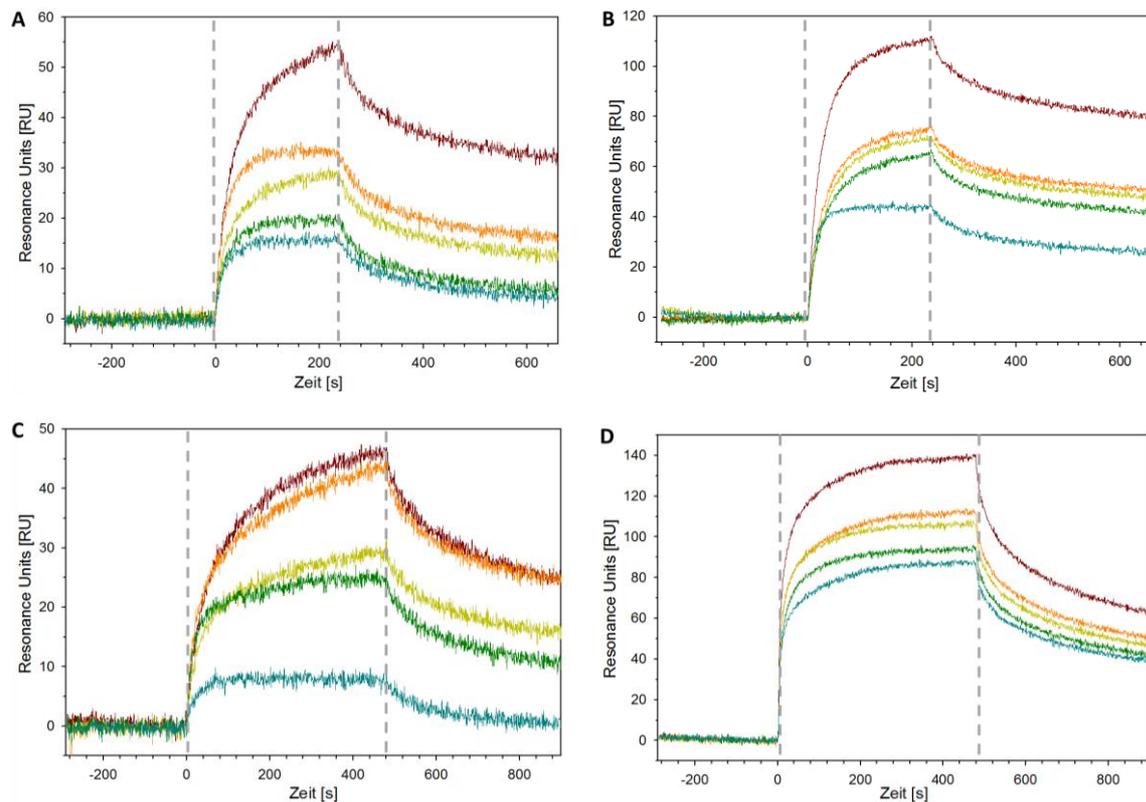


Abbildung 36: Vergleichende Darstellung der Sensorgramme der verschiedenen Einzel-aminosäurevarianten von Twisted gastrulation (Ligand) bei der Interaktion mit 300 nM BMP-2 (Analyt). A) Gruppe I: W116A, R80E, E69R, D68R, W67A B) Gruppe II: W116A, E105R, WT, Y82A, Y166A, C) Gruppe III: WT, E94R, E95R, W190A, D72R, D) Gruppe IV: R47E, Y188A, Y206A, WT, R189E. Die Assoziationsphasen beginnen zum Zeitpunkt 0 s (erste gestrichelte Linie) und haben eine Dauer von 240 s, danach (zweite gestrichelte Linie) beginnt die Dissoziationsphase für eine Dauer von 420 s. Die Flussrate beträgt 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

3.5 Präparation von binären und ternären Proteinkomplexen

Für die Aufklärung des stöchiometrischen Bindungsverhältnisses von Twisted gastrulation und BMP-2 sowie für die Vorbereitung auf eine Strukturanalyse mittels Röntgenbeugung wurde versucht, Ligand-Modulatorprotein-Komplexe zu isolieren. Für die Strukturaufklärung würde die Kristallisation von Twisted gastrulation zusammen mit einer Komponente, deren Struktur bereits bekannt ist, einen erheblichen Vorteil bieten, zumal bisher durchgeführte Kristallisationsversuche von alleinigem Twisted gastrulation erfolglos verlaufen sind.

Eine Herausforderung bei der Präparation von BMP-2:Twisted gastrulation-Komplexen stellt die schwierige Handhabung von BMP-2 dar, das aufgrund hydrophober Bereiche an der Proteinoberfläche allein unter physiologischen pH-Werten und salzhaltigen Pufferlösungen nur eine sehr geringe Löslichkeit aufweist (Ruppert et al., 1996; Scheufler et al., 1999). Durch die Komplexbildung mit Rezeptoren oder anderen Interaktionspartnern, die diese hydrophoben Bereiche abschirmen, kann aber die Löslichkeit drastisch erhöht werden.

Durch die Verdünnung von BMP-2 in Wasser und die anschließende Zugabe von Twisted gastrulation aus Insektenzellen in 2.5fachem molaren Verhältnis in doppeltkonzentriertem Puffer bei gleichzeitigem schnellem Mischen wurde zunächst versucht, binäre Komplexe herzustellen. Dabei wurde das Volumen in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge so gewählt, dass die Konzentration von BMP-2 im Proteingemisch zunächst 1 μM nicht überschreitet. Anschließend wurde das Proteingemisch per Ultrafiltration eingeeengt. Bereits hierbei und bei der abschließenden Zentrifugation während der Probenvorbereitung konnte eine deutliche Präzipitatbildung beobachtet werden. Die darauffolgende Analyse von Twisted gastrulation aus Insektenzellen als Referenz und dem Proteingemisch mittels Größenausschlusschromatographie zeigte, dass sich die Elutionsprofile von Twisted gastrulation und dem erwarteten binären Proteinkomplex nicht unterscheiden (Abbildung 37A). Bei einer Komplexbildung wäre aber die Verschiebung des Elutionsmaximums zu einer geringeren Retentionszeit zu erwarten gewesen. Die Analyse mittels SDS-PAGE bestätigte, dass keine Komplexbildung von Twisted gastrulation und BMP-2 stattgefunden hat, sondern die beiden Einzelkomponenten lediglich zeit-

gleich von der Gelfiltrationssäule eluierten (Abbildung 37B). Die verhältnismäßig geringe Menge BMP-2 lässt zudem vermuten, dass schon während der Probenvorbereitung ein Großteil des Proteins präzipitiert ist.

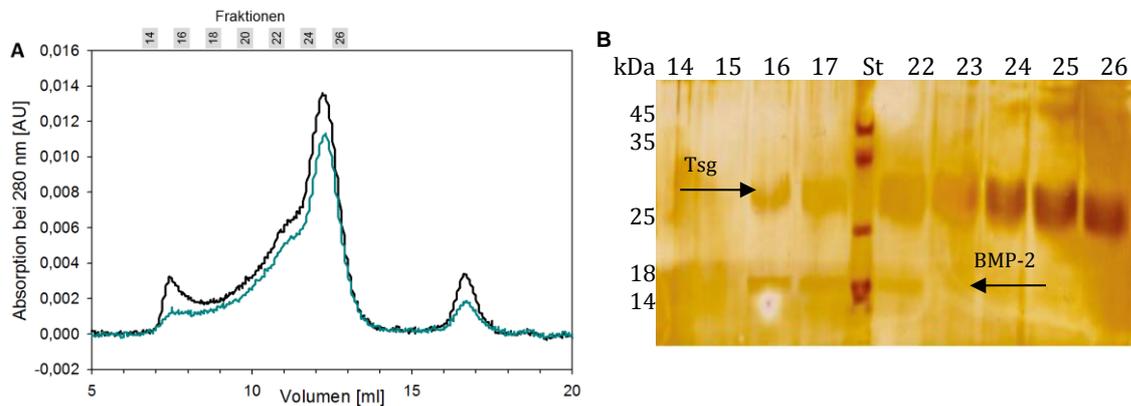


Abbildung 37: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie von Twisted gastrulation aus Insektenzellen separat und zusammen mit BMP-2 und SDS-PAGE Analyse des Proteingemisches. A) schwarz Twisted gastrulation aus Insektenzellen ($240 \mu\text{g} \pm 10 \text{ nmol}$), cyan Proteingemisch mit Twisted gastrulation aus Insektenzellen ($240 \mu\text{g} \pm 10 \text{ nmol}$) und BMP-2 ($120 \mu\text{g} \pm 4 \text{ nmol}$). Dargestellt ist der Bereich von 5-20 ml der Größenausschlusschromatographie-Läufe mit einer Superdex 75 HR 30/10 Säule (GE). **B)** St) Standard, 14 – 26) Proben ausgewählter Fraktionen. Die Analyse erfolgte unter reduzierenden Bedingungen und wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von L. Kalkenings durchgeführt.

Aus den Rezeptor-Bindungsstudien (siehe 3.3) geht hervor, dass das Bindeepitop für Twisted gastrulation im sogenannten *wrist*-Epitop von BMP-2 lokalisiert ist. Das heißt, dass die Bindung eines Typ II-Rezeptors, der im sogenannten *knuckle*-Epitop bindet, die Interaktion des Modulatorproteins nicht negativ beeinflussen sollte und so zur Verbesserung der Löslichkeit beitragen kann (Abbildung 38). Da die Typ II-Rezeptoren BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB allerdings bei einer 1:1-Interaktion nur eine geringe mikromolare Affinität zu BMP-2 aufweisen (Heinecke et al., 2009), wurde die BMP-2 Variante L100K/N102D hergestellt. Diese zeigt eine etwa 60fach erhöhte Affinität gegenüber dem Rezeptor ActR-IIB (Weber et al., 2007) und kann so für die Herstellung stabiler BMP-2/Typ II-Rezeptorkomplexe herangezogen werden.

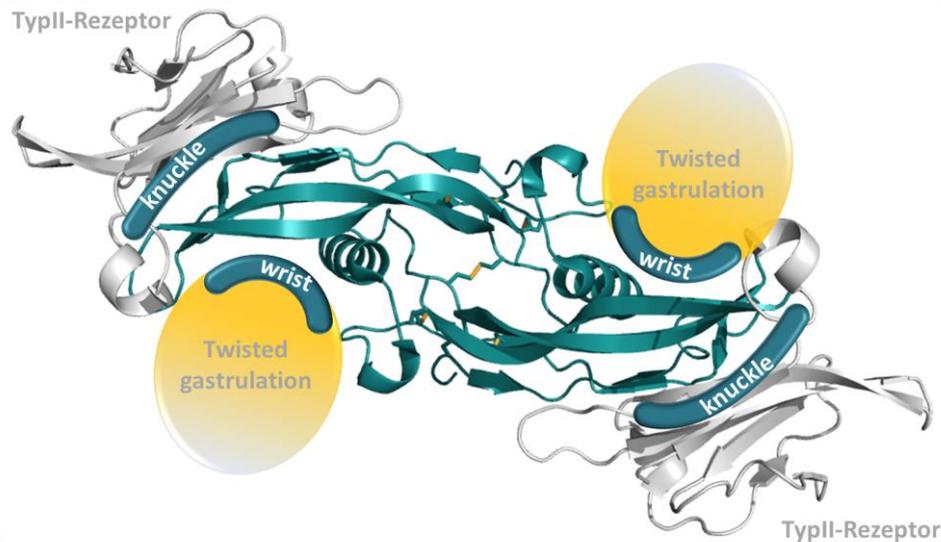


Abbildung 38: Darstellung der möglichen Binderegion von Twisted gastrulation anhand der dreidimensionalen Struktur von BMP-2 im Komplex mit der extrazellulären Domäne des Typ II-Rezeptors ActR-II (RCSB: 2G00; Allendorph et al., 2006). Das BMP-2 Homodimer ist in blau, die Ektodomänen des Typ II-Rezeptors ActR-II sind in grau und Twisted gastrulation ist schematisch in gelb dargestellt.

3.5.1 Expression und Aufreinigung der extrazellulären Domäne des Activin Typ IIB-Rezeptors

Die Aufreinigung der Ektodomäne des murinen Activin Typ-IIB Rezeptors (ActR-IIB_{ecd}) erfolgt weitgehend nach der publizierten Anleitung von Dionys Weber (Weber et al. 2007).

Für die Expression wurde ein bereits vorhandenes Vektorkonstrukt verwendet, in dem die DNA-Sequenz des Rezeptors so in ein modifiziertes pET32a Plasmid kloniert wurde, dass dieser N-terminal über eine Thrombin-Schnittstelle mit Thioredoxin und einer Hexahistidin-Sequenz fusioniert ist. Die Fusion mit Thioredoxin ermöglicht die lösliche Expression des Disulfidbrücken-enthaltenden Rezeptors und dient gleichzeitig als Faltungshelfer (Kumagai et al., 1990; Lavallie et al., 1993). Für die Expression wurde der *E.coli* Stamm OrigamiB (DE3) verwendet. Dieser Stamm weist veränderte Redoxbedingungen im Zytoplasma auf, da sowohl das Gen für die Thioredoxin-Reduktase (*trx*) als auch das Gen für die Glutathione-Reduktase (*gor*) Mutationen tragen. Dadurch ist das Zytoplasma weniger stark reduzierend und Disulfidbrücken können ausgebildet werden (Prinz et al., 1997; Bessette et al., 1999).

3.5.1.1 Expression und Zellaufschluss

Die Expression des löslichen Fusionsproteins erfolgte im 5-Liter-Maßstab in *E.coli* OrigamiB (DE3) Zellen. Hierfür wurden pro 2-Liter-Kulturkolben 800 ml Expressionskultur bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0.4 bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Kolben in einen auf 18°C temperierten Schüttler gestellt und nach 30 min die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 16-stündiger Expression wurden die Zellen pelletiert und 1-1.5 g Zellen pro Liter Expressionskultur geerntet.

In Abbildung 39 ist eine deutliche Induktionsbande auf der zu erwartenden Laufhöhe bei etwa 30 kDa zu erkennen. Die aus einem 5-Liter-Expressionsansatz gewonnenen Zellen wurden in 150 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (siehe 2.5.6). Nach Abtrennung der im Rohextrakt enthaltenen Zelltrümmer durch Zentrifugation, befand sich ein Teil des Fusionsproteins im Überstand. Allerdings konnte auch noch Protein im Zentrifugationspellet nachgewiesen werden (Abbildung 39, Spur 5). Um auszuschließen, dass zuvor nicht alle Zellen aufgeschlossen wurden, wurde das Pellet resuspendiert, mittels Ultraschallbehandlung lysiert und das Lysat erneut zentrifugiert. Die Überstände beider Zentrifugationsschritte wurden vereinigt.

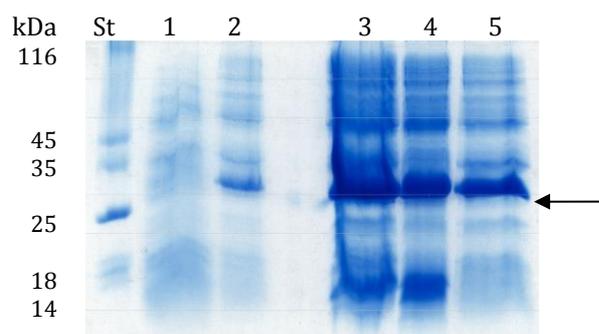


Abbildung 39: SDS-PAGE zum Verlauf der Expression des Thioredoxin-ActR-IIB_{ecd}-Fusionsproteins und dem anschließenden Zellaufschluss. St) Größenstandard, **1)** Expressionskultur vor der Induktion mit IPTG, **2)** Expressionskultur 16 h nach der Induktion mit IPTG, **3)** Probe nach Zellaufschluss, **4)** Überstand nach Zellaufschluss und Zentrifugation, **5)** Pellet nach Zentrifugation. Der Pfeil markiert die Proteinbande des Thioredoxin-ActR-IIB_{ecd}-Fusionsproteins, die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.5.1.2 Aufreinigung des Thioredoxin-ActR-IIB-Fusionsproteins mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie

Das im Überstand befindliche Fusionsprotein wurde sofort in einem ersten Aufreinigungsschritt mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie von weiteren im Überstand befindlichen Proteinen und Verunreinigungen unter Verwendung einer 5 ml HisTrap FF-Säule (GE) bei 4°C isoliert und aufkonzentriert (siehe 2.7.1.3). Die Proteinlösung wurde hierfür über die Säule geleitet und das am Säulenmaterial gebundene Protein mit dem zehnfachen Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit Elutionspuffer in Fraktionen zu 5 ml eluiert.

Abbildung 40 zeigt, dass das Fusionsprotein über die Hexahistidin-Sequenz an das Säulenmaterial gebunden und angereichert werden konnte. Ebenso konnte ein Teil der Verunreinigungen entfernt werden.

Nach der Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden protein-enthaltende Fraktionen vereinigt, 1:1 mit Dialysepuffer I verdünnt und gegen jeweils das 50fache Volumen Dialysepuffer I + II dialysiert. Die nach der Dialyse erhaltene Proteinmenge betrug 10 mg Fusionsprotein pro Gramm Bakterienzellen.

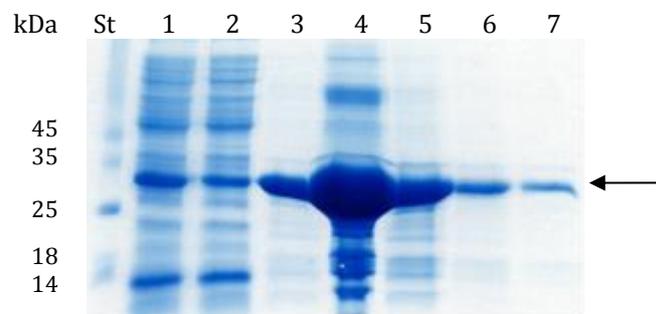


Abbildung 40: SDS-PAGE Analyse zum Verlauf der Metallchelate-Affinitätschromatographie mit dem Thioredoxin-ActR-IIB_{ecd}-Fusionsprotein. St) Größenstandard, 1) Proteinlösung vor der Affinitätschromatographie, 2) Proteinlösung nach der Affinitätschromatographie, 3 - 7) Elutionsfraktionen. Der Pfeil markiert die Proteinbande des Fusionsproteins, die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.5.1.3 Proteolytische Abspaltung des Thioredoxin-Fusionsanteils

Für die proteolytische Abspaltung der Thioredoxin- und Hexahistidin-Sequenz wurde die Proteinkonzentration auf 2.5 mg/ml eingestellt und 0.15 U Thrombin pro Milligramm Fusionsprotein hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 3-4 Stunden bei 30°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Überprüfung der Proteolyse mittels SDS-PAGE zeigte (Abbildung 41), dass das gesamte Fusionsprotein nahezu zu 100% gespalten wurde. Anschließend wurde zweimal gegen das zehnfache Volumen Nidrigsalzpuffer der folgenden Anionenaustausch-Chromatographie dialysiert und das Thioredoxin-Rezeptor-Gemisch 6 bis 8 Tage bei 4°C inkubiert. Dieser Inkubationsschritt wirkte hierbei als Rückfaltungsschritt und führte zur Erhöhung der Ausbeute an aktivem Rezeptor.

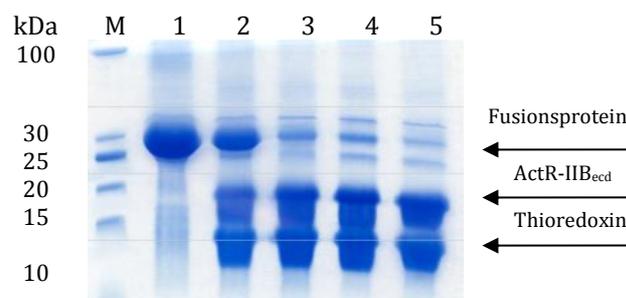


Abbildung 41: SDS-PAGE Analyse zum Verlauf der proteolytischen Spaltung des Thioredoxin-ActR-IIB_{ecd}-Fusionsproteins durch Thrombin. 1) vor Spaltung, 2) nach 1 h 3) nach 3.5 h, 4) nach 5 h, 5) über Nacht. Die Laufhöhen der verschiedenen Proteine sind durch Pfeile markiert, die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.5.1.4 Auftrennung des Thioredoxin-Rezeptor-Gemischs mittels Anionenaustausch-Chromatographie

Abweichend vom publizierten Protokoll wurde zur Abtrennung von Thioredoxin und Rezeptor das Proteingemisch auf eine Q-Sepharose-Säule (HP, 5ml, GE) aufgetragen (siehe 2.7.4). Während der Elution unter Verwendung eines Salzgradienten konnten drei Absorptionsmaxima erhalten werden (Abbildung 42). Nach Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigte sich, dass das Thioredoxin-Fusionsprotein vollständig abgetrennt werden konnte. Ebenfalls erfolgte die Auftrennung des Rezeptors in zwei nahezu völlig separat eluierenden Proteinspezies (Abbildung 43).

Die Fraktionen der ersten und zweiten Rezeptor-Spezies wurden jeweils separat vereinigt, dialysiert (dreimal, 100faches Volumen) und photometrisch die Konzentration bestimmt. Das Protein wurde anschließend bei -80°C tief gefroren und gefriergetrocknet.

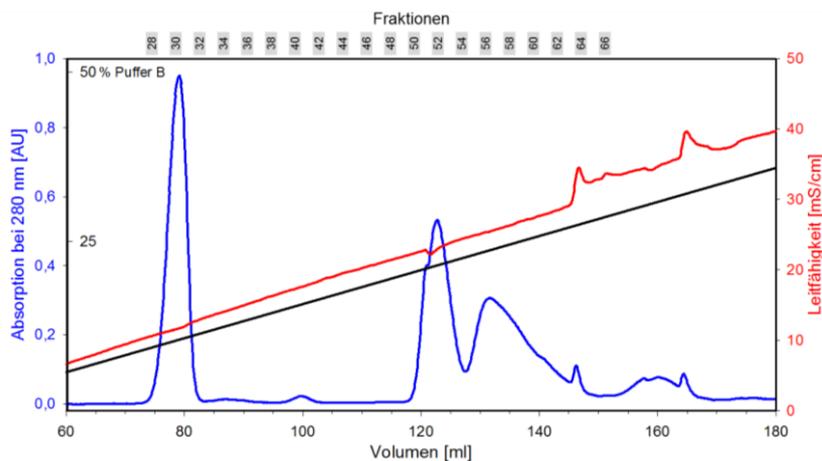


Abbildung 42: Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie zur Isolierung der extrazellulären Domäne des ActR-IIB. Dargestellt ist der Bereich des Elutionsprofils von 60 – 180 ml.

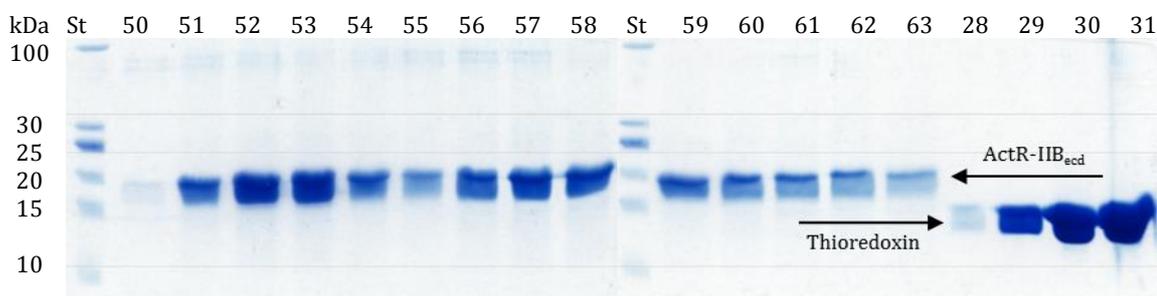


Abbildung 43: SDS-PAGE Analyse der Auftrennung des Proteingemisches aus Thioredoxin und ActR-IIB_{ecd} mittels Anionenaustausch-Chromatographie. St Standard, 28 – 31 Proben der Fraktionen des ersten Absorptionsmaximums, 50 – 63 Proben der Fraktionen des zweiten und dritten Absorptionsmaximums. Die Laufhöhen der verschiedenen Proteine sind durch Pfeile markiert, die Proben wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.5.2 Aufreinigung von BMP-2 und dessen Varianten

3.5.2.1 Klonierung, Expression und Präparation der Einschlusskörper

Für die Expression von wildtypischem BMP-2 wurde die cDNA-Sequenz für das reife Protein über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* in den Vektor pET28b eingebracht, so dass das Protein ohne zusätzliche Aminosäuresequenzen exprimiert wird. Die BMP-2 Variante L100K/N102D wurde hingegen über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* in ein Derivat des pET28b-Vektors kloniert, so dass N-terminal direkt über eine Thrombin-Schnittstelle eine Hexahistidin-Sequenz fusioniert ist. Für die Expression erfolgte eine Transformation der Expressionsvektoren in BL21(DE3)* *E.coli* Zellen.

Die Expression von BMP-2 und dessen Varianten erfolgte in Form von Einschlusskörpern (siehe 2.5.1). Nach Inkubation der Expressionskultur bei 37°C bis zu einer optische Dicht OD₆₀₀ von 0.6 erfolgte die Induktion der Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Nach 4-stündiger Expression bei 37°C wurden die Zellen pelletiert. Der Vergleich von Vor- und Nachinduktionsprobe zeigte eine Proteinbande auf der zu erwarteten Laufhöhe (Abbildung 44). Das etwas erhöhte apparente Molekulargewicht der BMP-2 Variante L100K/N102D ist auf die Anwesenheit der Hexahistidin-Sequenz zurückzuführen.

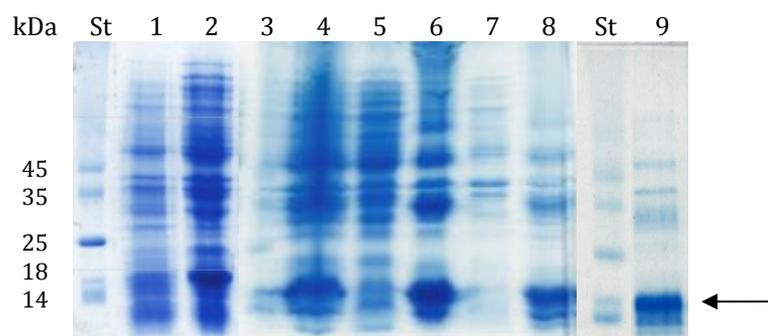


Abbildung 44: SDS-PAGE Analyse zum Verlauf der Präparation der Einschlusskörper der BMP-2 Variante L100K/N102D. St Größenstandard, **1)** Probe der Expressionskultur vor der Induktion mit IPTG, **2)** Probe der Expressionskultur 4 h nach der Induktion mit IPTG, **3)** Überstand nach erstem Aufschluss und Zentrifugation, **4)** Pellet nach erstem Aufschluss und Zentrifugation, **5)** Überstand nach zweitem Aufschluss und Zentrifugation, **6)** Pellet nach zweitem Aufschluss und Zentrifugation, **7)** Überstand nach finalem Waschen mit TBS-Puffer und Zentrifugation, **8)** Pellet nach Waschen mit TBS-Puffer und Zentrifugation, **9)** Überstand nach Lösen der Einschlusskörper und Zentrifugation. Der Pfeil markiert die Proteinbande der BMP-2 Variante L100K/N102D, die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

Aus einer Expression im 5-Liter-Maßstab wurden 4 g Zellen pro Liter Medium geerntet. Für den Zellaufschluss wurden bis zu 10 g Zellen in 200 ml TBSE-Puffer resuspendiert und daraus mittels Ultraschallyse 0.2-0.3 g Einschlusskörper pro Gramm *E.coli* Zellen präpariert. Der Verlauf der Isolierung ist in Abbildung 44 dargestellt. In den jeweiligen Überständen der Zentrifugationsschritte konnten lösliche Verunreinigungen effektiv abgetrennt werden, wobei sich BMP-2 immer in der Pelletfraktion befand. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt waren kaum noch andere Proteinverunreinigungen in der Pelletfraktion enthalten und nach Extraktion mit 2 M GuCl über Nacht und anschließender Zentrifugation, konnte das BMP-2 gelöst im Überstand erhalten werden. Anhand eines UV-Absorptionsspektrums zeigte sich, dass die in den bisher durchgeführten Extraktionen mit 6 M GuCl enthaltenen DNA-Verunreinigungen bei der hier gewählten fraktionierenden Extraktion nicht auftreten. Die für die Abtrennung von Verunreinigungen fusionierte Hexahistidin-Sequenz wurde daher nicht benötigt und die Proteinlösung konnte direkt für die nachfolgende Renaturierung eingeengt werden.

3.5.2.2 Renaturierung von BMP-2 und dessen Varianten

Für die Rückfaltung von BMP-2 und dessen Varianten wurde das Ansatzvolumen so gewählt, dass die Proteinkonzentration darin 100 bis 150 µg/ml beträgt, um so die Bildung von BMP-2-Dimer zu begünstigen. Die zuvor mittels Ultrafiltration bis zu einer Proteinkonzentration von 10 bis 15 mg/ml eingeengte Proteinlösung wurde unter zügigem Rühren langsam in den vorgekühlten und entgasten Rückfaltungspuffer getropft. Die Renaturierung erfolgte durch mehrtägige Inkubation des Ansatzes bei 10°C. Der Verlauf der Renaturierung wurde mittels SDS-PAGE erfasst (Abbildung 44). Nachdem keine weitere Zunahme an dimerer Proteinspezies verzeichnet werden konnte, wurde die Renaturierung durch Absenken des pH-Wertes auf 5.5 mit 2 M Salzsäure gestoppt. Der Ansatz wurde mittels Ultrafiltration auf 1/10 des Volumens einkonzentriert und die konzentrierte Proteinlösung gegen den Puffer der folgenden Heparin-Affinitätschromatographie dialysiert.

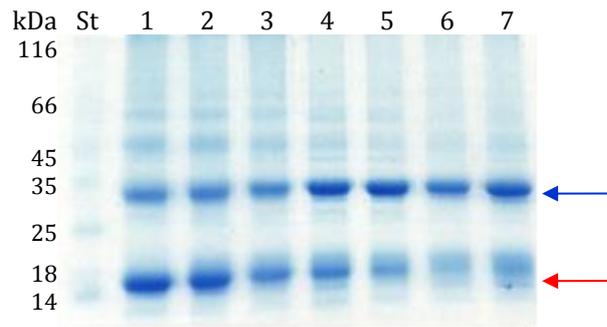


Abbildung 45: SDS-PAGE Analyse zum Verlauf der Renaturierung der BMP-2 Variante L100K/N102D. 1) Tag 0, 2) Tag 1, 3) Tag 2, 4) Tag 5, 5) Tag 7, 6) Tag 9, 7) Tag 12. Die aus 1 ml Renaturierungsansatz mittels TCA/Ethanol-Fällung angereicherten Proben wurden unter oxidierenden Bedingungen aufgetragen, um das Verhältnis von monomerer (roter Pfeil) und dimerer Proteinspezies (blauer Pfeil) beurteilen zu können.

3.5.2.3 Isolierung der dimeren Proteinspezies mittels Heparin-Affinitätschromatographie

Für die Isolierung dimerer Proteinspezies nach der Renaturierung wurde Heparinbindung von nativ gefaltetem BMP-2 ausgenutzt (Ruppert et al., 1996). Der hauptsächlich aus basischen Aminosäuren bestehende Bereich im N-Terminus des Proteins bindet dabei an die Sulfonsäuregruppen von Heparansulfat, einem Glykosaminoglykan aus der Gruppe der Heparine. Diese sind wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix und in der Zellmembran tierischer Zellen zu finden (Iozzo, 1998).

In Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad des Proteins steht eine unterschiedliche Anzahl von Heparinbindestellen zur Verfügung, wodurch die Affinität variiert und eine Trennung der verschiedenen Proteinspezies durch einen Salzgradienten erfolgen kann.

Die Proteinlösung wurde hierfür gegen einen Puffer dialysiert, in dem bereits ein Salzgehalt von 300 mM vorlag. Im Fall des wildtypischen Proteins ohne Hexahistidin-Sequenz bindet das noch vorhandene monomere BMP-2 aufgrund dessen nicht an das Säulenmaterial und wird direkt während dem Auftragen von der Säule eluiert. Die Hexahistidin-Sequenz der BMP-2 Variante L100K/N102D scheint allerdings die Bindung an Heparin zu verstärken, so dass hier auch die monomere Proteinspezies zunächst an das Säulenmaterial gebunden hat.

Das Elutionsprofil zeigte daher keine vollständige Trennung der verschiedenen Proteinspezies, die Absorptionsmaxima der verschiedenen BMP-2 Spezies gehen hier ineinander über (Abbildung 46). Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte (Abbildung 47), dass das BMP-2-Monomer allerdings bei sehr niedrigen Salzkonzentrationen eluierte. Im Anschluss wurde dimeres Protein zusammen mit höheroligomeren Spezies von dem Säulenmaterial eluiert, während ausschließlich dimeres Protein am Ende des Salzgradienten von der Säule gewaschen wurde.

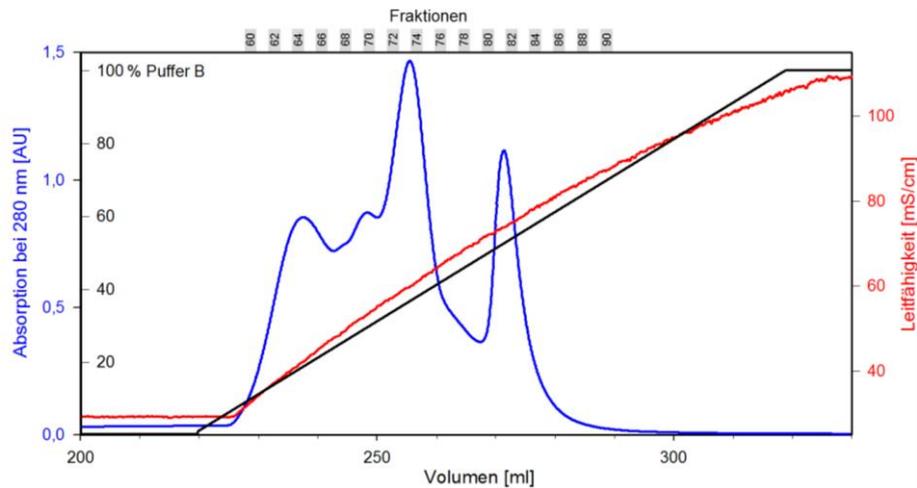


Abbildung 46: Elutionsprofil der Heparin-Affinitätschromatographie der BMP-2 Variante L100K/N102D. Dargestellt ist der Bereich des Elutionsprofils von 200 – 330 ml.

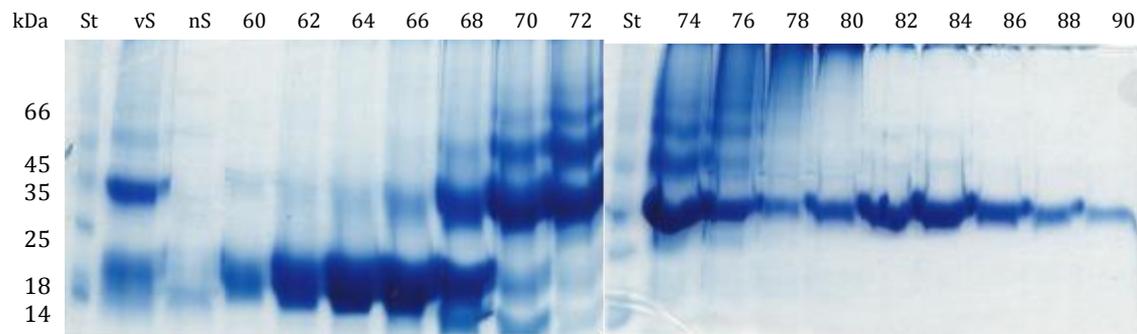


Abbildung 47: SDS-PAGE Analyse der Heparin-Affinitätschromatographie der BMP-2 Variante L100K/N102D. St Standard, vS Proteinlösung vor Auftrennung, nS Durchlauf, 60 – 90 Proben ausgewählter Fraktionen. Die Proben wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

Fraktionen, die nur dimeres Protein enthielten wurden vereinigt, dialysiert und gefriergetrocknet. Es wurden 4 mg Protein pro Gramm *E.coli* Zellen erhalten.

Die Fraktionen, die sowohl dimeres Protein als auch höher oligomere Proteinspezies enthielten, wurden ebenso vereinigt und dialysiert, die Proteinspezies jedoch im Anschluss mittels Umkehrphasen-HPLC separiert.

3.5.2.4 Isolation der dimeren Proteinspezies mittels Umkehrphasen-HPLC

Für die Abtrennung höheroligomerer Proteinspezies hat sich die Umkehrphasen-HPLC als geeignet erwiesen. Die Proteinlösung wurde vor dem Auftragen auf die Säule mit 0.1% Trifluoressigsäure angesäuert und das an das Säulenmaterial gebundene Protein mit 0.1% Trifluoressigsäure gewaschen. Die Elutions erfolgte über einen Acetonitril-Gradienten. Wie in Abbildung 48 zu erkennen, erfolgt eine Abtrennung des dimeren Proteins (Fraktion 34 – 36) von höheroligomeren Spezies bei 39% Acetonitril. Zusätzlich wurden so 2.5 mg dimeres Protein pro Gramm *E.coli* Zellen erhalten.

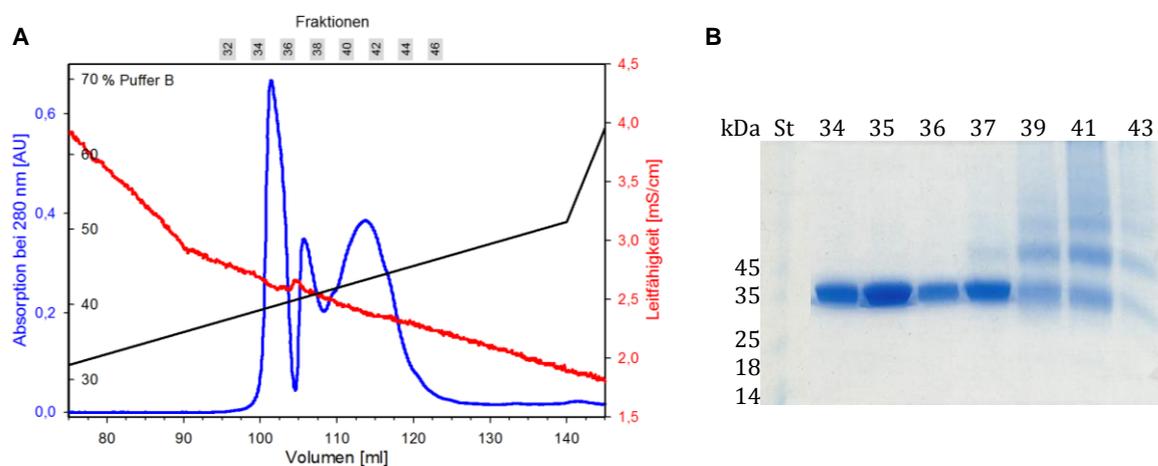


Abbildung 48: Elutionsprofil (A) und SDS-PAGE Analyse (B) zum Verlauf der Umkehrphasen-HPLC der BMP-2 Variante L100K/N102D. A) Darstellung des Elutionsprofils von 75 – 145 ml, B) St Standard, 34 – 43 Proben ausgewählter Fraktionen. Die Proben wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.5.3 Bestimmung der Bindeeigenschaften der BMP-2 Variante L100K/N102D und der extrazellulären Domäne des ActR-IIB

Die Untersuchung der Bindeeigenschaften der präparierten BMP-2 Variante L100K/N102D sowie der extrazellulären Domäne des ActR-IIB erfolgte mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie. Hierzu wurden etwa 1300 RU der BMP-2 Variante L100K/N102D nach der Heparin-Affinitätschromatographie sowie nach der Aufreinigung des Proteins mittels Umkehrphasen-HPLC auf der Biosensoroberfläche mittels Aminokopplung immobilisiert. Im Anschluss daran wurde der die extrazelluläre Domäne des Rezeptors ActR-IIB in sechs verschiedenen Konzentrationen darüber geleitet (300 nM, 150 nM, 75 nM, 25 nM, 18.8 nM und 9.4 nM) (Abbildung 49).

Die Auswertung der erhaltenen Sensorgramme erfolgte nach dem Langmuir-1:1-Interaktionsmodell und ergab mit der Literatur vergleichbare kinetische Parameter (Tabelle 20) (Weber et al., 2007). Ebenso wurde eine Konzentrationsreihe von Twisted gastrulation aus Insektenzellen über die Biosensoroberfläche geleitet. Auch hier konnte eine Interaktion nachgewiesen werden, wobei die erhaltenen kinetischen Parameter (Tabelle 20) mit den bisher bestimmten Werten übereinstimmen (Tabelle 16).

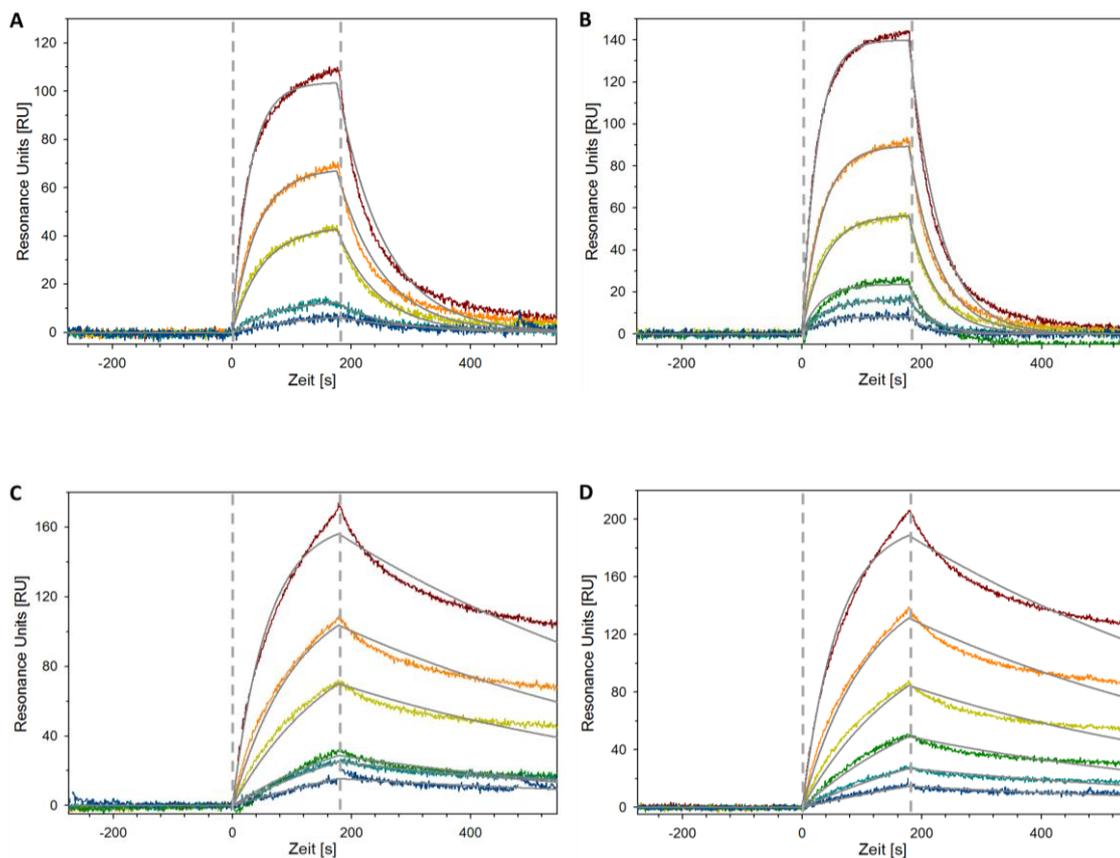


Abbildung 49: Sensorgramme der Aktivitätsbestimmung der BMP-2 Variante L100K/N102D (Ligand). A/B Interaktion der extrazellulären Domäne des Rezeptors ActR-IIB (Analyt) mit der BMP-2 Variante L100K/N102D nach Aufreinigung mittels Heparin-Affinitätschromatographie (A) beziehungsweise Umkehrphasen-HPLC (B). C/D Interaktion von Twisted gastrulation (Analyt) mit der BMP-2 Variante L100K/N102D nach Aufreinigung mittels Heparin-Affinitätschromatographie (C) beziehungsweise Umkehrphasen-HPLC (D). Die Analyten wurden in den Konzentrationen **300 nM**, **150 nM**, **75 nM**, **25 nM**, **18.8 nM** und **9.4 nM** eingesetzt. Die Assoziationsphasen beginnen zum Zeitpunkt 0 s (erste gestrichelte Linie) und haben eine Dauer von 180 s, danach (zweite gestrichelte Linie) beginnt die Dissoziationsphase für eine Dauer von 360 s. Die Flussrate betrug 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Tabelle 20: Übersicht der mit dem Langmuir-1:1-Interaktionsmodell ermittelten Gleichgewichtskonstanten für die Wechselwirkung von ActR-IIB_{ecd} und Twisted gastrulation mit der BMP-2 Variante L100K/N102D.

	BMP-2 Variante L100K/N102D nach Umkehrphasen-HPLC			BMP-2 Variante L100K/N102D nach Heparin-Affinitätschromatographie		
	k_a ($10^3/\text{Ms}$)	k_d ($10^{-4}/\text{s}$)	K_D (nM)	k_a ($10^3/\text{Ms}$)	k_d ($10^{-4}/\text{s}$)	K_D (nM)
ActR-IIB_{ecd}	71 ± 1.3	120 ± 0.3	165±36	66 ± 1.1	240 ± 7	370±65
Twisted gastrulation	52 ± 0.5	16 ± 0.1	30±4	51 ± 0.5	16 ± 0.5	31±3

3.5.4 Präparation der Proteinkomplexe

Zunächst wurde das Elutionsvolumen der Einzelkomponenten und deren Interaktion miteinander im analytischen Maßstab untersucht. Hierfür wurden zuerst jeweils 20 nmol von Twisted gastrulation sowie der extrazellulären Domäne des Rezeptors ActR-IIB separat in 1 ml Laufpuffer verdünnt und nacheinander chromatographisch analysiert. Im Anschluss erfolgte die chromatographische Analyse beider Komponenten, nachdem sie vorab zusammen inkubiert wurden. Dass die beiden Komponenten nicht direkt miteinander interagieren, geht aus der vergleichenden Darstellung der Elutionsprofile in Abbildung 50A hervor, denn auch nach der Vorinkubation von Twisted gastrulation zusammen mit der Ektodomäne des Rezeptors ActR-IIB, wurden jeweils die identischen Elutionsmaxima der Einzelkomponenten erhalten.

Für die Komplexpräparation der BMP-2 Variante L100K/N102D mit der extrazellulären Domäne des Rezeptors ActR-IIB wurden 10 nmol der BMP-2 Variante in 7.5 ml Wasser und 20 nmol des Rezeptors in 7.5 ml zweifach konzentriertem Laufpuffer vorgelegt. Anschließend wurden beide Verdünnungen unter Rühren zusammen gegeben und mittels Zentrifugal-Filtration auf ein Volumen von 1 ml eingengt.

Die Analyse der Komplexpräparation der BMP-2 Variante L100K/N102D und der extrazellulären Domäne des Rezeptors ActR-IIB mittels Größenausschlusschromatographie zeigte eine deutliche Verschiebung des Elutionsmaximums zu einer geringeren Retentionszeit (Abbildung 50 B), was eine Komplexbildung belegt. Dabei ist auch zu erkennen, dass keine weiteren Elutionsmaxima auftreten. Dies lässt darauf schließen, dass das molare Verhältnis, in dem die Komponenten ge-

mischt wurden, dem Bindungsverhältnis von zwei Rezeptormolekülen an ein BMP-2 Dimer entspricht und bestätigt die Annahme, dass durch die hochaffine Bindung eines Typ II-Rezeptors an die BMP-2 Variante L100K/N102D deren Löslichkeit verbessert werden kann. Würde sich die Zugabe der extrazellulären Domäne des ActR-IIB nicht entsprechend positiv auf die Löslichkeit von BMP-2 auswirken, wäre dieses während der Komplexpräparation präzipitiert und die extrazelluläre Rezeptor-Domäne wie zuvor bei der Einzelanalyse eluiert.

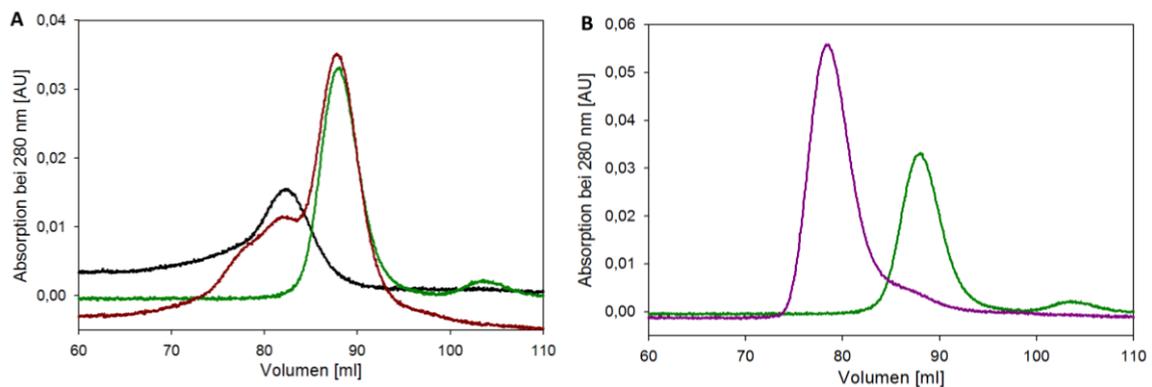


Abbildung 50: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie der Einzelkomponenten separat und in Kombination. **A)** schwarz Twisted gastrulation aus Insektenzellen ($470 \mu\text{g} \pm 20 \text{ nmol}$), grün ActR-IIB_{ecd} ($256 \mu\text{g} \pm 20 \text{ nmol}$), rot Proteingemisch mit Twisted gastrulation aus Insektenzellen und ActR-IIB_{ecd} (jeweils 20 nmol) **B)** grün ActR-IIB_{ecd} ($256 \mu\text{g} \pm 20 \text{ nmol}$), violett Komplexpräparation von ActR-IIB_{ecd} ($256 \mu\text{g} \pm 20 \text{ nmol}$) mit der BMP-2 Variante L100K/N102D ($300 \mu\text{g} \pm 10 \text{ nmol}$). Dargestellt ist jeweils der Bereich von 60 – 110 ml der Größenausschlusschromatographie-Läufe mit einer Superdex 200 16/60 pg Säule (GE).

Für die analytische Präparation eines ternären Komplexes mit Twisted gastrulation aus Insektenzellen wurden aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen die molaren Verhältnisse beibehalten. Die Proteinmengen wurden so gewählt, dass pro BMP-2 Dimer der Variante L100K/N102D zwei Moleküle ActR-IIB_{ecd} gebunden werden. Da Twisted gastrulation auch, wie von Oelgeschläger et al. (2000) beschrieben, in einem stöchiometrische Bindungsverhältnis von 2:1 an BMP-2 bindet, wurde ebenfalls so viel davon hinzu gegeben, dass zwei Moleküle Twisted gastrulation an den binären Komplex binden können (Oelgeschläger et al., 2000).

Für die Komplexpräparation der BMP-2 Variante L100K/N102D mit der extrazellulären Domäne des Rezeptors ActR-IIB und Twisted gastrulation wurden 10 nmol der BMP-2 Variante in 7.5 ml Wasser und jeweils 20 nmol des Rezeptors sowie des Modulatorproteins zusammen in 7.5 ml zweifach konzentriertem Laufpuffer vorgelegt.

Anschließend wurden beide Verdünnungen unter Rühren zusammen gegeben und mittels Zentrifugal-Filtration auf ein Volumen von 1 ml eingengt.

Die Analyse des ternären Proteinkomplexes mittels Größenausschlusschromatographie zeigte, dass das Elutionsvolumen der Probe, die alle drei Komponenten enthält, im Vergleich zu denen der Einzelkomponenten Twisted gastrulation und ActR-IIB_{eecd} zu einem deutlich geringeren Elutionsvolumen verschoben ist (Abbildung 51A). Der Unterschied zu dem Elutionsvolumen der Probe, die den Ligand-Rezeptor-Komplex beinhaltet, weist zwar nicht die erwartete Differenz auf, da aber keine zusätzlichen Elutionsmaxima auftreten, spricht dies dafür, dass alle Komponenten in die Komplexbildung eingegangen und keine Einzelkomponenten in der Probe verblieben sind. Die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 51B) belegt ebenfalls die Bildung eines ternären Komplexes. Auf den Spuren 1 bis 3 beziehungsweise 5 bis 7 wurden die Einzelkomponenten aufgetragen. Diese sind in der Probe des Elutionsmaximums (Spur 4 und 8) sowohl unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen eindeutig wieder zu finden.

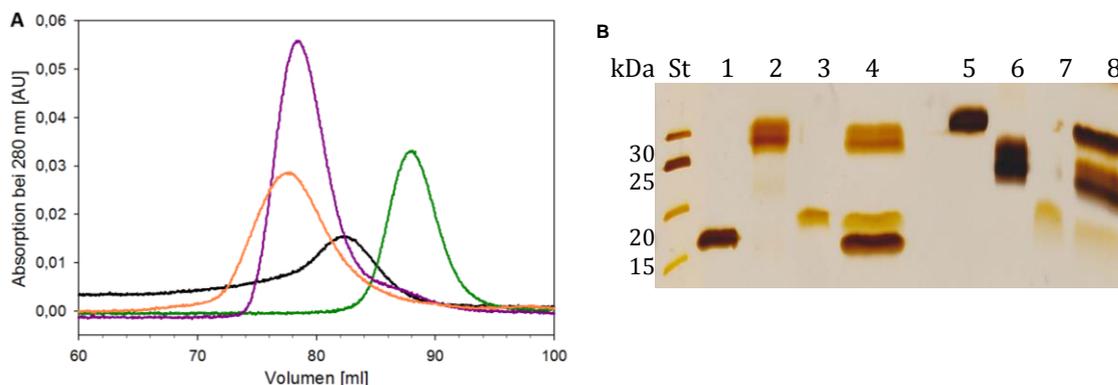


Abbildung 51: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie der Einzelkomponenten und der Komplexpräparationen (A) und SDS-PAGE Analyse der Einzelkomponenten und der Komplexpräparation von ActR-IIB, der BMP-2 Variante L100K/N102D und Twisted gastrulation (HighFive™) (B). **A)** schwarz Twisted gastrulation aus Insektenzellen (20 nmol), grün ActR-IIB_{eecd} (20 nmol), violett Komplexpräparation mit ActR-IIB_{eecd} (20 nmol) und der BMP-2 Variante L100K/N102D (10 nmol), orange Komplexpräparation mit ActR-IIB_{eecd} (20 nmol), Twisted gastrulation aus Insektenzellen (20 nmol) und der BMP-2 Variante L100K/N102D (10 nmol). Dargestellt ist der Bereich von 60 – 100 ml der Größenausschlusschromatographie-Analyse mit einer Superdex 200 16/60 pg Säule (GE). **B)** St Standard, 1 BMP-2 Variante L100K/N102D (1.4 µg), 2 Twisted gastrulation aus Insektenzellen (1.4 µg), 3 ActR-IIB_{eecd} (0.75 µg), 4 Probe des ternären Komplexes vom Elutionsmaximum bei 77.5 ml. Die Analyse der Proben 1 – 4 erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Die Reihenfolge der Proben 5 – 8 ist identisch zu 1 - 4 und erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen.

Auch die ternäre Komplexbildung bei Verwendung von Twisted gastrulation, welches aus *E.coli* präpariert wurde, konnte auf diese Weise durchgeführt werden. Bei der ersten Analyse der Komplexpräparation mittels Größenausschlusschromatographie wurde nun ein Elutionsprofil mit zwei Elutionsmaxima erhalten. Die vergleichende Darstellung in Abbildung 52 zeigt, dass das erste Elutionsmaximum eine ähnliche Retentionszeit aufweist, wie das des binären Komplexes aus der extrazellulären Domäne des Rezeptors ActR-IIB und der BMP-2 Variante L100K/N102D. Die SDS-PAGE Analyse zeigt jedoch, dass sich in den Fraktionen des Elutionsmaximums von 72 – 81 ml alle Einzelkomponenten befinden (Abbildung 53A, Fraktionen 60-64) und diese damit einen ternären Komplex gebildet haben.

Das weitere Elutionsmaximum von 81 – 91 ml weist eine Retentionszeit auf, die auch für isoliertes Twisted gastrulation aus *E.coli* beobachtet werden konnte. Die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 53A, Fraktionen 65-71) bestätigt, dass in diesem Bereich ein großer Anteil von freiem Twisted gastrulation eluierte.

Um zu überprüfen, ob die im ersten Elutionsmaximum eluierten Komponenten tatsächlich einen stabilen Komplex gebildet haben, wurden die Fraktionen vereinigt und erneut mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Dabei wurde ein Elutionsprofil mit nur einem Elutionsmaximum erhalten. Dieses war identisch mit dem ersten Elutionsmaximum der vorherigen Analyse (Abbildung 52). Die SDS-PAGE Analyse in Abbildung 53B zeigte, dass alle Einzelkomponenten in den Fraktionen des Elutionsmaximums enthalten sind und damit tatsächlich als Komplex von der Säule eluieren.

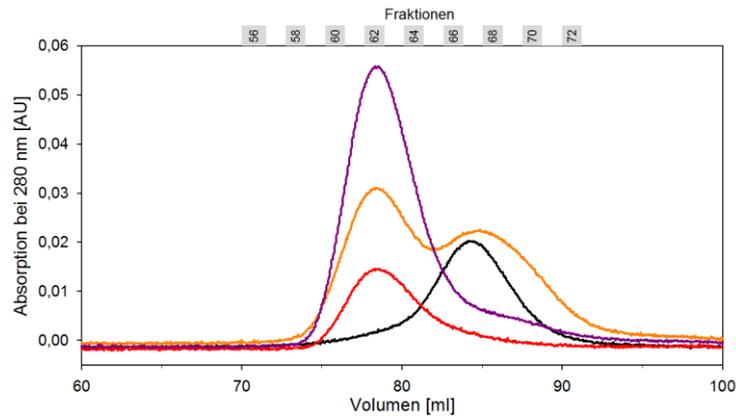


Abbildung 52: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie der Einzelkomponenten separat und der Komplexpräparation von ActR-IIB_{ecd}, der BMP-2 Variante L100K/N102D und Twisted gastrulation (*E.coli*) schwarz Twisted gastrulation aus *E.coli* (20 nmol), **violett** Komplexpräparation mit ActR-IIB_{ecd} (20 nmol) und der BMP-2 Variante L100K/N102D (10 nmol), **orange** erste Analyse der Komplexpräparation mit ActR-IIB_{ecd} (20 nmol), Twisted gastrulation aus *E.coli* (20 nmol) und der BMP-2 Variante L100K/N102D (10 nmol), **rot** zweite Analyse der vereinigten Fraktionen 58-64 der Komplexpräparation aus ActR-IIB_{ecd}, Twisted gastrulation aus *E.coli* und der BMP-2 Variante L100K/N102D. Dargestellt ist der Bereich von 60 – 100 ml der Größenausschlusschromatographie-Analysen mit einer Superdex 200 16/60 pg Säule (GE).

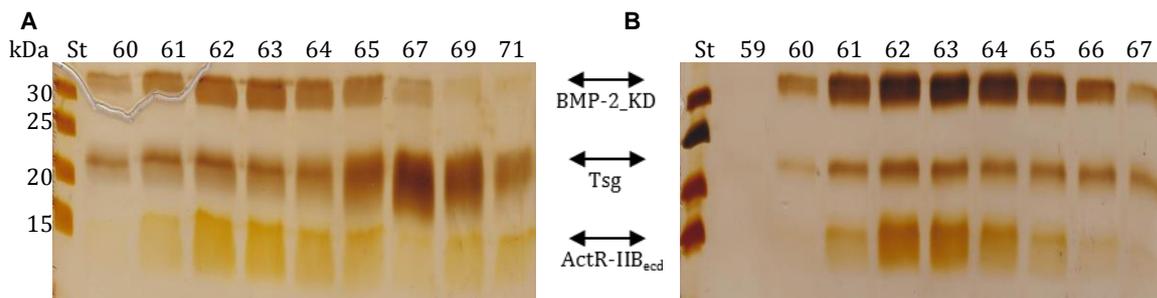


Abbildung 53: SDS-PAGE Analyse der Komplexpräparation von ActR-IIB, der BMP-2 Variante L100K/N102D und Twisted gastrulation aus *E.coli*. **A)** St Standard, 60 – 71 Proben ausgewählter Fraktionen der ersten Größenausschlusschromatographie, **B)** St Standard, 59 – 67 Proben ausgewählter Fraktionen der zweiten Größenausschlusschromatographie. Die Analyse erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen.

In Tabelle 21 sind die theoretischen und die sich aus den Elutionsvolumen abgeschätzten apparenten Molekulargewichte zusammengefasst. Für die Berechnung der apparenten Molekulargewichte wurde die Gelfiltrationssäule unter Verwendung verschiedener Proteine mit bekanntem Molekulargewicht zunächst referenziert (siehe 2.7.2.3) und anhand der so ermittelten Geradengleichung das apparent Molekulargewicht von Twisted gastrulation und der Proteinkomplexe bestimmt.

Tabelle 21: Zusammenfassung der theoretischen Molekulargewichte, Elutionsvolumen und apparenten Molekulargewichte der Einzelkomponenten der Komplexpräparation separat und der Komplexe.

Komponente(n)	theoretisches M_w (kDa)	Elutions- volumen V_E (ml)	apparentes M_w (kDa)
Tsg aus Insektenzellen	23.5	82.5	35.5
Tsg aus <i>E.coli</i>	23.9	84.3	28.4
ActR-IIB_{ecd}	13	87.6	18.9
BMP-2_KD	30	–	–
BMP-2_KD + ActR-IIB_{ecd} (Verhältnis 1:2)	56	78.3	59.7
BMP-2_KD + ActR-IIB_{ecd} + Tsg (HighFive™) (Verhältnis 1:2:2 bzw. 1:2:1)	79.5 bzw. 103	77.5	66

3.6 Charakterisierung der Sekundärstruktur von Twisted gastrulation aus *E.coli* mittels CD-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht setzt sich aus gleichen Anteilen links- und rechts-zirkular polarisierter Komponenten zusammen. Trifft dieses Licht auf optisch aktive Moleküle (Chirale), die eine der beiden Komponenten verstärkt absorbieren, resultiert daraus elliptisch polarisiertes Licht. Bei der CD-Spektroskopie (*circular dichroism*) wird diese Absorptionsdifferenz (Elliptizität θ) für eine Substanz über einen bestimmten Wellenlängenbereich gemessen und so ein CD-Spektrum erhalten.

Um erste experimentelle Aussagen über die Sekundärstruktur eines Proteins zu treffen, eignet sich die CD-Spektroskopie, da es sich bei Proteinen um chirale Moleküle handelt und das Peptidrückgrat im fernen UV-Bereich (170-250 nm) je nach Struktur, charakteristische Spektren liefert (Kelly et al., 2005). In Abbildung 54 ist der typische Verlauf der CD-Spektren von verschiedenen Sekundärstrukturelementen am Beispiel von Poly-L-Lysin dargestellt (Greenfield & Fasman, 1969).

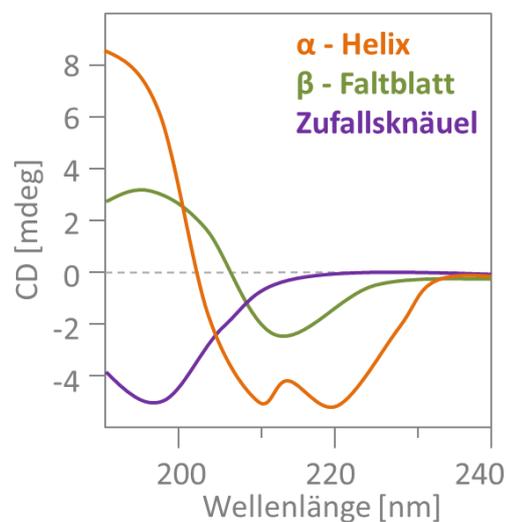


Abbildung 54: Darstellung der CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturelemente am Beispiel von Poly-L-Lysin in wässriger Lösung (nach Greenfield & Fasman, 1969).

Für die Aufnahme von CD-Spektren wurde lyophilisiertes Protein mit einer Konzentration von 150 µg/ml in 200 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.4 gelöst. Die Messung erfolgt in einer 1 mm Quartzglasküvette bei 20°C.

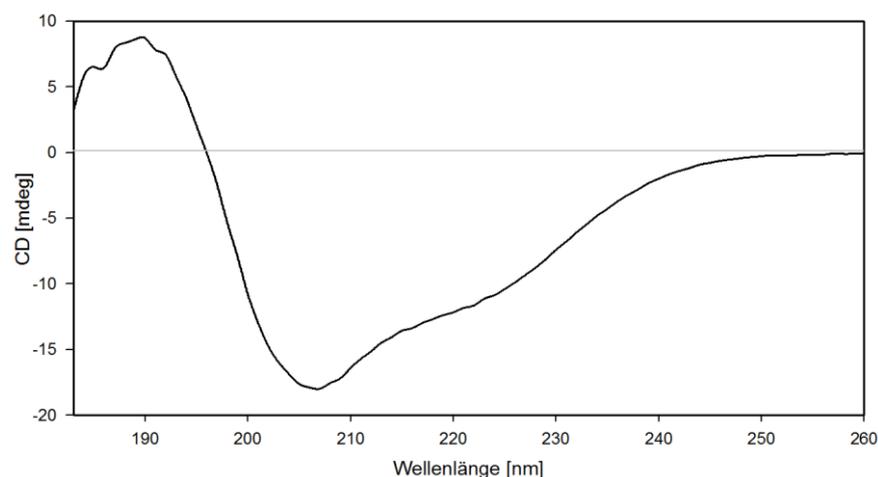


Abbildung 55: CD-Spektrum von murinem Twisted gastrulation aus *E.coli*. Die Messung erfolgte in 200 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.4 bei 20°C mit einer Proteinkonzentration von 150 µg/ml.

In Abbildung 55 ist das CD-Spektrum des rekombinanten murinen Twisted gastrulation aus *E.coli*, dargestellt. Der Verlauf des Spektrums entspricht dem eines hauptsächlich aus β -Faltblatt-Strukturen aufgebauten Proteins. Dafür spricht das mäßig ausgeprägte Maximum bei 190 nm und ein Minimum im Wellenlängenbereich von 205 – 230 nm. Für eine überwiegend α -helikal geprägte Struktur fehlt das dafür typische zweite Minimum bei einer Wellenlänge von 228 nm. Auch die Auswertung der erhaltenen Daten unter Verwendung des Programms „Jasco Secondary Structure Estimation“ zur Bestimmung des Gehalts der verschiedenen Sekundärstrukturelemente bestätigt dies, wobei auch ein hoher Anteil für Proteinbereiche ohne definierte Sekundärstruktur berechnet wurde (Tabelle 22).

Tabelle 22: Berechnung der Anteile der Sekundärstrukturelemente anhand des aufgenommenen CD-Spektrums mit Hilfe des Programms „Jasco Secondary Structure Estimation“.

Strukturelement	Anteil in %
α -Helix	10.5
β -Faltblatt	42.8
β -Schleifen	8.8
Zufallsknäuel	37.9

Neben der Bestimmung des Anteils von Sekundärstrukturelementen kann die CD-Spektroskopie auch dazu genutzt werden, die Faltungstabilität von Proteinen thermisch zu ermitteln, indem Spektren in einer Temperaturreihe aufgenommen werden. Verändert sich die Struktur aufgrund der Temperaturänderung, hat dies aufgrund des Verlusts an Sekundärstrukturen einen Einfluss auf den Spektrenverlauf. Wie in Abbildung 56 zu erkennen, sind allerdings nahezu keine Veränderungen im Verlauf des Spektrums von Twisted gastrulation im gesamten Temperaturbereich zu verzeichnen. Dies lässt auf eine äußerst stabile und rigide Tertiärstruktur schließen. Diese resultiert sehr wahrscheinlich aus der komplexen Disulfidverbrückung des Proteins.

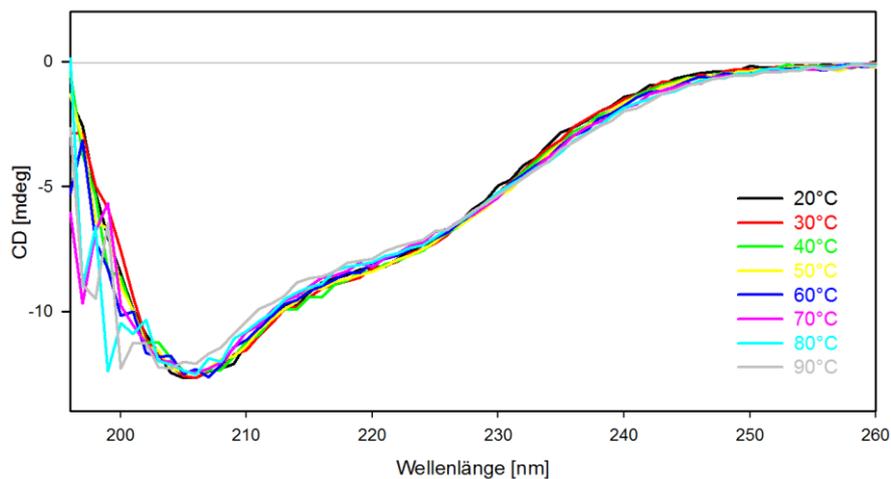


Abbildung 56: CD-Spektren von murinem Twisted gastrulation aus *E.coli* bei verschiedenen Temperaturen. Die Messung erfolgte in 200 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.4 mit einer Proteinkonzentration von 150 µg/ml. Die Messtemperatur wurde zwischen 20°C und 90°C in 10°C-Schritten variiert.

3.7 Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie

Die Strukturaufklärung mittels Kernresonanzspektroskopie erfordert für Proteine wie Twisted gastrulation mit einer Größe von circa 200 Aminosäuren eine isotopengefilterte NMR-Messung, das heißt, natürlich vorkommende Stickstoff- und Kohlenstoffatome müssen gegen die Isotope ^{15}N und ^{13}C ausgetauscht werden.

Zunächst wurde ^{15}N -markiertes Twisted gastrulation rekombinant durch Expression in *E.coli* hergestellt. Hierfür wurde die cDNA-Sequenz von *Xenopus laevis* (cDNA BC056070, imaGenes), die für den reifen Teil des Proteins codiert, über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Vektor pET28b eingefügt. C-terminal wurde über den Oligonukleotidprimer ein Stop-Codon eingefügt, so dass das Protein mit einer N-terminalen Hexahistidin-Sequenz exprimiert wird, die über eine Thrombin-Schnittstelle abspaltbar ist. Der *E.coli* Expressionsstamm BL21 (DE3)* wurde mit dem Plasmid transformiert (siehe 2.2.5.2). Mit 1 ml einer in LB-Medium kultivierten Übertagkultur wurden 200 ml Übernachtskultur in Minimalmedium ohne isotopenmarkierte Zusätze (siehe 2.5.3) inokuliert. Die Expression erfolgte im 5-Liter-Maßstab durch Zugabe der Übernachtskultur zu isopenhaltigem Medium, Kultivierung bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0.65 und Induktion mit 1 mM IPTG. Zusätzlich wurden zu Expressionsbeginn 2 g/l Glucose zur Expressionskultur hinzugegeben. Die Proteinexpression erfolgt für circa 18 Stunden bei 37°C. Es wurden etwa 4 g *E.coli* Zellen pro Liter Expressionskultur gewonnen. Im Anschluss daran wurde, wie in 3.1.3 beschrieben, verfahren. Die Aufreinigung und Renaturierung des isotopenmarkierten Twisted gastrulation zeigte einen ähnlichen Verlauf, wie die Aufreinigung und Expression von in LB-Medium exprimiertem Protein. Schließlich wurden circa 2 mg rückgefaltetes isotopenmarkiertes Protein pro Gramm *E.coli* Zellen gewonnen.

Nach Abspaltung der Hexahistidin-Sequenz an einer Thrombin-Schnittstelle (siehe 2.3.5) wurde das ^{15}N -markierte Protein mittels Umkehrphasen-HPLC aus dem Reaktionsansatz isoliert (siehe 2.7.5), lyophilisiert und anschließend in Messpuffer gelöst.

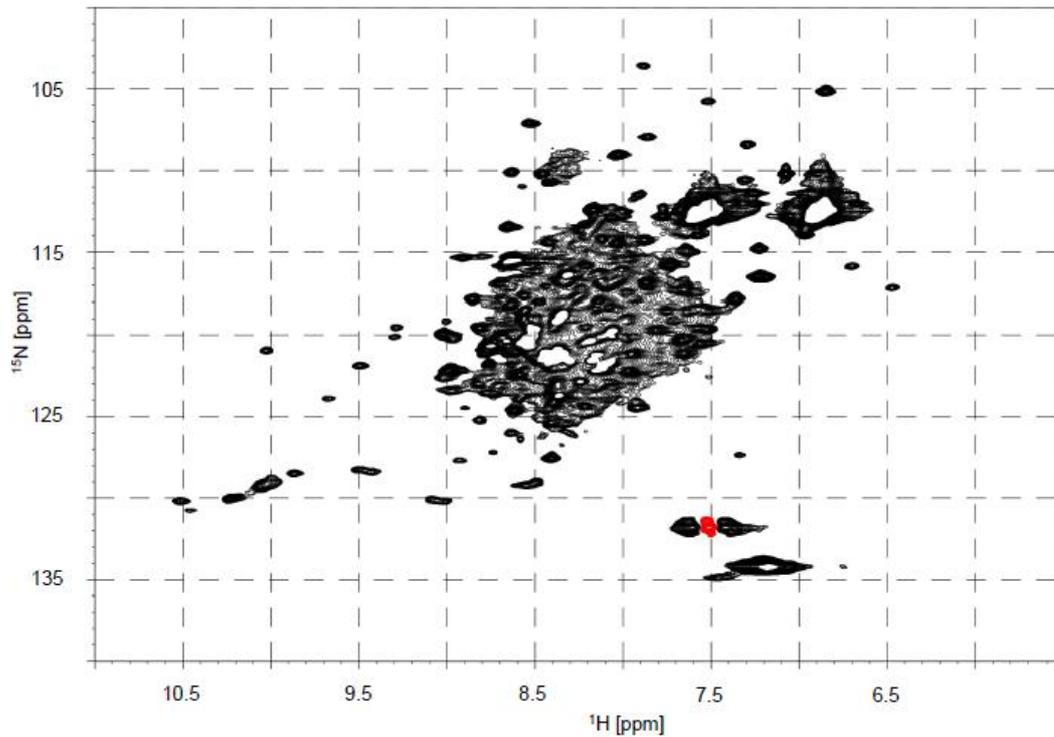


Abbildung 57: 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Korrelationsspektrums von ^{15}N -markiertem Twisted gastrulation.

Die Messung eines 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Korrelationsspektrums von ^{15}N -markiertem Protein gibt Auskunft über jeden mit einem Proton gekoppelten Stickstoffkern, wie er in der Hauptkette von Proteinen pro Aminosäure (außer Prolin) einmal vorkommt. Die chemische Verschiebung für Stickstoffkern und Proton variiert dabei in Abhängigkeit von deren Umgebung und ergibt ein sogenanntes Kreuzsignal. So wird ein sehr vereinfachtes Kernresonanz-Spektrum für ein homogenes Protein erhalten, das im Bereich der Hauptkettensignale so viele Kreuzsignale aufweist, wie es Aminosäuren abzüglich Prolin besitzt.

Das in Abbildung 57 dargestellte 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Korrelationsspektrum zeigt eine deutlich höhere Anzahl von Kreuzsignalen als erwartet, was darauf hindeutet, dass die Proteinprobe mehrere Faltungsspezies aufweist. Ebenso wurden Signale mit sehr unterschiedlichen Intensitäten erhalten. Viele der erhaltenen Signale im Zentrum des Spektrums zeigen eine hohe Intensität bei geringer Signalbreite, was auf das Vorhandensein ungefalteter Proteinregionen hinweist. Allerdings zeigt das Spektrum auch Signale von geringerer Intensität und größerer Signalbreite, so wie sie für ein Protein der Größe von Twisted gastrulation zu erwarten wären und hauptsächlich für eine globulär gefaltete Proteinspezies sprechen. So ergeben sich aus der

Kernresonanz-Spektroskopie zunächst keine detaillierten Strukturinformationen, jedoch deutet die Analyse auf eine α -helikal geprägte Struktur hin und zeigt weiterhin, dass die Kernspinresonanz-Probe heterogene Proteinspezies enthielt und die Präparation von Twisted gastrulation aus *E.coli* gegebenenfalls einer Optimierung bedarf.

4 Diskussion

Twisted gastrulation ist ein BMP-Modulatorprotein, das während der Embryonalentwicklung bei der Festlegung der dorso-ventralen Körperachse eine essentielle Rolle spielt und vor allem die Ausbildung der dorsalen Mittellinie steuert. Entdeckt wurde diese Funktion bei Untersuchungen der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* (Zusman & Wieschaus, 1985; Mason et al., 1994), aber auch in Vertebraten von *Danio rerio* über *Xenopus* bis hin zum Menschen ist die Regulation des BMP-Signals durch Twisted gastrulation unverzichtbar (Scott et al., 2001). Die Sequenzen der verschiedenen Spezies weisen dabei einen hohen Konservierungsgrad auf (Graf et al., 2001).

Unter den BMP-Modulatorproteinen nimmt Twisted gastrulation eine Sonderstellung ein. Bioinformative Sequenzanalysen (BLAST und PSI-BLAST Suchen), Sekundärstruktur- wie auch dreidimensionale *de novo* Strukturvorhersagen zum Beispiel unter Verwendung von Phyre² zeigen, dass es sich bei dem BMP-Modulatorprotein Twisted gastrulation um ein einzigartiges Protein handelt, welches zumindest mit den bisher zur Verfügung stehenden Mitteln auf Aminosäuresequenzebene keinerlei Ähnlichkeit zu anderen Proteinen aufweist. Zusätzlich zu dieser Besonderheit wird eine duale Funktionalität beschrieben, die allerdings nicht allein durch die Bindung von Twisted gastrulation an BMP-Liganden vermittelt wird, sondern auch im Zusammenwirken mit weiteren Modulatorproteinen der Chordinfamilie und Proteasen (Xie & Fisher, 2005; Wills et al., 2006). Um den molekularen Mechanismus dieser komplexen Regulation von BMP-Signalen durch Twisted gastrulation verstehen zu können, ist die biophysikalische Charakterisierung und Aufklärung der dreidimensionalen Struktur unerlässlich. Jedoch ist es aufgrund der oben beschriebenen fehlenden Aminosäuresequenzhomologie zu anderen Proteinen oder -domänen nicht möglich, mittels bioinformatischer Werkzeuge und der Aminosäuresequenz dreidimensionale Strukturinformationen für Twisted gastrulation zu generieren und so eine Analyse von Mutagenesedaten oder eine gerichtete Identifizierung von Aminosäurepositionen durchzuführen, die für die Interaktion mit den einzelnen Bindepartnern BMP und/oder Modulatorproteinen der Chordinfamilie von Bedeutung

sind. Daher ist eine experimentelle Strukturanalyse für die Aufklärung der Struktur-/Funktionsbeziehungen von Twisted gastrulation zwingend erforderlich. Die beiden heute zur Verfügung stehenden Methoden, Röntgenbeugung und Kernresonanzspektroskopie (NMR) haben teils überlappende, teils spezifische Anforderungen an das für die Analyse zur Verfügung stehende Proteinmaterial. So benötigen beide Verfahren für die erfolgreiche Durchführung eine hinreichend große Proteinmenge im Milligramm-Maßstab und das zu analysierende Protein muss zur Homogenität aufgereinigt vorliegen. Letzteres gilt nicht nur für die möglichst vollständige Abtrennung von jeglichen Kontaminationen durch andere Protein- und Nukleinsäurekomponenten, sondern auch dahingehend, dass das zu analysierende Protein als eine homogene Faltungsspezies vorliegt, welches einheitlich post-translational modifiziert ist, falls dies notwendig sein sollte oder die Modifikationen nicht abgetrennt werden können.

4.1 Rekombinante Herstellung des BMP-Modulatorproteins Twisted gastrulation

Grundvoraussetzung für die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Twisted gastrulation ist, wie zuvor beschrieben, eine Expression von biologisch aktivem Protein in hinreichenden Mengen. Da es sich bei Twisted gastrulation um ein Cystein-reiches Protein handelt, das wahrscheinlich sehr komplex disulfidverbrückt ist, bestand eine Herausforderung in der Wahl des Expressionssystems. Nur eine korrekte native Verknüpfung der 24 Cysteine zu 12 Disulfidbrücken stellt die biologische Aktivität des Proteins sicher. Die Anzahl der theoretischen Verbrückungsmöglichkeiten beläuft sich dabei auf mehr als 316 Milliarden.

4.1.1 Das Baculovirus-Expressionssystem ermöglicht die rekombinante Herstellung von nativem Twisted gastrulation

Da Twisted gastrulation ein normalerweise nur in Eukaryoten vorkommendes sekretiertes Protein ist, wurde zunächst die rekombinante Expression in Insektenzellen, einem säugerzell-ähnlichen Expressionssystem mit in der Regel höheren Proteinausbeuten, gewählt. Die Herstellung rekombinanter Proteine in Insektenzellen bietet den Vorteil, dass der Transport von biologisch aktivem Protein in den Medienüberstand durch ein komplexes, Chaperon-gestütztes sekretorisches System unterstützt wird und eine in Teilen säugerzell-ähnliche posttranslationale Modifikation erlaubt. Hierbei standen vor allem die Glykosylierung des Proteins im Fokus, da diese neben der Eigenschaft, die Löslichkeit und Stabilität des Zielproteins zu unterstützen (Rajan et al., 1995), potentiell auch eine Rolle bei der Wechselwirkung mit Interaktionspartnern spielen kann (George et al., 1986). Konkrete Beispiele hierfür aus der TGF- β Superfamilie sind die posttranslationale Modifikation von BMP-15/GDF-9 und die Interaktion von BMP-6 mit dem Activin-Rezeptor-I (Saito et al., 2008; Saremba et al., 2008). BMP-6 verfügt beispielsweise über drei potentielle N-Glykosylierungsstellen, wobei in Analogie zu BMP-7 davon ausgegangen wird, dass die beiden im unstrukturierten N-Terminus befindlichen nicht glykosyliert werden, aber die Glykosylierung der im *wrist*-Epitop lokalisierten Glykosylierungsstelle essentiell ist (Sampath et al., 1992; Jones et al., 1994). Denn wird diese nicht glykosyliert, wie es bei der rekombinanten Herstellung des Proteins in *E.coli* der Fall ist, zeigt BMP-6 keine Bindung an den Rezeptor ActR-I, der jedoch für die Aktivierung der Signalkaskade unerlässlich ist (Saremba et al., 2008).

Insektenzellen lassen sich gut in Suspension kultivieren, so dass eine Expression auch im Liter-Maßstab durchführbar ist. Ist die Herstellung und klonale Selektion rekombinanter Viren erfolgt, lassen sich diese einfach vermehren und nach 4-5 Tagen Expressionsdauer wird das gewünschte Protein im Überstand erhalten. Anschließend kann das üblicher Weise mit einer Erkennungssequenz fusionierte Protein durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie angereichert und von anderen im Überstand enthaltenen endogenen Proteinen isoliert werden. Für die Expression von Twisted gastrulation wurde dieses an eine Hexahistidin-Sequenz fusioniert, um anschließend eine Metallchelate-Affinitätschromatographie anzuwenden. Erste Expressionsversuche in dem hochexprimierenden *Sf*-21-Klon „TriEx™“

zeigten eine gute Expressionsrate von etwa 10 bis 15 mg pro Liter, jedoch stellte das im Medium enthaltene fetale Kälberserum ein Problem bei der Aufreinigung dar, da das enthaltene Rinderserumalbumin unspezifisch aber relativ stark mit dem Nickel-beladenen Nitrilotriessigsäurematerial der Metallchelate-Affinitätschromatographie interagiert und dadurch ebenfalls mit dem Zielprotein angereichert wurde. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Expression dahingehend optimiert, dass High-Five™-Insektenzellen ohne Zusatz von fetalem Kälberserum kultiviert wurden, was zudem die Expressionsrate zusätzlich erhöhte. Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis* konnte in diesem Expressionssystem als monomeres Protein mit einer Ausbeute von etwa 15 bis 20 mg pro Liter Expressionsansatz gewonnen werden. Deglykosylierungsversuche zeigten, dass das Protein heterogen glykosyliert vorliegt, was in der SDS-PAGE Analyse durch das Auftreten einer diffusen Bande beobachtet wird. Die Existenz verschiedener langer Proteinspezies konnte durch eine massenspektrometrische Analyse von deglykosyliertem Twisted gastrulation ausgeschlossen werden.

Da eine heterogene Glykosylierung allerdings ein Problem für eine Strukturanalyse mittels Proteinkristallisation darstellen kann, wurde versucht, die Glykanstrukturen mit verschiedenen (Endo-)glukosidasen zu verkürzen und zu einer homogenen Grundstruktur zu vereinfachen. Dass für die Stabilisierung eines Proteins der proximale Zucker ausreichend sein kann, wurde von Petrescu et al. (2004) gezeigt (Petrescu et al., 2004). Allerdings zeigte sich, dass scheinbar auch eine Fukosylierung stattfindet, die eine effektive Deglykosylierung erschwert. Um dies zu umgehen, erfolgte die Herstellung nicht-fukosylierter Proteinspezies durch die Zugabe von Kifunensin zum Expressionsansatz. Kifunensin ist ein Alkaloid, das die Fukosylierung des protein-gebundenen N-Acetylglucosamins hemmt (Crispin et al., 2006), wodurch sich die Sensitivität gegenüber der Endoglykosidase H erhöht. Dadurch kann ein Hauptteil der Glykosylierung entfernt und homogen glykosyliertes Protein erhalten werden. Dies gelang ohne negativen Effekt auf die Ausbeute mit einem positiven Einfluss auf die Möglichkeit der Deglykosylierung durch die Endoglykosidase H. Bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse wurde zusätzlich bestätigt, dass die Glykosylierung nicht homogen an jeder der drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen erfolgt, da neben Proteinspezies mit drei verbleibenden auch Spezies mit nur zwei N-Acetylglucosaminresten nachgewiesen werden konnten.

Im Gegensatz zu Twisted gastrulation von *Xenopus laevis*, konnte murines Twisted gastrulation nicht in Insektenzellen exprimiert werden. Da sowohl die Klonierung als auch die Expression der für beide Proteine kodierenden DNA identisch durchgeführt wurde, könnte ein Grund in der Ausbildung ungünstiger Sekundärstrukturen der mRNA liegen, wodurch die Translationsrate verringert wird. Ein weiterer Grund könnten möglicherweise Unterschiede in der Zusammensetzung der Basentriplets zwischen verschiedenen Organismen sein, die variieren und zu teilweise starken Unterschieden bei der rekombinanten Expression in heterologen Systemen führen können. Eine Analyse der cDNA-Sequenzen von *Mus musculus* und *Xenopus laevis* zeigt, dass erstere zwei Basentriplets enthält, die eine besonders niedrige Translationsrate in Insektenzellen aufweisen. Außer für Tryptophan und Methionin stehen mehrere Basentriplets für eine Aminosäure zur Auswahl. Manche Basentriplett-Varianten werden dabei von verschiedenen Spezies bevorzugt, andere hingegen kaum verwendet. Die seltene Verwendung eines Basentriplets führt zu einer niedrigen zugehörigen tRNA-Konzentration, was eine äußerst niedrige Translation des Zielproteins zur Folge haben kann. Die Basentriplets *cgg*, codierend für Arginin, und *ggg*, codierend für Glycin, kommen in beiden Gensequenzen vor, jedoch sind diese in der cDNA von *Xenopus laevis* eher gleichmäßig verteilt (*cgg* an Position 22, 80 und 164; *ggg* an Position 175), wohingegen vier der fünf Basentriplets mit niedriger Translationseffizienz (*cgg* an Position 22 und 55; *ggg* an Position 26, 39 und 187) im vordersten 5'-Bereich der Sequenz von *Mus musculus* zu finden sind und so zu einer äußerst niedrigen Translationsrate führen (Abbildung 58). Um dieses Problem zu umgehen, kann ein für die Expression in Insektenzellen Codon-optimiertes synthetisches Gen verwendet werden.

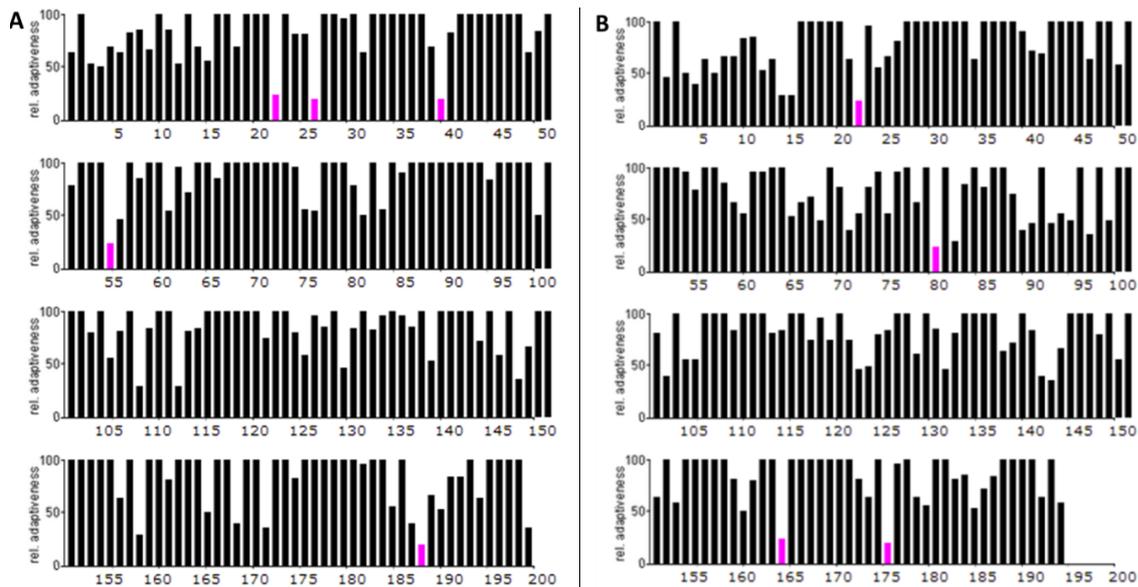


Abbildung 58: Analyse der cDNA-Sequenzen von *Mus musculus* (A) und *Xenopus laevis* (B) in Bezug auf die Häufigkeit der Verwendung der Basentriplets in *Spodoptera frugiperda*. Ein Balken entspricht jeweils einem Basentriplett entsprechend des Leserasters. Pink eingefärbt sind die Basentriplets deren relative Translationsrate in Insektenzellen unter 25% liegt (erstellt mit Graphical Codon Usage Analyser, <http://gcu.schoedl.de/>).

Würden jedoch aus der Verwendung einer Codon-optimierten Gensequenz keine höheren Expressionsraten resultieren, weist dies möglicherweise auf Schwierigkeiten bei der Ausbildung der nativen dreidimensionalen Struktur des murinen Twisted gastrulation in Insektenzellen hin. Fehlgefaltete Proteine werden in der Regel nicht sekretiert, sondern direkt in das Zytosol der Zelle transportiert, wo direkt der proteasomale Abbau erfolgt. Um die Proteinfaltung zu unterstützen, besteht die Möglichkeit der Co-Expression von Faltungsmediatoren und Enzymen, die die Ausbildung der nativen Struktur katalysieren. Die Protein-Disulfid-Isomerase beispielsweise ermöglicht die Isomerisierung und native Ausbildung von Disulfidbrücken, Calreticulin fördert die Faltung von Glykoproteinen und die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase katalysiert die cis-trans-Isomerisation von Amid-Bindungen, an denen die Aminosäure Prolin beteiligt ist.

Da jedoch die Expression von Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis* sehr erfolgreich verlief und die Sequenzen der reifen Proteine eine Identität von etwa 87% aufweisen, wurde für die Expression von Twisted gastrulation die cDNA von *Xenopus laevis* verwendet.

Die Qualität des so rekombinant produzierten Proteins wurde mit verschiedenen biophysikalischen Verfahren analysiert. So wurde die Bindungsaffinität gegenüber BMP-2 *in vitro* mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie und die biologische Aktivität im Zellassay durch Hemmung der BMP-2 Signalaktivität untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit dieser Expressionsstrategie biologisch aktives Protein erhalten werden konnte und der Einsatz des Alkaloids Kifunensin keine Veränderung der Eigenschaften von Twisted gastrulation zur Folge hat.

4.1.2 Die transiente Transfektion von Freestyle™ 293 F-Zellen ermöglicht die Herstellung von Proteinvarianten im Hochdurchsatzverfahren

Die Expression in Säugerzellen selbst, stellt ebenso eine Möglichkeit dar, native post-translational modifizierte Proteine rekombinant herzustellen.

Für das Einbringen von DNA in Säugerzellen stehen zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung. Neben physikalischen Verfahren, wie Mikroinjektion, Elektro- und Sonoporation, gibt es auch chemische Verfahren, die mit Hilfe von Liposomen, kationischen Polymeren oder Nanopartikeln die Transfektion von Säugerzellen ermöglichen. Eine Transfektion kann transient oder stabil erfolgen, dies hängt von der Anwendung und den gestellten Anforderungen ab. In Bezug auf die rekombinante Herstellung von Proteinen, sind Proteinmenge und Häufigkeit der Transfektion entscheidende Faktoren. Für die Transfektion von Säugerzellen ist die Menge der benötigten Plasmid-DNA oft erheblich. Sollen beispielsweise große Mengen eines Proteins hergestellt werden oder die Expression langfristig erfolgen, so bietet sich die Herstellung einer stabilen Zelllinie an. Dieses Vorgehen ist jedoch verhältnismäßig zeitaufwändig, da die Zellen nach dem Einbringen der DNA zunächst selektiert werden müssen. Steht hingegen nicht die absolute Proteinmenge im Vordergrund und erfolgt die Expression nur über einen kurzen Zeitraum, wird einer transienten Transfektion der Vorzug gegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Transfektion von Freestyle™ 293 F-Zellen ausschließlich transient, da für die anschließenden Untersuchungen nur geringe Proteinmengen benötigt wurden. Ein Vorteil bei der Verwendung von Freestyle™ 293 F-Zellen ist die Kultivierung ohne fetales Kälberserum oder Rinderserumalbumin im

Medium, was eine anschließende Aufreinigung des Zielproteins oder Untersuchungen, in denen der Expressionsüberstand direkt eingesetzt wird, gegebenenfalls stören kann. Zudem erfolgen Transfektion und Expression in Kulturmedium, so dass kein zusätzliches Expressionsmedium benötigt wird. Ein weiterer Vorteil der Freestyle™ 293 F-Zellen ist die Adaption an die Kultivierung in Suspension, wodurch höhere Zelldichten erreicht werden.

Die Transfektion der Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit dahin gehend optimiert, dass das kostenintensive Transfektionsreagenz FreeStyle™ MAX Reagent (Invitrogen) durch das sogar effizientere kationische Polymer Polyethylenimin ersetzt werden konnte.

Diese Form der Proteinexpression ist hervorragend geeignet, wenn eine Vielzahl von Proteinen oder Proteinvarianten exprimiert werden soll und nicht die gewonnene Proteinmenge im Vordergrund steht. Im Vergleich zur Proteinexpression in Insektenzellen, wofür zunächst die Viren hergestellt, vereinzelt und vervielfältigt werden müssen oder zur Expression in *E.coli*, woran sich die Renaturierung und eine Vielzahl von Aufreinigungsschritten anschließt, kann die Plasmid-DNA direkt in Freestyle™ 293 F-Zellen transfiziert werden und das Protein steht bereits nach 4-5 Tagen Expressionsdauer zur Verfügung (Abbildung 59). Die Analyse der Bindungseigenschaften gegenüber BMP-2 mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie von auf diese Weise erhaltenem Protein zeigte, dass funktionales Twisted gastrulation von *Xenopus laevis* aus Freestyle™ 293 F-Zellen gewonnen werden kann.

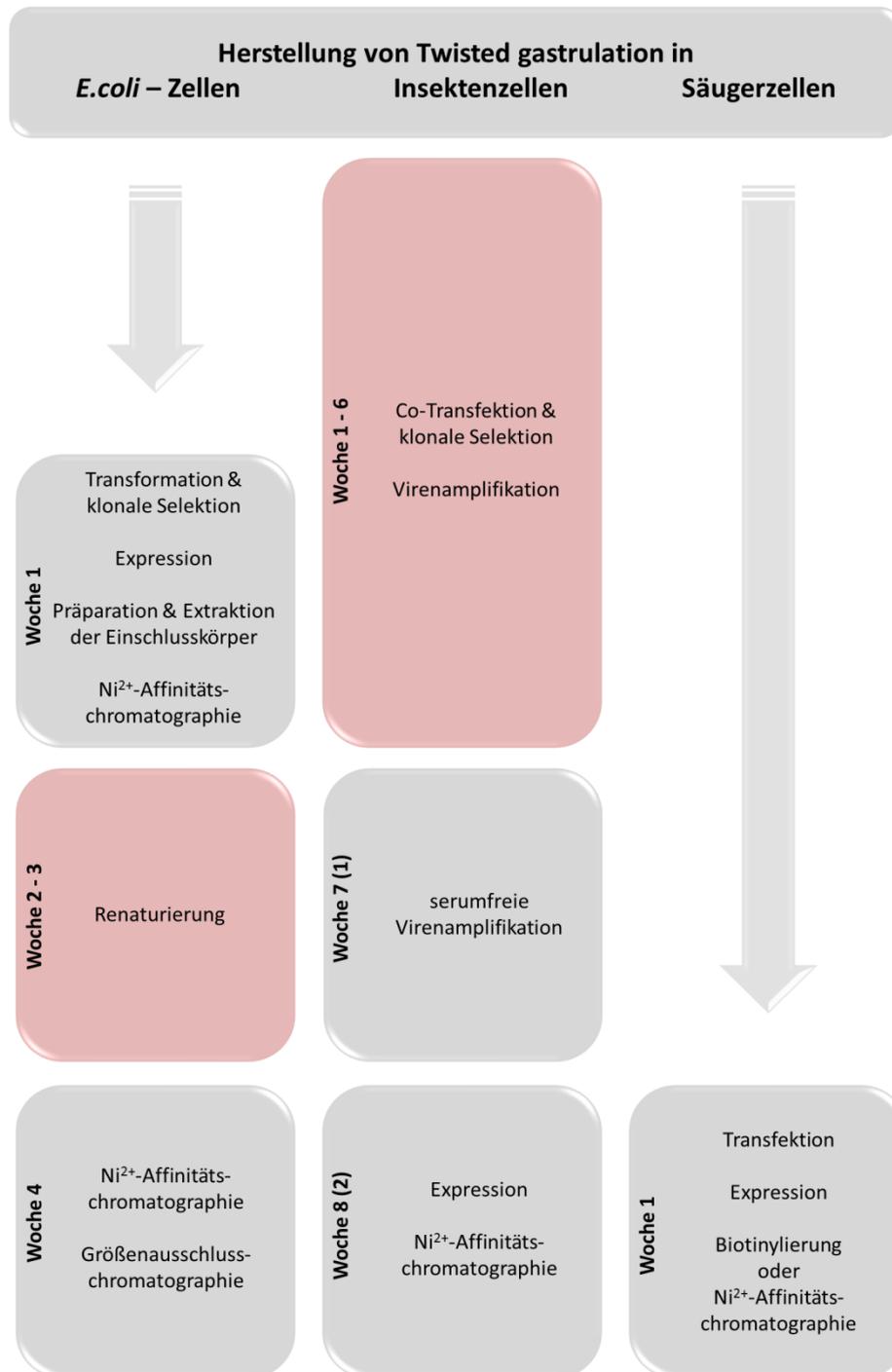


Abbildung 59: Vergleichende Darstellung der verschiedenen Expressions- und Aufreinigungsabläufe von Twisted gastrulation in Abhängigkeit vom Expressionssystem.

4.1.3 Twisted gastrulation kann durch Renaturierung aus *E.coli* Zellen gewonnen werden

Für die rekombinante Herstellung insbesondere für eine zukünftige strukturelle Charakterisierung wurde ebenso eine Expression in *E.coli* etabliert. Dies ermöglicht die Gewinnung von isotopenmarkiertem Protein für die Kernspinresonanz-Analyse oder auch von vollständig unglykosyliertem Protein. Letzteres ist ohne Veränderungen in der Oberflächenladung möglich, wie sie sonst durch die Desaminierung von Asparagin bei der Verwendung der Peptid-N-Glykosidase F stattfindet.

Allerdings werden für die Biosynthese von Proteinen aus eukaryotischen Proteinen häufig Eukaryoten-spezifische Faltungsmediatoren (Chaperone-Systeme) benötigt, die in den rekombinanten bakteriellen Expressionssystemen nicht zur Verfügung stehen oder spezieller Verfahren bedingen. Im Fall von extrazellulären, sekretierten Proteinen kommen zudem weitere Erschwernisse hinzu. So verfügen gram-negative Bakterien, wie *E. coli* über kein effizientes, dem endoplasmatischen Retikulum/Golgi-Apparat ähnelndem System. In diesem Eukaryoten-spezifischen Kompartiment herrschen besondere Bedingungen, die für die Ausbildung der korrekten Proteinfaltung unter Umständen von großer Bedeutung sind. So finden sich in diesem Kompartiment nicht nur besondere Redoxbedingungen, die im Gegensatz zum Cytoplasma eine effiziente Oxidation der Thiolgruppen von Cysteinresten zu Disulfidbrücken ermöglicht, sondern das Kompartiment beinhaltet auch eine Reihe besonderer Enzyme, wie Disulfidisomerasen, Oxidoreduktasen, Prolin-cis/trans-Isomerasen und Faltungsmediatoren, die wesentlich zur Ausbildung der nativen Faltung sekretierter Proteine beitragen.

Wie schon zuvor erwähnt, weist Twisted gastrulation einen extrem hohen Anteil an Cysteinresten auf. Das lässt eine lösliche Expression von nativ gefaltetem Protein im Zytoplasma von *E.coli* schwierig, wenn nicht unmöglich erscheinen, da das Redoxpotential im Zytoplasma stark reduzierend ist und sich daher keine Disulfidbrücken ausbilden können. Zwar besteht die Möglichkeit, andere *E.coli* Zellstämme zu benutzen, bei denen einzelne Komponenten des Redoxsystems ausgeschaltet sind („*loss of function*“ *trxB* und/oder *gor* Mutanten), jedoch weisen die Zellen dieser *E.coli* Stämme häufig ein deutlich niedrigeres Zellwachstum und niedrigere Expressionsraten auf (Übersichtsartikel siehe: Rietsch & Beckwith, 1998). Zudem ist eine Kultivierung

in Minimalmedium, die für die Herstellung von isotopenreinem Protein für die Kernspinresonanz-Strukturanalyse notwendig ist, nicht möglich, da unter diesen Bedingungen nicht ausreichend NADPH, ein für die Ribonukleotidreduktase essentielles Substrat, synthetisiert wird. Dadurch kommt die DNA-Synthese zum Erliegen und es findet kein Wachstum der Zellen statt (Ritz et al., 2001; Ortenberg et al., 2004).

Eine unter diesen Umständen existierende Alternative für eine Expression in *E.coli* ist die Sekretion des Zielproteins in den Zwischenraum der inneren und äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, dem Periplasma. Neben dem dort vorherrschenden hinreichend positivem Redoxpotential, enthält das Periplasma mit der Disulfidbrücken-Oxidoreduktase (DsbA) und der Disulfidisomerase (DsbC) Enzyme, die eine korrekte Ausbildung und auch Isomerisierung von Disulfidbrücken zulassen, wenn cysteinhaltige Proteine in dieses Kompartiment sekretiert werden (Übersichtsartikel siehe: Rietsch & Beckwith, 1998). Hierfür wird das Zielprotein entweder mit einer entsprechenden Signalsequenz wie beispielsweise von den Proteinen ompA oder pelB fusioniert, die für die Sekretion in das Periplasma adressiert (Movva et al., 1980; Lei et al., 1987; Skerra et al., 1991) oder das Protein kann als Fusion mit DsbA oder DsbC und deren Signalsequenzen exprimiert werden. Hierbei besteht allerdings auch häufig das Problem in niedrigen Expressionsraten und geringer Sekretionsraten für das Zielprotein, wodurch sich dieses auch in nicht-nativer Form im Zytoplasma wiederfindet.

Beide Expressionsverfahren wurden in der Arbeitsgruppe zuvor für verschiedene Proteine wie beispielsweise die extrazellulären Domänen der BMP-Rezeptoren-IA und -IB oder die erste von Willebrand Typ C-Domäne von Crossveinless-2 etabliert (Kirsch, Nickel, et al., 2000a; J.-L. Zhang et al., 2008; Kotzsch, 2008), allerdings wies keines dieser Proteine einen derart hohen Cysteingehalt und eine damit einhergehende äußerst komplexe Disulfidverbrückung auf.

Eine weitere Alternative für die Herstellung von Twisted gastrulation stellte daher die Expression des Proteins in sogenannten Einschlusskörpern dar. Das nicht in nativer Form vorliegende unlösliche Protein reichert sich dabei in kompakter Form im Zytoplasma an. Im Anschluss an die Expression werden die Einschlusskörper aus den Zellen isoliert, das ungefaltete Protein gelöst und schließlich durch Renaturierung in die biologisch aktive Form überführt.

Da in der Arbeitsgruppe bereits verschiedene Renaturierungsprotokolle etabliert werden konnten, wurde sich für die Expression von Twisted gastrulation in Einschlusskörpern entschieden und verschiedene Renaturierungspuffer getestet. Entscheidend für die Selektion des endgültigen Rückfaltungspuffers, war ein möglichst hohes Verhältnis von monomerer zu dimerer Proteinspezies, da die monomere Spezies, wie sie auch bei der Expression in Insektenzellen erhalten wurde, dem nativen Twisted gastrulation entspricht. Die Ermittlung des Verhältnisses der verschiedenen Proteinspezies erfolgte anhand der als letzten Aufreinigungsschritt durchgeführten Größenausschlusschromatographie. Am effektivsten hat sich der Renaturierungspuffer erwiesen, der bereits für die Rückfaltung von Sclerostin am besten geeignet war (Weidauer et al., 2009).

Auf diese Weise konnten 5 – 7.5 mg monomeres Twisted gastrulation pro Liter Bakterienkultur (\cong 2 – 3 g Feuchtwicht *E.coli* Zellen) gewonnen werden. Da auch murines Twisted gastrulation ähnlich gut auf diese Weise exprimiert und aufgereinigt werden konnte, bestätigt sich hier, dass die nicht nachweisbare Expression in Insektenzellen sehr wahrscheinlich auf Probleme bei der Translation zurückzuführen ist.

Die sich an die Aufreinigung anschließende Qualitätsanalyse des rekombinant in *E.coli* Zellen hergestellten Twisted gastrulation zeigte, dass auch mit dieser Expressionsstrategie biologisch aktives Protein erhalten werden konnte. Allerdings zeigen sich Unterschiede des auf diese Weise gewonnenen Proteins im Vergleich zu Twisted gastrulation aus Insektenzellen. So wurden bei Oberflächen-Plasmonresonanz-Analysen mit Protein aus *E.coli* im Vergleich zu dem aus Insektenzellen erhaltenen Protein ein niedrigeres Messsignal erreicht, höhere Dissoziationsraten und zudem, für eine 1:1-Interaktion, untypische biphasische Kurvenverläufe beobachtet. Dies kann erklärt werden, indem angenommen wird, dass möglicherweise das aus der Renaturierung erhaltene Protein nicht zu 100% homogen gefaltet ist. Dafür spricht auch das Ergebnis einer vorläufigen Kernspinresonanz-Analyse, die zeigte, dass die analysierte Proteinprobe verschiedene Faltungsspezies beinhaltet, von denen eine oder mehrere größere Anteile an ungefalteten Bereichen enthielten, woraus wahrscheinlich Unterschiede in den Bindungseigenschaften resultieren.

4.2 Charakterisierung der Struktur von Twisted gastrulation

4.2.1 Circular dichroismus-Spektroskopie lässt keine eindeutigen Aussagen über die Sekundärstruktur zu

Um einen ersten Einblick in die allgemeine Konformation von Twisted gastrulation zu erhalten, wurde die Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus-Spektroskopie untersucht und die thermische Stabilität analysiert. Dabei wurde neben unstrukturierten Bereichen ein hoher Anteil von β -Faltblatt-Strukturelementen bestimmt und eine nahezu unveränderte Struktur über das gesamte Temperaturspektrum von 20-90°C beobachtet.

Die hohe thermische Faltungstabilität des rekombinant in *E.coli* erzeugten Proteins gibt, entgegen der Kernspinresonanz-Analyse, keinen Hinweis auf die Existenz ungefalteter Proteinspezies. Da für diese eine geringere Faltungstabilität erwartet werden würde, müsste eine thermische Entfaltung eine Denaturierung aufzeigen und die Spektren einen veränderten Verlauf zeigen. Allerdings waren in den entsprechenden Circular dichroismus-Messungen selbst bei 90°C keine Anzeichen einer Entfaltung zu erkennen. Jedoch birgt diese Analyse methode die Gefahr, dass durch die extreme Disulfidverbrückung die einzelnen Sekundärstrukturelemente so stark miteinander verknüpft sind, dass auch bei hohen Temperaturen keine Entfaltung detektiert werden kann und somit die Analyse ein falsch positives Ergebnis ergibt. Zudem ergibt diese Messung ein gemitteltes Signal und kann somit ebenfalls die Anwesenheit ungefalteter oder fehlgefalteter Spezies verschleiern, so dass keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich der Sekundärstruktur getroffen werden können.

4.2.2 Kernspinresonanz-Analyse weist auf Faltungsheterogenität des bakteriell erzeugten Twisted gastrulation hin

Da erste Vorversuche zur Kristallisation des freien Twisted gastrulation nicht erfolgsversprechend verlaufen sind, wurde statt einer Strukturaufklärung mittels Proteinkristallographie zunächst versucht, die Struktur mittels Kernresonanzspektroskopie aufzuklären. Hierzu ist die Herstellung isotope-markierten Proteins notwendig, da aufgrund der Größe von Twisted gastrulation mit etwa 200 Aminosäureresten eine erfolgreiche Kernspinresonanz-gestützte Strukturaufklärung zwingend die Messung isotope-gefilterter Kernspinresonanz-Experimente verlangt und hierfür für die natürlich vorkommenden Stickstoff- und Kohlenstoffatome gegen „Kernspinresonanz-aktive“ Kerne, das heißt der Isotope ^{15}N und ^{13}C ausgetauscht werden müssen. Dies kann biosynthetisch durch Expression des Proteins in Medium mit isotope-reiner Zusammensetzung erfolgen. Da Prokaryoten im Gegensatz zu Eukaryoten die Fähigkeit aufweisen, alle notwendigen Bausteine aus den relativ einfachen Grundbausteinen Acetat (oder besser Glukose) und Ammonium synthetisieren zu können, werden für Kernspinresonanz-gestützte Strukturanalyse überwiegend prokaryotische Expressionssysteme verwendet. Die rekombinante Herstellung erfolgte aus den oben genannten Gründen daher mittels einer Expression von Twisted gastrulation im Zytoplasma, was aufgrund der fehlenden Ausbildung der Disulfidbrücken zur Ablagerung von Twisted gastrulation in sogenannte Einschlusskörper führt, in denen das Protein in ungefalteter, inaktiver Form vorliegt. Für eine erste Analyse erfolgte zunächst die Herstellung von uniform ^{15}N -markierten Proteins, in dem jedes Stickstoffatom aus dem Kernspinresonanz-aktiven Stickstoffisotop ^{15}N besteht. Die Analyse eines derartig markierten Proteins erfolgt durch Messung eines sogenannten 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Korrelationsspektrum, in welchen für jeden mit Protonen verbundenen Stickstoffkern ein Kernspinresonanz-Kreuzsignal erhalten wird. Da in Proteinen jede Aminosäure mit der Ausnahme von Prolin ein Stickstoff-Proton-Paar in der Hauptkette aufweist, welche aufgrund der unterschiedlichen Umgebung ein spezifische chemische Verschiebung für den Stickstoffkern und Proton besitzt, kann auf diese Weise ein sehr vereinfachtes Kernspinresonanz-Spektrum erhalten werden, in dem pro Aminosäure (außer Prolin) ein Kreuzsignal erhalten wird. Zusätzliche Signale werden für die Carboxamidgruppen für Asparagin und Glutamin erhalten, zudem finden sich auch Kreuzsignale für die

aromatischen Stickstoffkerne von Histidin und Tryptophan, die aber aufgrund ihrer besonderen Signalfrequenz außerhalb des für die Analyse interessanten Bereichs der Hauptkettensignale liegen. Somit kann eine erste Analyse anhand der Anzahl der vorliegenden Kernspinresonanz-Signale für die Hauptkettenamidprotonen schnell einen Hinweis auf die Faltung – die NMR-Signale von Aminosäuren in helikalen und β -Faltblattstrukturen weisen jeweils charakteristische chemische Verschiebungen auf – geben, da eine Probe eines homogen gefalteten Proteins ebenso viele Kernspinresonanz-Kreuzsignale aufweisen sollte, wie das Protein Aminosäuren außer Prolin besitzt.

Hier wies das in Abbildung 57 gezeigte ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum von Twisted gastrulation eine deutliche Abweichung zu dem erwarteten Spektrum auf. So überstieg die Zahl der Kernspinresonanz-Signale die Zahl der Aminosäuren deutlich, so dass dies als ein erster Hinweis auf die Existenz mehrerer Faltungsspezies in der in Bakterien hergestellten Proteinprobe von Twisted gastrulation gewertet werden muss. Ein weiterer Hinweis kann aus der Analyse der Signalamplituden beziehungsweise deren Linienbreite erhalten werden. Hierfür ist voraus zu schicken, dass das Volumen eines Kernspinresonanz-Signals mit der Anzahl der beteiligten Kerne korreliert ist. So hat das Protonen Kernspinresonanz-Signal einer Methylgruppe aufgrund der drei verknüpften Protonen ein dreifach größeres Signal im Vergleich zu dem Signal einer Methingruppe, die nur ein Proton aufweist. In dem angeführten ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum beruhen alle Kernspinresonanz-Signale auf der Korrelation eines Amidprotons mit einem verknüpften Stickstoffkern und die beobachteten Kreuzsignale sollten daher eine identische Signalamplitude aufweisen. Allerdings ist die Breite der Kernspinresonanz-Signale abhängig von deren Relaxation, welche wiederum mit der Flexibilität der entsprechenden Aminosäure korreliert. Daher werden für Aminosäuren aus sehr flexiblen Strukturbereichen oder für ungefaltete Proteine höhere Signalintensitäten bei gleicher Signalamplitude (!) beobachtet wie für Kernspinresonanz-Signale von Aminosäuren aus sehr definierten Strukturbereichen. Für die meisten nativ gefalteten globulären Proteine, die keine dynamischen Regionen mit mehr als 10 bis 20 zusammenhängenden Aminosäuren aufweisen, ergibt das ^1H - ^{15}N -Korrelationsexperiment sonst ein Spektrum mit relativ ähnlichen Signalintensitäten für alle Aminosäurereste. Im Gegensatz hierzu zeigt das 2D-HSQC-Spektrum der hier verwendeten Twisted gastrulation Probe allerdings stark unter-

schiedliche Signalintensitäten. Neben einer sehr großen Anzahl von Kreuzsignalen, die im Spektrum eine chemische Verschiebung für Protonen zwischen 7.5 und 8.7 ppm aufweisen und eine hohe Signalintensität zeigen, existieren wenige Signale vor allem im Randbereich des 2D-Spektrums (^1H chemische Verschiebung 8.7 bis 10.5 ppm und 6.5 bis 7.5 ppm), die eine scheinbar deutlich geringere Signalintensität aufweisen, deren Signalbreite aber dafür deutlich größer ist als der meisten im Zentrum des 2D-Spektrums liegenden Kernspinresonanz-Signale. Während letztere auf die Anwesenheit einer globulär gefalteten Proteinspezies hindeuten, resultieren die sehr intensiven Signale im Zentrum des 2D-Spektrums scheinbar von ungefaltetem Protein beziehungsweise Proteinregionen. Dies ist ein klarer Hinweis, dass die verwendete Kernspinresonanz-Probe entweder eine Proteinspezies enthält, in der ein großer Bereich ungefaltet und dynamisch ungeordnet vorliegt oder aber mehrere Proteinspezies enthält, von denen ein Großteil vor allem fehl- und ungefaltete Proteinkonformere sind. Da bioinformatische Sequenzanalysen keinerlei Hinweise darauf geben, dass es sich bei Twisted gastrulation um einen Vertreter der sogenannten *intrinsically disordered proteins* handelt, erscheint der erste Erklärungsversuch als sehr unwahrscheinlich. Zudem haben die Interaktionsanalysen gezeigt, dass das in Prokaryoten hergestellte rekombinante Twisted gastrulation spezifisch BMP Liganden zu binden vermag. Auch die Beobachtung, dass die für Twisted gastrulation aus *E.coli* mittels Oberflächenplasmonresonanz beobachtete Interaktionskinetik einen für eine 1:1-Interaktion untypischen biphasischen Kurvenverlauf aufwies, der auf die Anwesenheit von multiplen Twisted gastrulation Spezies mit unterschiedlichen BMP-Bindungseigenschaften hindeutet, unterstreicht die Wahrscheinlichkeit, dass die Renaturierung des aus Einschlusskörpern isolierten denaturierten Twisted gastrulation möglicherweise zur Bildung heterogener Proteinspezies geführt hat. Eine Weiterführung einer Kernspinresonanz-gestützten Strukturanalyse des freien Twisted gastrulation bedarf daher zunächst einer effektiven Abtrennung der fehlgefalteten Proteinspezies, um so eine homogene Proteinprobe für die Analyse mittels Kernresonanz bereitzustellen. Dies könnte beispielsweise durch Anwendung einer Affinitätschromatographie unter Verwendung eines BMP-2-beschichteten Säulenmaterials erfolgen, wie dies auch erfolgreich bei der Aufreinigung des BMP Typ I-Rezeptors BMPRII angewandt wurde (Kotzsch et al., 2009). Allerdings bedeutet die Abtrennung auch, dass die bisher angenommenen Ausbeuten

für isotopenmarkiertes Twisted gastrulation deutlich niedriger wären und gegebenenfalls zusätzlich eine Optimierung von Expression und/oder der Renaturierung zwingend erforderlich ist.

4.2.3 Strategien zur Strukturaufklärung von Twisted gastrulation mittels Röntgenbeugung

Sequenzanalysen von Twisted gastrulation deuten an, dass das Protein aus zwei Domänen/Regionen aufgebaut ist, die über eine lange Schleifenregion verknüpft sind. Hierdurch erscheint eine Kristallisation des freien Modulatorproteins eventuell aufgrund flexibler Bereiche schwierig und wie schon zuvor erwähnt, verliefen erste Kristallisationsversuche von freiem Twisted gastrulation ohne Erfolg. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Strukturanalyse des BMP Typ I-Rezeptors BMPR-IA gemacht. Während die Strukturanalyse des Komplexes von BMPR-IA gebunden an BMP-2 und GDF-5 mittels Röntgenbeugung erfolgreich durchgeführt werden konnte, scheiterte die Kristallisation der Ektodomäne des freien Rezeptors trotz vielfacher Optimierungsversuche (T. Mueller persönliche Mitteilung, Harth, Kotsch, Sebald, et al., 2010). Die anschließend durchgeführte Strukturanalyse mittels Kernresonanzspektroskopie zeigte, dass eine lange Schleifenregion im ungebundenen Zustand des Rezeptors dynamisch vorliegt (Klages et al., 2008) und damit die notwendige Ausbildung eines regulären Gitters bei Kristallisation wahrscheinlich verhindert. Dieser flexible Bereich bildet jedoch zugleich das Zentrum der Interaktionsfläche mit BMPs und wird beispielsweise bei Komplexbildung mit BMP-2 (Kirsch, Sebald, et al., 2000; Keller et al., 2004) strukturell fixiert, so dass die Kristallisation des Rezeptors im Komplex ermöglicht wird. Auch andere Bindepartner, die mit der Schleifenregion interagieren, sind in der Lage die die Kristallisation hemmende Flexibilität zu unterbinden. So konnte ein BMPR-IA neutralisierendes Antikörperfragment, Fab AbD1556, erfolgreich verwendet werden, um die Struktur der BMP Typ I-Rezeptorektodomäne erfolgreich aufzuklären (Harth, Kotsch, Hu, et al., 2010). Diese Studie zeigte zudem, dass die Konformation der Schleifenregion abhängig ist von dem jeweiligen Bindepartner und unterschiedliche Konformationen einnehmen kann.

Für die Strukturaufklärung von Twisted gastrulation bedeutet dies, dass auch hier trotz einer scheinbar höheren Komplexität die Kristallisation eines Komplexes von Twisted gastrulation gebunden an BMP-2 möglicherweise höhere Erfolgsaussichten hat, als die Kristallisation von Twisted gastrulation in seinem ungebundenen Zustand. Zudem ermöglicht nur die Strukturaufklärung des Twisted gastrulation-BMP Komplexes direkte Einblicke in die Protein-Protein-Interaktion und ist daher bereits aus diesen Gründen einer Strukturanalyse des isolierten Proteins vorzuziehen.

Erste Versuche, einen binären Twisted gastrulation-BMP-Komplex zu präparieren, verliefen ohne Erfolg. Hierfür wurde aus Insektenzellen gewonnenes Twisted gastrulation ohne enzymatisch verkürzte Glykanstrukturen verwendet, da dieses bei den Interaktionsstudien mittels Oberflächen-Resonanz-Spektroskopie, die höchste BMP-2 Affinität aufwies. Trotz dessen war die Stabilität des Komplexes nicht ausreichend, um ihn mittels Größenausschlusschromatographie aufzureinigen und es wurde lediglich Twisted gastrulation einzeln von der Säule eluiert. Da BMP-2 unter den für die Komplexbildung und -isolierung benötigten Pufferbedingungen und Konzentrationen sehr schlecht löslich ist, führt die Dissoziation von BMP-2 aus dem Komplex unmittelbar zu dessen Präzipitation (Ruppert et al., 1996; Scheufler et al., 1999). Möglicherweise ist die Dissoziationsrate von Twisted gastrulation aus dem Komplex mit BMP-2 größer, als für den BMP-2:BMPR-IA-Komplex, welcher als erfolgreicherer Ansatz als Vergleichspunkt dient. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Bindung von Twisted gastrulation im Gegensatz zur extrazellulären Domäne von BMPR-IA, die Löslichkeit nicht verbessert. Möglicherweise werden durch die Bindung von der extrazellulären Domäne des BMPR-IA mehr hydrophobe Bereiche von BMP-2 bedeckt und dadurch dessen Löslichkeit erhöht, als durch die Bindung von Twisted gastrulation. Um die Präzipitation von BMP-2 zu verhindern, besteht zum einen die Möglichkeit rekombinant in eukaryotischen Zellen hergestelltes BMP-2 zu verwenden, dessen Löslichkeit durch Glykosylierung verbessert ist. Die eukaryotische Expression dessen ist allerdings wesentlich komplexer, da dies nur in Form des Präpro-Proteinkomplexes erfolgreich ist und nur geringe Ausbeuten erhalten werden. Zudem erhöht sich die Heterogenität des Komplexes durch die Verwendung von glykosyliertem BMP-2, was wiederum die Ausbildung von Proteinkristallen verhindern kann.

Zum anderen kann man einen weiteren Bindepartner in den Komplex einbringen, der einen positiven Effekt auf die Löslichkeit von BMP-2 ausübt, aber die Interaktion von BMP-2 und Twisted gastrulation nicht stört.

Daher sollte die Präparation eines ternären Komplexes aus Ligand, Rezeptor und Modulatorprotein etabliert werden. Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien bezüglich der Rezeptoren geht hervor, dass Twisted gastrulation wie auch die Typ I-Rezeptoren im *wrist*-Epitop von BMP-2 binden, woraufhin nur die Verwendung eines Typ II-Rezeptors als Alternative zur Verfügung steht. Da die Affinität von BMP-2 gegenüber seiner Typ II-Rezeptoren allerdings gering ist, wurde die BMP-2 Variante L100K/N102D verwendet und deren 60fach erhöhte Affinität gegenüber der extrazellulären Domäne des Rezeptors ActR-IIB ausgenutzt, um einen stabilisierenden Effekt auf die Löslichkeit von BMP-2 zu erzielen (Weber et al., 2007). Beide Proteine wurden im Zuge dessen nach bestehenden Aufreinigungsprotokollen präpariert, wobei diese zusätzlich optimiert werden konnten. Die Bindungseigenschaften der Einzelkomponenten wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie überprüft, sowie der stabilisierende Effekt der Ektodomäne des Typ II-Rezeptors ActR-IIB auf die Löslichkeit von BMP-2 bei der Isolierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes mittels Größenausschlusschromatographie nachgewiesen. Im Anschluss daran wurde versucht, ternäre Komplexe aus Modulatorprotein, Rezeptor und Ligand zu präparieren. Zunächst wurde dies mit Twisted gastrulation aus Insektenzellen ohne enzymatisch verkürzte Glykanstrukturen durchgeführt und es konnte die Präparation eines ternären Komplexes nachgewiesen werden.

Um einen Komplex zu erhalten, der keine posttranslational modifizierten Komponenten beinhaltet, wurde die Präparation auch mit nicht glykolysiertem Twisted gastrulation aus *E.coli* getestet. Dabei wurde die Vermutung bestätigt, dass das aus *E.coli* präparierte Twisted gastrulation verschiedene Proteinspezies enthält, von denen nicht alle in die Komplexbildung eingegangen sind und stattdessen in einem zusätzlichen Elutionsmaximum separat von der Gelfiltrationssäule eluierten. Da während einer wiederholten Analyse des zuvor erhaltenen ternären Komplexes keine erneute Abtrennung von alleinigem Twisted gastrulation beobachtet wurde, kann geschlussfolgert werden, dass auch mit aus *E.coli* präpariertem Protein, welches im zellbasierten Assay und bei der Entwicklung der Mandibularen abgeschwächte bis

keine Aktivität zeigte, stabile Komplexe erhalten werden, die für Kristallisationsversuche verwendet werden können. Faltungskonformere, die keine oder verringerte Affinität BMP-2 gegenüber aufweisen, konnten durch die Präparation und anschließende Isolierung der Komplexe mittels Größenausschlusschromatographie erfolgreich abgetrennt werden.

Bei der Verwendung von Twisted gastrulation aus HighFive™ Zellen scheint alles hinzugegebene Protein in den Komplex einzugehen, da von vornherein neben dem Elutionsmaximum für den ternären Komplex keine weiteren Elutionsmaxima zu beobachten waren, die auf die Elution einzelner, nicht in den Komplex eingegangener Komponenten hinweisen. Dies bestätigt die von M. Oelgeschläger beobachtete Bindung von zwei Molekülen Twisted gastrulation pro BMP-2 Dimer (Oelgeschläger et al., 2003).

Dass die Verschiebung des Elutionsmaximums im Elutionsprofil nicht so stark ausgefallen ist, wie erwartet liegt darin begründet, dass für die Größenbestimmung von Proteinen und Proteinkomplexen weniger das Molekulargewicht entscheidend ist, sondern vielmehr der hydrodynamische Radius der Moleküle. Eine Eichgerade wird in der Regel mit Proteinen erstellt, deren Struktur globulär ist. Abweichungen von den mittels einer Eichgeraden ermittelten Molekulargewichten zu den theoretisch bestimmten werden erhalten, sobald die Struktur eines Moleküls von der globulären Form abweicht und beispielsweise stäbchenförmig ist. Dies hat zur Folge, dass das durch die Größenausschlusschromatographie bestimmte Molekulargewicht größer ist, da die längste Ausdehnung für die Geschwindigkeit ausschlaggebend ist, mit der das Säulenmaterial passiert werden kann. Bei der Einzelanalyse der Ektodomäne des ActR-IIB wie auch von Twisted gastrulation aus *E.coli* wurden Molekulargewichte ähnlich der theoretisch bestimmten erhalten. Dies entspricht der Erwartung in Bezug auf die kompakte Struktur der extrazellulären Domäne des ActR-IIB und lässt die Vermutung zu, dass es sich bei Twisted gastrulation auch um ein kompaktes globuläres Protein handelt. Für das Protein aus Insektenzellen war das apparente Molekulargewicht hingegen deutlich höher als erwartet, wobei die Ursache hierfür sehr wahrscheinlich in der Glykosylierung liegt, die bereits bei der SDS-PAGE Analyse zu einem abweichenden Laufverhalten des Proteins führt. Dass der ternäre Komplex im Vergleich zum Komplex aus der Ektodomäne des ActR-IIB und BMP-2 kaum eine Veränderung im Elutionsvolumen aufweist, liegt vermutlich an der Anordnung der

Moleküle. Möglicherweise fügt sich Twisted gastrulation so in das *wrist*-Epitop des binären Komplexes ein, dass dies zu keiner Änderung der räumlichen Ausdehnung führt, die für das Elutionsverhalten des Komplexes ausschlaggebend wäre (Abbildung 60).

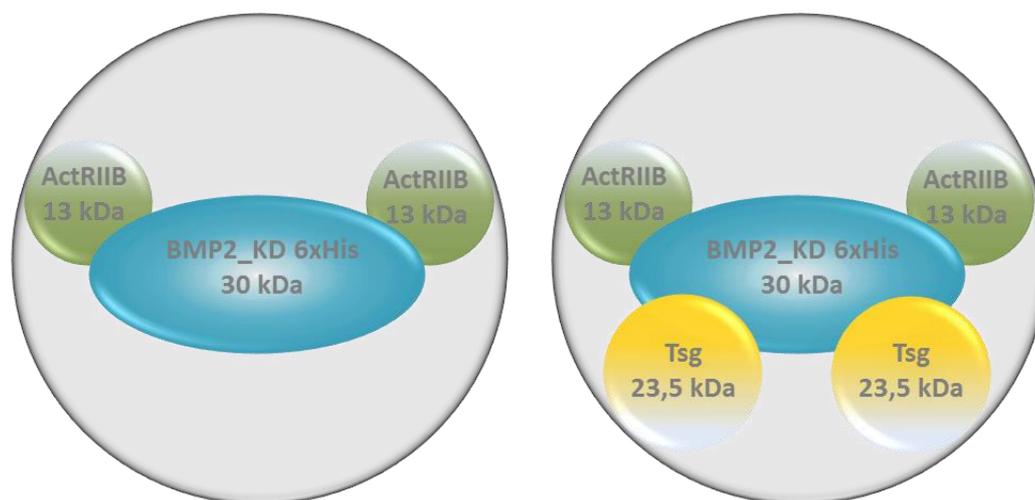


Abbildung 60: Schematische Darstellung der (möglichen) Anordnung der Einzelkomponenten während der binären und ternären Komplexbildung.

Die Möglichkeit der ternären Komplexbildung, sowohl mit Twisted gastrulation aus Insektenzellen wie auch aus *E.coli*, bietet bei erfolgreicher Kristallisation sogleich die Möglichkeit, einen Hinweis auf die Rolle der Glykosylierung in der Interaktion zu erhalten. Die heterogene Glykosylierung des Proteins aus Insektenzellen, kann durch die Verwendung von Kifunensin während der Expression und dadurch ermöglichte enzymatische Verkürzung im Anschluss daran nahezu homogen gestaltet werden.

4.3 Die N-Glykosylierung von Twisted gastrulation beeinflusst die Bindung zu BMP-2

Wie bereits beschrieben, verfügt Twisted gastrulation über potentielle Glykosylierungsstellen, die variabel bedient werden, wie die Expression in Insekten- und Säugerzellen zeigt. Allerdings kann eine heterogene Glykosylierung für die Strukturanalyse mittels Proteinkristallisation problematisch sein. Daher wurde versucht, die Glykanstrukturen vollständig zu entfernen, beziehungsweise Protein mit verkürzten homogenen Glykanstrukturen zu erhalten.

Bei dem Versuch, die zumeist heterogenen Glykanstrukturen zu verkürzen oder zu entfernen, wurden auch Veränderungen in Hinsicht auf die Affinität zu BMP-2 beobachtet. So zeigt mit Endoglykosidase H oder Peptid-N-Glykosidase F behandeltes Twisted gastrulation bei Oberflächen-Plasmonresonanz-Analysen zum Teil niedrigere Signale und schnellere Dissoziationsraten, die sich zwischen denen von nicht glykosyliertem Protein aus *E.coli* und unbehandeltem Protein aus Insektenzellen einordnen ließen. Wie die aus der Massenspektrometrie erhaltenen Daten zeigten, konnte durch die Peptid-N-Glykosidase F kein vollständig deglykosyliertes Protein erhalten werden, da eventuell nicht alle Glykanstrukturen unter nativen Spaltbedingungen zugänglich sind und so nicht der Effekt einer kompletten Deglykosylierung beobachtet werden konnte.

In der Wirkung auf Zellen, welche durch Inhibition der BMP-2 Aktivität bestimmt wurde, war der Unterschied zwischen unbehandeltem und mit Peptid-N-Glykosidase F deglykosyliertem Protein relativ gering. Ein deutlicher Unterschied in den mittleren inhibitorischen Konzentrationen zeigte sich jedoch beim Vergleich mit Twisted gastrulation aus *E.coli*, die deutlich zu höheren Konzentrationen verschoben ist. Scheinbar reichen die nach der Behandlung mit Peptid-N-Glykosidase F verbleibenden partiellen Glykanstrukturen aus, um im zellbasierten Nachweisverfahren nahezu vollständige biologische Aktivität herzustellen, wohingegen das von vornherein nicht glykosylierte Protein aus *E.coli* die Wirkung von BMP-2 deutlich schlechter inhibiert.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Anna Petryk (University of Minnesota, Minneapolis, USA) wurde die biologische Aktivität in einem weiteren komplexeren Nachweisverfahren bestimmt (Billington et al., 2011). Hierfür wurden die Mandibularen 10.5 Tage alter Mausembryonen explantiert (Jaskoll et al., 2005) und mit Ligand und Modulatorprotein benetzten Kugeln versehen. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte anschließend die Überprüfung der Expression des Reportergens *Msx2* durch *in situ* Hybridisierung (MacKenzie et al., 1992; Sasaki & Hogan, 1993). Die Expression von *Msx2* wird durch BMP-4 induziert. Kann eine Expression in Gegenwart der Modulatorproteine nicht nachgewiesen werden, lässt diese auf eine inhibierende Wirkung von Twisted gastrulation schließen. Auf diese Weise konnten die mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie und Alkalische Phosphatase-Assay erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Das aus Insektenzellen erhaltene glykosylierte Protein zeigte, wie auch das aus murinen Zellen erhaltene Twisted gastrulation, einen inhibierenden Effekt BMP-4 gegenüber. Bei Behandlung der Mandibularen mit nicht glykosyliertem Protein aus *E.coli*, konnte hingegen keine Inhibition der Expression von *Msx2* nachgewiesen werden. Eine Mutation der Glykosylierungsstellen, welche in der Arbeitsgruppe um Dr. Anna Petryk durchgeführt wurde, zeigte dass die Deletion der Glykanstrukturen zu einem Verlust der BMP-2/-4 Bindung führte (Billington et al., 2011).

Da es bisher keine genauen Informationen zum molekularen Bindungsmechanismus gibt, bleibt offen, wie die Glykosylierung die Interaktion von Twisted gastrulation und BMP-2/4 beeinflusst, allerdings scheint die Glykosylierung für eine hochaffine Wechselwirkung beider Proteine notwendig zu sein. Möglicherweise stellen auch metabolisch bedingte unterschiedliche Glykosylierungen eine weitere Möglichkeit für eine Feinregulierung des komplex regulierten Netzwerks der BMP-Wachstumsfaktoren dar. Um dies näher charakterisieren zu können, wurden in einer weiterführenden Mutagenesestudie im Rahmen der Masterarbeit von L. Kalkenings die im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisierten Glykosylierungsstellen Asn 52 und Asn 81 separat stumm geschaltet. Die Glykosylierungsstelle im C-terminalen Bereich wurde hierbei nicht verändert, da dieser Bereich des Proteins für die Interaktion mit Chordin verantwortlich ist (Oelgeschläger et al., 2003).

Bei einem Austausch der Aminosäure Asparagin 81 gegen Glutamin wurde nicht mit einer Veränderung der BMP-Bindungseigenschaften gerechnet. Obwohl diese Aminosäure in den verschiedensten Organismen hoch konserviert ist, ist sie als potentielle Glykosylierungsstelle durch einen Austausch von Serin in der Glykosylierungssequenz Asn-Xxx-Ser/Thr gegen Prolin deletiert. Somit scheint diese posttranslationale Modifikation nicht essentiell für die biologische Aktivität zu sein. Die Bestimmung der Bindungseigenschaften dieser Twisted gastrulation Variante mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie bestätigten dies, allerdings zeigte auch der Austausch der Aminosäure Asparagin 52 gegen Glutamin keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten zu BMP-2. Dies spricht dafür, dass eventuell doch beide Glykosylierungsstellen, wenn nicht sogar alle drei, für die biologische Aktivität verantwortlich sind und die Deletion einer einzelnen Glykosylierung nur einen geringen Einfluss zeigt. Dass offensichtlich nicht das gleichzeitige Vorhandensein aller Glykosylierungen für die biologische Aktivität notwendig ist, wird sowohl bei der Expression des murinen Twisted gastrulation in murinen Zellen als auch bei der des Proteins aus *Xenopus leavis* in Insektenzellen deutlich, da immer Proteinspezies unterschiedlichen Glykosylierungsgrades sekretiert werden (Billington et al., 2011). Dass der Einfluss der Glykosylierung im zellbasierten Assay und während der Entwicklung der Mandibularen größer zu sein scheint, als die Analysen mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie widerspiegeln, hängt vermutlich auch mit dem Vorhandensein endogener Faktoren zusammen, die beispielsweise für eine schnellere Degradation von nicht glykosyliertem Protein verantwortlich sein können.

4.4 Mutagenesestudien grenzen ein mögliches Bindeepitop im N-terminalen Bereich von Twisted gastrulation ein

Um neben der Strukturanalyse einen Einblick in die molekulare Interaktion von Twisted gastrulation und BMP-2 zu erhalten, wurde ein Verfahren entwickelt, das eine effiziente Expression und Analyse von Proteinvarianten, in denen einzelne Aminosäuren substituiert wurden, zulässt. Da es bisher lediglich Hinweise darauf gibt, dass sich das BMP-2 Bindeepitop im N-terminalen Bereich von Twisted gastrulation befindet, sollte eine möglichst umfassende Analyse durchgeführt werden, woraus eine Vielzahl von zu untersuchenden Proteinvarianten resultierte. Da die Herstellung einer solch hohen Anzahl von Proteinvarianten in *E.coli* oder Insektenzellen einen enormen zeitlichen und materiellen Aufwand bedeutet, wurde die Expression in transient transfizierten Freestyle™ 293 F-Zellen etabliert. Nach dem Einbringen des die Gensequenz enthaltenden Plasmids in die Zellen, wird das Protein nach 4 bis 5 Tagen im Expressionsüberstand erhalten. Da auch bei dieser Möglichkeit der Proteinherstellung, in Anbetracht der hohen Anzahl von Proteinvarianten, auf eine anschließende Aufreinigung dieser verzichtet werden sollte, erfolgte die Analyse der Bindungseigenschaften direkt mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie. Durch die Fusion von beispielsweise V5-, avi- oder Hexahistidin-Peptidsequenzen, über die eine gezielte Immobilisierung der Proteinvarianten an der Biosensor-Oberfläche erfolgen kann, sollte die Notwendigkeit einer vorherigen Aufreinigung aus dem Expressionsüberstand entfallen. Zudem werden durch die direkte Immobilisierung der Proteinvarianten deutlich geringere Mengen an Protein benötigt, als wenn diese als Analyt bei der Oberflächen-Plasmonresonanz-Analyse eingesetzt würden. Dadurch kann der Expressionsmaßstab klein gestaltet werden.

Zuerst wurde die Immobilisierung der Proteinvarianten mittels Hexahistidin-Sequenz auf einem mit tris-NTA und darüber gebundenen Ni²⁺-Ionen beschichteten HTG-Biosensor (Bio-Rad) durchgeführt. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise besteht in der Wiederverwendung des Biosensors, da die immobilisierten Twisted gastrulation Varianten sich nach Abschluss der Interaktionsanalyse ohne Rückstände von der Oberfläche des Biosensors durch Perfusion einer Imidazol-haltigen Lösung entfernen lassen. Allerdings lieferten die Messungen mit BMP-2 als Analyt keine auswertbaren Daten, da auch BMP-2 direkt mit der Oberfläche des Biosensors

interagierte. Eine Optimierung des Messpuffers dahingehend, diese Interaktion zu unterbinden, resultierte in der Dissoziation der Liganden von der Biosensoroberfläche, wodurch weitere Messungen ausgeschlossen wurden. Möglicherweise stellt die Verwendung einer His₁₀-Sequenz einen Lösungsansatz dar, da diese eine höhere Affinität zu der Metallchelate-Oberfläche aufweisen sollte.

Ebenso wurde eine an die Proteinvarianten fusionierte V5-Sequenz für die Immobilisierung an der Biosensoroberfläche getestet. Über einen direkt auf einem GLC-Sensor immobilisierten α -V5-Antikörper wurden die Fusionsproteine durch Überleiten der Expressionsüberstände gebunden. Die Immobilisierung verlief allerdings sehr ineffizient, da die Expressionsraten mit den bis dahin verwendeten pcDNA3-basierten Expressionsvektoren gering war. Zusätzlich zeigt die nicht-kovalente Immobilisierung der Proteinvarianten eine fortwährende Dissoziation dieser von der Biosensoroberfläche, wodurch keine zuverlässige Auswertung der erhaltenen Sensorgramme gegeben war.

Letztlich bot die Herstellung von Proteinvarianten mit einer fusionierten avi-Sequenz in einem pHlsec-basierten Vektor eine Lösung. Für die Immobilisierung der Proteinvarianten an der Biosensoroberfläche wurden diese nach der Expression *in vitro* gerichtet an der avi-Sequenz biotinyliert. Die Immobilisierung erfolgte schließlich nahezu irreversibel durch Bindung an auf der GLC-Biosensoroberfläche immobilisiertes Neutravidin. Dadurch ist die Wiederverwendung des Biosensors nicht mehr gegeben, allerdings gelang es nur so, die Interaktion zu BMP-2 ohne Nebeneffekte, wie unspezifische Bindung des Analyten an die Biosensoroberfläche oder die Dissoziation des Liganden davon zu messen. So konnte eine Expressions- und Analyse-methode etabliert werden, die schnell Aufschluss über den Einfluss von Aminosäuresubstitutionen auf das BMP-2 Bindeverhalten gibt.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde keine Quantifizierung der tatsächlichen Beladungsdichte durchgeführt, die belegt, dass diese tatsächlich auf die Immobilisierung von Twisted gastrulation zurückzuführen ist. In später von L. Kalkenings durchgeführten Messungen zu weiteren Proteinvarianten im Rahmen der Masterarbeit, erfolgte die Überprüfung durch Überleiten eines α -V5-Antikörpers, womit die beobachtete Beladungsdichte für jede Proteinvariante bestätigt werden konnte.

Für eine erste Auswahl von Aminosäuresubstitutionen, war neben den von A. Bogan und K. Thorn identifizierten Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Arginin, die häufig an der Interaktion von Proteinen beteiligt sind (Bogan & Thorn, 1998), auch die Mutagenesestudien von M. Oelgeschläger maßgeblich (Oelgeschläger et al., 2000, 2003). Dabei stand neben der Lokalisation des BMP-2/-4 Bindeepitops im N-terminalen Bereich von Twisted gastrulation auch die Substitution der Aminosäure Tryptophan 67 im Fokus. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen des Einflusses von Twisted gastrulation auf die BMP-Bindung der Rezeptoren in dieser Arbeit konnten die von Zhang et al. durchgeführten Messungen bestätigt werden, dass sich das Bindeepitop für Twisted gastrulation im *wrist*-Epitop von BMP-2/-4 befindet, in dem auch die Bindung der Typ-I Rezeptoren erfolgt, wobei die Epitope nicht identisch sind (J.-L. Zhang et al., 2007). Die Aufklärung der Struktur des BMP-2:BMPR-IA-Komplexes zeigte, dass unter anderem die hydrophobe aromatische Aminosäure Phenylalanin 85 eine Schlüsselrolle bei der Erkennung des Rezeptors spielt (Abbildung 61). Möglicherweise wiederholt sich dieses sogenannte „*knob-into-hole*“-Motiv bei der Bindung von Twisted gastrulation an BMP-2 über die ebenfalls hydrophobe und aromatische Aminosäure Tryptophan 67.

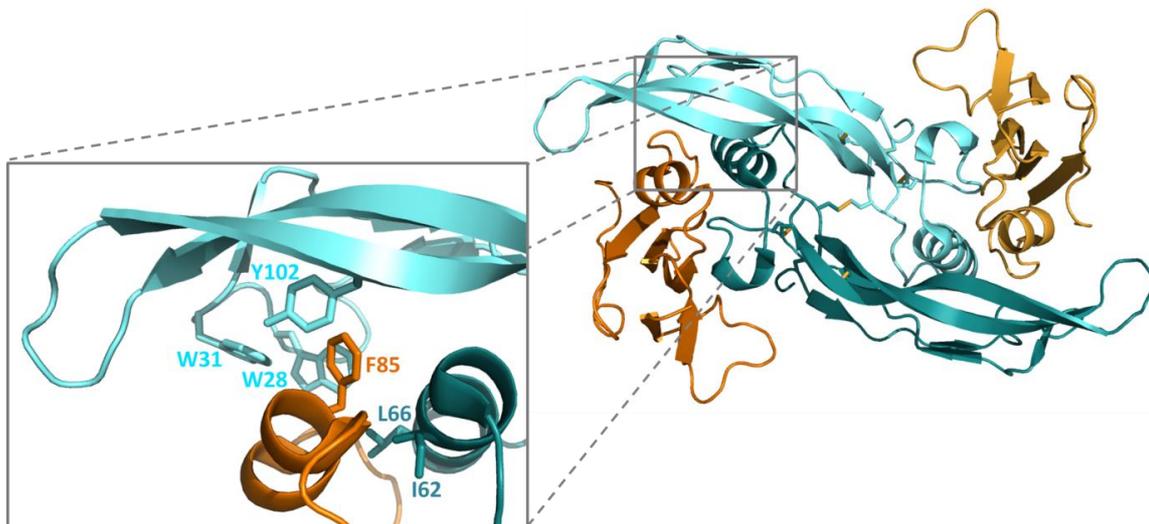


Abbildung 61: Darstellung eines binären Ligand-Rezeptor-Komplex und vergrößerte Ansicht des Interaktionsbereichs (RCSB: 2G00; Allendorph et al., 2006). Das BMP-2 Homodimer ist in blau dargestellt und die Ektodomänen des Typ-I Rezeptors BMPR-IA in orange. In der vergrößerten Ansicht ist das „*knob-into-hole*“-Motiv dargestellt. Die Seitenkette von Phenylalanin 85 des Rezeptors bindet in die von beiden BMP-2 Monomeren gebildete hydrophobe Tasche (nach Nickel et al., 2001).

Aber auch die Erkenntnisse von Keller et al. (2004), dass neben den hydrophoben Wechselwirkungen bei der Bindung von BMP-2 und BMPR-IA Wasserstoffbrücken einen entscheidenden Beitrag leisten (Keller et al., 2004), gingen in die Auswahl der Aminosäuresubstitutionen ein. Twisted gastrulation weist jedoch keine Homologie mit anderen Proteinen oder Proteindomänen auf und aktuell gibt es keinerlei Strukturinformationen zu diesem Modulatorprotein, die beispielsweise Aussagen darüber zulassen, welche Seitenketten sich auf der Proteinoberfläche befinden. Dies führte zu einer systematischen Analyse der Aminosäureseitenketten Typtophan, Tyrosin und Arginin im gesamten Protein, sowie der Aminosäuren Glutamat und Aspartat im N-terminalen Bereich von Twisted gastrulation.

Die Substitution von Tryptophan 67 gegen Alanin führte bei der Analyse mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie nur zu einer verminderten Affinität gegenüber BMP-2, aber nicht zu einem vollständigen Bindungsverlust, wie von Oelgeschläger et al. (2003) beschrieben. Die von Oelgeschläger et al. durchgeführte Substitution von Tryptophan 67 erfolgte gegen Glycin und die Analyse der Mutante durch Injektion von mRNA in *Xenopus* Embryonen. Die Expression der mRNA führte zu Phänotypen mit reduzierten dorsalen Strukturen, wie sie von BMP-4 oder -7 Überexpressionen bekannt sind (Oelgeschläger et al., 2003). Die Überexpression dieser Wachstumsfaktoren hat eine vermehrte Ausbildung ventraler Gewebe zur Folge, da ein Missverhältnis zu den Faktoren entsteht, die diese Entwicklung inhibieren. Immunopräzipitationsversuche zeigten, dass die Proteinvariante W67G kein BMP-4 mehr binden konnte, was im *Xenopus* Embryo zu einer Erhöhung an frei verfügbarem Wachstumsfaktor führte, woraus ebenso eine ventralisierende Entwicklung resultierte (Oelgeschläger et al., 2003). Der Austausch einer Aminosäure gegen Glycin kann allerdings einen destabilisierenden Effekt auf die Proteinstruktur haben, da Glycin aufgrund der fehlenden Seitenkette, eine drastisch erhöhte konformationelle Flexibilität der Hauptkette aufweist. Die zeigt sich darin, dass Glycinreste besondere phi-/psi-Hauptkettentorsionswinkel einnehmen können, die für andere Aminosäuren nicht möglich sind. Glycinreste werden daher auch „Helix-brechende“ Faltungseigenschaften zugeordnet und können helikale Bereiche unterbrechen. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass biologisch inaktives Protein entsteht. Dass die in dieser Arbeit hergestellte Proteinvariante W67A keinen so deutlichen Bindungsverlust

zeigte, liegt eventuell daran, dass die Substitution gegen Alanin und nicht gegen Glycin erfolgte.

Auch die Substitution von Tryptophan 190 führte zu einer geringen Erniedrigung der BMP-2 Affinität dieser Proteinvarianten, obwohl diese Positionen nicht in dem für die Interaktion vorhergesagten N-terminalen Bereich lokalisiert sind. Da Tryptophan 190 laut Sekundärstrukturvorhersage in eine α -Helix involviert ist, hat der Austausch gegen Alanin gegebenenfalls eine destabilisierende Wirkung auf diese, die sich möglicherweise bis in das BMP-2 Bindepitop auswirkt.

Interessanterweise führte die Substitution von Tryptophan 116 gegen Alanin zu einer geringfügigen Erhöhung der BMP-2 Affinität. Eventuell wird hierbei eine sterische Hinderung der raumeinnehmenden Seitenkette aufgehoben.

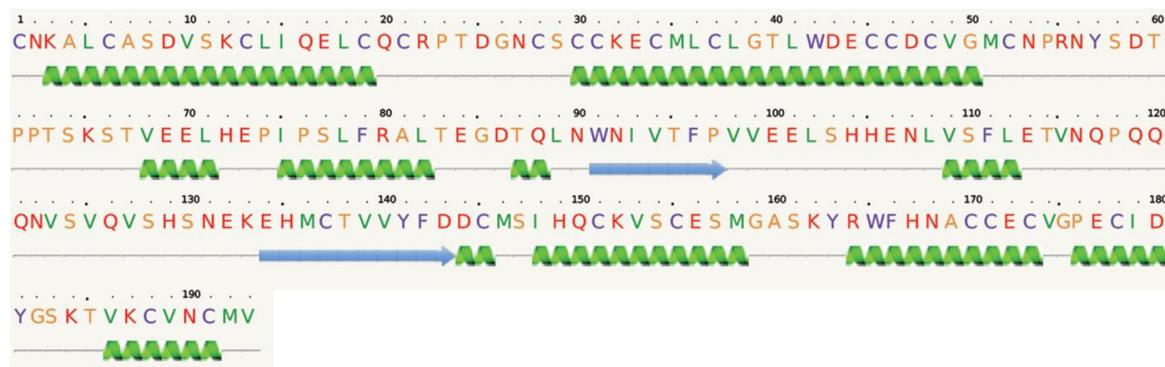


Abbildung 62: Sekundärstrukturvorhersage unter Verwendung der Aminosäuresequenz von Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis*. Grüne Spiralen markieren α -Helices, blaue Pfeile β -Faltblattstrukturen, den Bereichen dazwischen wurde keine Struktur zugeordnet. (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/phyre2/html/page.cgi?id=index>)

Der Austausch der aromatischen Aminosäure Tyrosin, die fast ausschließlich außerhalb des N-terminalen Bereichs an den Positionen 82, 166, 188 und 206 zu finden ist, blieb bis auf die Substitution von Tyrosin 166 gegen Alanin, ohne einen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen BMP-2 und Twisted gastrulation. Während die Tyrosine an den Positionen 82, 188 und 206, nach der Sekundärstrukturvorhersage (Abbildung 62), in Bereichen ohne definierte Sekundärstruktur liegen, ist Tyrosin 166 in eine β -Faltblattstruktur involviert. Die Substitution an dieser Position führt womöglich zu einer Destabilisierung der Struktur, die sich auch auf das BMP-2 Bindepitop auswirkt und zu einem um 30% verringerten Messsignal führt.

Neben den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin wurden vor allem geladene Aminosäuren substituiert. Grund für diese Auswahl ist vor allem, dass diese in der Regel lösungsmittlexponiert an der Proteinoberfläche vorzufinden sind und für Protein-Protein-Interaktionen an hochenergetischen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein können. Ähnliche Interaktionen wurden auch bei der Bindung des Rezeptors BMPR-IA an BMP-2 identifiziert (Kirsch, Sebald, et al., 2000; Keller et al., 2004). Ein negativer Einfluss konnte bei den Substitutionen der negativ geladenen Aminosäure Aspartat an den Positionen 68 und 72 von Twisted gastrulation beobachtet werden. Die erreichten Signalstärken betrugen lediglich 25 bis 50% im Vergleich zu wildtypischem Protein. Zusammen mit der Beobachtung bei der Proteinvariante W67A, kann so geschlussfolgert werden, dass zumindest dieser relativ begrenzte, konsekutive Bereich in die Interaktion mit BMP-2 involviert ist.

Eine *de novo* Strukturvorhersage, erstellt mit dem Struktursimulationsprogramm Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/phyre2/html/page.cgi?id=index>), diente einer erweiterten Auswahl von Proteinvarianten. Dabei gilt es allerdings zu beachten, dass das erhaltene Modell nicht der Realität entspricht, sondern lediglich anhand bekannter Strukturen bestimmten Aminosäureabfolgen entsprechende Sekundärstrukturelemente zugeordnet werden. Die Anordnung derer erfolgt zufällig und bezieht biophysikalische Aspekte der Proteinfaltung nicht ein. Auch die Ausbildung von Disulfidbrücken wird beispielsweise nicht berücksichtigt. Auffällig war die Sekundärstrukturvorhersage von zwei relativ langen α -Helices im N-terminalen Bereich (Abbildung 62), die sich mit Vorhersagen von anderen Programmen deckte und auf die sich die Auswahl weiterer Aminosäurepositionen für eine erweiterte Mutagenesereihe beschränkte (Tabelle 23). Hierzu wurden die vorhergesagten helikalen Bereiche strukturell so angeordnet, dass mittels der Amphiphilie-Verteilung eine potentielle, dem hydrophoben Proteinkern zugewandte Innenseite und eine dem Lösungsmittel zugewandte Außenseite für die jeweiligen Helices ermittelt beziehungsweise abgeschätzt werden konnte. Auf diese Weise wurden auf der Proteinoberfläche lokalisierte potentielle Aminosäurepositionen identifiziert unter denen dann auch hydrophobe Aminosäurereste zu finden waren. Ein weiteres Entscheidungskriterium für die Identifizierung der wahrscheinlichen Innen- und Außenseiten der Helices, war die Lokalisierung der Cysteinreste, von denen aufgrund ihrer

Existenz in Disulfidbrücken angenommen wurde, dass sie überwiegend zum hydrophoben Proteinkern ausgerichtet sind (Abbildung 63).

Tabelle 23: Übersicht zur zweiten Auswahl durchgeführter Aminosäure-Substitutionen in Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis* im Rahmen der Masterarbeit von L. Kalkenings.

Aminosäure-Substitution	Position		Bezeichnung
	Helix 1	Helix 2	
Lysin → Aspartat	28	57	K28D, K57D
Serin → Phenylalanin	33, 36		S33F, S36F
Valin → Tyrosin	35		V35Y
Leucin → Asparagin	39	61, 63	L39N, L61N, L63N
Isoleucin → Threonin	40	65	I40T, I65T
Glutamat → Arginin	42	58	E42R, E58R
Methionin → Serin		60	M60S

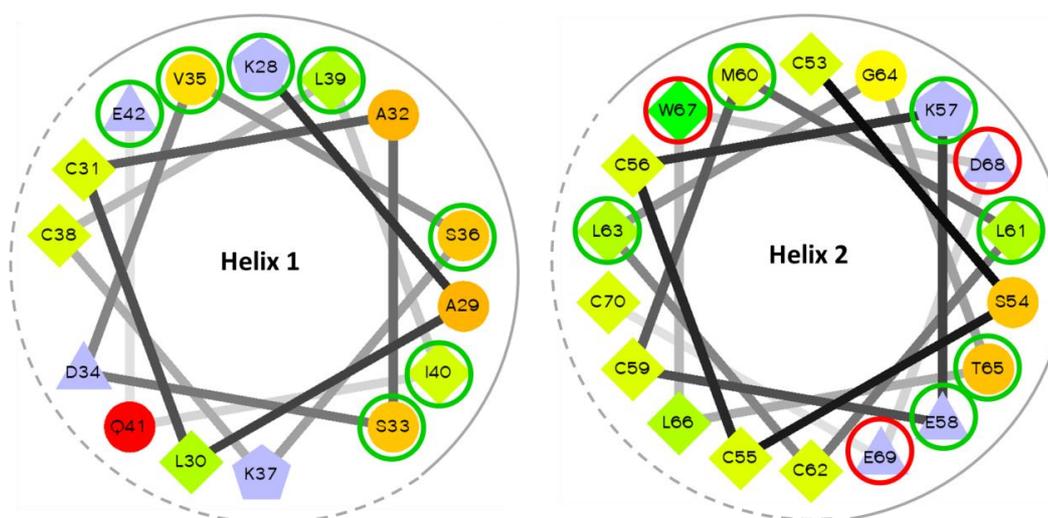


Abbildung 63: Schematische Darstellung der in der *de novo* Struktur ermittelten N-terminalen α -Helices. Die im Rahmen der ersten Auswahl substituierten Aminosäuren sind rot, die im Rahmen der zweiten Auswahl erfolgten Aminosäuresubstitutionen sind grün umrahmt. Die gestrichelten Linien markieren den wahrscheinlich dem hydrophoben Proteinkern zugewandten und die durchgehenden Linien den zur Proteinoberfläche ausgerichteten Bereich der Helices.

(<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>)

Die individuellen Substitutionen dreier Aminosäuren in den oben aufgeführten Bereichen führten dabei zu einem vollständigen Verlust der Bindung von BMP-2. Dabei handelt es sich um Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (V35Y, I40T, L63N). Zusätzlich wurde allerdings durch die Substitution von Leucin 63 zu Asparagin eine

weitere Glykosylierungsstelle eingefügt, wobei die Glykanstruktur an dieser Position offensichtlich die Interaktion zwischen Twisted gastrulation und BMP-2 beeinflusst. Vier weitere Positionen, bei denen zumeist ebenfalls polare ungeladene Aminosäuren (S33F, S36F, L39N, T65I) substituiert wurden, zeigten ein um 50% verringertes Messsignal. In Hinblick auf die drei Aminosäuren Tryptophan 67, Aspartat 68 und Aspartat 72 aus der ersten Auswahl, die wahrscheinlich an der Interaktion mit BMP-2 beteiligt sind, wird mit den Aminosäuren Leucin 63 und Threonin 65 diese Region auf der zweiten α -Helix im N-terminalen Bereich als mögliche Binderegion bestätigt. Aber auch in der ersten α -Helix des N-terminalen Bereichs sind Aminosäuren lokalisiert, die scheinbar eine weitere Binderegion für BMP-2 bilden.

Bei den so identifizierten Aminosäureresten in der N-terminalen Region von Twisted gastrulation, welche bei Mutation eine Verringerung der Bindung zu BMP-2 verursachen, ist allerdings zu beachten, dass neben einer essentiellen Beteiligung in der Protein-Protein Interaktionsfläche, auch alternative Mechanismen die Affinitätsänderung verursachen können. So kann der Austausch eines Rests oder mehrerer dieser auch eine Strukturänderung in Twisted gastrulation bewirken, so dass der Verlust der BMP-2 Bindung hierdurch indirekt verursacht werden kann. Die Sekundärstrukturanalyse ist hierbei der Unsicherheitsfaktor, da über die dreidimensionale Ausrichtung der Aminosäureseitenkette in der Struktur nur spekuliert werden kann und die fehlende Strukturinformation hier eine genaue Unterscheidung, ob der Aminosäurerest eine strukturstabilisierende Funktion aufweist oder vollständig dem Lösungsmittel zugewandt ist, zunächst unmöglich macht.

Allerdings existieren andere Hilfsmittel, wenn dreidimensionale Strukturdaten nicht zur Verfügung stehen, um auf diese Weise die Rolle der mutierten Aminosäurereste abschätzen zu können. So führt eine Fehlfaltung in der Regel zu einer Erniedrigung der Löslichkeit und fördert die Bildung von oligomeren Aggregaten, da zusätzliche hydrophobe Bereiche an die dem Lösungsmittel zugewandte Seite kommen. Zudem sollten sich auch die Parameter für die Aufreinigung sehr viel stärker gegenüber dem wildtypischen Protein verändern, als dies für den Einzelaminosäureaustausch erwartet wird, da durch die zumindest lokale Konformations- beziehungsweise Strukturänderung ein größerer Proteinbereich verändert wird.

Weitere Analysen können zusätzliche Indizien für die Abschätzung der Funktion liefern, so kann die Messung der Interaktion mit einem weiteren Bindungspartner eine

Aussage darüber geben, ob mögliche Konformationsänderungen beim Aminosäureaustausch global erfolgen oder wenn, dann nur sehr lokal begrenzt sind. Diese Methodik wurde für die Mutageneseanalyse von BMP-2 erfolgreich angewandt (Kirsch, Nickel, et al., 2000a), da die Bindung der extrazellulären Domäne des Typ I- und Typ II-Rezeptors zwar räumlich getrennt, aber die Bindeepitope strukturell miteinander gekoppelt sind. Führt die Substitution einer Aminosäure im Typ I-Rezeptor Epitop zu einer nicht sehr lokal begrenzten Strukturänderung, so führt dies unmittelbar auch zu einer Konformationsänderung im räumlich gekoppelten Typ II-Rezeptorepitop. So wäre eine sogenannte Strukturmutante dadurch gekennzeichnet, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure in einem der beiden Rezeptorbindeepitope dennoch Auswirkung auf die Bindungsaffinität zu beiden Rezeptorsubtypen aufwiese. Da auch für Twisted gastrulation eine weitgehend globuläre und, aufgrund der hohen Disulfidverbrückung, monolithische Struktur angenommen wird, wäre auch hier eine derartige indirekte Analyse der Konformation möglich. So könnte einerseits ein Antikörper verwendet werden, welcher nicht BMP-neutralisierend wirkt und somit nicht die Interaktion mit BMP-2 stört, der aber andererseits ein diskontinuierliches Epitop erkennt und dessen Bindung daher stark vom Faltungszustand von Twisted gastrulation abhängig ist. Allerdings sind die derzeit kommerziell zur Verfügung stehenden gegen Twisted gastrulation gerichteten Antikörper nicht hinreichend charakterisiert, so dass ein α -Twisted gastrulation Antikörper mit den beschriebenen Eigenschaften nicht für eine derartige Analyse zur Verfügung stand. Da Twisted gastrulation direkt mit dem BMP-Modulatorproteinen Chordin, Chordinlike 2 (CHL2) und möglicherweise mit Crossveinless-2 (die Berichte hierzu sind allerdings kontrovers) interagiert, wäre eventuell eine ähnliche Analyse auch unter Verwendung dieser Interaktionspartner möglich. Laut Oelgeschläger et al. (2003) findet allerdings die Interaktion mit den genannten BMP-Modulatorproteinen in der C-terminalen Region von Twisted gastrulation statt (Oelgeschläger et al., 2003), so dass aufgrund der räumlichen Entfernung des BMP-Bindeepitops möglicherweise nur globale Strukturänderungen auf diese Weise detektiert werden. Lokal begrenzte Konformationsänderungen können hierdurch eventuell nicht identifiziert werden, was somit deren Aussagekraft einschränkt. Zudem müssen aufgrund des hier eingesetzten Aufbaus mit immobilisierten Twisted gastrulation-Liganden die Modulatorproteine als Analyten in löslicher Form eingesetzt werden, was für die gewünschte

Analyse einen relativ großen Proteinbedarf nach sich zieht und somit die Nutzung kommerzieller Quellen für die Modulatorproteine ausschließt. Da zudem kein eigenes, hinreichend effizientes Expressionsverfahren für die drei genannten BMP-Modulatorproteine zur Verfügung stand, konnte eine derartige Analyse nicht durchgeführt werden.

Eine von der Interaktion mit weiteren Bindepartnern unabhängige Form der Strukturanalyse wäre die Messung von Circular dichroismus-Spektren, die wie zuvor erwähnt, eine direkte, wenn auch keine ortsgenaue Angabe über den Anteil an den drei Sekundärstrukturelementen α -Helix, β -Faltblatt und nicht strukturiert (*random coil*) wiedergibt. Da die Sekundärstrukturangaben allerdings mit relativ großen Fehlerweiten ($\pm 3-5\%$) behaftet sind, können wiederum kleinere Strukturänderungen nur schwer detektiert werden. Normalerweise kann dieser Ungenauigkeitsnachteil dadurch kompensiert werden, indem zusätzlich eine Analyse der thermisch induzierten Entfaltung durchgeführt wird, da die Entfaltungstemperatur hierbei ein sehr genaues und hochempfindliches Merkmal für die Faltungstabilität eines Proteins darstellt. Die Faltungstabilität kann hierbei entweder ebenfalls mittels CD-Spektroskopie ermittelt werden, indem das CD-Spektrum des Proteins im Rahmen einer Temperaturreihe gemessen wird. Alternativ kann auch die ThermoFluor Methodik angewendet werden. Hierbei wird das temperaturabhängige Verlöschen der Fluoreszenz eines dem Protein beigefügten Farbstoffs gemessen, der sich aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften an das thermisch denaturierte Protein anlagert. Die Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur ergibt somit eine Entfaltungskurve, aus deren Umkehrpunkt die Faltungsenergie ΔG errechnet werden kann. Ebenso kann dies ohne Zusatz von Fluoreszenzfarbstoffen durch Anwendung der Dynamische Differenzkalorimetrie (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) erfolgen, wobei letztere den Nachteil eines sehr großen Probenbedarfs aufweist. Allen drei letztgenannten Analysemethoden ist jedoch gemein, dass hierfür zunächst hochaufgereinigtes Protein notwendig ist und somit das in dieser Arbeit verwendete Verfahren einer transienten Expression der zu untersuchenden Twisted gastrulation Varianten mit einer „*in situ*“ Aufreinigung auf dem Sensor der Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie nicht zum Tragen kommt. Für die zu untersuchenden Mutanten müsste eine semipräparative Expression mit anschließender mehrstufiger Aufreinigung durchgeführt werden. Dennoch ist in Hinblick auf die Beurteilung

eventueller struktureller Veränderungen diesen Verfahren gegenüber den Interaktionsanalysen der Vorzug zu geben, da hier keine Einschränkung durch eine mögliche partielle Überlappung der Bindeepitope von BMP-2 und dem zweiten Interaktionspartner befürchtet werden muss und daher die Methodik uneingeschränkt für alle Aminosäurepositionen angewendet werden kann. Daher sollen bei Weiterführung des Projekts von den hier identifizierten Twisted gastrulation Varianten Mengen im Milligramm-Maßstab hergestellt, zur Homogenität aufgereinigt und anschließend mit einer der drei letztgenannten Verfahren, CD-Spektroskopie, ThermoFluor oder Dynamische Differenzkalorimetrie analysiert werden.

Allerdings besteht auch eine weitere Möglichkeit für die Interaktion zwischen Twisted gastrulation und BMP-2 darin, dass die Seitenketten von Twisted gastrulation gar nicht in die Bindung involviert sind. Ähnlich wie bei der Bindung der ersten Von Willebrand Typ C Domäne von Crossveinless-2 an das *wrist*-Epitop von BMP-2 (Abbildung 64), könnte auch ein Teil der Interaktion über Atome der Hauptkette des Modulatorproteins vermittelt werden (J.-L. Zhang et al., 2008). Für die Substitution von Aminosäureresten wäre in dem Fall keine Veränderung der Affinität zum Liganden zu erwarten.

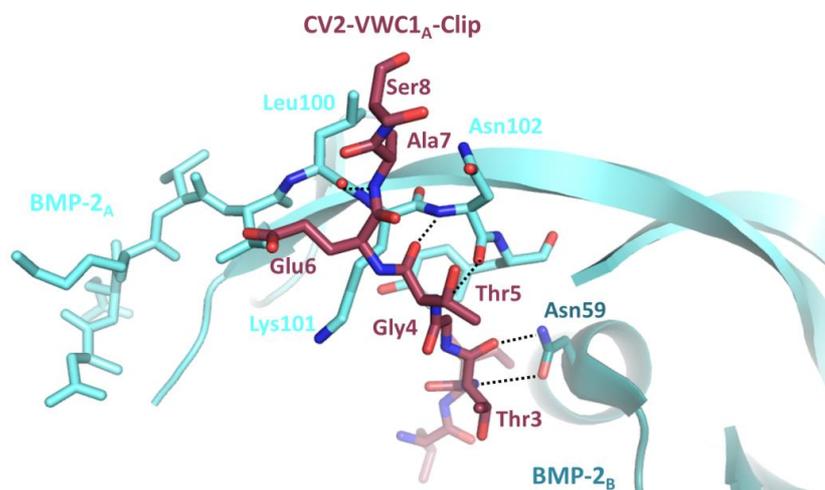


Abbildung 64: Darstellung der Interaktion zwischen BMP-2 und dem Clip-Segment der ersten von Willebrand Typ C Domäne von Crossveinless-2. Wasserstoffbrücken sind als gepunktete Linie dargestellt. (RCSB: 3BK3; J.-L. Zhang et al., 2008)

Zwei Bereiche in der N-terminalen Domäne konnten allerdings bereits mit den zuvor beschriebenen Aminosäuresubstitutionen eingegrenzt werden. Wie jedoch eingangs beschrieben, nimmt Twisted gastrulation unter den Modulatorproteinen eine Sonderstellung ein, da es sich um ein einzigartiges Protein handelt, dass auf Ebene der

Aminosäuresequenz keine Homologie zu anderen Proteinen oder Proteindomänen aufweist. Daher ist es nicht möglich dreidimensionale Strukturinformationen unter Verwendung bioinformatischer Werkzeuge zu generieren und einen Mechanismus für die Interaktion mit BMP-2 und anderen Modulatorproteinen zu erstellen.

Eine experimentelle Strukturanalyse für die Aufklärung der Struktur-/Funktionsbeziehungen von Twisted gastrulation bleibt daher weiterhin zwingend erforderlich. Mit der erfolgreichen Präparation des ternären Komplexes aus der Ektodomäne des Typ II-Rezeptors ActR-IIB, BMP-2 und Twisted gastrulation aus verschiedenen Expressionssystemen, konnte dafür eine gute Ausgangssituation geschaffen werden.

5 Zusammenfassung

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind extrazellulär vorkommende Wachstumsfaktoren und werden der Superfamilie der *Transforming Growth Factors* β (TGF- β) zugeordnet. Entgegen ihrem Namen spielen sie nicht nur eine Rolle bei der Ausbildung und Regeneration der Knochenmatrix, sondern regulieren bereits während der Embryonalentwicklung zahlreiche Abläufe. Unter anderem sind sie an der Festlegung der Körperachsen und Entwicklung der Organanlagen beteiligt. Später steuern sie das Wachstum von Organen und Geweben und sind schließlich im adulten Organismus für deren Homöostase und Regeneration verantwortlich. Bei fast allen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie erfolgt die Signalbildung nach derzeitigem Kenntnisstand durch die Bindung an transmembrane Serin/Threonin-Kinaserezeptoren, die in zwei Untergruppen unterteilt werden können. Dabei werden von einem Liganden jeweils zwei Typ I- und zwei Typ II-Rezeptoren gebunden, wodurch ein aktiver Komplex entsteht, der im Inneren der Zelle eine Signalkaskade auslöst.

Um die vielseitigen Aufgaben der BMPs spezifisch vermitteln zu können, gibt es zahlreiche Mechanismen, die Signalbildung stringent neben der Ligand-Rezeptor-Interaktion zu regulieren. Die *Small Mothers Against Decapentaplegic* (Smad)-Signalkaskade im Zellinneren wird beispielsweise durch die Interaktion der inhibitorischen Smads mit rezeptor-regulierten Smads oder durch den proteasomalen Abbau der rezeptor-regulierten Smads durch die Bindung von Ubiquitin-Ligasen der Smurf-Familie beeinflusst. Auch auf Membranebene besteht die Möglichkeit der negativen Signalmodulation durch Pseudorezeptoren oder der Verstärkung der Signalbildung durch positive Effektoren wie beispielsweise aktivitätssteigernde Co-Rezeptoren.

Ein Charakteristikum der TGF- β Superfamilie stellt jedoch die Vielzahl an sekretierten, löslichen Modulatorproteinen dar. Die meist glykosylierten Proteine üben, bis auf wenige Ausnahmen, einen antagonistischen Effekt auf die BMPs aus. Bei dem BMP-spezifischen Modulatorprotein Twisted gastrulation handelt es sich um ein extrazelluläres Glykoprotein, das im Gegensatz zu den meisten anderen BMP-

Modulatoren jedoch eine duale Funktion als Besonderheit aufweist. Es zeigt zum einen eine anti-BMP-Wirkung, indem es den BMP-inhibierenden Einfluss von Chordin durch Bildung eines stabilen ternären Komplexes verstärkt; andererseits kann Twisted gastrulation in Gegenwart spezifischer Metalloproteasen eine proteolytische Spaltung von Chordin und die anschließende Freisetzung von aktivem BMP fördern und so eine BMP-Aktivität vermittelnde Wirkung aufweisen. Twisted gastrulation hat keine beziehungsweise nur eine äußerst geringe Homologie zu anderen (Modulator)Proteinen. Um daher den komplexen Wirkmechanismus detailliert molekular beschreiben zu können, ist die Aufklärung der Struktur-/Funktionsbeziehungen essentiell.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten unterschiedliche Expressionsstrategien für die rekombinante Herstellung von Twisted gastrulation etabliert werden, welche eine umfassende Charakterisierung des Proteins *in vitro* ermöglichen. Erste Kristallisationsversuche von isoliertem Twisted gastrulation für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur mittels Röntgenbeugung verliefen ohne Erfolg, allerdings gelang die Präparation stabiler ternärer Proteinkomplexe für weiterführende Kristallisationsansätze. Hochdurchsatzverfahren für die Expression und Interaktionsanalyse erlauben zudem die Untersuchung einer Vielzahl von Twisted gastrulation-Proteinvarianten. Auf diese Weise konnten Aminosäuren identifiziert werden, die an der Wechselwirkung von Twisted gastrulation mit seinem Interaktionspartner BMP-2 beteiligt sind. Dies ermöglichte eine detaillierte Lokalisation des Bindeepitops im N-terminalen Bereich von Twisted gastrulation. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Glykosylierung von Twisted gastrulation für die Wechselwirkung mit BMP-2 von Bedeutung ist.

Eine experimentelle Strukturanalyse von Twisted gastrulation für die detaillierte Aufklärung des Mechanismus der Interaktion mit BMP-2 und anderen Modulatorproteinen bleibt allerdings weiterhin aufgrund der Einzigartigkeit dieses Modulatorproteins zwingend erforderlich. Für eine Fortsetzung der Untersuchungen bietet der stabile ternäre Komplex eine gute Voraussetzung in Hinblick auf weitere Kristallisationsansätze.

6 Summary

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are secreted growth factors belonging to the superfamily of *Transforming Growth Factors* β (TGF- β). In contrast to their name they are not only involved in bone morphogenesis and regeneration, but also regulate numerous events during embryonic development. Furthermore, they play a key role in body axis determination, embryonic patterning as well as organogenesis, later in the adult organism these factors control organ and tissue homeostasis and regeneration. At the current state of research all classical members of the TGF- β family signal through transmembrane serine/threonine kinase receptors, which can be subdivided into type I- and type II-receptors. For receptor activation the ligand induces receptor heteromerisation forming an active complex containing type I- and type II-receptors which subsequently triggers intracellular signaling cascades.

To ensure highly specific signaling a complex network of regulatory mechanisms has evolved. The *Small Mothers Against Decapentaplegic* (Smad) signaling cascade for example is modulated by inhibitory Smads interacting with the receptor-regulated Smads or through proteasomal degradation of the receptor-regulated Smads by binding to ubiquitin-ligases of the Smurf-family. In the membrane, pseudoreceptors such as BAMBI lacking a kinase domain or GPI-anchored co-receptors such as the RGM-receptor family or Cripto can positively or negatively regulate BMP/TGF- β signaling.

A highlight of the TGF- β superfamily is the multitude of different secreted soluble modulator proteins. Most present glycoproteins, which act as BMP-antagonists by interfering with BMP-signaling. The BMP-specific modulator Twisted gastrulation is such an extracellular glycoprotein, which however features an unique dual function. On the one hand, by forming a stable ternary complex it strongly enhances the BMP-antagonizing (anti-BMP) activity of another BMP-modulator Chordin. On the other hand, upon proteolytic processing of Chordin in this ternary complex in the presence of specific metalloproteases such as Tolloid, Twisted gastrulation facilitates the dissociation of the ternary complex releasing active BMP and thereby exerts a pro-(moting) BMP-activity.

Twisted gastrulation exhibits very low if at all any homology to other proteins and seems also unique among the large variety of BMP-modulator proteins. To understand its dual mode of action on a molecular level analysis of the structure/function-relationship is a pre-requisite.

In this project we have established different strategies for recombinant production of Twisted gastrulation for a comprehensive *in vitro* characterization. Although crystallization of Twisted gastrulation for X-ray diffraction analysis failed, we could successfully prepare stable ternary complexes consisting BMP-2, a type II-receptor and Twisted gastrulation which are ideally suited for protein crystallization. High-throughput expression and interaction-analysis schemes allowed us to study a multitude of single amino acid variants of Twisted gastrulation. This resulted in the identification of several amino acid residues in Twisted gastrulation, which form the binding epitope for BMP-2 confirming its supposed location in the N-terminal half of Twisted gastrulation. We could also show that the N-glycosylation of Twisted gastrulation is involved in high-affinity BMP binding and required for its BMP-modulatory activity *in vivo*.

For a full analysis of its molecular mechanism of BMP-2 interaction and its interplay with other modulator proteins, a structure analysis of Twisted gastrulation is required in the near future. Providing efficient recombinant sources and the preparation of stable ternary complexes will likely facilitate this.

7 Literaturverzeichnis

- Abdollah, S., Macias-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L. & Wrana, J. L. (1997). **T β RI Phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 Is Required for Smad2-Smad4 Complex Formation and Signaling.** *J. Biol. Chem.*, 272, 27678–27685.
- Abe, E., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Lecka-Czernik, B., O'Brien, C. A., Economides, A. N., Stahl, N., Jilka, R. L. & Manolagas, S. C. (2000). **Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin.** *J. Bone Miner. Res.*, 15(4), 663–73.
- Allendorph, G. P., Isaacs, M. J., Kawakami, Y., Izipisua Belmonte, J. C. & Choe, S. (2007). **BMP-3 and BMP-6 Structures Illuminate the Nature of Binding Specificity with Receptors.** *Biochemistry*, 46(43), 12238–12247.
- Allendorph, G. P., Vale, W. W. & Choe, S. (2006). **Structure of the ternary signaling complex of a TGF- β superfamily member.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(20), 7643–8.
- Aricescu, A. R., Lu, W. & Jones, E. Y. (2006). **A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells.** *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 62(Pt 10), 1243–50.
- Attisano, L., Cárcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M., Massagué, J. & Wrana, J. L. (1993). **Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors.** *Cell*, 75(4), 671–80.
- Attisano, L. & Lee-Hoeflich, S. T. (2001). **The Smads.** *Genome Biol.*, 2(8), 1–8.
- Attisano, L. & Wrana, J. L. (2002). **Signal transduction by the TGF- β superfamily.** *Science*, 296(5573), 1646–7.
- Attisano, L., Wrana, J. L., Cheifetz, S. & Massague, J. (1992). **Novel activin receptors: Distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors.** *Cell*, 68(1), 97–108.
- Avsian-Kretchmer, O. & Hsueh, A. J. W. (2004). **Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists.** *Mol. Endocrinol.*, 18(1), 1–12.
- Babitt, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T. A., Campagna, J. A., Chung, R. T., Schneyer, A. L., Woolf, C. J., Andrews, N. C. & Lin, H. Y. (2006). **Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression.** *Nat. Genet.*, 38(5), 531–9.
- Babitt, J. L., Zhang, Y., Samad, T. A., Xia, Y., Tang, J., Campagna, J. A., Schneyer, A. L., Woolf, C. J. & Lin, H. Y. (2005). **Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor.** *J. Biol. Chem.*, 280(33), 29820–7.
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J. A., Anderson, R. M., May, S. R., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M., Rossant, J. & De Robertis, E. M. (2000). **The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development.** *Nature*, 403(6770), 658–61.
- Balemans, W. & Van Hul, W. (2002). **Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates: A Cocktail of Modulators.** *Dev. Biol.*, 250(2), 231–250.

- Bassing, C. H., Yingling, J. M., Howe, D. J., Wang, T., He, W. W., Gustafson, M. L., Shah, P., Donahoe, P. K. & Wang, X. F. (1994). **A transforming growth factor β type I receptor that signals to activate gene expression.** *Science*, 263(5143), 87–9.
- Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P. J. (1999). **A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation.** *Protein Sci.*, 8(4), 921–9.
- Bell, C. H., Healey, E., van Erp, S., Bishop, B., Tang, C., Gilbert, R. J. C., Aricescu, A. R., Pasterkamp, R. J. & Siebold, C. (2013). **Structure of the repulsive guidance molecule (RGM)-neogenin signaling hub.** *Science*, 341(6141), 77–80.
- Bell, E., Muñoz-Sanjuán, I., Altmann, C. R., Vonica, A. & Brivanlou, A. H. (2003). **Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGF β and Wnt inhibitor.** *Development*, 130(7), 1381–1389.
- Besette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. (1999). **Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(24), 13703–8.
- Billington, C. J., Fiebig, J. E., Forsman, C. L., Pham, L., Burbach, N., Sun, M., Jaskoll, T., Mansky, K., Gopalakrishnan, R., O'Connor, M. B., Mueller, T. D. & Petryk, A. (2011). **Glycosylation of Twisted Gastrulation is Required for BMP Binding and Activity during Craniofacial Development.** *Front. Physiol.*, 2, 1–9.
- Bogan, A. A. & Thorn, K. S. (1998). **Anatomy of hot spots in protein interfaces.** *J. Mol. Biol.*, 280(1), 1–9.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. a, Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J. P. (1995). **A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(16), 7297–301.
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. & Nohe, A. (2011). **Bone morphogenetic proteins: a critical review.** *Cell. Signal.*, 23(4), 609–20.
- Brown, M. a, Zhao, Q., Baker, K. a, Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I. & Choe, S. (2005). **Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors.** *J. Biol. Chem.*, 280(26), 25111–8.
- Brunkow, M. E., Gardner, J. C., Van Ness, J., Paepfer, B. W., Kovacevich, B. R., Proll, S., Skonier, J. E., Zhao, L., Sabo, P. J., Fu, Y.-H., Alisch, R. S., Gillett, L., Colbert, T., Tacconi, P., Galas, D., Hamersma, H., Beighton, P. & Mulligan, J. T. (2001). **Bone Dysplasia Sclerosteosis Results from Loss of the SOST Gene Product, a Novel Cystine Knot-Containing Protein.** *Am. J. Hum. Genet.*, 68(3), 577–589.
- Chacko, B., Qin, B. & Correia, J. (2001). **The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization.** *Nat. Struct. Biol.*, 8(3), 4–9.
- Chaiet, L. & Wolf, F. (1964). **The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 106, 1–5.
- Chang, C., Holtzman, D. A., Chau, S., Chickering, T., Woolf, E. A., Holmgren, L. M., Bodorova, J., Gearing, D. P., Holmes, W. E. & Brivanlou, A. H. (2001). **Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist.** *Nature*, 410, 483–7.
- Chang, V. T., Crispin, M., Aricescu, A. R., Harvey, D. J., Nettleship, J. E., Fennelly, J. A., Yu, C., Boles, K. S., Evans, E. J., Stuart, D. I., Dwek, R. A., Jones, E. Y., Owens, R. J. & Davis, S. J. (2007). **Glycoprotein structural genomics: solving the glycosylation problem.** *Structure*, 15(3), 267–73.
- Chapman-Smith, A. & Cronan Jr, J. E. (1999). **Molecular biology of biotin attachment to proteins.** *J. Nutr.*, 129, 477–484.

- Cheifetz, S., Bassols, A., Stanley, K., Ohta, M., Greenberg, J. & Massagué, J. (1988). **Heterodimeric transforming growth factor β . Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors.** *J. Biol. Chem.*, 263, 10783–10789.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J. & Letarte, M. (1992). **Endoglin is a component of TGF β receptor system in human endothelial cells.** *J. Biol. Chem.*, 2(17), 19027–19030.
- Chen, I., Howarth, M., Lin, W. & Ting, A. (2005). **Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase.** *Nat. Methods*, 2(2), 99–104.
- Cheng, S. K., Olale, F., Bennett, J. T., Brivanlou, A. H. & Schier, A. F. (2003). **EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF- β signals Vg1 and GDF1.** *Genes Dev.*, 17(1), 31–6.
- Conley, C. A., Silburn, R., Singer, M. A., Ralston, A., Rohwer-Nutter, D., Olson, D. J., Gelbart, W. & Blair, S. S. (2000). **Crossveinless 2 contains cysteine-rich domains and is required for high levels of BMP-like activity during the formation of the cross veins in Drosophila.** *Development*, 127(18), 3947–59.
- Conrad, S., Genth, H., Hofmann, F., Just, I. & Skutella, T. (2007). **Neogenin-RGMa signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC.** *J. Biol. Chem.*, 282(22), 16423–33.
- Constam, D. B. & Robertson, E. J. (1999). **Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases.** *J. Cell Biol.*, 144(1), 139–49.
- Contreras-Gómez, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. & Chisti, Y. (2013). **Protein production using the baculovirus-insect cell expression system.** *Biotechnol. Prog.*, 30(1), 1–18.
- Corradini, E., Babitt, J. L. & Lin, H. Y. (2009). **The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors.** *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(5-6), 389–98.
- Crispin, M., Harvey, D. J., Chang, V. T., Yu, C., Aricescu, A. R., Jones, E. Y., Davis, S. J., Dwek, R. A. & Rudd, P. M. (2006). **Inhibition of hybrid- and complex-type glycosylation reveals the presence of the GlcNAc transferase I-independent fucosylation pathway.** *Glycobiology*, 16(8), 748–56.
- Dale, L. (2000). **Pattern formation: A new twist to BMP signalling.** *Curr. Biol.*, 10(18), R671–R673.
- Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y. & Davies, D. R. (1992). **Crystal structure of transforming growth factor- β 2: an unusual fold for the superfamily.** *Science*, 257(5068), 369–73.
- Davis, S. J., Davies, E. A., Barclay, A. N., Daenke, S., Bodian, D. L., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Butters, T. D., Dwek, R. A. & van der Merwe, P. A. (1995). **Ligand binding by the immunoglobulin superfamily recognition molecule CD2 is glycosylation-independent.** *J. Biol. Chem.*, 270(1), 369–75.
- De Crescenzo, G., Grothe, S., Zwaagstra, J., Tsang, M. & O'Connor-McCourt, M. D. (2001). **Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF- β type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding.** *J. Biol. Chem.*, 276(32), 29632–43.
- Derynck, R. & Zhang, Y. (2003). **Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling.** *Nature*, 425, 577–584.
- Derynck, R., Zhang, Y. & Feng, X.-H. (1998). **Transcriptional Activators of TGF- β Responses: Smads.** *Cell*, 95(6), 737–740.

- Devlin, R. D., Du, Z., Pereira, R. C., Kimble, R. B., Economides, A. N., Jorgetti, V. & Canalis, E. (2003). **Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation.** *Endocrinology*, 144(5), 1972–8.
- Diestel, U., Resch, M., Meinhardt, K., Weiler, S., Hellmann, T. V., Mueller, T. D., Nickel, J., Eichler, J. & Muller, Y. A. (2013). **Identification of a Novel TGF- β -Binding Site in the Zona Pellucida C-terminal (ZP-C) Domain of TGF- β -Receptor-3 (TGFR-3).** *PLoS One*, 8(6), e67214.
- Ding, J., Yang, L., Yan, Y.-T., Chan, A., Desai, N., Wynshaw-Boris, A. & Shen, M. M. (1998). **Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo.**, 395(October), 702–707.
- Dionne, M. S., Skarnes, W. C. & Harland, R. M. (2001). **Mutation and Analysis of Dan , the Founding Member of the Dan Family of Transforming Growth Factor β Antagonists.** *Mol. Cell. Biol.*, 21(2), 636–643.
- Ebendal, T., Bengtsson, H. & So, S. (1998). **Mini-Review Bone Morphogenetic Proteins and Their Receptors : Potential Functions in the Brain**, 146(September 1997), 139–146.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. & Miyazono, K. (2001). **Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation.** *J. Biol. Chem.*, 276(16), 12477–80.
- Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T. K., Kawabata, M., Miyazono, K. & Imamura, T. (1999). **Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation.** *J. Cell Sci.*, 112, 3519–3527.
- Ebner, R., Chen, R. H., Lawler, S., Zioncheck, T. & Derynck, R. (1993). **Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin.** *Science*, 262(5135), 900–2.
- Edelhoch, H. (1967). **Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins.** *Biochemistry*, 6(7), 1948–1954.
- Eigenbrot, C. & Gerber, N. (1997). **X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding.** *Nat. Struct. Biol.*, 4(6), 435–438.
- Franzen, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C.-H. & Miyazono, K. (1993). **Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF β type II receptor.** *Cell*, 75(4), 681–692.
- Galla, H. J. & Müller, H. J. (1988). *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme.
- Garcia Abreu, J., Coffinier, C., Larraín, J., Oelgeschläger, M. & De Robertis, E. M. (2002). **Chordin-like CR domains and the regulation of evolutionarily conserved extracellular signaling systems.** *Gene*, 287(1-2), 39–47.
- Gazzerro, E. & Canalis, E. (2006). **Bone morphogenetic proteins and their antagonists.** *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 7(1-2), 51–65.
- George, S. T., Ruoho, A. E. & Malbon, C. C. (1986). **N-glycosylation in expression and function of β -adrenergic receptors.** *J. Biol. Chem.*, 261(35), 16559–64.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendörfer, T., Sebald, W., Henis, Y. I. & Knaus, P. (2000). **Bone Morphogenetic Protein Receptor Complexes on the Surface of Live Cells: A New Oligomerization Mode for Serine/Threonine Kinase Receptors.** *Mol. Biol. Cell*, 11, 1023–1035.

- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). **Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.** *Anal. Biochem.*, 182(2), 319–326.
- Gong, Y., Krakow, D., Marcelino, J., Wilkin, D., Chitayat, D., Babul-Hirji, R., Hudgins, L., Cremers, C. W., Cremers, F. P., Brunner, H. G., Reinker, K., Rimoin, D. L., Cohn, D. H., Goodman, F. R., Reardon, W., Patton, M., Francomano, C. A. & Warman, M. L. (1999). **Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis.** *Nat. Genet.*, 21(3), 302–4.
- Graf, D., Timmons, P. M., Hitchins, M., Episkopou, V., Moore, G., Ito, T., Fujiyama, A., Fisher, A. G. & Merckenschlager, M. (2001). **Evolutionary conservation, developmental expression, and genomic mapping of mammalian Twisted gastrulation.** *Mamm. Genome*, 12, 554–560.
- Graff, J. M. (1997). **Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question.** *Cell*, 89(2), 171–4.
- Green, N. M. (1966). **Thermodynamics of the binding of biotin and some analogues by avidin.** *Biochem. J.*, 101(3), 774–80.
- Greenfield, H. & Fasman, G. (1969). **Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation.** *Biochemistry*, 8(10), 4108–16.
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W. & Choe, S. (2003). **The BMP7/ActRII Extracellular Domain Complex Provides New Insights into the Cooperative Nature of Receptor Assembly.** *Mol. Cell*, 11(3), 605–617.
- Griffith, D. L., Keck, P. C., Sampath, T. K., Rueger, D. C. & Carlson, W. D. (1996). **Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(2), 878–83.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Izpisua Belmonte, J. C. & Choe, S. (2002). **Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin.** *Nature*, 420(6916), 636–42.
- Grotewold, L., Plum, M., Dildrop, R., Peters, T. & Rüther, U. (2001). **Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis.** *Mech. Dev.*, 100(2), 327–330.
- Harrington, A. E., Morris-Triggs, S. A., Ruotolo, B. T., Robinson, C. V., Ohnuma, S.-I. & Hyvönen, M. (2006). **Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin.** *EMBO J.*, 25(5), 1035–45.
- Hart, P. J., Deep, S., Taylor, A. B., Shu, Z., Hinck, C. S. & Hinck, A. P. (2002). **Crystal structure of the human T β R2 ectodomain - TGF- β 3 complex.** *Nat. Struct. Biol.*, 9(3), 203–8.
- Harth, S., Kotzsch, A., Hu, J., Sebald, W. & Mueller, T. (2010). **A selection fit mechanism in BMP receptor IA as a possible source for BMP ligand-receptor promiscuity.** *PLoS One*, 5(9), 1–13.
- Harth, S., Kotzsch, A., Sebald, W. & Mueller, T. (2010). **Crystallization of BMP receptor type IA bound to the antibody Fab fragment AbD1556.** *Acta Crystallogr. Sect. F*, 66(Pt 8), 964–8.
- Hassel, S., Schmitt, S., Hartung, A., Roth, M., Nohe, A., Petersen, N., Ehrlich, M., Yoav, I. H., Sebald, W. & Knaus, P. (2003). **Initiation of Smad-Dependent and Smad-Independent Signaling via Distinct BMP-Receptor Complexes.** *JBJS*, 85, 44–51.
- Heinecke, K., Seher, A., Schmitz, W., Mueller, T. D., Sebald, W. & Nickel, J. (2009). **Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins.** *BMC Biol.*, 7(59).

- Hillger, F., Herr, G., Rudolph, R. & Schwarz, E. (2005). **Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor.** *J. Biol. Chem.*, 280(15), 14974–80.
- Hinck, A. P., 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. & Torchia, D. A. (1996). **Transforming Growth Factor β 1: Three-Dimensional Structure in Solution and Comparison with the X-ray Structure of Transforming Growth Factor β 2.** *Biochemistry*, 35(26), 8517–8534.
- Hinck, A. P. & Huang, T. (2013). **TGF- β antagonists: same knot, but different hold.** *Structure*, 21(8), 1269–70.
- Hink, W. (1970). **Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*.** *Nature*, 226, 466–7.
- Hogan, B. M. L. (1996a). **Bone morphogenetic proteins in development.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6(4), 432–438.
- Hogan, B. M. L. (1996b). **Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development.** *Genes Dev.*, 10(13), 1580–1594.
- Hoodless, P. A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M. B., Attisano, L. & Wrana, J. L. (1996). **MADR1, a MAD-Related Protein That Functions in BMP2 Signaling Pathways.** *Cell*, 85(4), 489–500.
- Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M. & Harland, R. M. (1998). **The *Xenopus* Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities.** *Mol. Cell*, 1(5), 673–683.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. & Miyazono, K. (1997). **Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily.** *Nature*, 389(6651), 622–6.
- Iozzo, R. V. (1998). **Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.** *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 609–52.
- Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C., Dijke, P. & Itoh, S. (2001). **Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads.** *EMBO Rep.*, 20(15), 4132–4142.
- Jarvis, D. & Finn, E. (1995). **Biochemical Analysis of the N-Glycosylation Pathway in Baculovirus-Infected Lepidopteran Insect Cells.** *Virology*, 212, 500–511.
- Jaskoll, T., Abichaker, G., Witcher, D., Sala, F. G., Bellusci, S., Hajihosseini, M. K. & Melnick, M. (2005). **FGF10/FGFR2b signaling plays essential roles during in vivo embryonic submandibular salivary gland morphogenesis.** *BMC Dev. Biol.*, 5, 11.
- Jay, G. D., Culp, D. J. & Jahnke, M. R. (1990). **Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes.** *Anal. Biochem.*, 185(2), 324–30.
- Jones, W., Richmond, E., White, K., Sasak, H., Kusmik, W., Smart, J., Oppermann, H., Rueger, D. & Tucker, R. (1994). **Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1.** *Growth Factors*, 11(3), 215–25.
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. S. & Wassarman, P. M. (2004). **A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(16), 5922–7.

- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. & Wassarman, P. M. (2002). **The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins.** *Nat. Cell Biol.*, 4(6), 457–61.
- Kalantry, S., Manning, S., Haub, O., Tomihara-Newberger, C., Lee, H. G., Fangman, J., Distèche, C. M., Manova, K. & Lacy, E. (2001). **The amnionless gene, essential for mouse gastrulation, encodes a visceral-endoderm-specific protein with an extracellular cysteine-rich domain.** *Nat. Genet.*, 27(4), 412–6.
- Kamimura, M., Matsumoto, K., Koshiba-Takeuchi, K. & Ogura, T. (2004). **Vertebrate crossveinless 2 is secreted and acts as an extracellular modulator of the BMP signaling cascade.** *Dev. Dyn.*, 230(3), 434–45.
- Kassai, Y., Munne, P., Hotta, Y., Penttilä, E., Kavanagh, K., Ohbayashi, N., Takada, S., Thesleff, I., Jernvall, J. & Itoh, N. (2005). **Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin.** *Science*, 309(5743), 2067–70.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A. & Suda, T. (1994). **Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage.** *J. Cell Biol.*, 127(6 Pt 1), 1755–66.
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H. & Wrana, J. L. (2000). **Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation.** *Mol. Cell*, 6(6), 1365–1375.
- Keller, S., Nickel, J., Zhang, J.-L., Sebald, W. & Mueller, T. D. (2004). **Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA.** *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(5), 481–8.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. (2005). **How to study proteins by circular dichroism.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1751(2), 119–39.
- Kingsley, D. M. (1994). **The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms.** *Genes Dev.*, 8(2), 133–146.
- Kirsch, T., Nickel, J. & Sebald, W. (2000a). **BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II.** *EMBO J.*, 19(13), 3314–24.
- Kirsch, T., Nickel, J. & Sebald, W. (2000b). **Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2.** *FEBS Lett.*, 468(2-3), 215–9.
- Kirsch, T., Sebald, W. & Dreyer, M. K. (2000). **Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex.** *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 7(6), 492–496.
- Klages, J., Kotsch, A., Coles, M., Sebald, W., Nickel, J., Müller, T. & Kessler, H. (2008). **The solution structure of BMPR-IA reveals a local disorder-to-order transition upon BMP-2 binding.** *Biochemistry*, 47(46), 11930–9.
- Koenig, B. B., Cook, J. S., Wolsing, D. H., Ting, J., Tiesman, J. P., Correa, P. E., Olson, C. A., Pecquet, A. L., Ventura, F., Grant, R. A., Chen, G.-X., Wrana, J. L., Massagué, J. & Rosenbaum, J. S. (1994). **Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells.** *Mol. Cell. Biol.*, 14(9), 5961–74.
- Kolle, G., Georgas, K., Holmes, G. P., Little, M. H. & Yamada, T. (2000). **CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis.** *Mech. Dev.*, 90(2), 181–193.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985). **Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.** *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 631–64.

- Kotzsch, A. (2008). **BMP Ligand-Rezeptor-Komplexe: Molekulare Erkennung am Beispiel der spezifischen Interaktion zwischen GDF-5 und BMPRII**. *EMBO J.*, 27(7), 937–47.
- Kotzsch, A., Nickel, J., Seher, A., Sebald, W. & Müller, T. (2009). **Crystal structure analysis reveals a spring-loaded latch as molecular mechanism for GDF-5-type I receptor specificity**. *EMBO J.*, 28(7), 937–47.
- Krause, C., Guzman, A. & Knaus, P. (2011). **Noggin**. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 43(4), 478–81.
- Kumagai, I., Takeda, S., Hibino, T. & Miura, K. (1990). **Expression of goat alpha-lactalbumin in Escherichia coli and its refolding to biologically active protein**. *Protein Eng.*, 3(5), 449–52.
- Labbé, E., Silvestri, C., Hoodless, P. A., Wrana, J. L. & Attisano, L. (1998). **Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF β -dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2**. *Mol. Cell*, 2(1), 109–20.
- Laemmli, U. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, 227, 680–685.
- Larraín, J., Bachiller, D., Lu, B., Agius, E., Piccolo, S. & De Robertis, E. M. (2000). **BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space**. *Development*, 127(4), 821–30.
- Larraín, J., Oelgeschläger, M., Ketpura, N. I., Reversade, B., Zakin, L. & De Robertis, E. M. (2001). **Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling**. *Development*, 128(22), 4439–47.
- Lavallie, E. R., Diblasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. & McCoy, J. M. (1993). **A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the Escherichia-Coli Cytoplasm**. *Bio-Technology*, 11, 187–193.
- Lee, D., Zhou, L., Zhou, Z., Xie, J., Jung, J., Liu, Y., Xi, C., Mei, L. & Xiong, W. (2010). **Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis**. *Blood*, 115(15), 3136–3145.
- Lei, S., Lin, H. & Wang, S. (1987). **Characterization of the Erwinia carotovora pelB gene and its product pectate lyase**. *J. Bacteriol.*, 169(9), 4379–83.
- Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M. & Vale, W. (2000). **Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling**. *Nature*, 404(6776), 411–4.
- Lin, H. Y., Wang, X.-F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R. A. & Lodish, H. F. (1992). **Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase**. *Cell*, 68(4), 775–785.
- Lin, L., Goldberg, Y. & Ganz, T. (2005). **Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin**. *Blood*, 106(8), 2884–2889.
- Lin, S., Hu, Y., Zhu, J., Woodruff, T. & Jandetzky, T. (2011). **Structure of betaglycan zona pellucida (ZP)-C domain provides insights into ZP-mediated protein polymerization and TGF- β binding**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(13), 5232–5236.
- Little, S. C. & Mullins, M. C. (2006). **Extracellular modulation of BMP activity in patterning the dorsoventral axis**. *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, 78(3), 224–42.
- Liu, F., Ventura, F., Doody, J. & Massagué, J. (1995). **Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs**. *Mol. Cell. Biol.*, 15(7), 3479–86.
- Luo, D. & Saltzman, W. (2000). **Synthetic DNA delivery systems**. *Nat. Biotechnol.*, 18, 33–37.

- MacKenzie, A., Ferguson, M. W. & Sharpe, P. T. (1992). **Expression patterns of the homeobox gene, Hox-8, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape.** *Development*, 115(2), 403–20.
- Mann, M. & Wilm, M. (1995). **Electrospray mass spectrometry for protein characterization.** *Trends Biochem. Sci.*, 20(6), 219–224.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002). **The protein kinase complement of the human genome.** *Science*, 298(5600), 1912–34.
- Marcelino, J., Sciortino, C. M., Romero, M. F., Ulatowski, L. M., Ballock, R. T., Economides, A. N., Eimon, P. M., Harland, R. M. & Warman, M. L. (2001). **Human disease-causing NOG missense mutations: effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(20), 11353–8.
- Marshall, R. (1972). **Glycoproteins.** *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 673–702.
- Mason, E. D., Konrad, K. D., Webb, C. D. & Marsh, J. L. (1994). **Dorsal midline fate in Drosophila embryos requires twisted gastrulation, a gene encoding a secreted protein related to human connective tissue growth factor.** *Genes Dev.*, 8(13), 1489–1501.
- Mason, E. D., Williams, S., Grotendorst, G. R. & Marsh, J. L. (1997). **Combinatorial signaling by twisted gastrulation and decapentaplegic.** *Mech. Dev.*, 64, 61–75.
- Massagué, J. (1987). **The TGF- β family of Growth and Differentiation Factors - Minireview.** *Cell Press*, 49, 437–438.
- Massagué, J. (1990). **The Transforming Growth Factor- β Family.** *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6, 597–641.
- Massagué, J. (1998). **TGF- β signal transduction.** *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 753–91.
- Massagué, J. (2000). **How cells read TGF- β signals.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 169–178.
- Matshuhashi, S., Noji, S., Koyama, E., Myokai, F., Ohuchi, H., Taniguchi, S. & Hori, K. (1995). **New gene, nel, encoding a Mr 93 K protein with EGF-like repeats is strongly expressed in neural tissues of early stage chick embryos.** *Dev. Dyn.*, 203(2), 212–222.
- Matsui, M., Mizuseki, K., Nakatani, J., Nakanishi, S. & Sasai, Y. (2000). **Xenopus kielin: A dorsalizing factor containing multiple chordin-type repeats secreted from the embryonic midline.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(10), 5291–6.
- McDonald, N. Q. & Hendrickson, W. A. (1993). **A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif.** *Cell*, 73(3), 421–424.
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C.-M., Harland, R. M. & McMahon, A. P. (1998). **Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite.** *Genes Dev.*, 12(10), 1438–1452.
- Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M., Mendoza-Hernández, G., Huang, T., Villarreal, M., Hick, A., López-Casillas, F. & Montiel, J.-L. (2009). **Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF- β binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity.** *Biochemistry*, 48(49), 11755–11765.
- Miller-Bertoglio, V. E., Fisher, S., Sánchez, A., Mullins, M. C. & Halpern, M. E. (1997). **Differential regulation of chordin expression domains in mutant zebrafish.** *Dev. Biol.*, 192(2), 537–50.

- Minabe-Saegusa, C., Saegusa, H., Tsukahara, M. & Noguchi, S. (1998). **Sequence and expression of a novel mouse gene PRDC (protein related to DAN and cerberus) identified by a gene trap approach.** *Dev. Growth Differ.*, 40(3), 343–53.
- Mittl, P. R., Priestle, J. P., Cox, D. A., McMaster, G., Cerletti, N. & Grütter, M. G. (1996). **The crystal structure of TGF- β 3 and comparison to TGF- β 2: Implications for receptor binding.** *Protein Sci.*, 5, 1261–1271.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. & Miyazono, K. (2002). **Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling.** *Genes Cells*, 7(12), 1191–204.
- Miyazono, K. (2000). **Positive and negative regulation of TGF- β signaling.** *J. Cell Sci.*, 113, 1101–9.
- Miyazono, K., Kamiya, Y. & Morikawa, M. (2010). **Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction.** *J. Biochem.*, 147(1), 35–51.
- Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. (2005). **BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk.** *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16(3), 251–63.
- Moester, M. J. C., Papapoulos, S. E., Löwik, C. W. G. M. & van Bezooijen, R. L. (2010). **Sclerostin: current knowledge and future perspectives.** *Calcif. Tissue Int.*, 87(2), 99–107.
- Monnier, P. P., Sierra, A., Macchi, P., Deitinghoff, L., Andersen, J. S., Mann, M., Flad, M., Hornberger, M. R., Stahl, B., Bonhoeffer, F. & Müller, B. K. (2002). **RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons.** *Nature*, 419, 392–395.
- Moscona, A. (1960). **Patterns and mechanisms of tissue reconstruction from dissociated cells.** In *Developing Systems and Their Control* (pp. 45–70).
- Moustakas, A. & Heldin, C.-H. (2005). **Non-Smad TGF- β signals.** *J. Cell Sci.*, 118(Pt 16), 3573–84.
- Movva, N., Nakamura, K. & Inouye, M. (1980). **Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of Escherichia coli.** *J. Biol. Chem.*, 255, 27–29.
- Mueller, T. D. & Nickel, J. (2012). **Promiscuity and specificity in BMP receptor activation.** *FEBS Lett.*, 586(14), 1846–59.
- Müller, B. K., Yamashita, T., Schaffar, G. & Mueller, R. (2006). **The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system.** *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 361(1473), 1513–29.
- Murashima-Suginami, A., Takahashi, K., Kawabata, T., Sakata, T., Tsukamoto, H., Sugai, M., Yanagita, M., Shimizu, A., Sakurai, T., Slavkin, H. C. & Bessho, K. (2007). **Rudiment incisors survive and erupt as supernumerary teeth as a result of USAG-1 abrogation.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 359(3), 549–55.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H. & ten Dijke, P. (1997). **Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF β -signalling.** *Nature*, 389(6651), 631–635.
- Nakao, A., Röijer, E., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Stenman, G., Heldin, C. & ten Dijke, P. (1997). **Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor β signaling pathway.** *J. Biol. Chem.*, 272, 2896–2900.
- Nakayama, N., Han, C. E., Scully, S., Nishinakamura, R., He, C., Zeni, L., Yamane, H., Chang, D., Yu, D., Yokota, T. & Wen, D. (2001). **A novel chordin-like protein inhibitor for bone**

- morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages.** *Dev. Biol.*, 232(2), 372–87.
- Natsume, T., Tomita, S., Iemura, S., Kinto, N., Yamaguchi, A. & Ueno, N. (1997). **Interaction between soluble type I receptor for bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein-4.** *J. Biol. Chem.*, 272, 11535–11540.
- Newfeld, S. J., Wisotzkey, R. G. & Kumar, S. (1999). **Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor- β family ligands, receptors and Smad signal transducers.** *Genetics*, 152(2), 783–795.
- Nickel, J., Dreyer, M. K., Kirsch, T. & Sebald, W. (2001). **The crystal structure of the BMP-2:BMPIA complex and the generation of BMP-2 antagonists.** *J. Bone Jt. Surg.*, 83, 7–14.
- Nickel, J., Kotsch, A., Sebald, W. & Mueller, T. (2005). **A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB.** *J. Mol. Biol.*, 349(5), 933–47.
- Nishitoh, H., Ichijo, H., Kimura, M., Matsumoto, T., Makishima, F., Yamaguchi, A., Hidetoshi, Y., Enomoto, S. & Miyazono, K. (1996). **Identification of Type I and Type II Serine/Threonine Kinase Receptors for Growth/Differentiation Factor-5.** *J. Biol. Chem.*, 271(35), 21345–21352.
- Nogami, H. & Urist, M. R. (1970). **The classic : a morphogenetic matrix for differentiation of cartilage in tissue culture.** *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 467(12), 3063–7.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I. & Knaus, P. (2002). **The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways.** *J. Biol. Chem.*, 277(7), 5330–8.
- Nohno, T., Ishikawa, T., Saito, T., Hosokawa, K., Noji, S., Wolsing, D. H. & Rosenbaum, J. S. (1995). **Identification of a Human Type II Receptor for Bone Morphogenetic Protein-4 That Forms Differential Heteromeric Complexes with Bone Morphogenetic Protein Type I Receptors.** *J. Biol. Chem.*, 270(38), 22522–22526.
- Nolan, K., Kattamuri, C., Luedeke, D. M., Deng, X., Jagpal, A., Zhang, F., Linhardt, R. J., Kenny, A. P., Zorn, A. M. & Thompson, T. B. (2013). **Structure of protein related to Dan and Cerberus: insights into the mechanism of bone morphogenetic protein antagonism.** *Structure*, 21(8), 1417–29.
- Oelgeschlager, M., Larraín, J., Geissert, D. & De Robertis, E. M. (2000). **The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling.** *Nature*, 405(6788), 757–63.
- Oelgeschlager, M., Reversade, B., Larraín, J., Little, S., Mullins, M. C. & De Robertis, E. M. (2003). **The pro-BMP activity of Twisted gastrulation is independent of BMP binding.** *Development*, 130(17), 4047–4056.
- Oh, S. P., Yeo, C.-Y., Lee, Y., Schrewe, H., Whitman, M. & Li, E. (2002). **Activin type IIA and IIB receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning.** *Genes Dev.*, 16(21), 2749–54.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. & Niehrs, C. (1999). **Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI.** *Nature*, 401(6752), 480–5.
- Ortenberg, R., Gon, S., Porat, A. & Beckwith, J. (2004). **Interactions of glutaredoxins, ribonucleotide reductase, and components of the DNA replication system of Escherichia coli.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(19), 7439–44.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.** *Protein Sci.*, 4(11), 2411–23.

- Padgett, R. W., St Johnston, R. D. & Gelbart, W. M. (1987). **A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor- β family.** *Nature*, 325(6099), 81–4.
- Paine-Saunders, S., Viviano, B. L., Economides, A. N. & Saunders, S. (2002). **Heparan sulfate proteoglycans retain Noggin at the cell surface: a potential mechanism for shaping bone morphogenetic protein gradients.** *J. Biol. Chem.*, 277(3), 2089–96.
- Pearce, J. J., Penny, G. & Rossant, J. (1999). **A mouse cerberus/Dan-related gene family.** *Dev. Biol.*, 209(1), 98–110.
- Pereira, R. C., Economides, A. N. & Canalis, E. (2000). **Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts.** *Endocrinology*, 141(12), 4558–63.
- Petrescu, A.-J., Milac, A.-L., Petrescu, S. M., Dwek, R. a & Wormald, M. R. (2004). **Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding.** *Glycobiology*, 14(2), 103–14.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. & De Robertis, E. M. (1999). **The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals.** *Nature*, 397, 707–710.
- Piccolo, S., Agius, E., Lu, B., Goodman, S., Dale, L. & De Robertis, E. M. (1997). **Cleavage of Chordin by Xolloid Metalloprotease Suggests a Role for Proteolytic Processing in the Regulation of Spemann Organizer Activity.** *Cell*, 91(3), 407–416.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. & De Robertis, E. M. (1996). **Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4.** *Cell*, 86(4), 589–98.
- Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997). **The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm.** *J. Biol. Chem.*, 272(25), 15661–15667.
- Rajan, N., Tsarbopoulos, A., Kumarasamy, R., Odonnell, R., Taremi, S. S., Baldwin, S. W., Seelig, G. F., Fan, X. D., Pramanik, B. & Le, H. V. (1995). **Characterization of Recombinant Human Interleukin 4 Receptor from CHO Cells: Role of N-Linked Oligosaccharides.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206(2), 694–702.
- Reddi, A. H. (1997). **Bone morphogenetic proteins: An unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens.** *Cytokine Growth Factor Rev.*, 8(1), 11–20.
- Rentzsch, F., Zhang, J., Kramer, C., Sebald, W. & Hammerschmidt, M. (2006). **Crossveinless 2 is an essential positive feedback regulator of Bmp signaling during zebrafish gastrulation.** *Development*, 133(5), 801–11.
- Rietsch, A. & Beckwith, J. (1998). **The genetics of disulfide bond metabolism.** *Annu. Rev. Genet.*, 32, 163–84.
- Ritz, D., Lim, J., Reynolds, C. M., Poole, L. B. & Beckwith, J. (2001). **Conversion of a peroxiredoxin into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion.** *Science*, 294(5540), 158–60.
- Rodríguez-Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A. N., Pascual, J., Ortiz, A. & Izpisua Belmonte, J. C. (1999). **The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry.** *Nature*, 401(6750), 243–51.
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H. & Miyazono, K. (1995). **Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(17), 7632–6.

- Ross, J. J., Shimmi, O., Vilmos, P., Petryk, A., Kim, H., Gaudenz, K., Hermanson, S., Ekker, S. C., O'Connor, M. B. & Marsh, J. L. (2001). **Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist.** *Nature*, 410, 479–483.
- Ruppert, R., Hoffmann, E. & Sebald, W. (1996). **Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity.** *Eur. J. Biochem.*, 237(1), 295–302.
- Saito, S., Yano, K., Sharma, S., McMahon, H. E. & Shimasaki, S. (2008). **Characterization of the post-translational modification of recombinant human BMP-15 mature protein.** *Protein Sci.*, 17(2), 362–70.
- Saloman, D. S., Bianco, C., Ebert, A. D., Khan, N. I., De Santis, M., Normanno, N., Wechselberger, C., Seno, M., Williams, K., Sanicola, M., Foley, S., Gullick, W. J. & Persico, G. (2000). **The EGF-CFC family: novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer.** *Endocr. Relat. Cancer*, 7(4), 199–226.
- Samad, T. a, Rebbapragada, A., Bell, E., Zhang, Y., Sidis, Y., Jeong, S.-J., Campagna, J. a, Perusini, S., Fabrizio, D. a, Schneyer, A. L., Lin, H. Y., Brivanlou, A. H., Attisano, L. & Woolf, C. J. (2005). **DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor.** *J. Biol. Chem.*, 280(14), 14122–9.
- Sampath, T. K., Maliakal, J. C., Hauschka, P. V, Jones, W. K., Sasak, H., Tucker, R. F., White, K. H., Coughlin, J. E., Tucker, M. M. & Pang, R. H. (1992). **Recombinant Human Osteogenic Protein- 1 (hOP- 1) Induces New Bone Formation in Vivo with a Specific Activity Comparable with Natural Bovine Osteogenic Protein and Stimulates Osteoblast Proliferation and Differentiation in Vitro.** *J. Biol. Chem.*, 267(28), 20352–62.
- Saremba, S., Nickel, J., Seher, A., Kotsch, A., Sebald, W. & Mueller, T. D. (2008). **Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand.** *FEBS J.*, 275(1), 172–83.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. & De Robertis, E. M. (1994). **Xenopus chordin: A Novel Dorsalizing Factor Activated by Organizer-Specific Homeobox Genes.** *Cell*, 79(5), 779–790.
- Sasaki, H. & Hogan, B. L. (1993). **Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo.** *Development*, 118(1), 47–59.
- Schaeffer, C., Santambrogio, S., Perucca, S., Casari, G. & Rampoldi, L. (2009). **Analysis of uromodulin polymerization provides new insights into the mechanisms regulating ZP domain-mediated protein assembly.** *Mol. Biol. Cell*, 20, 589–599.
- Scheufler, C., Sebald, W. & Hülsmeier, M. (1999). **Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution.** *J. Mol. Biol.*, 287, 103–113.
- Schier, A. F. & Shen, M. M. (2000). **Nodal signalling in vertebrate development.** *Nature*, 403(6768), 385–389.
- Schlunegger, M. P. & Grütter, M. G. (1992). **An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-β2.** *Nature*, 358, 430–434.
- Scott, I. C., Blitz, I. L., Pappano, W. N., Maas, S. a, Cho, K. W. & Greenspan, D. S. (2001). **Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling.** *Nature*, 410(6827), 475–8.
- Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J.-L. & Mueller, T. D. (2004). **Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction.** *Biol. Chem.*, 385(8), 697–710.

- Shawlot, W., Deng, J. M. & Behringer, R. R. (1998). **Expression of the mouse cerberus-related gene, Cerr1, suggests a role in anterior neural induction and somitogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11), 6198–203.
- Shi, Y. & Massagué, J. (2003). **Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus.** *Cell*, 113(6), 685–700.
- Shukunami, C., Ohta, Y., Sakuda, M. & Hiraki, Y. (1998). **Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5.** *Exp. Cell Res.*, 241(1), 1–11.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C. & Knaus, P. (2009). **Recent advances in BMP receptor signaling.** *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(5-6), 343–55.
- Simmons, D. G. & Kennedy, T. G. (2002). **Uterine Sensitization-Associated Gene-1: A Novel Gene Induced Within the Rat Endometrium at the Time of Uterine Receptivity/Sensitization for the Decidual Cell Reaction.** *Biol. Reprod.*, 67, 1638–1645.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991). **The functional expression of antibody Fv fragments in Escherichia coli: improved vectors and a generally applicable purification technique.** *Biotechnology*, 9, 273–278.
- Slack, J. M. W. & Tannahill, D. (1993). **Noggin the dorsalizer.** *Nature*, 361, 498–499.
- Smith, W. C. & Harland, R. M. (1992). **Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos.** *Cell*, 70(5), 829–840.
- Spemann, H. & Mangold, H. (1924). **Induction of Embryonic Primordia by Implantation of Organizers from a Different Species.** *Arch. Für Mikroskopische Anat. Und Entwicklungsmechanik*, 100, 599–638.
- Stanley, E., Biben, C., Kotecha, S., Fabri, L., Tajbakhsh, S., Wang, C.-C., Hatzistavrou, T., Roberts, B., Drinkwater, C. & Lah, M. (1998). **DAN is a secreted glycoprotein related to Xenopus cerberus.** *Mech. Dev.*, 77(2), 173–184.
- Sun, J., Zhuang, F.-F., Mullersman, J. E., Chen, H., Robertson, E. J., Warburton, D., Liu, Y.-H. & Shi, W. (2006). **BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction.** *J. Biol. Chem.*, 281(39), 29349–56.
- Tanaka, M., Endo, S., Okuda, T., Economides, A. N., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Robertson, E., Sakurai, T., Fukatsu, A., Yancopoulos, G. D., Kita, T. & Yanagita, M. (2008). **Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury.** *Kidney Int.*, 73(2), 181–91.
- Tarentino, A. L., Gómez, C. M. & Plummer, T. H. (1985). **Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F.** *Biochemistry*, 24(17), 4665–4671.
- Ten Dijke, P., Yamashita, H., Estevez, M., Riddle, D. L., Ichijo, H., Heldin, C.-H. & Miyazono, K. (1994). **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. & Jandetzky, T. S. (2003). **Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF- β ligand:receptor interactions.** *EMBO*, 22(7), 1555–1566.
- Urist, M. R. (1965). **Bone: Formation by Autoinduction.** *Science*, 150, 893–9.
- Urist, M. R., Mikulski, A. & Lietze, A. (1979). **Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(4), 1828–32.

- Van Bezooijen, R. L., Roelen, B. A. J., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P. & Löwik, C. W. G. M. (2004). **Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist.** *J. Exp. Med.*, 199(6), 805–14.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. & McCawley, P. (1977). **The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae).** *In Vitro*, 13(4), 213–217.
- Vilmos, P., Gaudenz, K., Hegedus, Z. & Marsh, J. L. (2001). **The Twisted gastrulation family of proteins, together with the IGFBP and CCN families, comprise the TIC superfamily of cysteine rich secreted factors.** *Mol. Pathol.*, 54(5), 317–23.
- Vitt, U. A., Hsu, S. Y. & Hsueh, A. J. (2001). **Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules.** *Mol. Endocrinol.*, 15(5), 681–94.
- Wakefield, L. M. & Roberts, A. B. (2002). **TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12(1), 22–29.
- Watanabe, T. K., Katagiri, T., Suzuki, M., Shimizu, F., Fujiwara, T., Kanemoto, N., Nakamura, Y., Hirai, Y., Maekawa, H. & Takahashi, E. (1996). **Cloning and Characterization of Two Novel Human cDNAs (NELL1 and NELL2) Encoding Proteins with Six EGF-like Repeats.** *Genomics*, 38(3), 273–276.
- Weber, D., Kotzsch, A., Nickel, J., Harth, S., Seher, A., Mueller, U., Sebald, W. & Mueller, T. D. (2007). **A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor.** *BMC Struct. Biol.*, 7, 6.
- Weidauer, S. E., Schmieder, P., Beerbaum, M., Schmitz, W., Oschkinat, H. & Mueller, T. D. (2009). **NMR structure of the Wnt modulator protein Sclerostin.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380(1), 160–5.
- Wieser, R., Wrana, J. L. & Massagué, J. (1995). **GS domain mutations that constitutively activate T β R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex.** *EMBO J.*, 14(10), 2199–208.
- Wijgerde, M., Karp, S., McMahon, J. & McMahon, A. P. (2005). **Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse.** *Dev. Biol.*, 286(1), 149–57.
- Wills, A., Harland, R. M. & Khokha, M. K. (2006). **Twisted gastrulation is required for forebrain specification and cooperates with Chordin to inhibit BMP signaling during *X. tropicalis* gastrulation.** *Dev. Biol.*, 289, 166–178.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. & Hogan, B. L. (1995). **Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse.** *Genes Dev.*, 9(17), 2105–16.
- Wolpert, L. (1969). **Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation.** *J. Theor. Biol.*, 25, 1 – 47.
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitscock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. & Wang, E. A. (1988). **Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.** *Science*, 242(4885), 1528–34.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massague, J. (1994). **Mechanism of activation of the TGF- β receptor.** *Nature*, 370, 341–347.
- Xie, J. & Fisher, S. (2005). **Twisted gastrulation enhances BMP signaling through chordin dependent and independent mechanisms.** *Development*, 132(2), 383–91.

- Xu, J., Wang, A. H., Oses-Prieto, J., Makhijani, K., Katsuno, Y., Pei, M., Yan, L., Zheng, Y. G., Burlingame, A., Brückner, K. & Derynck, R. (2013). **Arginine Methylation Initiates BMP-Induced Smad Signaling.** *Mol. Cell*, 51(1), 5–19.
- Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. & Matsumoto, K. (1999). **XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway.** *EMBO J.*, 18(1), 179–87.
- Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzén, P., Miyazono, K. & Heldin, C. H. (1994). **Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β .** *J. Biol. Chem.*, 269(31), 20172–8.
- Yamashita, H., ten Dijke, P., Huylebroeck, D., Sampath, T. K., Andries, M., Smith, J. C., Heldin, C. & Miyazono, K. (1995). **Osteogenic Protein-1 Binds to Activin Type II Receptors and Induces Certain Activin-like Effects.** *J. Cell Biol.*, 130(1), 217–226.
- Yanagita, M., Oka, M., Watabe, T., Iguchi, H., Niida, A., Takahashi, S., Akiyama, T., Miyazono, K., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. (2004). **USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316(2), 490–500.
- Yang, F., West Jr., A. P., Allendorph, G. P., Choe, S. & Bjorkman, P. J. (2008). **Neogenin interacts with hemojuvelin through its two membrane-proximal fibronectin type III domains.** *Biochemistry*, 47(14), 1–18.
- Yeo, C.-Y. & Whitman, M. (2001). **Nodal Signals to Smads through Cripto-Dependent and Cripto-Independent Mechanisms.** *Mol. Cell*, 7(5), 949–957.
- Yi, J. Y., Shin, I. & Arteaga, C. L. (2005). **Type I transforming growth factor β receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase.** *J. Biol. Chem.*, 280(11), 10870–6.
- Yokouchi, Y., Vogan, K. J., Pearse II, R. V & Tabin, C. J. (1999). **Antagonistic Signaling by Caronte, a Novel Cerberus-Related Gene, Establishes Left-Right Asymmetric Gene Expression.** *Cell*, 98(5), 573–583.
- Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. & Woodlock, J. J. (1969). **Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels.** *Anal. Biochem.*, 30(1), 148–52.
- Zhang, A.-S., Yang, F., Wang, J., Tsukamoto, H. & Enns, C. A. (2009). **Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenetic protein-4-induced hepcidin expression.** *J. Biol. Chem.*, 284(34), 22580–9.
- Zhang, J.-L., Huang, Y., Qiu, L.-Y., Nickel, J. & Sebald, W. (2007). **von Willebrand factor type C domain-containing proteins regulate bone morphogenetic protein signaling through different recognition mechanisms.** *J. Biol. Chem.*, 282(27), 20002–14.
- Zhang, J.-L., Patterson, L. J., Qiu, L.-Y., Graziussi, D., Sebald, W. & Hammerschmidt, M. (2010). **Binding between Crossveinless-2 and Chordin von Willebrand factor type C domains promotes BMP signaling by blocking Chordin activity.** *PLoS One*, 5(9), e12846.
- Zhang, J.-L., Qiu, L.-Y., Kotsch, A., Weidauer, S., Patterson, L., Hammerschmidt, M., Sebald, W. & Mueller, T. D. (2008). **Crystal structure analysis reveals how the Chordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding.** *Dev. Cell*, 14(5), 739–50.
- Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L. & Thomsen, G. H. (1999). **A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation.** *Nature*, 400, 687–693.

- Zimmerman, L. B., De Jesús-Escobar, J. M. & Harland, R. M. (1996). **The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4.** *Cell*, 86(4), 599–606.
- Zusman, S. B. & Wieschaus, E. F. (1985). **Requirements for zygotic gene activity during gastrulation in *Drosophila melanogaster*.** *Dev. Biol.*, 111(2), 359–371.

8 Anhang

8.1 Übersicht verwendeter cDNA- und daraus resultierender Aminosäuresequenzen für Twisted gastrulation

DNA-Sequenz für den codierenden Bereich von Twisted gastrulation aus *Mus musculus* (cDNA BC004850) und daraus resultierende Aminosäuresequenz mit Signalsequenz:

ATGAAGTCAC	ACTATATTGT	GCTAGCTCTA	GCCTCCCTGA	CGTTCCTGCT	50
GTGTCTCCCC	GTGTCCCAGA	GCTGTAACAA	AGCACTCTGT	GCCAGCGATG	100
TGAGCAAATG	CCTCATTGAG	GAGCTCTGCC	AGTGCCGGCC	TGGAGAAGGG	150
AACTGCCCCCT	GCTGTAAGGA	GTGCATGCTG	TGCCTCGGGG	CCCTGTGGGA	200
CGAGTGCTGC	GACTGTGTCG	GTAGGTGCAA	CCCTCGGAAT	TACAGCGACA	250
CCCCGCCCAC	ATCCAAGAGC	ACCGTGGAGG	AGCTGCACGA	GCCCATTCGG	300
TCCCTGTTCA	GGGCGCTGAC	GGAGGGCGAC	ACCCAGCTGA	ACTGGAACAT	350
CGTCTCCTTC	CCTGTGGCAG	AGGAGCTGTC	ACACCATGAA	AACCTAGTCT	400
CCTTCCTAGA	AACTGTGAAC	CAGCTGCACC	ACCAAAACGT	GTCTGTTCCC	450
AGCAACAATG	TCCACGCCCC	CTTCCCCAGC	GACAAAGAGC	GCATGTGCAC	500
AGTGGTTTAC	TTTGATGACT	GCATGTCCAT	CCACCAGTGT	AAGATATCCT	550
GCGAATCCAT	GGGTGCATCC	AAGTATCGCT	GGTTTCACAA	CGCCTGCTGC	600
GAGTGCATCG	GTCCAGAGTG	CATTGACTAT	GGGAGTAAAA	CTGTCAAGTG	650
TATGAACTGC	ATGTTTTTAA				669
MKSHYIVLAL	ASLTFLCLP	VSQSCNKALC	ASDVSKCLIQ	ELCQCRPGEG	50
NCPCCKECLM	CLGALWDECC	DCVGMCNPRN	YSDTPPTSLS	TVEELHEPIP	100
SLFRALTEGD	TQLNWNIVSF	PVAEELSHHE	NLVSFLETVN	QLHHQNVSVF	150
SNNVHAPFPS	DKERMCTVVY	FDDCMSIHQC	KISCESMGAS	KYRWFHNACC	200
ECIGPECIDY	GSKTVKCMNC	MF			222

Anhang

DNA-Sequenz für den codierenden Bereich von Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis* (cDNA BC056070) und daraus resultierende Aminosäuresequenz mit Signalsequenz:

ATGAAGCCCT	CTTTCCTTCA	TATTCCAGCG	GCGGCTCTGC	TCCTCTGCTC	50
TCTATGGATT	TTGCCCATTC	ATTGCTGCAA	TAAGGCACTT	TGTGCAAGTG	100
ATGTCAGCAA	ATGTCTAATA	CAGGAGCTGT	GCCAGTGTCG	GCCCACGGAT	150
GGAAACTGCT	CCTGCTGCAA	GGAGTGTATG	CTGTGCCTGG	GCACACTCTG	200
GGACGAGTGC	TGTGACTGCG	TTGGTATGTG	CAACCCAAGG	AACTACAGCG	250
ATACGCCCCC	AACCTCCAAA	AGTACAGTAG	AGGAACTTCA	TGAACCCATT	300
CCATCCTTGT	TCCGGGCTCT	AACTGAGGGA	GACACCCAAC	TTAATTGGAA	350
TATTGTAACC	TTTCCTGTAG	TGGAGGAACT	TTCCCATCAT	GAGAACCCTGG	400
TCTCCTTCCT	GGAAACTGTG	AACCAACCAC	AACAGCAAAA	TGTATCTGTC	450
CAGGTGTCGC	ACAGCAATGA	AAAGGAGCAC	ATGTGTACAG	TGGTCTATTT	500
TGATGACTGC	ATGTCAATCC	ATCAGTGTA	GGTTTCCTGC	GAGTCCATGG	550
GAGCGTCAA	GTACCGGTGG	TTCCACAACG	CTTGCTGCGA	ATGTGTGGGG	600
CCCGAGTGTA	TTGACTACGG	AAGCAAAACA	GTCAAGTGCG	TGAACTGTAT	650
GGTTTAA					657

MKPSFLHIPA	AALLLCSLWI	LPIH C CNKAL	CASDVSKCLI	QELCQCRPTD	50
GNCSCKECM	LCLGTLWDEC	CDCVGM CNPR	NYS DTPPTSK	STVEELHEPI	100
PSLFRALTEG	DTQLNWNIVT	FPVVEELSHH	ENLVSFLETV	NQPQQQNVSV	150
QVSHSNEKEH	MCTVVYFDDC	MSIHQCKVSC	ESMGASKYRW	FHNACCECVG	200
PECIDYGSKT	VKCVNCMV				218

8.2 Übersicht der angefertigten Expressionskonstrukte für Twisted gastrulation

Ausschnitt des **Vektors pMK1** für die Expression in Insektenzellen mit der cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation aus *Mus musculus* und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

Hexahistidin-Sequenz

Thrombin-Schnittstelle

cDNA Tsg

verwendete Restriktionsschnittstellen: *BamHI* + *XhoI*

```

atggtc catcatcaccaccatcac tccgcgggtttgggtgcccagaggatccgtgaacaaa 1388
gcactctgtgccagcgatgtgagcaaatgcctcattcaggagctctgccagtgccggcct 1448
ggagaagggaaactgccctgctgtaaggagtgcattgctgtgcctcggggcctgtgggac 1508
gagtgtcgcactgtgtcggtaggtgcaaccctcggaattacagcgacaccccgccaca 1568
tccaagagcaccgtggaggagctgcacgagcccattccgtccctgttcagggecgtgacg 1628
gagggcgacaccagctgaactggaacatcgtctccttcctgtggcagaggagctgtca 1688
caccatgaaaacctagtctccttcctagaaaactgtgaaccagctgcaccaccaaactgtg 1748
tctgttcccagcaacaatgtccacgcccccttcccagcgacaaagagcgcattgtgcaca 1808
gtggttactttgatgactgcatgtccatccaccagtgtgaagatatcctgccaatccatg 1868
ggcgcattccaagtatcgtggtttcacaacgcctgctgogagtgcattcggcagagtgcc 1928
attgactatgggagtaaaactgtcaagtgtatgaactgcatgttttaaa ctcgagcaccac 1988
caccaccaccactaa 2003

```

```

M V H H H H H H S A G L V P R G S C N K 20
A L C A S D V S K C L I Q E L C Q C R P 40
G E G N C P C C K E C M L C L G A L W D 60
E C C D C V G R C N P R N Y S D T P P T 80
S K S T V E E L H E P I P S L F R A L T 100
E G D T Q L N W N I V S F P V A E E L S 120
H H E N L V S F L E T V N Q L H H Q N V 140
S V P S N N V H A P F P S D K E R M C T 160
V V Y F D D C M S I H Q C K I S C E S M 180
G A S K Y R W F H N A C C E C I G P E C 200
I D Y G S K T V K C M N C M F 215

```

Ausschnitt des **Vektors pET28b** für die Expression in *E.coli* Zellen mit der cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation aus *Mus musculus* und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

Hexahistidin-Sequenz

Thrombin-Schnittstelle

cDNA mTsg

verwendete Restriktionsschnittstellen: *NdeI* + *XhoI*

```

atgggcagcagc catcatcatcatcatca agcagcggc ctggtgccgcgcggcagc cat 5130
atgtgtaacaaagcactctgtgccagcgatgtgagcaaatgcctcattcaggagctctgc 5190
cagtgccggcctggagaagggaaactgccctgctgtaaggagtgcattgctgtgcctcggg 5250
gccctgtgggacgagtgtgctgcgactgtgtcggtaggtgcaaccctcggaattacagcgac 5310
acccgcccacatccaagagcaccgtggaggagctgcacgagcccattccgtccctgttc 5370
agggcgctgacggaggggcgacaccagctgaactggaacatcgtctccttcctgtggca 5430
gaggagctgtcacaccatgaaaacctagtctccttcctagaaaactgtgaaccagctgcac 5490
caccaaaacgtgtctgttcccagcaacaatgtccacgccccctccccagcgacaaagag 5550
cgcatgtgcacagtggtttactttgatgactgcattccaccagtgtgaagatatcc 5610
tgcgaatccatgggtgcatccaagtatcgctggtttcacaacgcctgctgcgagtgcac 5670
gggccagagtgcattgactatgggagtaaaaactgtcaagtgtatgaactgcattgtttaa 5730
ctcgagcaccaccac 5745
    
```

```

M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H 20
M C N K A L C A S D V S K C L I Q E L C 40
Q C R P G E G N C P C C K E C M L C L G 60
A L W D E C C D C V G R C N P R N Y S D 80
T P P T S K S T V E E L H E P I P S L F 100
R A L T E G D T Q L N W N I V S F P V A 120
E E L S H H E N L V S F L E T V N Q L H 140
H Q N V S V P S N N V H A P F P S D K E 160
R M C T V V Y F D D C M S I H Q C K I S 180
C E S M G A S K Y R W F H N A C C E C I 200
G P E C I D Y G S K T V K C M N C M F 219
    
```

Ausschnitt des **Vektors pMK1** für die Expression in Insektenzellen mit der cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis* und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

Hexahistidin-Sequenz

Thrombin-Schnittstelle

cDNA xTsg

verwendete Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI + *Xho*I

```

atgggtc catcatcaccaccatcactccgcggggtttgggtgcccagaggatccctgcaataag 1388
gcactttgtgcaagtgatgtcagcaaagtctaaacaggagctgtgccagtgtcggccc 1448
acggatggaaactgctcctgctgcaaggagtgtatgctgtgcctgggcacactctgggac 1508
gagtgtgtgactgctgttggtatgtgcaaccaaggaactacagegatacgcceccaacc 1568
tccaaaagtacagtagaggaacttcatgaaccattccatccttgttccgggctctaact 1628
gaggagacaccaacttaattggaatattgtaacctttcctgtagtgaggaaactttcc 1688
catcatgagaacctgggtctccttccctggaaactgtgaaccaaccacaacagcaaaatgta 1748
tctgtccaggtgtcgcacagcaatgaaaaggagcacatgtgtacagtgggtctatttgat 1808
gactgcatgtcaatccatcagtgaaggtttcctgaggtccatgggagcgtcaaagtag 1868
cgggtggtccacaacgcttgctgcaatgtgtggggcccgagtgattgactacggaagc 1928
aaaacagtcaagtgcgtgaactgtatggtttaa ctcgagcaccaccaccaccactaa 1988

```

```

M V H H H H H H S A G L V P R G S C N K 20
A L C A S D V S K C L I Q E L C Q C R P 40
T D G N C S C C K E C M L C L G T L W D 60
E C C D C V G M C N P R N Y S D T P P T 80
S K S T V E E L H E P I P S L F R A L T 100
E G D T Q L N W N I V T F P V V E E L S 120
H H E N L V S F L E T V N Q P Q Q Q N V 140
S V Q V S H S N E K E H M C T V V Y F D 160
D C M S I H Q C K V S C E S M G A S K Y 180
R W F H N A C C E C V G P E C I D Y G S 200
K T V K C V N C M V 210

```

Anhang

Ausschnitt des **Vektors pET28b** für die Expression in *E.coli* Zellen mit der cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis* und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

Hexahistidin-Sequenz

Thrombin-Schnittstelle

cDNA xTsg

verwendete Restriktionsschnittstellen: **NdeI** + **XhoI**

```
atgggcagcagc catcatcatcatcatca agcagcggc ctggtgccgcgcggcagc cat 5130
atgtgcaataaggcactttgtgcaagtgatgtcagcaaagtctaacacaggagctgtgc 5190
cagtgtcggcccacggatggaaactgctcctgctgcaaggagtgtatgctgtgctgctgggc 5250
acactctgggacgagtgctgtgactgcgcttggtatgtgcaaccaaggaactacagcgat 5310
acgcccccaacctccaaaagtacagtagaggaacttcatgaaccattccatccttgcttc 5370
cgggctctaactgaggagacaccaacttaattggaatattgtaacctttcctgtagtg 5430
gaggaactttcccatcatgagaacctggtctccttctctggaaactgtgaaccaaccacaa 5490
cagcaaaatgtatctgtccagggtgctgcacagcaatgaaaaggagcacatgtgtacagtg 5550
gtctatthttgatgactgcatgtcaatccatcagtgtaagggtttcctgogagtcctatggga 5610
gCGTCAAAGTACCggtgggtccacaacgcttgctgcaatgtgtggggcccgagtgatt 5670
gactacggaagcaaaacagtgcaagtgcgtgaactgtatggtttaa ctcgagcaccac 5727
```

```
M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H 20
M C N K A L C A S D V S K C L I Q E L C 40
Q C R P T D G N C S C C K E C M L C L G 60
T L W D E C C D C V G M C N P R N Y S D 80
T P P T S K S T V E E L H E P I P S L F 100
R A L T E G D T Q L N W N I V T F P V V 120
E E L S H H E N L V S F L E T V N Q P Q 140
Q Q N V S V Q V S H S N E K E H M C T V 160
V Y F D D C M S I H Q C K V S C E S M G 180
A S K Y R W F H N A C C E C V G P E C I 200
D Y G S K T V K C V N C M V 214
```

Ausschnitt des **Vektors pHLsec** mit proteineigener Signalsequenz für die Expression in Säugerzellen mit der cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis* und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

proteineigene Signalsequenz

cDNA xTsg

V5-Sequenz

avi-Sequenz

Hexahistidin-Sequenz

verwendete Restriktionsschnittstellen: *EcoRI* + *XhoI*

```

gaattcgcaccatggccaaagccctctttccttcatattccagcggcggtctgctcctc 75
tgctctctatggattttgcccattcattgctgcaataaggcactttgtgcaagtgatgct 135
agcaaagtgtctaatacaggagctgtgcccagtgctggcccacggatggaaactgctcctgc 195
tgcaaggagtgtatgctgtgctgggcacactctgggacgagtgctgtgactgcgttgg 255
atgtgcaaccaaggaactacagcgatacgccccaacctccaaaagtacagtagaggaa 315
cttcatgaaccattccatccttgttccgggctctaactgagggagacaccaactta 375
tggaatattgtaaccttctgtagtgaggaaactttcccatcatgagaacctggctcc 435
ttcctggaaactgtgaaccaaccacaacagcaaatgtatctgtccaggtgtcgcacagc 495
aatgaaaaggagcacatgtgtacagtggtctatcttggatgactgcatgtcaatccatcag 555
tgtaagggttctcctgcgagtcctatgggagcgtcaaagtaccgggtgggtccacaacgcttgc 615
tgcaaatgtgtggggcccagtgattgactacggaagcaaacagtcaagtgcgtgaac 675
tgtatggttccgcggttcgaaggtaagcctatccctaaccctctcctcggtctcgattct 735
acgggtaccggaggttccgggtggttccggctctgaatgatctttgaagctcagaagatt 795
gaatggcatgaaggacgtaccaagcaccaccatcaccatcac 855
taatgatcactcgagact 858
agt

```

```

M A K P S F L H I P A A A L L L C S L W 20
I L P I H C C N K A L C A S D V S K C L 40
I Q E L C Q C R P T D G N C S C C K E C 60
M L C L G T L W D E C C D C V G M C N P 80
R N Y S D T P P T S K S T V E E L H E P 100
I P S L F R A L T E G D T Q L N W N I V 120
T F P V V E E L S H H E N L V S F L E T 140
V N Q P Q Q Q N V S V Q V S H S N E K E 160
H M C T V V Y F D D C M S I H Q C K V S 180
C E S M G A S K Y R W F H N A C C E C V 200
G P E C I D Y G S K T V K C V N C M V P 220
R F E G K P I P N P L L G L S T G T G 240
G S G G S G L N D I F E A Q K I E W H E 260
G R T K H H H H H H 270

```

Ausschnitt des **Vektors pHLsec** mit bereits vorhandener Signalsequenz für die Expression in Säugerzellen mit der cDNA-Sequenz von Twisted gastrulation aus *Xenopus laevis* und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

im Vektor vorhandene Signalsequenz

cDNA xTsg

avi-Sequenz

V5-Sequenz

Hexahistidin-Sequenz

verwendete Restriktionsschnittstellen: *AgeI/XmaI* + *XhoI*

```

gaattcaagcttgccaccatggggatccttcccagccctgggatgctgcgctgctctcc 63
ctcgtgagccttctctccgtgctgctgatgggttgcgtagctgaaaccgggtgcaataag 123
gcactttgtgcaagtgatgtcagcaaatgtctaatacaggagctgtgccagtgtcggcc 183
acggatggaaactgctcctgctgcaaggagtgtatgctgtgctgggcacactctgggac 243
gagtgctgtgactgcggttggtatgtgcaaccaaggaactacagcgatacggcccaacc 303
tccaaaagtacagtagaggaacttcatgaaccattccatccttgttccgggctctaact 363
gagggagacaccaacttaattggaatattgtaaccttctctgtagtgagggaactttcc 423
catcatgagaacctggtctccttctctggaactgtgaaccaaccacaacagcaaaatgta 483
tctgtccagggtgtcgcacagcaatgaaaaggagcacatgtgtacagtgggtctatthgat 543
gactgcatgtcaatccatcagtgtgaaggttctctgcgagtcctatgggagcgtcaaagtac 603
cggtggttcacaacgcttgctgcgaatgtgtggggcccagtgattgactacggaagc 663
aaaacagtcaagtgcgtgaactgtatggttggatccggcgggggagccttaacgatata 723
tttgaggcgcaaaagattgagtggcatgaaagaattctgcagatatccagcacagtggcgg 783
ccgctgggtaagcctatccctaaccctctcctcggtctcgattctacgggtaccaagcac 843
caccatcaccatcac 858
    
```

```

M G I L P S P G M P A L L S L V S L L S 20
V L L M G C V A E T G C N K A L C A S D 40
V S K C L I Q E L C Q C R P T D G N C S 60
C C K E C M L C L G T L W D E C C D C V 80
G M C N P R N Y S D T P P T S K S T V E 100
E L H E P I P S L F R A L T E G D T Q L 120
N W N I V T F P V V E E L S H H E N L V 140
S F L E T V N Q P Q Q Q N V S V Q V S H 160
S N E K E H M C T V V Y F D D C M S I H 180
Q C K V S C E S M G A S K Y R W F H N A 200
C C E C V G P E C I D Y G S K T V K C V 220
N C M V G S G G G G L N D I F E A Q K I 240
E W H E E F C R Y P A Q W R P L G K P I 260
P N P L L G L D S T G T K H H H H H H 279
    
```

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Die Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen der Aminosäuren entsprechen den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur.

ActR-IB	Activin Typ IB Rezeptor	FPLC	Proteinflüssigchromatographie
ActR-II	Activin Typ II Rezeptor	GSH	Glutathion, oxidiert
ActR-IIB	Activin Typ IIB Rezeptor	GSSG	Glutathion, reduziert
ALP	Alkalische Phosphatase	GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
Amp ^R	Ampicillinresistenz	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat	His ₆	Hexa-Histidin-Sequenz
BirA	Biotin-Protein-Ligase	HPLC	Hochleistungsflüssig-Chromatographie
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
BMPR-IA	BMP Typ IA Rezeptor	k_a	Assoziationsrate
BMPR-IB	BMP Typ IB Rezeptor	Kan ^R	Kanamycinresistenz
BMPR-II	BMP Typ II Rezeptor	K _D	Dissoziationskonstante
BSA	Rinderserumalbumin	k_d	Dissoziationsrate
cDNA	codierende DNA	LB	Luria Broth
CHAPS	3-[(3Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate	MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
Da	Dalton	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	M _w	Molekulargewicht
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	OD	optische Dichte
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	P/S	Penicillin/Streptomycin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ecd	extrazelluläre Domäne	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimid	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PNGaseF	Peptid-N-Glykosidase F
Endo H	Endoglykosidase H		
FCS	Fetales Kälberserum		

Anhang

PPP	Protein-Probenpuffer
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheiten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamin-tetraacetat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
trx	Thioredoxin
Tsg	Twisted gastrulation
v/v	Volumenanteil Einzelkomponente vom Gesamtvolumen
VT	Volumenteil
VWC	Von Willebrand Faktor Type C Domänen
w/v	Massenanteil Einzelkomponente vom Gesamtvolumen

8.4 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Billington, C. J. Jr., Fiebig, J. E., Forsman, C. L., Pham, L., Burbach, N., Sun, M., Jaskoll, T., Mansky, K., Gopalakrishnan, R., O'Connor, M. B., Mueller, T. D. & Petryk, A. (2011). **Glycosylation of Twisted Gastrulation is Required for BMP Binding and Activity during Craniofacial Development.** *Frontiers in physiology*, 2, 1-9

Fiebig, J. E., Weidauer, S. E., Qiu, L.-Y., Bauer, M., Schmieder, P., Beerbaum, M., Zhang, J.-L., Oschkinat, H., Sebald, W. & Mueller, T. D. (2013). **The clip-segment of the von Willebrand domain 1 of the BMP modulator protein Crossveinless 2 is preformed.** *Molecules*, 18(10), 11658-82

8.5 Lebenslauf

8.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Müller für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, sowie für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas. Besonders möchte ich mich bedanken für die gute Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen und Ideen, die zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Christian Janzen danke ich für die Bereitschaft, sich als Gutachter dieser Dissertation zur Verfügung zu stellen.

Weiterhin danke ich allen ehemaligen und aktuellen Kollegen der Arbeitsgruppe und des gesamten Lehrstuhls für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt dabei Eva-Maria Muth, Jens Lautenschläger, Tina Hellmann, Julia Frank, Stella Weidauer, Markos Pechlivanis, Mathias Kottmair, Philipp Scheide, Simone Zapf und Alice Schaaf für unterhaltsame Momente, Diskussionen aller Art und Unternehmungen außerhalb des Laboralltags.

Bei Laura Kalkenings und Nagjie Aziraj bedanke ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen, ihre Abschlussarbeit(en) unter meiner Betreuung anzufertigen und die tolle Zusammenarbeit dabei!

Bei meinen Freunden möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich immerwieder daran erinnern haben, dass es auch ein Leben außerhalb der Arbeit gibt und für das Verständnis, dass das in der letzten Zeit nicht wirklich viel genützt hat.

Meiner Familie danke ich für die fortwährende Unterstützung, den Rückhalt während dieser Arbeit und den steten Glauben an mich.

Mein größter Dank gilt meinem Lebensgefährten Andreas Stumpf, der wieder einmal tapfer alle Höhen und Tiefen, vor allem während der finalen Zeit, durchgestanden hat und auf den ich mich in allen Lebenslagen verlassen kann.

8.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation „Twisted gastrulation – ein BMP-Modulatorprotein mit dualer Funktionalität“ eigenständig, das heißt insbesondere selbstständig und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich versichere an Eides statt, dass mir die Möglichkeit zur Promotion nicht kommerziell vermittelt wurde und keine Person oder Organisation beteiligt war, die gegen Entgelt Betreuer/innen für die Anfertigung einer Dissertation sucht.

Weiterhin erkläre ich, dass die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden und die Dissertation weder in gleicher noch ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Neben dem Grad des Diplom-Biochemikers wurden bisher keine weiteren akademischen Grade erworben.

Würzburg, September 2014

Juliane Fiebig