

**AUFKLÄRUNG DER STRUKTUR
UND CHARAKTERISIERUNG
DES TERNÄREN KOMPLEXES AUS
BMP-2, BMPR-IA UND ACTR-IIB**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON

DIONYS A. WEBER

AUS MUSSENHAUSEN



WÜRZBURG 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter:

Prof. Dr. W. Sebald

2. Gutachter:

Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	BMPs und TGF- β ähnliche Proteine.....	5
1.2	Die Rezeptoren der TGF- β Superfamilie.....	8
1.3	Signaltransduktion	10
1.4	Die Ligand-Rezeptor Interaktionen – Spezifität und Affinität	11
1.5	Strukturelle Basis der Ligand-Rezeptor Interaktionen	14
1.6	Kooperativität der Rezeptor-Oligomerisierung	20
1.7	Zielstellung der Arbeit	22
2.	Material und Methoden	23
2.1	Abkürzungen.....	23
2.2	Ausgangsmaterialien.....	24
2.2.1	Chemikalien, Enzyme	24
2.2.2	Kits	24
2.2.3	Bakterienstämme.....	24
2.2.4	Vektoren.....	25
2.2.5	Oligonukleotide.....	25
2.2.6	Wachstumsfaktoren.....	27
2.3	Steriles Arbeiten	27
2.4	Molekularbiologische Methoden	27
2.4.1	Klonierung von ActR-IIB _{ecd}	27
2.4.2	Mutagenese von BMPR-IA _{ecd} und ActR-IIB _{ecd}	28
2.5	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	28
2.5.1	Präparative Proteinexpression in TB-Medium.....	28
2.5.2	Selenmarkierung unter metabolischer Repression.....	29
2.5.3	Herstellung des Rohextraktes der Thioredoxin-Fusionsproteine.....	31
2.6	Chromatographische Verfahren zur Reinigung von Proteinen.....	32
2.6.1	Metall-Affinitäts-Chromatographie	32

2.6.2	Anionenaustausch-Chromatographie.....	33
2.6.3	Reverse-Phase-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie.....	34
2.6.4	Chromatographie an der BMP-2 Affinitätssäule	35
2.6.5	Gelfiltrations-Chromatographie an der Superdex 200® - Säule	36
2.6.6	Kalibrierung der Superdex 200® - Säule	36
2.7	Proteinchemische Methoden	37
2.7.1	Proteingrößenstandard für SDS-PAGE	37
2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.7.3	Proteinfärbung	39
2.7.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	40
2.7.5	Thrombinspaltung.....	41
2.7.6	Massenspektrometrie	41
2.8	Analyse von Protein-Protein Interaktionen	42
2.8.1	Oberflächen-Plasmonresonanz Analyse mit der BIAcore Technik.....	42
2.8.2	Isothermale Mikrokalorimetrie.....	43
2.9	Präparation von Ligand-Rezeptor Komplexen.....	43
2.10	Kristallisation von Proteinen	44
2.11	Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten.....	45
2.11.1	Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten an der hauseigenen Tiefkühlanlage.....	45
2.11.2	Aufnahme von MAD-Datensätzen am Synchrotron	46
2.12	Analyse der Röntgenbeugungsdaten und kristallographische Auswertung	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Präparation der extrazellulären Domänen der Rezeptoren.....	47
3.1.1	Expression und Reinigung von BMPRII _{ecd}	47
3.1.2	Expression und Reinigung von ActRII _{ecd}	52
3.2	BIAcore Interaktionsanalyse der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung.....	62
3.3	Präparation der nativen Ligand-Rezeptor Komplexe.....	64
3.3.1	Analytische Komplexpräparation	64

3.3.2 Präparative Komplexpräparation	66
3.4 Ermittlung der Stöchiometrie des ternären Komplexes.....	67
3.5 Isothermale Titrationskalorimetrie	69
3.6 Kristallisation der nativen Ligand-Rezeptor-Komplexe.....	71
3.7 Messung von nativen Beugungsdatensätzen	78
3.8 Strukturlösungsansatz durch molekularen Ersatz	79
3.9 Kristallisationstests unter Niedrigsalzbedingungen.....	80
3.9.1 Analyse der Komplexstabilität unter Niedrigsalzbedingungen	80
3.9.2 „Nanoliter-Kristallisationsscreening“ mit Kristallisationsroboter.....	81
3.10 Selenomethionin Markierung	84
3.10.1 Selenomethionin Markierung von BMPR-IA _{ecd}	85
3.10.2 Selenomethionin Markierung von BMP-2.....	88
3.11 Präparation und Kristallisation von Selenomethionin-markiertem Komplex	93
3.12 Strukturlösung durch die MAD-Methode.....	95
3.13 Hochauflösender Datensatz und Verfeinerung der Struktur.....	97
3.14 Beschreibung der Struktur des Komplexes aus BMP-2/BMPR-IA/ActR-IIB ...	99
3.14.1 Allgemeine Beschreibung des ternären Komplexes	99
3.14.2 Das Typ I Ligand-Rezeptor Bindungsepitop	105
3.14.3 Das Typ II Ligand-Rezeptor Bindungsepitop.....	107
3.15 Analyse der Struktur-Funktions-Beziehungen durch Mutagenesestudien von ActR-IIB _{ecd}	111
3.15.1 Mutagenese und Isolierung der ActR-IIB _{ecd} Varianten	111
3.15.2 Interaktionsanalysen mit den ActR-IIB _{ecd} Varianten.....	115
3.16 Analyse der Struktur-Funktions-Beziehungen durch das Einfügen der Typ II-Rezeptor Kontaktreste aus ActA in BMP-2.....	121
3.16.1 Mutagenese und Isolierung der BMP-2 Varianten	122
3.16.2 Interaktionsanalysen mit den BMP-2 Varianten.....	124
3.16.3 Gegenüberstellende Interaktionsanalyse von BMP-2 und ActR-IIB _{ecd} Varianten („double-mutant-cycle“).....	127

4.	Diskussion	130
4.1	Der signalaktive Komplex BMP-2/BMPRII ^{ecd} /ActRII ^{ecd}	130
4.2	Spezifität im promiskuitiven „knuckle“-Epitop	132
4.3	Die Rezeptoraktivierung von BMP-2 unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie	138
4.4	Die Rezeptorbindung von BMP-2 repräsentiert einen minimalen Mechanismus der Kooperativität innerhalb der TGF- β Superfamilie.....	143
5.	Zusammenfassung.....	146
6.	Summary	148
7.	Literaturverzeichnis.....	150
	Schriftenverzeichnis	162
	Danksagung	163
	Lebenslauf	164
	Erklärungen	165

1. Einleitung

1.1 BMPs und TGF- β ähnliche Proteine

„Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) sind Mitglieder der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Superfamilie. Aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen kann diese Gruppe multifunktionaler Wachstumsfaktoren in Unterfamilien eingeteilt werden (s. Abb. 1.1A) (Newfeld et al. 1999; Sebald et al. 2004). Zusammen mit den „Growth and Differentiation Factors“ (GDFs) bilden die BMPs neben TGF- β s, Activinen, Inhibinen, Nodal, Myostatin, der „Muellerian Inhibiting Substance“ (MIS) und dem „Glial-Derived Neurotrophic Growth Factor“ (GDNF) die größte Unterfamilie.

Die namensgebende Aktivität der BMPs wurde im Jahr 1965 entdeckt. M. Urist beobachtete die Induktion von ektopem Knochengewebe durch die intramuskuläre Implantation von demineralisierter Knochenmatrix in Ratten (Urist 1965). Das osteoinduktive Potential wurde einem Glycoproteinkomplex zugeschrieben, der fortan als „Knochenmorphogenesefaktor“ (engl.: „bone morphogenetic protein“, kurz: BMP) bezeichnet wurde. Ende der 80er Jahre konnten erstmals BMPs isoliert und deren Gensequenz aufgeklärt werden (Wozney et al. 1988).

Die Wirkung der BMPs ist allerdings nicht nur auf Knochen- und Knorpelbildung beschränkt. Expressionsstudien und die Analyse von BMPs in Mausmodellen zeigen ein sehr breites Aktivitätsspektrum in verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Epithelialzellen, Mesenchymzellen und Neuronalzellen (Balemans and Van Hul 2002). BMPs regulieren die Zellproliferation und Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose. Sie kontrollieren fundamentale entwicklungsbiologische Prozesse wie die Ausbildung der Links-Rechts Asymmetrie, sie sind an Aspekten der Neurogenese und der Musterbildung beteiligt. Auch an der Entwicklung von Niere, Darm, Lunge, Zähnen, Gliedmaßen, Amnion und Geschlechtsorgane sind BMPs beteiligt (Hogan 1996; Graff 1997; Ebendal et al. 1998; Wozney 1998).

Mittlerweile werden der Gruppe der BMPs mehr als 30 Proteine zugeordnet, die in den verschiedensten Organismen von *C.elegans* über *D. melanogaster*, *Xenopus laevis* und vor allem in Säugetieren identifiziert wurden.

BMPs können aufgrund ihrer Funktionen und Strukturen in Untergruppen aufgeteilt werden (Kawabata et al. 1998). BMP-2, BMP-4 und das Drosophila Homolog

Decapentaplegic (dpp) bilden eine Untergruppe (BMP-2/4 Gruppe). BMP-5, BMP-6, BMP-7 (auch „osteogenic protein-1“, OP-1 genannt), BMP-8 und das Drosophila gbb-60A Genprodukt bilden eine weitere Gruppe (OP-1 Gruppe). Growth and Differentiation Factor-5 (GDF-5), GDF-6 und GDF-7 bilden eine dritte Untergruppe.

BMPs werden wie alle Mitglieder der TGF- β Superfamilie als Vorläuferproteine translatiert. Diese setzen sich aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer Prodomäne und einer C-terminalen reifen Domäne zusammen (s. Abb. 1.1B). Nach der Abspaltung des Signalpeptids erfolgt die Dimerisierung der Präproteine. Das reife Protein entsteht schließlich durch proteolytische Spaltung mit furinähnlichen Proteasen an einem RXXR-Motiv (Jones et al. 1994; Constanam and Robertson 1999).

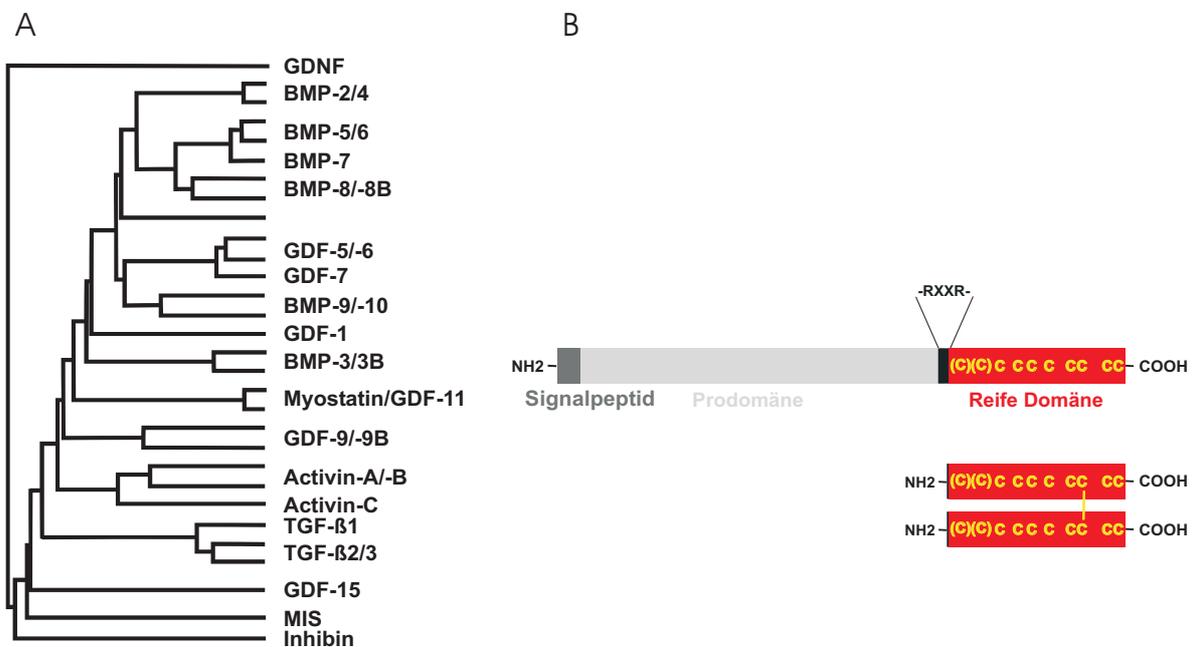


Abbildung 1.1: **A:** Grad der Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der reifen Domänen von ausgewählten Mitgliedern der TGF- β Superfamilie nach Sebald et al. (Sebald et al. 2004). **B:** Schematische Darstellung eines Präproteins (oben) und eines reifen Liganden (unten) der TGF- β Superfamilie.

Die reife Domäne eines Monomers setzt sich aus 100-140 Aminosäureresten zusammen und weist als charakteristisches Merkmal ein Cystinknoten-Motiv auf (Daopin et al. 1992; McDonald and Hendrickson 1993). Hierbei wird über zwei Disulfidbrücken ein acht Aminosäurereste umfassender Ring gebildet. Eine dritte Disulfidbrücke ist durch diesen Ring gefädelt und bildet den Knoten. Diese sehr stabile Struktur ist nicht nur auf die TGF- β Familie beschränkt. Sie findet sich sowohl in anderen Cytokinen wie dem „Platelet

Derived Growth Factor“ (PDGF) und dem „Nerve Growth Factor“ als auch in sehr kleinen Proteinen wie ω -Conotoxinen (Pallaghy et al. 1994).

Die Grundstruktur der monomeren Untereinheiten der TGF- β Familie ist in Abbildung 1.2 anhand des BMP-2 (Scheufler et al. 1999) dargestellt. Sie wird gemeinhin mit dem Modell der „offenen linken Hand“ beschrieben (Daopin et al. 1992). Jedes Monomer ist in 9 β -Stränge (β 1- β 9) und eine lange α -Helix (im BMP-2 α 3) gefaltet. Der N-Terminus repräsentiert den Daumen, die beiden β -Faltblätter werden als Finger 1 und 2 bezeichnet. Diesem Modell folgend wird die konvexe Oberfläche der Finger als Knöchel („knuckle“), die Helix Region als Handgelenk („wrist“) bezeichnet. Die meisten TGF- β ähnlichen Proteine liegen in ihrer natürlichen Form als Homodimere vor, allerdings kann bei Inhibinen, Activin und einigen BMPs auch die Bildung von Heterodimeren beobachtet werden. Der Handballen eines Monomers ist in die konkave Seite der Finger des anderen Monomers eingepasst. Das Dimer wird von hydrophoben Wechselwirkungen stabilisiert und in den meisten Fällen (nicht in GDF3; GDF-9/-9b und lefty-1/-2) von einer intermolekularen Disulfidbrücke zusammengehalten.

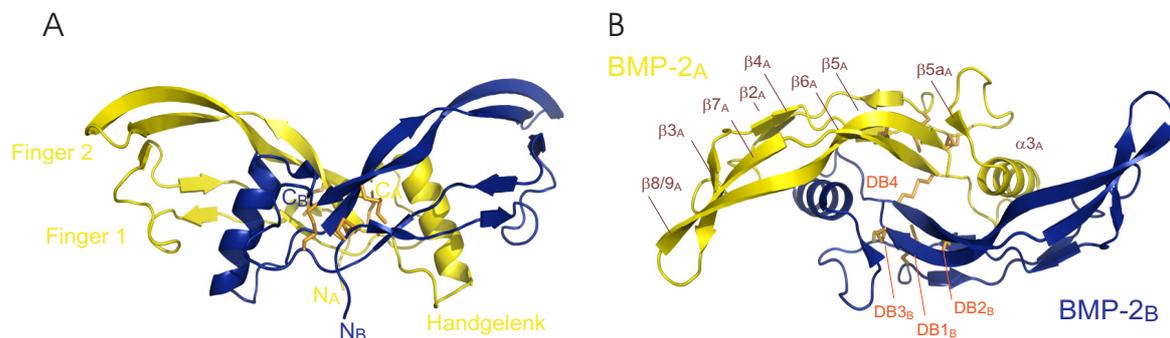


Abbildung 1.2: Kristallstruktur von BMP-2. Bänderdarstellung in der Seitenansicht (A) und der Draufsicht (B) nach Scheufler et al. (Scheufler et al. 1999). Die Monomere BMP-2_A und BMP-2_B sind gelb, bzw. blau dargestellt. Die α -Helizes (α), β -Faltblätter (β) und Disulfidbrücken (DSB) sind gekennzeichnet.

Aus der TGF- β Superfamilie wurden die Kristallstrukturen von TGF- β 2 (Daopin et al. 1992), TGF- β 3 (Mittl et al. 1996), ActA (Harrington et al. 2006), BMP-7 (Griffith et al. 1994), BMP-2 (Scheufler et al. 1999), GDNF (Eigenbrot and Gerber 1997), GDF-5 (Nickel et al. 2005; Schreuder et al. 2005), BMP-9 (Brown et al. 2005), BMP-6 und GDF-15 (T. Müller, unpublizierte Ergebnisse) aufgeklärt. Von TGF- β 1 wurde die Struktur durch NMR gelöst (Hinck et al. 1996). Trotz profunder Unterschiede in der Aminosäuresequenz zeigen die Mitglieder der TGF- β Superfamilie doch eine sehr hohe Ähnlichkeit in der Faltung des Rückgrats. So sind die Aminosäuresequenzen von BMP-2 und TGF- β 2 nur zu 32%

identisch, ihre Strukturen lassen sich aber mit einer Abweichung vom quadratischen Mittelwert von weniger als 1 Å übereinander legen (Sebald et al. 2004). Hier sind lediglich in den Schleifen an den Fingerspitzen und vor der zentralen α -Helix sowie im N-terminalen Segment Unterschiede zu finden.

1.2 Die Rezeptoren der TGF- β Superfamilie

Nach bisherigem Kenntnisstand vermitteln nahezu alle gut charakterisierten Liganden der TGF- β Superfamilie ihr Signal über eine Familie von Transmembran-Serin/Threonin-Kinasen. Eine Ausnahme bildet GDNF, dessen Signal über eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase initiiert wird (Massague 1998). Weiterhin existieren Liganden wie das MIC-1, deren signalvermittelnde Rezeptoren unbekannt sind. Im menschlichen Genom konnten bisher nur 12 Serin/Threonin Rezeptorkinasen innerhalb des TGF- β Systems nachgewiesen werden, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie und ihrer funktionellen Eigenschaften in zwei Unterfamilien, den Typ I und den Typ II Rezeptoren, eingeteilt werden können (Manning et al. 2002) (s. Abb 1.3A).

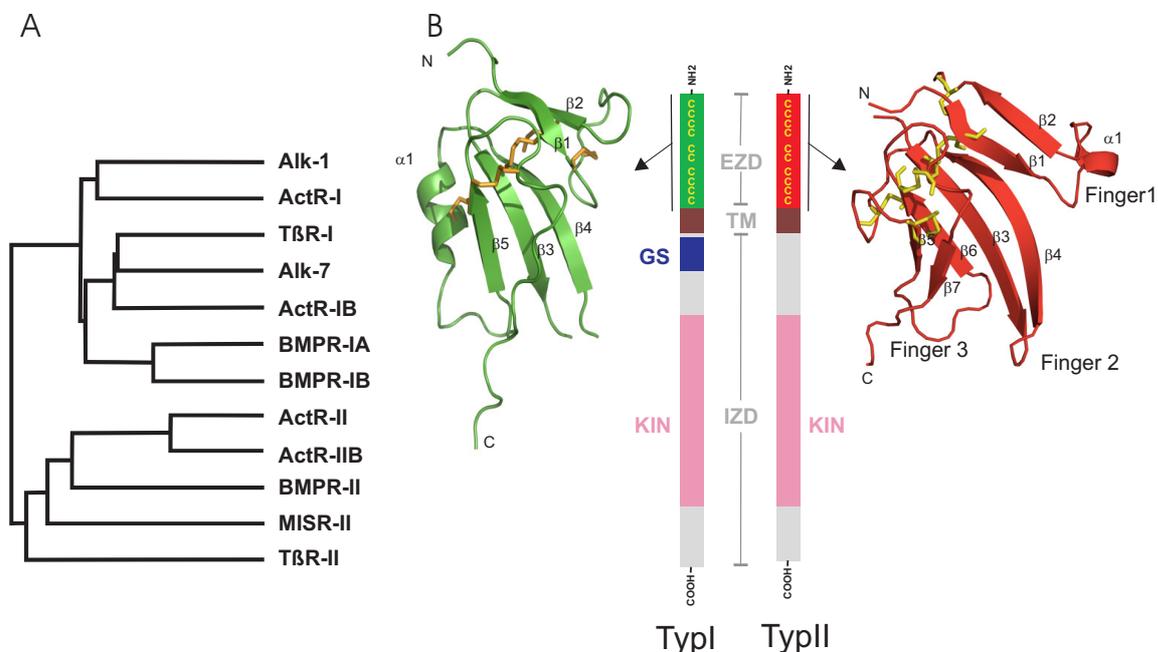


Abbildung 1.3: **A:** Grad der Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der Rezeptoren der TGF- β Superfamilie nach Sebald et al. (Sebald et al. 2004). **B:** Schematische Darstellung der Typ I und Typ II Rezeptoren (mitte). EZD: extrazelluläre Domäne; TM: Transmembrandomäne; IZD: Intrazelluläre Domäne; KIN: Kinase; GS: Glycin/Serin-reiche Domäne. Bänderdarstellung der Kristallstruktur der extrazellulären Domänen von ActR-II (rot) nach Greenwald et al. (Greenwald et al. 1999) und BMPR-IA (grün) nach Kirsch et al. (Kirsch et al. 2000). Die Sekundärstrukturmerkmale sind gekennzeichnet.

Zur Gruppe der Typ I Rezeptoren gehören die „Activin-Like-Kinase1 (= Alk1), die Activin Typ-I und -IB Rezeptoren (ActR-I = Alk2; ActR-IB = Alk4), die BMP Typ-IA und -IB Rezeptoren (BMPR-IA = Alk3; BMPR-IB = Alk6), der TGF- β Typ I Rezeptor (T β R-I = Alk5) und Alk-7. Die Gruppe der Typ II Rezeptoren setzt sich aus dem TGF- β Typ II Rezeptor (T β R-II), dem BMP Typ II Rezeptor (BMPR-II), dem Activin Typ II und IIB Rezeptor (ActR-II; ActR-IIB) und dem Muellierian Inhibiting Substance Receptor (MISR-II) zusammen (de Caestecker 2004).

Die Rezeptoren beider Unterfamilien sind aus 500 bis 570 Aminosäureresten aufgebaut und können, wie in Abbildung 1.3B ersichtlich, in drei Domänen aufgeteilt werden: eine ligandenbindende extrazelluläre, die Transmembran- und die intrazelluläre Domäne mit der Kinasefunktion. Die extrazellulären Domänen umfassen 120-150 Aminosäuren die sehr geringe Sequenzhomologien zueinander aufweisen. Es findet sich hier jedoch ein regelmäßiges Muster von zehn oder mehr Cysteinen auf, die für die Stabilisierung bestimmend sind.

Die grundlegende Faltung der extrazellulären Domänen der Typ II Rezeptoren konnte durch die Kristallstruktur des Activin Typ II Rezeptors aufgeklärt werden (Greenwald et al. 1999) (s. Abb 1.3B). Das Muster, das aufgrund seiner Ähnlichkeit mit den physiologisch nicht verwandten Neurotoxinen als Drei-Finger-Toxin-Faltungsmuster bezeichnet wird, beinhaltet fünf Disulfidbrücken und drei doppelsträngige β -Faltblätter. Die Struktur der extrazellulären Domäne des Typ I Rezeptors BMPR-IA ist diesem Motiv sehr ähnlich. Sie umfasst ebenfalls fünf Disulfidbrücken um die allerdings zwei β -Faltblätter und eine kurze α -Helix angeordnet sind (Kirsch et al. 2000).

Das besondere Merkmal der Typ I Rezeptoren ist eine aus 30 Aminosäuren zusammengesetzte hochkonservierte Region die der Kinasedomäne unmittelbar vorangeht (s. Abb 1.3B). Aufgrund der Aminosäureabfolge SGSGSG wird diese Region als GS-Box bezeichnet. Die Phosphorylierung dieser Region aktiviert die Kinase zur Signalübertragung (Wieser et al. 1995; Attisano et al. 1996). Die Kinasen der Typ II Rezeptoren sind konstitutiv aktiv, die Kinaseaktivität der Typ I Rezeptoren ist von der Ligandenbindung und der Aktivierung durch einen Typ II Rezeptor abhängig (Wrana et al. 1994).

Zusätzlich zu den signalvermittelnden Rezeptorkinasen sind für die Bindung mancher Liganden weitere Zelloberflächenproteine notwendig, die als Typ III Rezeptoren bezeichnet werden. Diese Gruppe beinhaltet Betaglykan, Endoglin und Proteine aus der EGF-CFC Familie (Miyazawa et al. 2002).

1.3 Signaltransduktion

Der Smad-abhängige Signalweg ist die am besten charakterisierte Signalkaskade die durch die Interaktion der TGF- β Liganden mit den Rezeptoren initiiert wird. In Abbildung 1.4 ist dieser Signalweg schematisch dargestellt. Durch die Bindung des Liganden an die extrazellulären Domänen der beiden Rezeptortypen werden die intrazellulären Kinasedomänen in unmittelbare Nähe zueinander gebracht. Dies führt zur Transphosphorylierung der GS-Box des Typ I Rezeptors durch den konstitutiv-aktiven Typ II Rezeptor (Wrana et al. 1992; Wrana et al. 1994; Liu et al. 1995; Attisano et al. 1996; ten Dijke et al. 1996). Die Phosphorylierung führt zu Konformationsänderungen in der GS-Box. Die nun aktivierte Typ I Rezeptor-Kinase gibt das Signal über die Smad-Familie intrazellulärer Mediatoren weiter. Smads können in drei Klassen eingeteilt werden: die rezeptorregulierten Smads (R-Smads), die „common-mediator“-Smads (Co-Smads) und die inhibitorischen Smads (I-Smads) (Moustakas et al. 2001).

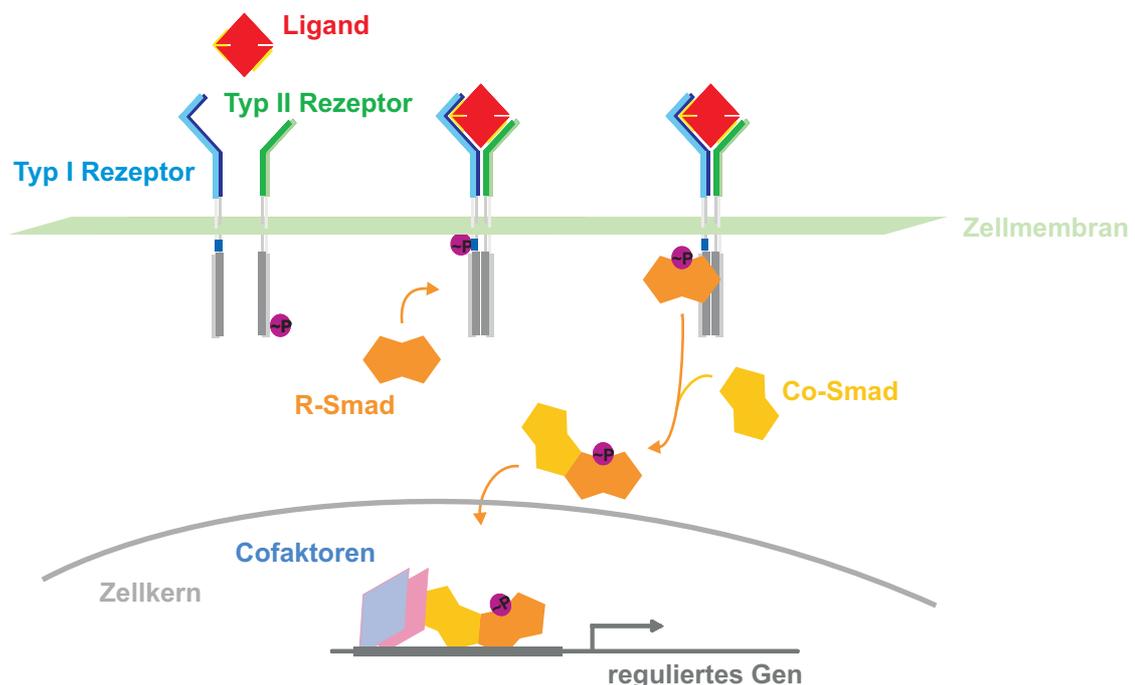


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Smad-abhängigen Signalwegs des TGF- β Systems.

Die R-Smads-1,-2,-3,-5,-8 werden direkt von den Typ I Rezeptor-Kinasen phosphoryliert und aktiviert (Shi and Massague 2003). Die R-Smads können in 2 Unterklassen aufgeteilt werden. Smad-2 und Smad-3 werden als Activin/TGF- β aktivierte Smads bezeichnet. Sie

können durch die Typ I Rezeptoren T β R-I, ActR-IB und Alk-7 phosphoryliert werden. Smad-1, -5 und -8 werden durch BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-I und Alk1 aktiviert und werden BMP aktivierte Smads genannt (Miyazawa et al. 2002).

Die Phosphorylierung der R-Smads führt zu einer Dissoziation vom Rezeptorkomplex und der Bildung des heteromeren Komplexes mit Smad-4, dem einzigen Vertreter der Klasse der Co-Smads. Dieser Komplex reichert sich im Zellkern an und hat dort die Möglichkeit der Assoziation mit diversen DNA-Bindungspartnern oder verschiedensten Koaktivatoren bzw. Korepressoren der Transkription (Attisano and Wrana 2002). Die I-Smads Smad-6 und -7 konkurrieren um die Interaktion mit den Rezeptoren oder den Co-Smads und üben so eine negative Regulation auf die Signalkaskade aus (Imamura et al. 1997; Nakao et al. 1997).

Die TGF- β Liganden können Signale auch Smad-unabhängig vermitteln. So konnte die Aktivierung der kleinen GTPase Ras und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) ERKs, p38 und c-Jun-terminale Kinasen gezeigt werden (Moustakas and Heldin 2005).

1.4 Die Ligand-Rezeptor Interaktionen – Spezifität und Affinität

Für die mehr als 30 Liganden der TGF- β Superfamilie stehen lediglich sieben Typ I und fünf Typ II Rezeptoren zur Verfügung. Dieses Missverhältnis und die Notwendigkeit der Bindung des Liganden an beide Rezeptortypen zur Auslösung der Signalkaskade (Yamashita et al. 1994) setzt eine Überlappung der Rezeptorspezifität voraus. In Abbildung 1.5 sind die verschiedenen Möglichkeiten der Ligand-Rezeptorinteraktionen von signalaktiven Komplexen innerhalb der TGF- β Superfamilie dargestellt. Hier wird deutlich, dass bestimmte Rezeptoren mit verschiedenen Liganden und einzelne Liganden mit mehreren Rezeptoren interagieren können. Die Promiskuität der Rezeptoren ist keinesfalls auf die jeweiligen Untergruppen der TGF- β Liganden beschränkt. In diesem Zusammenhang sind hier die Typ II Rezeptoren ActR-IIB und sein naher Verwandter ActR-II besonders hervorzuheben. Diese Rezeptoren binden Activine und Inhibine (Attisano et al. 1992; Zimmerman and Mathews 1996) sowie GDF-1/-8/-11 (Lee and McPherron 2001; Oh et al. 2002; Cheng et al. 2003) und Nodal (Yeo and Whitman 2001) um über den Typ I Rezeptor ActR-IB bzw. Alk-7 die Smad-2/-3 spezifische Genexpression zu initiieren. Gleichzeitig konnte die Interaktion von 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) gezeigt werden. Zusammen mit den Typ I Rezeptoren BMPR-IA/-IB bzw. ActR-I kann hier der Smad 1,5,8 spezifische Signalweg aktiviert werden.

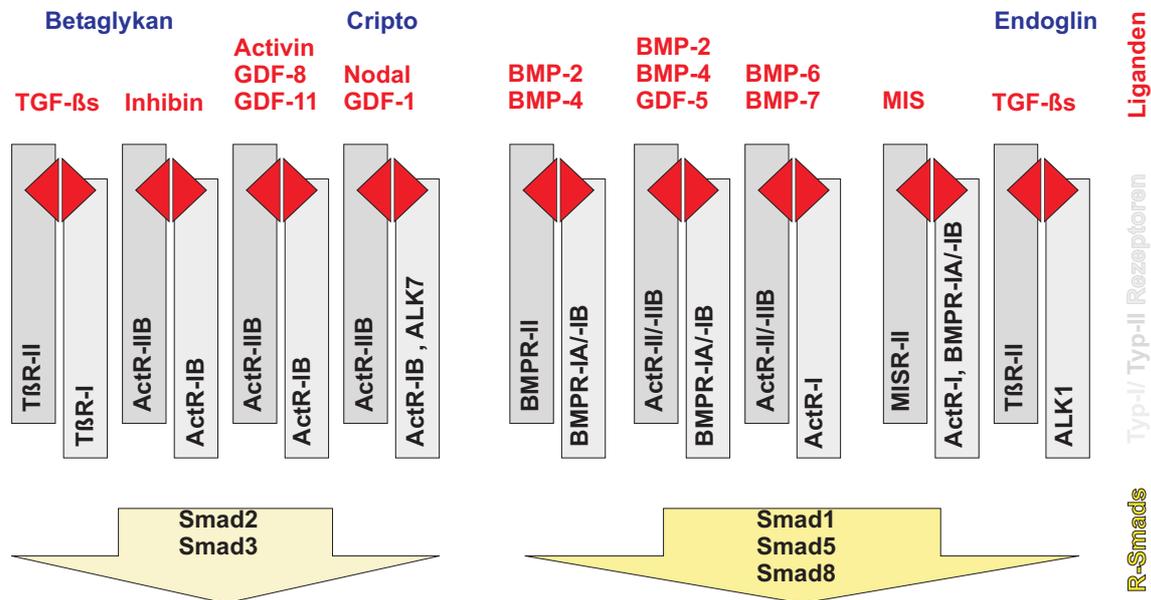


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Liganden der TGF-β Superfamilie mit Typ-I/-II/-III Rezeptoren und die Signalspezifität der R-Smads (nach Shi und Massague (Shi and Massague 2003)) in signalaktiven Ligand-Rezeptor Komplexen.

Auf der Grundlage von Quervernetzungsexperimenten wurden die Ligand-Rezeptor-Interaktionen innerhalb der TGF-β Superfamilie in zwei Gruppen unterteilt (Massague 1998). Zur ersten Gruppe zählen die Activine und TGF-βs. Diese binden hochaffin an ihre konstitutiv-aktiven Typ II Rezeptoren (Ventura et al. 1994). Erst diese Bindung ermöglicht die Rekrutierung und Transphosphorylierung des jeweiligen Typ I Rezeptors (Attisano et al. 1993; Ebner et al. 1993; Franzen et al. 1993; Bassing et al. 1994). Die Interaktion von ungebundenem TGF-β mit einem Typ I Rezeptor in Abwesenheit von TβR-II konnte bisher nicht gezeigt werden. Quervernetzungsexperimente mit ActA zeigen eine vergleichbare kooperative Bindungsreihenfolge. Auch hier ist eine hochaffine Interaktion mit seinen Typ II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB zu beobachten. Der Typ I Rezeptor alleine zeigt keine Wechselwirkung zum freien Liganden, wohl aber zum intermediären Ligand/TypII-Rezeptor Komplex (Mathews and Vale 1993; Attisano et al. 1996).

Der zweite Bindungsmodus ist am auffälligsten in der Interaktion von BMP-2, BMP-4, BMP-6 und GDF-5 mit deren Rezeptoren ausgeprägt. BMP-2 bindet mit hoher Affinität an die Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB. Die Affinität zu den Typ II Rezeptoren

BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB fällt um ein 50- bis 100-faches niedriger aus (Kirsch et al. 2000). GDF-5 bindet hochaffin an BMPR-IB und zeigt eine geringere Affinität zu seinen Typ II Rezeptoren (Ebisawa et al. 1999; Sebald et al. 2004; Nickel et al. 2005). Bindungsexperimente in ganzen Zellen geben die Auswirkung dieser Affinitätsunterschiede wieder. Hier kann sowohl die Bindung der Liganden zum Typ I als auch zum Typ II Rezeptor unabhängig voneinander nachgewiesen werden. Allerdings werden die Typ I Rezeptoren bevorzugt, die Bindung der Typ II Rezeptoren ist nur sehr schwach ausgeprägt. Bei der gleichzeitigen Anwesenheit der Typ I Rezeptoren tritt eine Verstärkung der Bindung des Liganden zu den Typ II Rezeptoren auf (ten Dijke et al. 1994; Letsou et al. 1995; Liu et al. 1995; Macias-Silva et al. 1998; Ebisawa et al. 1999; Rebbapragada et al. 2003). BMP-7 zeigt prinzipiell denselben kooperativen Modus, da hier eine hohe Affinität zu BMPR-IB und eine geringe Wechselwirkung mit den Typ II Rezeptoren (ActR-II/ActR-IIB) zu beobachten ist (ten Dijke et al. 1994; Yamashita et al. 1995). Allerdings scheint das BMP-7 Signal nicht von BMPR-IB, sondern von ActR-I vermittelt zu werden, zu dem der Ligand eine sehr geringe Affinität aufweist (Greenwald et al. 2003). Hier wird das Vorhandensein eines Corezeptors vorgeschlagen, der die Bindung des Liganden an die signalvermittelnden Rezeptoren unterstützt.

Für einige Liganden der TGF- β Superfamilie konnte die Beteiligung von Corezeptoren an der Bildung eines signalaktiven Ligand-Rezeptorkomplexes nachgewiesen werden (s. Abb. 1.5). Betaglykan fungiert als Typ III Rezeptor für TGF- β s und Inhibin (Lopez-Casillas et al. 1991; Lewis et al. 2000). Cripto ist für die Bindung von Nodal und GDF-1 an die signalvermittelnden Rezeptoren unerlässlich (Shen and Schier 2000; Cheng et al. 2003).

Neben den signalvermittelnden Rezeptoren und Corezeptoren finden sich in der Zellmembran auch Pseudorezeptoren für TGF- β Mitglieder. Der Pseudorezeptor BAMBI („BMP and Activin receptor membrane bound inhibitor“) besteht lediglich aus einer membrandurchspannenden und einer ligandenbindenden extrazellulären Domäne weshalb er um die Bildung signalaktiver Ligand-Rezeptor Komplexe konkurrieren kann (Onichtchouk et al. 1999; Tsang et al. 2000).

Außer der Rezeptorbindung können die TGF- β Liganden im extrazellulären Raum mit einer Vielzahl von löslichen Modulatorproteinen interagieren (Massague and Chen 2000; Harland 2001; Balemans and Van Hul 2002). Die Bindung an diese Faktoren verhindert den Zugang zu den Rezeptoren. So binden Decorin und α 2-Makroglobulin an freies TGF- β , Follistatin bindet Activine und BMPs. Die Mitglieder der Noggin, Chordin/SOG und DAN/Cerberus Familien sind potente Inhibitoren der BMPs.

1.5 Strukturelle Basis der Ligand-Rezeptor Interaktionen

Die Signale der TGF- β Superfamilie werden durch die gleichzeitige Bindung an die jeweiligen Typ I und Typ II Rezeptoren initiiert. Die röntgenkristallographische Beschreibung von Ligand-Rezeptorkomplexen liefert einen großen Beitrag zum Verständnis der molekularen Grundlagen und der Mechanismen der Wechselwirkung zwischen Liganden und Rezeptoren. Bisher konnten die Kristallstrukturen von BMP-2, BMP-7, TGF- β 3, und ActA im Komplex mit ihren hochaffinen Rezeptoren beschrieben werden.

Die dreidimensionale Struktur des heteromeren Komplex aus BMP-2 und der extrazellulären Domäne des BMPRII (Kirsch et al. 2000; Keller et al. 2004) in Abbildung 1.6A zeigt die Bindung von zwei Molekülen des hochaffinen Typ I Rezeptors an die Finger-Helix Vertiefungen des BMP-2 Dimers. Dabei stehen die Rezeptorketten mit beiden Monomeren des Liganden in Kontakt. Dem Modell der offenen linken Hand folgend wird die Bindungsregion als „wrist“-Epitop (Handgelenk-Epitop) bezeichnet. Die zweifache Symmetrie des ungebundenen Liganden (Scheufler et al. 1999) bleibt auch im Komplex erhalten. Die N-Termini der Rezeptoren zeigen von der Membran weg, die C-Termini sind in Richtung der Membranoberfläche orientiert und stehen nicht in Kontakt miteinander.

Die Ausdehnung der Bindungsfläche eines Rezeptormoleküls mit dem Liganden (Kirsch et al. 2000) beträgt 1130\AA^2 . An der Bindung sind 27 Aminosäurereste vom BMPRII und 15, bzw. 11 Reste der jeweiligen BMP-2 Untereinheiten beteiligt. Ein Großteil der Bindung wird von hydrophoben Resten getragen, wobei Phe85 in BMPRII eine zentrale Rolle zukommt (Kirsch et al. 2000). Die aromatische Seitenkette dieses Restes bildet ein „knob into hole“-Motiv mit der großen hydrophoben Tasche von BMP-2 an deren tiefster Stelle die Aminosäurereste M89 und M106 lokalisiert sind (s. Abb. 1.6B). Neben hydrophoben Wechselwirkungen konnten 11 Wasserstoffbrücken zwischen BMP-2 und dem Typ I Rezeptor identifiziert werden. Durch Mutations-/Funktionsanalysen von BMPRII und BMP-2 (Hatta et al. 2000; Kirsch et al. 2000) konnte das „wrist“-Epitop als Typ I Bindungsepitop bestätigt werden. In den Interaktionsanalysen mit den hier verwendeten Alaninmutationen Varianten wurden zwar einige schwache- aber keine Hauptdeterminanten der Typ I Rezeptorbindung gefunden.

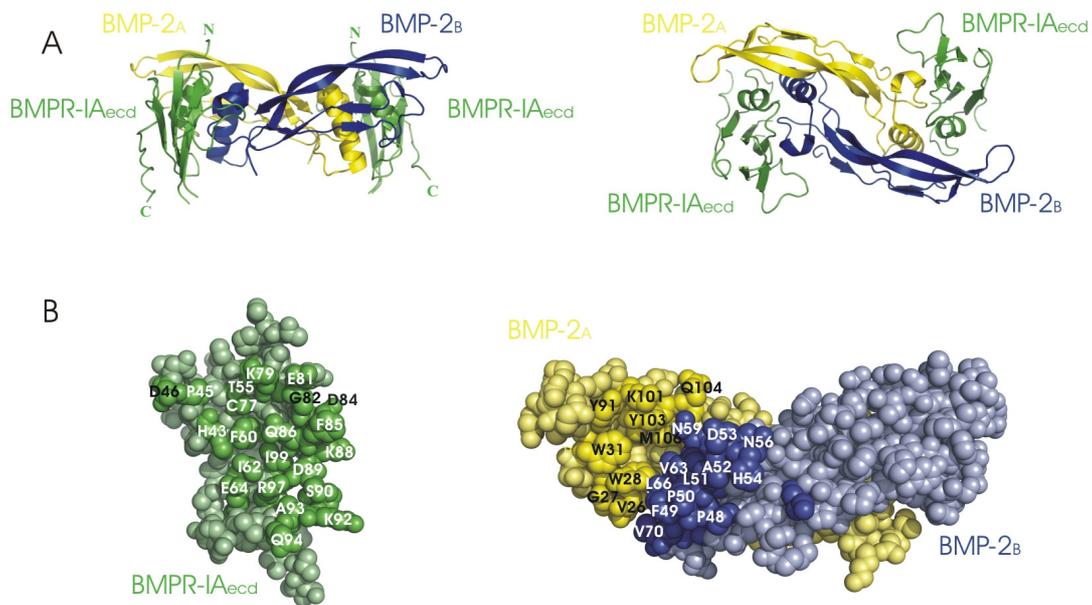


Abbildung 1.6: Röntgenkristallstruktur des binären Komplexes aus BMP-2 und der extrazellulären Domäne von BMPR-IA. **A:** Bänderdarstellung in der Seitenansicht (links) und der Draufsicht (rechts) (Kirsch et al. 2000). Die Monomere BMP-2_A und BMP-2_B sind gelb bzw. blau und die extrazellulären Domänen von BMPR-IA sind grün dargestellt. **B:** Kugelmodell der Ligand-Rezeptorinteraktionsfläche von BMP-2/BMPR-IA_{eccd} in der „open book“ Ansicht (BMPR-IA_{eccd} ist um 180° um die y-Achse gedreht) (Keller et al. 2004). Die Farbwahl aus A wird beibehalten. Die Aminosäurereste in der Kontaktfläche sind gekennzeichnet.

Die hochaufgelöste Struktur des binären Komplexes BMP-2/BMPR-IA (Keller et al. 2004) ermöglichte die genaue Charakterisierung der Geometrie des Wasserstoffbrückennetzwerkes. Die Hauptkettenamide von BMP-2 Leu51 und Asp53 wurden als Hauptdeterminanten der Bindung identifiziert. Durch eine Prolinmutation konnte insbesondere die Wichtigkeit der Wasserstoffbrücke ausgehend von der Hauptkette des Leu51 gezeigt werden. Die hydrophobe Umgebung dieses Restes bietet eine optimale Abschirmung der polaren Wechselwirkung vom Lösungsmittel und trägt somit zu deren Stärkung bei.

Mittels Mutationsanalysen von BMP-2 konnte auch das funktionelle Bindungsepitop für die Interaktion mit ActR-II und BMPR-II bestimmt werden (Kirsch et al. 2000). Die Bindung der Typ II Rezeptoren erfolgt demnach auf der konvexen Seite der Finger 1 und 2 von BMP-2, die dem Model der offenen linken Hand folgend als „knuckle“-Epitop (Knöchel-Epitop) bezeichnet wird. Funktionelle Untersuchungen zeigten nur geringe Affinitätsänderungen, Hauptdeterminanten der Typ II Interaktion wurden hier bisher nicht

identifiziert. Die größte Affinitätsänderung war hier bei der Variante BMP-2 A34D zu messen. Diese zeigte eine 10-, bzw. 3-fach geringere Affinität zu BMPR-II und ActR-II.

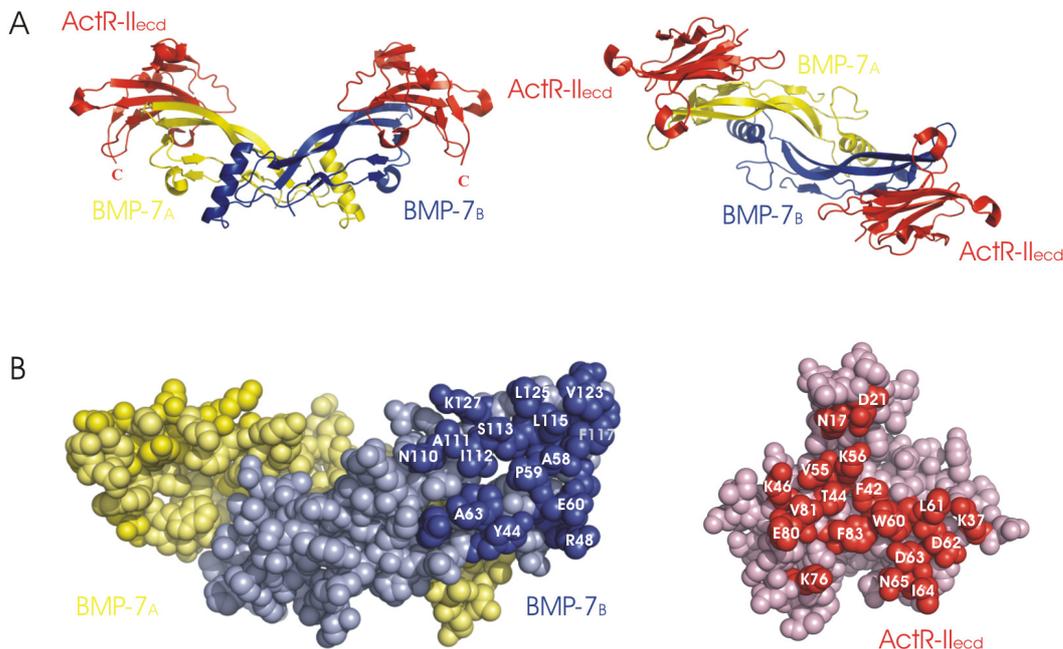


Abbildung 1.7: Röntgenkristallstruktur des binären Komplexes aus BMP-7 und der extrazellulären Domäne von ActR-II. **A:** Bänderdarstellung in der Seitenansicht (links) und der Draufsicht (rechts) (Greenwald et al. 2003). Die Monomere BMP-7_A und BMP-7_B sind gelb bzw. blau und die extrazellulären Domänen von ActR-II sind rot dargestellt. **B:** Kugelmodell der Ligand-Rezeptorinteraktionsfläche von BMP-7/ActR-II_{ecd} in der "open book" Ansicht (Act-II_{ecd} ist um 180° um die y-Achse gedreht). Die Farbwahl aus A wird beibehalten. Die Aminosäurereste in der Kontaktfläche sind gekennzeichnet.

Mit der Kristallstruktur des binären Komplexes aus BMP-7 und ActR-II (Greenwald et al. 2003) konnte das Typ II Rezeptor Bindepitop bestätigt werden. Wie in Abbildung 1.7 sichtbar, bindet jeweils ein Typ II Rezeptormolekül an das „knuckle“-Epitop einer Untereinheit des Liganden. Die C-Termini der Rezeptoren zeigen in Richtung der Oberfläche und stehen nicht miteinander in Kontakt. Die gesamte Bindungsfläche beträgt 676Å² pro Untereinheit und ist somit nahezu um die Hälfte kleiner als die Interaktionsfläche mit dem Typ I Rezeptor. Der Großteil der Bindung beruht hier auf hydrophoben Kontakten. Es wurden hier lediglich vier polare Interaktionen beschrieben, die alle, mit Ausnahme der zentralen Wasserstoffbrücke zwischen BMP-7 Ser113 und dem Hauptkettenamid von ActR-II Leu61 in der Peripherie des Bindepitops lokalisiert sind.

Abbildung 1.8C zeigt die Interaktionsflächen des binären Komplexes aus ActA mit der extrazellulären Domäne von ActR-IIB. Hier ist deutlich sichtbar, dass die Geometrie und

die Lage des Bindeepitopes von ActR-IIB an ActA nahezu komplett mit dem korrespondierenden Bindungsepitop von ActR-II an BMP-7 überlappt (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004). Es erstreckt sich auf 662\AA^2 pro Monomer und wird sowohl auf Liganden- als auch auf Rezeptorseite von hydrophoben Aminosäureresten dominiert. Wie beim binären Komplex aus BMP-7 und ActR-II (Greenwald et al. 2003) sind elektrostatische Interaktionen hauptsächlich an der Peripherie der Bindungsstelle zwischen ActA und ActR-IIB zu finden (Thompson et al. 2003). Im Zentrum der Bindungsfläche von ActR-IIB befindet sich ein Cluster aus den hydrophoben Resten Tyr42, Trp60 und Phe83, die bereits durch Mutationsanalysen als wichtige Determinanten der Bindung mit ActA und Inhibin identifiziert wurden (Gray et al. 2000). Auf der Ligandenseite zeigten Mutations-/Bindungsanalysen die Wichtigkeit des Restes ActA Lys102 auf. Die Substitution dieser Aminosäure mit einem neutralen oder negativ geladenen Rest führt zum Verlust der Bindung an ActR-II und ActR-IIB (Wuytens et al. 1999).

Die Besonderheit an den Komplexstrukturen von Activin mit ActR-IIB_{ecd} ist die relative Orientierung der Untereinheiten im dimeren Liganden. In den Ligand-Rezeptor Komplexen aus BMP-2/BMPRIIA bzw. BMP-7/ActR-II stimmt die Konformation des ungebundenen Liganden mit der des gebundenen weitestgehend überein (Scheufler et al. 1999; Kirsch et al. 2000; Greenwald et al. 2003; Keller et al. 2004). In beiden Fällen liegt der homodimere Ligand in einer schmetterlingsartigen, gestreckten Konformation vor. ActA zeigt im ungebundenen Zustand (Harrington et al. 2006) und im Komplex mit dem Modulatorprotein Follistatin (Thompson et al. 2005) eine weitestgehend gestreckte Konformation. In den Kristallstrukturen von ActA im Komplex mit dem Typ II Rezeptor sind die monomeren Untereinheiten des Liganden nahezu deckungsgleich mit freiem BMP-2 (r.m.s.d $1,25\text{\AA}^2$) oder TGF- β 3 (r.m.s.d $1,70\text{\AA}^2$), der Unterschied in der Konformation der Dimere ist jedoch augenscheinlich. In der Struktur von Thompson (Thompson et al. 2003) sind die Untereinheiten um 75° zueinander verdreht, wodurch das Dimer eine stark geknickte und kompakte Konformation einnimmt (s. Abb 1.8A). Auch in der Struktur des ActA/ActR-IIB Komplexes von Greenwald (Greenwald et al. 2004) zeigen die Untereinheiten des Liganden eine abweichende Orientierung (s. Abb 1.8B). Hier weist der Ligand eine geknickte Konformation auf, jedoch nicht in der hohen Kompaktheit. Diese konformationelle Flexibilität lässt die Bindung des hochaffinen Typ II Rezeptors am „knuckle“-Epitop zu, die mutmaßliche Typ I Rezeptorbindungsstelle ist jedoch nicht korrekt zusammengesetzt.

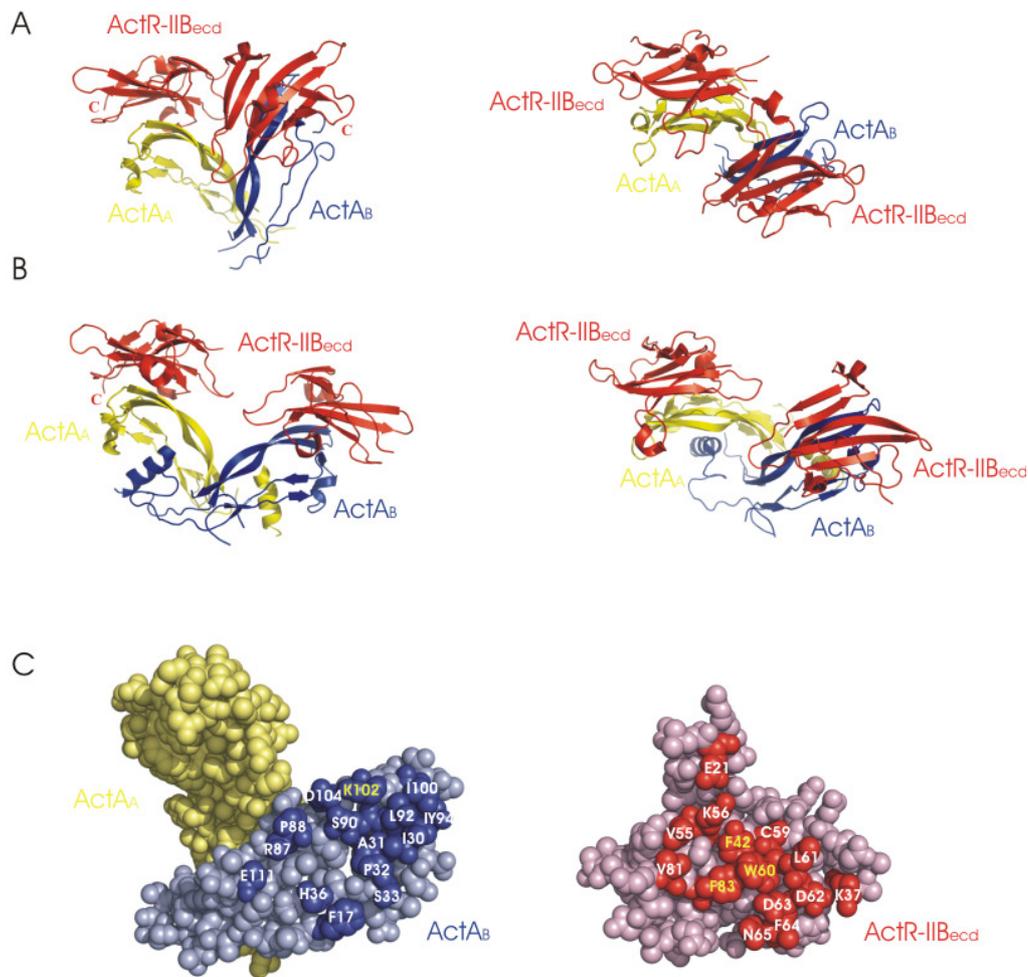


Abbildung 1.8: Röntgenkristallstrukturen des binären Komplexes aus ActA und der extrazellulären Domäne von ActR-IIB. **A:** Bänderdarstellung in der Seitenansicht (links) und der Draufsicht (rechts) (Thompson et al. 2003) **B:** Bänderdarstellung in der Seitenansicht (links) und der Draufsicht (rechts) (Greenwald et al. 2004). Die Monomere ActA_A und ActA_B sind gelb bzw. blau und die extrazellulären Domänen von ActR-IIB sind rot dargestellt. **C:** Kugelmodell der Ligand-Rezeptorinteraktionsfläche des binären Komplexes ActA/ActR-IIB_{ecd} (Thompson et al. 2003) in der “open book” Ansicht (ActR-IIB_{ecd} ist um 180° um die y-Achse gedreht). Die Farbwahl wird beibehalten. Die Aminosäurereste in der Kontaktfläche sind gekennzeichnet.

Nach dem Modell von Greenwald (Greenwald et al. 2004) wird ein funktionelles „wrist“-Epitop durch die Wechselwirkung von ActA mit zwei Typ II Rezeptoren geschaffen. Durch die Bindung an der Membranoberfläche wird der flexible Ligand „aufgespannt“, somit ergibt sich die favorisierte Konformation der Typ I Rezeptorbindungsstelle. Der Activin Typ I Rezeptor kann dadurch an den intermediären Komplex binden um die Signalkaskade zu initiieren.

Ein weiteres Beispiel für eine Konformationsänderung des Liganden im Komplex zeigt die Röntgenkristallstruktur von TGF- β 3 mit T β R-II (Hart et al. 2002), hier liegen die TGF- β 3 Untereinheiten um 101° zueinander verdreht vor (s. Abb. 1.9A).

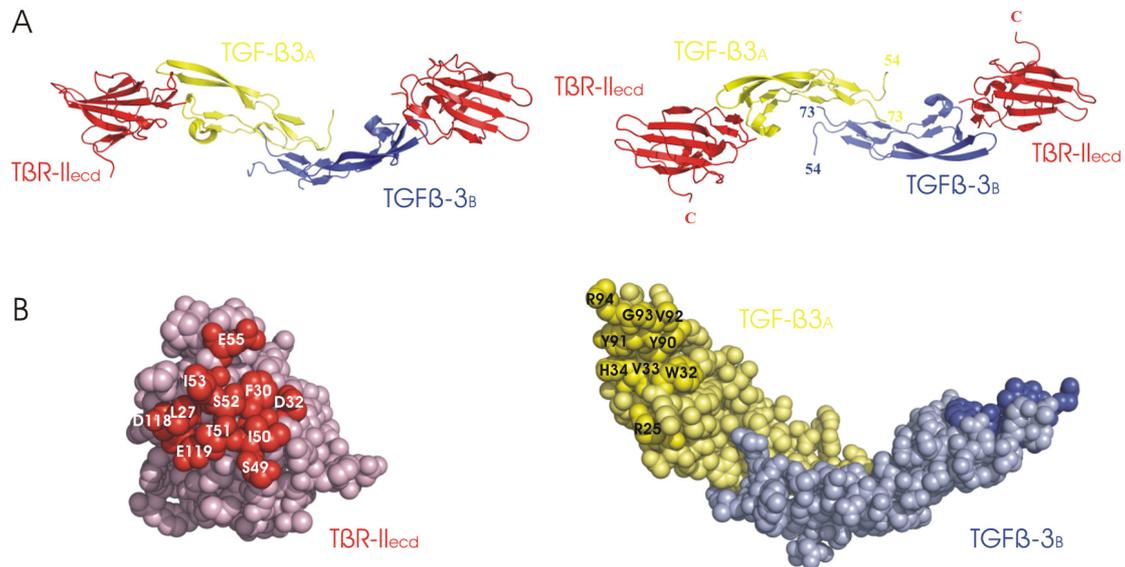


Abbildung 1.9: Röntgenkristallstruktur des binären Komplexes aus TGF- β 3 und der extrazellulären Domäne von T β R-II. **A:** Bänderdarstellung in der Seitenansicht (links) und der Draufsicht (rechts) (Hart et al. 2002). Die Monomere TGF- β _{3A} und TGF- β _{3B} sind gelb bzw. blau und die extrazellulären Domänen von T β R-II sind rot dargestellt. **B:** Kugelmodell der Ligand-Rezeptorinteraktionsfläche von TGF- β 3/T β R-II in der ‘open book’ Ansicht (T β R-II_{ecd} ist um 180° um die y-Achse gedreht). Die Farbwahl aus A wird beibehalten. Die Aminosäurereste in der Kontaktfläche sind gekennzeichnet.

Diese Drehung führt zu einer Unordnung im ‘wrist’-Epitop was, die Überlappung der Typ I Rezeptorepitope von BMP-2 und TGF- β 3 vorausgesetzt, die Bindung der Typ I Rezeptoren unterbinden würde. Folglich wäre, ähnlich wie beim oben beschriebenen Activin-Modell, die Zellmembran zur Bildung einer funktionellen Typ I Rezeptorbindungsstelle unerlässlich. Neuere Untersuchungen des TGF- β Bindungsmodus weisen jedoch auf eine membranunabhängige Bindung von TGF- β 3 an den TGF- β Typ I Rezeptor hin (Zuniga et al. 2005).

Im Gegensatz zu der bisher beschriebenen Typ II Rezeptor-Ligand Interaktionsfläche, dem ‘knuckle’-Epitop, binden im TGF- β 3/T β R-II Komplex die Typ II Rezeptoren an die äußersten Spitzen der Monomere des Liganden. Diese Region wird dem Modell der offenen linken Hand folgend als ‘fingertip’-Epitop (Fingerspitzen-Epitop) bezeichnet (Hart et al. 2002). Die Interaktionsfläche umfasst 515 \AA^2 und setzt sich aus elf

Aminosäureresten von T β R-II und neun von TGF- β 3 zusammen (s. Abb 1.9B). Auf der Seite des TGF- β 3 stellen die Reste Arg94 und Arg25 wichtige Bindungs determinanten dar, die mit den Resten Ile53, Glu119 und Asp32 von T β R-II in Kontakt stehen (Burmester et al. 1993; Qian et al. 1996; Burmester et al. 1998; De Crescenzo et al. 2006).

1.6 Kooperativität der Rezeptor-Oligomerisierung

Bei der Aktivierung von Rezeptoren mit einer einfachen Transmembrandomäne sind oft hoch- und niederaffine Interaktionen zwischen dem Liganden und den Rezeptoren zu beobachten. Erstmals wurde dieser Sachverhalt für die Bindung des homodimeren „Human Growth Hormon Receptors“ (hGHR) an seinen hGH beschrieben (Cunningham et al. 1991). Während hier der Ligand zwei unterschiedliche Bindungsstellen für die Rezeptoren aufweist, werden in heterodimeren Rezeptorkomplexen hoch- und niederaffine Interaktionen durch unterschiedliche Rezeptortypen generiert (Massague et al. 1994; Stroud and Wells 2004).

Eine allgemeine Beobachtung bei der ligandenvermittelten Komplexbildung ist die Kooperativität bei der Bindung des niederaffinen Rezeptors in der Zellmembran (Sebold and Mueller 2003; Stroud and Wells 2004). Auf Zellen binden die niederaffinen Rezeptorketten nur sehr schwach oder gar nicht an den Liganden. Erfolgt aber zunächst die Bindung des Liganden an seinen hochaffinen Rezeptor, dann kann der niederaffine Rezeptor in den Komplex rekrutiert werden.

Für diesen kooperativen Effekt werden drei wesentliche Mechanismen vorgeschlagen: (1) Konformationsänderungen im Liganden: Durch die Bindung des hochaffinen Rezeptors kommt es zu Konformationsänderungen im Liganden, worauf ein funktionelles Bindeepitop für den niederaffinen Rezeptor gebildet wird. (2) Zusammengesetztes Bindeepitop: Die Bindung des niederaffinen Rezeptors an den Liganden wird durch zusätzliche Rezeptor-Rezeptor Kontakte verstärkt. (3) Affinitätssteigerung durch die Reduzierung der Dimensionalität: Der frei im interzellulären Raum (3 Dimensionen) diffundierende Ligand wird vom hochaffinen Rezeptor gebunden, der sich zweidimensional auf der Membranoberfläche bewegt. Der Verlust eines Freiheitsgrades führt neben einer lokalen Konzentrationserhöhung des Liganden zu einer produktiveren Begegnung mit dem niederaffinen Rezeptor.

Aus den Kristallstrukturen der Liganden und intermediären Ligand-Rezeptor Komplexen der TGF- β Superfamilie lassen sich Muster dieser Mechanismen erkennen. Der Vergleich der Strukturen von ungebundenem TGF- β 1, bzw. TGF- β 3 (Hinck et al. 1996; Mittl et al. 1996) mit TGF- β 3 im Komplex mit T β R-II (Hart et al. 2002) zeigt umfassende Änderungen in der Konformation Liganden. Auch die Strukturen von ActA im Komplex mit ActR-IIB (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004) zeigen je nach Kristallform eine unterschiedliche Architektur. Die Nähe der Bindungsstelle des hochaffinen Typ II Rezeptors zur mutmaßlichen Typ I Rezeptorbindungsstelle lässt auf einen potentiellen Kontakt zwischen TGF- β Typ I und Typ II Rezeptor schließen (Hart et al. 2002; Zuniga et al. 2005; De Crescenzo et al. 2006). In der Struktur des binären Komplexes aus BMP-2 und BMPR-IA (Kirsch et al. 2000) weist der Ligand keinen Unterschied zum ungebundenen BMP-2 (Scheufler et al. 1999) auf. Ein allosterischer Mechanismus zur Erklärung der Kooperativität kann hier also weitgehend ausgeschlossen werden. Aus der Kombination der Strukturen der binären Komplexe BMP-2/BMPR-IA_{ecd} und BMP-7/ActR-II_{ecd} kann ein Modell eines ternären BMP Ligand-Rezeptor Komplexes erstellt werden (Greenwald et al. 2003; Sebald and Mueller 2003). In diesem Modell stehen Typ I und Typ II Rezeptoren nicht in Kontakt miteinander. So scheint hier auch der Mechanismus eines zusammengesetzten Bindepitopes nicht für das kooperative Verhalten des niederaffinen Rezeptors verantwortlich zu sein. Eine eindeutige Aussage über den dabei zutreffenden Mechanismus der Kooperativität kann jedoch erst durch die experimentelle Lösung der Struktur des ternären Komplexes gemacht werden.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Die Initiation der Signalkaskade der TGF- β Superfamilie verläuft über die Bindung des Liganden an zwei Arten von Serin/Threonin Kinase Rezeptoren, die als Typ I und Typ II Rezeptoren bezeichnet werden. Die Rezeptoraktivierung findet in zwei Schritten statt: Zunächst wird der Ligand von seinem hochaffinen Rezeptor gebunden, dann kann der niederaffine Rezeptor rekrutiert werden. Bisher sind nur dreidimensionale Strukturen von intermediären hochaffinen Komplexen bekannt. Die molekularen Mechanismen der Rekrutierung des niederaffinen Rezeptors sind unklar.

Die Zielstellung dieser Arbeit war es, durch röntgenkristallographische Analyse die Struktur des ternären Ligand-Rezeptor Komplexes von BMP-2 mit seinem hochaffinen Typ I Rezeptor BMPR-IA und dem niederaffinen Typ II Rezeptor ActR-IIB aufzuklären. Die Struktur dieses signalaktiven Komplexes soll Einblicke in den Mechanismus der Rezeptoraktivierung ermöglichen. Hierzu sollten Expressions- und Reinigungsstrategien zur Präparation der extrazellulären Domänen von BMPR-IA und ActR-IIB gefunden werden. Nach der Präparation des ternären Komplexes aus den Komponenten BMP-2, BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} sollte dieser charakterisiert und in Kristallisationsexperimente eingesetzt werden.

Der Activin Typ IIB Rezeptor weist eine breite Ligandenspezifität innerhalb der TGF- β Superfamilie auf. Allerdings sind die Wechselwirkungen mit verschiedenen Liganden durch unterschiedliche Affinitäten gekennzeichnet. So bindet ActR-IIB_{ecd} mit hoher Affinität an ActA, während die Interaktion mit BMP-2 durch eine geringe Affinität gekennzeichnet ist. Anhand von funktionellen Analysen sollte im Rahmen dieser Arbeit, ergänzend zur strukturellen Charakterisierung, die Ursache von Affinität und Spezifität bei der Ligand-Typ II Rezeptor Wechselwirkung genauer untersucht werden. Dazu sollten Mutagenesestudien sowohl auf der Seite des ActR-IIB als auch des BMP-2 durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

AA	Acrylamid	k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeit
Abb.	Abbildung	LB	Luria Broth
ActR-I	Activin Typ I Rezeptor	M_w	Molekulargewicht
ActR-IB	Activin Typ IB Rezeptor	OD	Optische Dichte
ActR-II	Activin Typ II Rezeptor	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
ActR-IIB	Activin Typ IIB Rezeptor	PCR	Polymerase Kettenreaktion
Alk	Activin receptor-like kinase	PDB	Protein Datenbank
AMH	Anti Müllerian Hormone	r.m.s.d	Quadratwurzel der mittleren Abweichung
Amp	Ampicillin	red.	reduziert
BMP	Bone Morphogenetic Protein	n. red.	nicht reduziert
BMPR-IA	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Typ IA	rpm	Umdrehungen pro Minute
BMPR-IB	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Typ IB	RT	Raumtemperatur
BMPR-II	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Typ II	ru	Resonanz-Einheiten („resonance units“)
bp	Basenpaare	SDS	Natriumdodecylsulfat
cDNA	kodierende DNA	<i>Sf-9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Da	Dalton	β -ME	β -Mercaptoethanol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	SV	Säulenvolumen
DNA	Desoxyribonucleinsäure	TB	Terrific Broth
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TFA	Trifluoressigsäure
ecd	extrazelluläre Domäne	TGF- β	Transforming Growth Factor β
FPLC	Protein Flüssigkeits Chromatographie	T β R-I	TGF- β Typ I Rezeptor
GDF	Growth and Differentiation Factor	T β R-II	TGF- β Typ II Rezeptor
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	ÜN	über Nacht
K_D	Dissoziationskonstante	ÜNK	Übernachtskultur
k_{off}	Dissoziationsgeschwindigkeit	wt	wildtypisch

2.2 Ausgangsmaterialien

2.2.1 Chemikalien, Enzyme

Chemikalien und Enzyme werden von folgenden Firmen in höchster Reinheitsstufe bezogen: Amersham, Biorad, Biolabs, Fermentas, Fluka, Gibco-BRL, Merck, NEB, Pharmacia, Promega, Pharmingen, Roth, Serva, Sigma, Stratagene.

2.2.2 Kits

DNA Präparation:	Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
Agarose-Gelextraktion:	GelExtraction Sytem (Promega)

2.2.3 Bakterienstämme

MM 294:	ATCC 39607	F- supE44 hsdR17 endA1 thi-1 lambda
JM109 :	ATCC 53323	F' traD36 proA+ proB+ lacIq delta(lacZ)M15 delta(lac-proAB) supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 thi- 1 endA1 relA1 e14- lambda-
DH5alpha:	ATCC 53868	F- supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 deoR lambda-
AD494(DE3):	Novagen	trxB hsdS gal (lclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5)
OrigamiB(DE3):	Novagen	F – ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB (KanR, TetR)
B834 (DE3):	Novagen	F – ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm met (DE3)
BL21 (DE3):	Novagen	F – ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm (DE3)

2.2.4 Vektoren

modifizierter (Novagen) Grundgerüst: T7 Promotor; lacI Sequenz; Thioredoxin A (N-terminal); His-6 Tag
pET32a:

Modifikation (Kirsch et al. 2000): durch die Deletion der Basenpaare 223 bis 297 aus dem originalen Vektor ist die Position der Thrombinschnittstelle unmittelbar vor das Zielgen verschoben.

pQE80L: (Novagen) KanRO- ; T5 Promotor/lac Operator Element

2.2.5 Oligonukleotide

Klonierung von acvr2b_{ecd} in pET32a mod:

ActRIIBPU5-3': TTATTGCTCAGCTACTCGTACGTGACTTCTG

Mutageneseprimer für Mutationsanalyse von ActR-IIB_{ecd}:

K37A5: GGGAACAGGACGCGCGGCTGCACTGCTAC

K37A3: GTAGCAGTGCAGCCGCGCGTCCTGTTCCC

Y42A5: GCTGCACTGCGCGGCCTCGTGGCGCAAC

Y42A3: GTTGCGCCACGAGGCCGCGCAGTGCAGC

K56A5: CCATCGAGCTGGTGGCGAAGGGCTGCTGGCTAG

K56A3: CTAGCCAGCAGCCCTTCGCCACCAGCTCGATGG

W60A5: GAAGAAGGGCTGCGCGCTAGATGACTTC

W60A3: GAAGTCATCTAGCGCGCAGCCCTTCTTC

L61A5: GAAGAAGGGCTGCTGGGCAGATGACTTCAATTG

L61A3: CAATTGAAGTCATCTGCCAGCAGCCCTTCTTC

L61P5: GAAGAAGGGCTGCTGGCCGGATGACTTCAATTG

L61P3: CAATTGAAGTCATCCGGCCAGCAGCCCTTCTTC
D63A5: GCTGCTGGCTAGATGCGTTCAATTGCTACGAC
D63A3: GTCGTAGCAATTGAACGCATCTAGCCAGCAGC
F83A5: GAACCCCCAGGTGTACGCCTGCTGCTGCGAAG
F83A3: CTTCGCAGCAGCAGGCGTACACCTGGGGGTTC
E10R5: CTGAGACTCGGCGTTGCATCTACTAC
E10R3: GTAGTAGATGCAACGCCGAGTCTCAG
L28W5: CCAGAGCGGCTGGGAGCGCTGCG
L28W3: CGCAGCGCTCCCAGCCGCTCTGG
R94A5: CTGCAACGAGGCGTTCACCCAC
R94A3: GTGGGTGAACGCCTCGTTGCAG

Mutageneseprimer für die Methioninsubstitution von BMPR-IA_{ecd}:

A3_F35M5': GAGGATACCTTGCCTATGTTAAAGTGCTATTGC
A3_F35M3': GCAATAGCACTTTAACATAGGCAAGGTATCCTC
A3_L73M5': CAGGGAGAAACCACAATGGCTTCAGGGTGTATG
A3_L73M3': CATAACCCTGAAGCCATTGTGGTTTCTCCCTG
A3_L95M5': CCAAAGCCAGATGCGCCGGACAATAG
A3_L95M3': CTATTGTCCGGCGCATCTGGGCTTTTGG

Mutageneseprimer für die Methioninsubstitution von BMP-2:

F41M5: GGGTATCACG CCATGTA CTG CCACGGAG
F41M3: CTCCGTGGCA GTACATGGCG TGATACCC
Y91M5: GCTATCTCGA TGCTGATGCT TGACGAGAAT G
Y91M3: CATTCTCGTC AAGCATCAGC ATCGAGATAG C

2.2.6 Wachstumsfaktoren

<u>Protein</u>	<u>Spezies</u>	<u>Bezug</u>
Activin A:	Sf-9; rekombinant	Im Rahmen meiner Diplomarbeit selbst hergestellt
BMP-2:	CHO; rekombinant	R&D Company
BMP-7:	CHO; rekombinant	R&D Company
BMP-2:	<i>E.coli</i> ; rekombinant	Prof. Dr. W. Sebald

2.3 Steriles Arbeiten

Die Sterilbänke sind absolut keimfrei zu halten und mindestens 15 min vor Gebrauch anzuschalten. Vor dem Arbeiten an der Sterilbank werden Hände und Unterarme mit 70-prozentiger Ethanollösung gewaschen. Pipetten, Flaschen- und Kolbenhäse werden abgeflammt. Hitzestabile Lösungen werden mit dem Sterico Vapoklav Dampfsterilisator für 30min bei 120°C und 1,2 bar autoklaviert. Hitzelabile Lösungen werden mittels Spritzen- oder Aufsatzfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2µM sterilfiltriert. Glasgeräte und Pipetten werden nach dem Trockenautoklavieren in den Heißluftschrank (Heraeus Trockenschrank ST 5060) für 6 h bei 180°C eingebracht.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Klonierung von ActR-IIB_{ecd}

Mit spezifischen Primern wird die korrespondierende Sequenz der extrazellulären Domäne des Rezeptors mit der PCR-Methode amplifiziert und gleichzeitig mit den Restriktions-Schnittstellen für NcoI und Bpu1101I versehen. Nach der enzymatischen Spaltung und einer Agarosegel- Aufreinigung erfolgt die Ligation in den modifizierten pET32a Vektor. Zur DNA-Amplifikation werden die Plasmide zunächst in den Bakterienstamm MM294 (DE3) transformiert. Von 3-6 Transformanden wird eine DNA-Minipräparation

durchgeführt. Die Richtigkeit des Plasmids wird durch DNA-Sequenzierung (Service der Humangenetik, Biozentrum der Universität Würzburg) überprüft. Aus dem für korrekt befundenen Transformanden wird eine DNA Maxipräparation angelegt, die in den Expressionsstamm transformiert wird.

2.4.2 Mutagenese von $BMPR-IA_{ecd}$ und $ActR-IIB_{ecd}$

Mutationen werden durch die Zwei-Schritt-PCR Methode eingeführt. Nach den beiden PCR-Reaktionen wird eine Restriktionsspaltung des Inserts mit *NcoI* und *Bpu1102I* durchgeführt. Im Agarose-Gel wird das Fragment aufgereinigt und kann in das modifizierte Vektor Rückgrat ligiert werden. Nach Transformation in *E.coli* MM294 wird eine DNA-Minipräparation durchgeführt. Das die jeweilige Mutation aufweisende Plasmid wird dann in den jeweiligen Expressionsstamm transformiert.

2.5 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

2.5.1 Präparative Proteinexpression in TB-Medium

TB-Medium: 13,3g/l Bacto-Trypton; 26,6g/l Bacto-Yeast Extract; 4,4ml/l Glycerin.
Vor dem Verwenden werden zu 720ml TB-Medium 80ml 10x Pi gegeben

10x Pi: 0,17M KH_2PO_4 , 0,72M K_2HPO_4

Waschpuffer: 20mM Tris/HCl; pH 7,5; 150mM NaCl

Zur Fermentation werden 6-12 Schüttelkolben mit je 800ml TB-Medium (plus entsprechende Antibiotika und 200 μ l Antifoam) mit einer Übernachtskultur im Verhältnis 1:40 angeimpft und bei 30°C und 120rpm geschüttelt (Braun Certomat RM). Ab einer OD_{550} von 0,5 werden die Fermentationsansätze auf Raumtemperatur (21°C) abgekühlt. Nach der Induktion mit 1mM IPTG erfolgt eine 16- bis 18-stündige Inkubation unter Schütteln. Die Expression wird beendet, indem die Zellen bei 4°C für 10min mit 7000rpm

abzentrifugiert werden (JA-10 Rotor). Das Pellet wird im Waschpuffer gründlich resuspendiert und erneut 10min bei 7000rpm sedimentiert. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes wird das Pellet portioniert und bei -80°C aufbewahrt.

2.5.2 Selenmarkierung unter metabolischer Repression

Vorratslösungen für Minimalmedium

10X M9:	60g Na_2HPO_4 ; 30g KH_2PO_4 ; 5g NaCl; ad 1000ml dH_2O ; pH 7,2 - 7,4; autoklavieren
1000x MgSO_4 :	1M $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; autoklavieren
1000x CaCl_2 :	1M $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; autoklavieren
100x Spurenelemente:	5g EDTA; 0,8g FeCl_3 ; 0,05g ZnCl_2 ; 0,01g CuSO_4 ; 0,01g CoCl_2 ; 0,01g H_3BO_3 ; 1,6g $\text{MnCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,01g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; ad 1000ml, pH 8,0; steril filtrieren; dunkel lagern
100x Glucose:	40g Glucose/100ml dH_2O ; sterilfiltrieren
1000x Thiamin:	50mg Thiamin HCl/ml dH_2O ; frisch herstellen, sterilfiltrieren
500x NH_4Cl :	0,25g NH_4Cl /ml dH_2O

Zur Herstellung des Minimalmediums wird 800ml autoklaviertes dH_2O vorgelegt und die oben angegebenen Vorratslösungen schrittweise unter Schwenken zugegeben. Die Volumina der Einzelkomponenten sind auf ein Endvolumen von 1l zu beziehen, auf das am Schluss aufgefüllt wird.

Aminosäuremix: 100mg/l L-Lysin; 100mg/l L-Phenylalanin; 100mg/l L-Threonin; 50mg/l L-Isoleucin; 50mg/l L-Leucin; 50mg/l L-Valin

Selenomethionin: 50mg/l D/L-Selenomethionin

Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen. Der Aminosäuremix kann in Pulverform gemischt oder frisch als 100-fach konzentrierte Lösung angesetzt werden.

LB-Medium: 10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Yeast Extract; 10g NaCl; pH 7,5

Selenmarkierung von BMP-2

Zur Selenmarkierung von BMP-2 kann der Expressionsstamm MM294 beibehalten werden. Zusätzlich wurden Versuche mit dem Methionin-auxotrophen Stamm *E.coli* B834(DE3) durchgeführt. Von einer Einzelkolonie wird eine 2ml Starterkultur mit LB-Medium (+30mg/l Kanamycin) angelegt. Die Starterkultur wird in 400ml Minimalmedium eingebracht und 12-16 h mit 120 rpm bei 37°C geschüttelt. 30ml dieser Zellsuspension werden nun zu 0,8l Minimalmedium (+30mg/l Kanamycin) in Kolben mit Schikanen gegeben und bis zu einer OD von 0,3 mit 120rpm bei 37°C inkubiert. An diesem Punkt werden der Aminosäuremix und das Selenomethionin zugegeben und für 0,5 h bei 37°C mit 120 rpm geschüttelt. Nach der Induktion mit 1mM IPTG wird unter denselben Bedingungen für weitere 3,5 h inkubiert. Die Bakterien werden dann wie bei der klassischen Fermentation geerntet und weiter prozessiert.

Selenmarkierung von BMPR-IA_{ecd}

Zur Markierung von BMPR-IA_{ecd} liegt das Expressionsplasmid in *E.coli* BL21(DE3) vor. Auch hier wird eine Starterkultur mit einer Einzelkolonie in 2ml LB-Medium (+30mg/l Kanamycin + 50mg/l Ampicillin) angelegt. Diese wird in 400ml Minimalmedium eingebracht und 12-16 h mit 120 rpm bei 37°C geschüttelt. 30ml dieser Zellsuspension werden anschließend zu 0,8l Minimalmedium (+30mg/l Kanamycin + 50mg/l Ampicillin) in Kolben mit Schikanen gegeben und bis zu einer OD von 0,3 mit 120rpm bei 37°C inkubiert. An diesem Punkt werden der Aminosäuremix und das Selenomethionin zugegeben und für 0,5 h bei 37°C mit 120 rpm geschüttelt. Nach der Induktion mit 1mM IPTG wird unter denselben Bedingungen für 12-16 h inkubiert. Die Bakterien werden dann wie bei der klassischen Fermentation geerntet und weiter prozessiert.

2.5.3 Herstellung des Rohextraktes der Thioredoxin-Fusionsproteine

Aufschlusspuffer: 20mM Tris/HCl; pH 7,9; 500mM NaCl; 5mM Imidazol

Sonotrode: System 585, Ultraschallkopf 512/1204 (KLM)

Ultrazentrifuge: Ultrazentrifuge L8-70M; 45Ti-Rotor (Beckmann)

Das bei -80°C gelagerte Bakterienpellet wird in 6 Volumenteilen (w/v) Aufschlusspuffer bei 4°C resuspendiert. In einer Glasrosette wird die Suspension in 8 Intervallen zu je 30s bei 300W beschallt. Der Zeitabstand zwischen den Intervallen beträgt jeweils 30s. Nach dem Aufschluss werden feste Bestandteile durch Ultrazentrifugation bei 18°C und 40000rpm pelletiert. Der Überstand enthält das lösliche Fusionsprotein und kann weiter prozessiert werden.

Im Falle des Trx-ActR-IIB_{ecd} wird nach Ultrazentrifugation oft ein sehr großes Pellet erhalten. Dies wird erneut resuspendiert, aufgeschlossen und zentrifugiert.

2.6 Chromatographische Verfahren zur Reinigung von Proteinen

2.6.1 Metall-Affinitäts-Chromatographie

Auftragspuffer:	20mM Tris/HCl; pH 7,9; 500mM NaCl; 5mM Imidazol
Waschpuffer:	20mM Tris/HCl; pH 7,9; 500mM NaCl; 60mM Imidazol
Elutionspuffer:	20mM Tris/HCl; pH 7,9; 500mM NaCl; 500mM Imidazol
EDTA-Puffer:	50mM Tris/HCl; pH 7,5; 150mM NaCl; 1mM EDTA
Vorsäulenmaterial:	Sephacryl S-100 (Pharmacia)
Säulenmatrix:	Chelating Sepharose FF (Pharmacia)
Säulenkartuschen:	Econo-Column Glassäule (BioRad)
Pumpe:	Minipuls 3 (Gilson)

Die Metall-Affinitäts-Chromatographie wird im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Bei allen Schritten dieses Verfahrens ist eine Flussrate von 2,5ml/min empfehlenswert.

10ml Chelating Sepharose FF (Pharmacia) werden in die Glassäule eingebracht und mit 10 Säulenvolumina (SV) dH₂O gewaschen. Durch die Zugabe von 50ml einer 50mM NiCl₂ Lösung wird die Matrix mit Ni-Ionen beladen. Überschüssiges NiCl₂ wird mit 5-10 SV dH₂O ausgewaschen. Eine zweite Säule wird mit 2ml Sephacryl S-100 (Pharmacia) bestückt und wird der Hauptsäule als Filter vorgeschaltet. Auf die äquilibrierte Säule kann der Rohextrakt aufgetragen werden. Nach dem Auftrag des Rohextraktes wird das System mit 2-5 SV Auftragspuffer nachgespült, dann kann die Vorsäule entfernt werden. Nun wird mit 5 SV Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt in 6 Fraktionen zu je 10ml. Mittels SDS-Page wird der Proteingehalt der Fraktionen analysiert. Proteinhaltige Fraktionen werden zusammengegeben und gegen 4l EDTA-Puffer dialysiert. Durch das Spülen mit 5 SV 100mM EDTA, pH 8 wird die Säulenmatrix regeneriert.

2.6.2 Anionenaustausch-Chromatographie

Laufpuffer:	20mM Tris/HCl; pH 7,4; 5mM Na-Azid
Elutionspuffer:	20mM Tris/HCl; pH 7,4; 5mM Na-Azid; 1M NaCl
Matrix:	Fractogel EMD TMAE 650 (S) (Merck, Darmstadt)
Säule:	Superperformance 10 (Merck, Darmstadt)
Pumpe:	L6210 intelligent pump (Merck/Hitachi)
Detektor:	GAT PHD 601; GAT-Linear (Gamma Analysen-Technik)
Fraktionssammler:	Model 203 (Gilson)

Die Anionen-Austauschchromatographie wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Säule wird mit 12ml Fractogel EMD TMAE 650 (S) Suspension befüllt und mit 5 SV dH₂O gespült und komprimiert. Nach der Äquilibration mit Auftragspuffer wird die Proteinlösung über einen 50ml Superloop mit einer Flussrate von 1,5ml/min aufgetragen. Eine Proteinmasse von 150mg pro Lauf sollte hier nicht überschritten werden. Die beladene Säule wird solange mit Auftragspuffer gespült bis die Nulllinie erreicht ist. Die Elution erfolgt im Salzgradienten bei einer Flussrate von 1ml/min. Die Gradienten für die verschiedenen Rezeptoren sind in Tabelle 2.1 angegeben. Es werden Fraktionen zu 1,5ml gesammelt. Die im Chromatogramm angezeigten Peakfraktionen werden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

BM _{PR} -IA _{e_{cd}}	
t [min]	c _{NaCl} [M]
0	0
60	0,35
70	1,0
80	1,0
90	0

ActR-IIB _{e_{cd}}	
t [min]	c _{NaCl} [M]
0	0
35	0,3
40	1,0
50	1,0
55	0

Tabelle 2.1: Gradient der Anionen-Austauschchromatographie für die Aufreinigung von BM_{PR}-IA_{e_{cd}} (links) und ActR-IIB_{e_{cd}} (rechts)

2.6.3 Reverse-Phase-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie

TFA-Lösung:	0,1 % (v/v) TFA in ddH ₂ O
Elutionspuffer:	Acetonitril (AN)
Säule - Analytisch:	Vydac-214TP; C4; 10µM Porengröße; 0,46 x 25 cm (MZ-Analysentechnik)
Säule - Semipräparativ:	Vydac-214TP; C4; 10µM Porengröße; 0,8 x 25 cm (MZ-Analysentechnik)
Pumpe:	2150 HPLC-pump (LKB)
Detektor:	655A Variable Wavelength UV Monitor (Merck/Hitachi) 2210 Recorder 2-Channel (LKB)
Fraktionssammler:	2211 Superrac

Die analytische RP-HPLC wird zur Auftrennung von Proteinproben bis zu einer Gesamtmasse von 2mg verwendet. Größere Proteinmassen bis 30mg wurden mit der semipräparativen Säule aufgetrennt. Die Proteinlösung wird 1:1 mit TFA-Lösung gemischt und über die Injektionsschleife auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate beträgt hierbei 1ml/min für den analytische und 2ml/min für den präparativen Auftrag. Nach dem Beladen wird die Schleife aus dem System genommen und die Säule solange gewaschen bis das Signal auf Nulllinie ist. Die Elution erfolgt im Acetonitril-Gradienten entsprechend Tabelle 2.2.

<u>Analytisch</u> Flussrate: 0,7ml/min Fraktionsgröße: 1ml		<u>Semipräparativ</u> Flussrate: 2,0ml/min Fraktionsgröße: 3ml	
t [min]	% Acetonitril	t [min]	% Acetonitril
0	0	0	0
5	25	10	25
50	35	60	35
60	100	75	100

Tabelle 2.2: Gradienten der Reverse Phase HPLC im analytischen (links) und semipräparativen Maßstab (rechts).

Von den Peakfraktionen werden 5-20µl Aliquots abgenommen und in der SpeedVac (Bachofer) getrocknet. Die Rückstände werden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das entsprechende Protein enthalten, werden spektralphotometrisch vermessen, portioniert und gefriergetrocknet (Christ Alpha1-4).

2.6.4 Chromatographie an der BMP-2 Affinitätssäule

HBS ₅₀₀ -Puffer:	10mM HEPES; pH 7,4; 500mM NaCl; 3,4mM EDTA
HBS ₁₅₀ -Puffer:	10mM HEPES; pH 7,4; 150mM NaCl; 3,4mM EDTA
Säulenmatrix:	20mg BMP2 gebunden an 10mg Cyanbromid-aktivierte Sepharose (Pharmingen)
Säulenkartusche:	Econo-Column Glassäule (BioRad)
Pumpe:	Minipuls 3 (Gilson)
Detektor:	2210 Recorder 2-Channel (LKB Bromma) 2238 Uvicord SII (LKB Bromma)
Fraktionssammler:	Model 203 Gilson

Dieses Verfahren wird im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die unter HBS₁₅₀-Puffer lagernde Säule wird mit HBS₅₀₀-Puffer mit einer Flussrate von 1,5ml/min äquilibriert. Die Proteinlösung wird mittels Druckfiltration auf ein möglichst kleines Volumen (0,1 - 5ml) eingengt und mit einer Pipette direkt auf das Säulenbett gegeben. Nachdem die Proteinlösung eingelaufen ist, wird die Matrix mit HBS₅₀₀-Puffer überschichtet. Mit einer Flussrate von 1,5ml/min wird solange gewaschen, bis das Signal auf Nulllinie ist, der Durchlauf wird dabei aufgefangen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgt mit 4MgCl₂ mit einer Flussrate von 0,45ml/min in 6 Fraktionen zu 4ml. Die Fraktionen werden spektralphotometrisch auf ihren Proteingehalt getestet, proteinhaltige Fraktionen werden vereinigt und gegen 4l HBS₁₅₀-Puffer bei 4°C ÜN dialysiert.

Die Säulenmatrix wird wieder mit HBS₅₀₀-Puffer äquilibriert. Aufgrund der geringen Kapazität der Säule (ca. 2mg) wird der Durchlauf aus dem ersten Durchgang erneut konzentriert und noch einmal auf die Säule aufgetragen. Auftrags-, Wasch- und Elutionsschritte wiederholt man solange, bis kein Protein mehr an die Säule bindet.

Als abschließenden Schritt werden alle Dialysate vereinigt und konzentriert. Der Proteingehalt des Konzentrats wird bestimmt. Dann wird die Proteinlösung aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.6.5 Gelfiltrations-Chromatographie an der Superdex 200® - Säule

Laufpuffer	10mM HEPES; pH 7,4; 150-700mM NaCl; 3,4mM EDTA
Säule:	HiLoad 16/60TM Superdex 200®, vorgepackt (Pharmacia)
Pumpe:	L6210 intelligent pump (Merck/Hitachi)
Detektor:	GAT PHD 601; GAT-Linear (Gamma Analysen-Technik)
Fraktionssammler:	Model 203 (Gilson)

Alle Gelfiltrationsläufe wurden im Rahmen dieser Arbeit bei Raumtemperatur durchgeführt, die Flussrate beträgt durchweg $0,5\text{ml/min}$. Die HiLoad 16/60TM Superdex 200® wird solange mit Laufpuffer äquilibriert, bis eine stabile Nulllinie erreicht ist. Die in einem Volumen von $50\text{-}100\mu\text{l}$ vorliegende Proteinlösung wird über die Injektionsschleife aufgetragen. Das Fraktionsvolumen beträgt $0,5\text{ml}$. Die Peakfraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert.

2.6.6 Kalibrierung der Superdex 200® - Säule

System zur Gelfiltration:	identisch zu 2.6.5	
Standard-Lösungen:	$10\mu\text{g/ml}$ BSA	(M_w 66400)
	$10\mu\text{g/ml}$ Ovalbumin	(M_w 47700)
	$10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNaseA	(M_w 13700)

Zur Bestimmung der Kalibrierkurve (s. Abb. 2.1) werden jeweils $20\mu\text{l}$ der Standard-Lösungen gemischt und auf ein Volumen von $100\mu\text{l}$ aufgefüllt. Das Proteingemisch wird wie unter 2.6.5 beschrieben aufgetrennt.

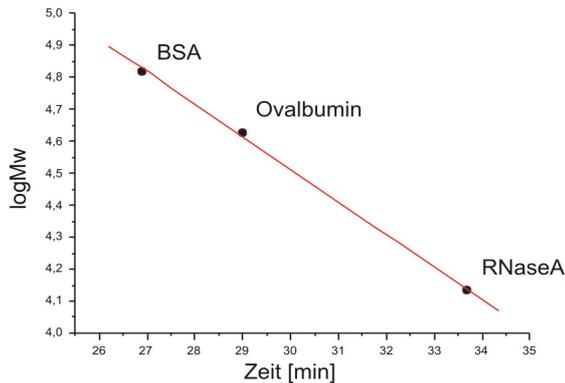


Abbildung 2.1: Kalibrierkurve der Superdex200-Säule am FPLC-System

Aus der Kalibrierkurve errechnet sich durch lineare Regression die folgende Gleichung:

$$\log M_w = -0,102 \cdot t_E + 7,565 \quad t_E: \text{Elutionszeit}$$

Aufgrund der Abhängigkeit der Elutionszeit von der Säulengeometrie und der Flussrate gilt diese Gleichung nur für die unter 2.6.5 beschriebene Versuchsanordnung.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Proteingrößenstandard für SDS-PAGE

Die Bestimmung der Molekulargewichte der Proben erfolgt durch einen Vergleich mit einem Gemisch von Proteinen bekannter Konzentration und Größe:

Protein	M _w	c [µg/5µl]
Phosphorylase b:	97000	0,67
Albumin:	66000	0,83
Ovalbumin:	45000	1,47
Carbon Anhydrase:	30000	0,83
Trypsin Inhibitor:	20100	0,80
Lactalbumin:	14400	1,16

Tabelle 2.3: Proteingrößenstandard für SDS-PAGE

2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

AA/BAA-Lösung: 30% Acrylamid; 1% N,N'-Methylenbisacrylamid

4X Lower Tris: 1,5M Tris/HCl; pH 8,8; 0,4% SDS

4X Upper Tris: 0,5 M Tris/HCl; pH 6,8; 0,4% SDS

SDS-Laufpuffer: 25mM Tris/HCl; pH 8,6; 0,19M Glycin; 0,15% SDS

SDS-Probenpuffer: 62,5mM Tris/HCl; pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin (87%); 2% BPB in H₂O; (für reduzierende Bedingung: 2% 2-Mercaptoethanol)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird mit dem „Perfect Blue TM Vertical Electrophoresis System“ der Firma PEQLAB durchgeführt. Tabelle 2.4 gibt die Zusammensetzung der Gelkomponenten an. Zuerst wird das Trenngel bis 2cm unter den oberen Rand eingefüllt und mit H₂O dest. überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Wasser entfernt, das Sammelgel zugegeben und der Kamm für die Probenaschen luftblasenfrei eingesteckt. Bis zum Gebrauch wird das Gel feucht bei 4°C aufbewahrt.

	<u>Sammelgel (5%)</u>	<u>Trenngel (12%)</u>
Upper Tris:	1.25ml	
Lower Tris:		2,5ml
AABAA:	0,5ml	4,0ml
H ₂ O dest.:	3,2ml	1,5ml
Glycerin:		2,0ml
APS 40% (w/v):	12µl	14µl
TEMED:	12µl	14µl

Tabelle 2.4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der SDS-PAGE

Die Proteinproben werden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min in 100°C heißem Wasser denaturiert. Die Proben werden in die Geltaschen eingebracht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt stromstärkereguliert bei 35mA pro Gel.

2.7.3 Proteinfärbung

Coomassie-Blau Färbung

Färbelösung: 10g Coomassie Brillant Blue R250 in Entfärbelösung;
0,4l Eisessig; 1,6l Methanol; 2,0l dH₂O

Entfärbelösung: Isopropanol, Eisessig, dH₂O Im Verhältnis 1:1:8

Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel 20min in der Färbelösung gefärbt. Das Entfärben erfolgt über Nacht im Entfärbebad. Nach einstündiger Inkubation in 30% Methanol kann das nun vollständig entfärbte Gel luftblasenfrei zwischen zwei Cellophanfolien im Rahmen getrocknet werden.

Silberfärbung

Lösung 1: 60ml 50% (v/v) Aceton in dH₂O; 1,5ml 50% (w/v) TCA in dH₂O;
25µl 37% Formaldehyd

Lösung 2: 60ml 50% (v/v) Aceton in dH₂O

Lösung 3: 100µl 10% (w/v) Na₂S₂O₃ • 5 H₂O in dH₂O; 60ml dH₂O

Lösung 4: 0,8ml 20% (w/v) AgNO₃ in dH₂O; 0,6ml 37% Formaldehyd; 60ml dH₂O

Lösung 5: 1,2 g Na₂CO₃; 25µl 37 % Formaldehyd; 25µl 10 % (w/v) Na₂S₂O₃ • 5 H₂O; 60ml dH₂O

Das Acrylamidgel wird mit Handschuhen aus den Glasplatten entnommen und für 5min in Lösung 1 eingebracht. Dann wird das Gel einige Male gut gespült und 5min in dH₂O geschüttelt. Es wird erneut gespült und 5min in Lösung 2 inkubiert. Anschließend wird das Gel 1min in Lösung 3 geschwenkt. Nach dreimaligem Spülen mit dH₂O wird das Gel 8min in Lösung 4 belassen. Auf fünfmaliges Spülen folgt eine 30-sekündige Inkubation in Lösung 5. Sobald die Proteinbanden sichtbar werden, wird die Fixierungsreaktion mit einprozentiger Essiglösung gestoppt. Das Gel wird mit Wasser gespült und in 20 % MeOH eingebracht. Anschließend kann es im Trockenrahmen zwischen Cellophanfolie getrocknet werden.

2.7.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Durch die Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrums im Bereich von 250- 320nm (Varion CARY 50 Bio UV-visible Spektrometer) kann die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden. Die Absorption (A) eines Proteins hängt von den als Chromophor wirkenden Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein ab (Gill and von Hippel 1989). Die molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) bei der Wellenlänge von 280nm und die molaren Massen (M) der in der Arbeit verwendeten Proteine wurden in der ProtParamTool Datenbank errechnet und sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben. Mit diesen Werten kann über das Lambert-Beersche-Gesetz ($A = c \cdot d \cdot \epsilon$; Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$) die Konzentration bestimmt werden.

<i>Protein</i>	<i>Molare Masse M [g/mol]</i>	<i>Extinktionskoeffizient ϵ (280 nm) [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]</i>
Thioredoxin-ActR-IIB _{ecd}	27004	39410
ActR-IIB _{ecd}	12810	25350
Thioredoxin	14084	14060
Thioredoxin- BMPR-IA _{ecd}	28582	18962
BMPR-IA _{ecd}	14660	5075
Thrombin	35437	65770
BMPR-II	14370	17100
ActR-II	12551	22790
ActA	26240	37416
BMP-2	25952	37162

Tabelle 2.5: Molare Massen und Extinktionskoeffizienten

2.7.5 Thrombinspaltung

Puffer zur Thrombinspaltung	50mM Tris/HCl; pH 7,5; 150mM NaCl; 2,5mM CaCl ₂
Thrombinlösung	10mg Thrombin (Sigma T4648) wird in 0,5ml Puffer zur Thrombinspaltung gelöst, dann 0,5ml Glycerin (87%) zugegeben. Lagerung bei -20°C für 4 Wochen

Mit der Thrombinspaltung wird das Thioredoxin incl. Hexahistidin-Tag von der extrazellulären Domäne der Rezeptoren bzw. Rezeptormuteine abgespalten.

Die das Fusionsprotein enthaltende Lösung wird gegen 4l Puffer zur Thrombinspaltung dialysiert und dann auf eine Konzentration von 200µM eingestellt. Nach Zugabe von 1 u Thrombin/mg Fusionsprotein wird 4-5h bei 30°C inkubiert. Der Erfolg der Spaltung wird mittels SDS-PAGE überprüft.

2.7.6 Massenspektrometrie

Die Molekulargewichte der in dieser Arbeit exprimierten rekombinanten Proteine wurden von Herrn Dr. W. Schmitz an einem Elektrospray- Fouriertransformations-Ionencyclotron-Resonance- Massenspektrometer (ESI-FTICR-MS) der Firma Bruker bestimmt.

2.8 Analyse von Protein-Protein Interaktionen

2.8.1 Oberflächen-Plasmonresonanz Analyse mit der BIAcore Technik

System: Biosensor BIAcore 2000™ (BIAcore)

HBS₅₀₀-Puffer 10mM HEPES, pH 7,4; 500mM NaCl; 3,4mM EDTA, 0,05% P20

Die Messungen der Protein-Protein Interaktionen wurden von Herrn Prof. Dr. W. Sebald an dem Gerät Biosensor BIAcore 2000™ durchgeführt.

Zur Messung der Interaktionen mit den ActR-IIBecd Muteinen wurden 200-250 Resonanz-Einheiten (RU) der jeweiligen biotinylierten Liganden auf der mit Streptavidin beschichteten Matrix des Biosensor-Chips CM5 immobilisiert. Die Sensogramme werden bei einer Flussrate von 10µl/min bei 25°C aufgezeichnet. Die Analyten liegen dabei in HBS₅₀₀-Puffer gelöst vor. Durch 2-minütiges spülen mit 4M MgCl₂ wird die Chipoberfläche regeneriert. Zur Messung möglicher kooperativer Interaktionen wird ein Streptavidin beschichteter CM5-Chip mit biotinyliertem BMP-2 in der Flusszelle 2 und biotinyliertem BMPR-IA in Flusszelle 3 beladen. Die Bindung von ActR-IIBecd zu BMP-2 wird wie oben beschrieben gemessen. Der immobilisierte Typ I Rezeptor wird durch das Überspülen mit 200nM BMP-2 abgesättigt. Die Bindung von ActR-IIB_{ecd} zu diesem binären Komplex kann anschließend analysiert werden. Alle Messungen werden durch die Subtraktion eines Kontrollsensogramm korrigiert. Dieses wird jede Messung begleitend durch das Überspülen eines ausschließlich mit Streptavidin beschichteten Kontrollkanals erstellt. Die kinetischen Geschwindigkeitskonstanten der Komplex-Assoziation (k_{on}) und Komplex-Dissoziation (k_{off}) werden mit dem Computerprogramm Biaevaluation Version 2 (BIAcore) bestimmt. Für die BMPR-IA_{ecd} – BMP-2 Interaktion wurde die apparente Dissoziationskonstante (K_D) aus den kinetischen Geschwindigkeitskonstanten berechnet ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Die K_D aller anderen Interaktionen wurde durch die konzentrationsabhängige Gleichgewichtsbindung des Analyten auf der Basis eines Langmuir'schen Modell einer 1:1 Interaktion bestimmt. Die mittlere Standardabweichung für alle K_D Werte war kleiner als 50%.

2.8.2 Isothermale Mikrokalorimetrie

Mikrokalorimeter: VP-ITC Mikrokalorimeter (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA)

HBS₅₀₀-Puffer: 10mM HEPES, pH 7,4; 500mM NaCl

Mit dieser Methode können die thermodynamischen Parameter der Bindung von ActR-IIB an BMP-2 bestimmt werden. Da der Ligand in salzhaltigem Puffer nur in geringen Konzentrationen löslich ist, wurde der binäre Komplex aus BMP-2 und BMPR-IA_{ecd} als Interaktionspartner mit dem Typ II Rezeptor verwendet. Um Mischungsartefakten vorzubeugen, werden die Proteinlösungen des binären Komplexes und des ActR-IIB_{ecd} gegen denselben Ansatz HBS₅₀₀-Puffer dialysiert, dann werden alle Lösungen für 5min bei 20°C entgast.

In der Messzelle werden 1400µl binärer Komplex in einer Konzentration von 7,5µM vorgelegt. 150µM ActR-IIB_{ecd} wird in die Spritze aufgezogen. Auf eine 3µl Injektion folgen 56 Injektionen zu je 5µl mit einer Flussrate von 0,5µl/s. Die Äquilibrierungszeit zwischen den einzelnen Titrationen wurde mit 240s angesetzt, die Rührgeschwindigkeit beträgt 300rpm. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Computerprogramm MicroCal Origin an das mathematische Modell einer 1:1 Interaktion angepasst.

2.9 Präparation von Ligand-Rezeptor Komplexen

HBS₇₀₀-Puffer: 10mM HEPES, pH 7,4; 700mM NaCl; 5mM Na-Azid

2x HBS₇₀₀-Puffer: 20mM HEPES, pH 7,4; 1400mM NaCl; 10mM Na-Azid

Der ternäre Komplex aus BMP-2, BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} kann entweder in einer schrittweisen Prozedur oder direkt präpariert werden. Die angegebenen Puffer sind das Optimum einer ausgedehnten Analytik über pH Wert und Salzanteil.

Schrittweise Prozedur

Bei der schrittweisen Prozedur wird zunächst der binäre Komplex aus BMP-2 und BMPR-IA_{ecd} hergestellt. Dazu werden 10-20nmol BMP-2 in 2ml ddH₂O gelöst, die 2,2-fache Stoffmenge (22-44nmol) an BMPR-IA_{ecd} wird in doppeltkonzentriertem HBS₇₀₀-Puffer (2x HBS₇₀₀-Puffer) vorgelegt. Die Ligandenlösung wird unter stetem Mischen zur Lösung des Rezeptors pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wird ungebundener Rezeptor durch Gelfiltrations-Chromatographie abgetrennt. Die Fraktionen, die den binären Komplex enthalten werden auf ein Volumen von 1ml konzentriert.

Die Konzentration des binären Komplexes wird bestimmt. Die 2,2-fache Stoffmenge ActR-IIB_{ecd} wird in 1ml HBS₇₀₀-Puffer aufgenommen und mit der Lösung des binären Komplexes durch vortexen gemischt. Auch hier wird nach 10min Inkubation bei RT ungebundener Rezeptor durch Gelfiltrations-Chromatographie abgetrennt.

Direkte Präparation

Durch die direkte Präparation des ternären Komplexes werden neben der Zeitersparnis höhere Komplexausbeuten erzielt.

Hierzu werden 10-20nmol BMP-2 in dH₂O gelöst. Sowohl BMPR-IA_{ecd} als auch ActR-IIB_{ecd} werden im 2,2-fachen Verhältnis in 2 x HBS₇₀₀-Puffer vorgelegt. Die Ligandenlösung wird unter Vortexen zur Lösung der Rezeptoren pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT werden ungebundene Rezeptoren durch Gelfiltrations-Chromatographie abgetrennt.

2.10 Kristallisation von Proteinen

„Sparse-Matrix Screens“: HR-I; HR-II, Index-, Cryo-, Salt-Screen (Hampton Research)

„Grid Screens“: Malonat-, PEG-Ion-Screen (Hampton Research)
JBS Screens I, II, III, IV, V (Jena BioScience)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Proteinkristallisation die Methode der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen angewandt. Zunächst werden Kristallisationsversuche mit den oben

angegebenen, vorgefertigten Screens angesetzt. Hierbei wird die Proteinlösung mit einer Konzentration zwischen 12 und 15mg/ml eingesetzt. 1µl der Proteinlösung wird auf einem silanisieretes Deckgläschen (Hampton Research) vorgelegt und mit 1µl Reservoirflüssigkeit vermischt. Das Deckgläschen wird mit dem Tropfen nach unten auf die mit 800µl der entsprechenden Reservoirflüssigkeit befüllten Kammer der Linbro Platte (Hampton Research) aufgesetzt. Um das Verdampfen der Flüssigkeit zu verhindern wird die Kammer mit Siliconfett abgedichtet. Die Kristallisationsansätze werden bei Raumtemperatur gelagert und auf Kristallwachstum überprüft.

Von Bedingungen die das Wachstum von Kristallen begünstigen, werden sogenannte „Finescreens“ angesetzt. Die Ursprungsbedingung wird hinsichtlich ihrer Zusammensetzung (pH, Salz, Puffer, Präzipitanz) variiert um die Qualität der Kristalle zu verbessern. Im „Finescreen“ werden auch das optimale Verhältnis von Proteinlösung zu Reservoirflüssigkeit im Tropfen und das Temperaturoptimum der Kristallbildung getestet.

2.11 Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten

2.11.1 Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten an der hauseigenen Tieftemperaturanlage

Tieftemperaturanlage: MicroMax007, Osmic VariMaxCu HighRes Optik (Rigaku);
R-Axis IV++ Detektor (Rigaku)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Röntgenbeugungsdaten unter Tieftemperaturbedingungen bei 100K aufgezeichnet. Dazu wird ein Proteinkristall mit einer Nylonschleife aufgenommen und in den Kühlstrom der Tieftemperaturanlage eingebracht.

Um die Qualität eines Kristalls zu bestimmen, werden von diesem Beugungsdaten zu je 120s bei 0° und bei 90° bestimmt. Wenn die Beugungsaufnahmen Reflexe mit hoher Auflösung zeigen und die Indizierung der Raumgruppe möglich ist, werden komplette Datensätze aufgezeichnet. Hierzu werden in der Regel Belichtungszeiten von 5-30min bei einer Schrittweite von 0,5-1° gewählt.

2.11.2 Aufnahme von MAD-Datensätzen am Synchrotron

Synchrotron – BESSY: Synchrotron „Beamline“ BL14.1, BESSY, Proteinstruktur-Fabrik (PSF), Berlin

MAD („multiple wavelength anomalous dispersion method“) Datensätze von selenmarkierten Kristallen wurden am Synchrotron-Strahlrohr BL14.1 der Proteinstruktur-Fabrik (PSF) am BESSY in Berlin bei 100K gemessen. Durch die Messung eines Fluoreszenzspektrums entlang der theoretischen Röntgenabsorptionskante von Selen wird die genaue Energie des Absorptionsmaximums bestimmt. Die Messung der Datensätze erfolgt bei den drei Wellenlängen „inflection“, „peak“ und „remote“. Die Rotation betrug 360° mit einer Schrittweite von 1° pro Beugungsaufnahme. Als Belichtungsdauer wurden 30s pro Grad gewählt.

2.12 Analyse der Röntgenbeugungsdaten und kristallographische Auswertung

Die drei MAD-Datensätze wurden mit der Software MOSFLM version 6.2.1 (Leslie 1992) integriert und prozessiert. Mit der Software SCALA CCP4 version 4.2.1 (Project 1994) werden die drei Datensätze zusammengeführt und skaliert.

Nach der Bestimmung der Positionen der Selenatome mit dem Computerprogramm SHELX C/D/E wurden die Positionen und der Besetzungsgrad mit SOLVE version 2.06 weiter verfeinert. Die Softwarepakete RESOLVE und ARP/WARP wurden für eine erste automatische Auswertung der Elektronendichtekarte verwendet.

Dieses initiale Modell wurde mit den Strukturen von monomerem BMP-2 (PDB Eintrag 1REW), BMPR-IA_{ecd} (PDB Eintrag 1REW) und ActR-IIB_{ecd} (PDB Eintrag 1NYS) überlagert und dieses Komplexmodell unter Verwendung der Programme REFMAC5 (Murshudov et al. 1997) und CNS weiter verfeinert.

3. Ergebnisse

3.1 Präparation der extrazellulären Domänen der Rezeptoren

3.1.1 Expression und Reinigung von $\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$

Die Präparation der extrazellulären Domäne des BMP Typ IA Rezeptors ($\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$) erfolgte weitgehend nach dem publizierten Protokoll von Dr. T. Kirsch (Kirsch et al. 2000).

Klonierung und Expression

In das modifizierte Expressionsplasmid pET32a wurde über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *Bpu1102I* die korrespondierende Sequenz zu den Resten 24 bis 152 des BMPR-IA Vorläuferproteins inklusive einer N-terminalen GSGAMA-Extension kloniert. Im resultierenden Expressionsvektor pET32a[Trx-BMPRIA] schließt die für $\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$ codierende Sequenz an eine Thrombinschnittstelle, einen Hexahistidin-Tag und das Thioredoxin Gen an (s. Abb. 3.1). Für die Expression wurde der Vektor in den *E.coli* Stamm AD494(DE3) transformiert.

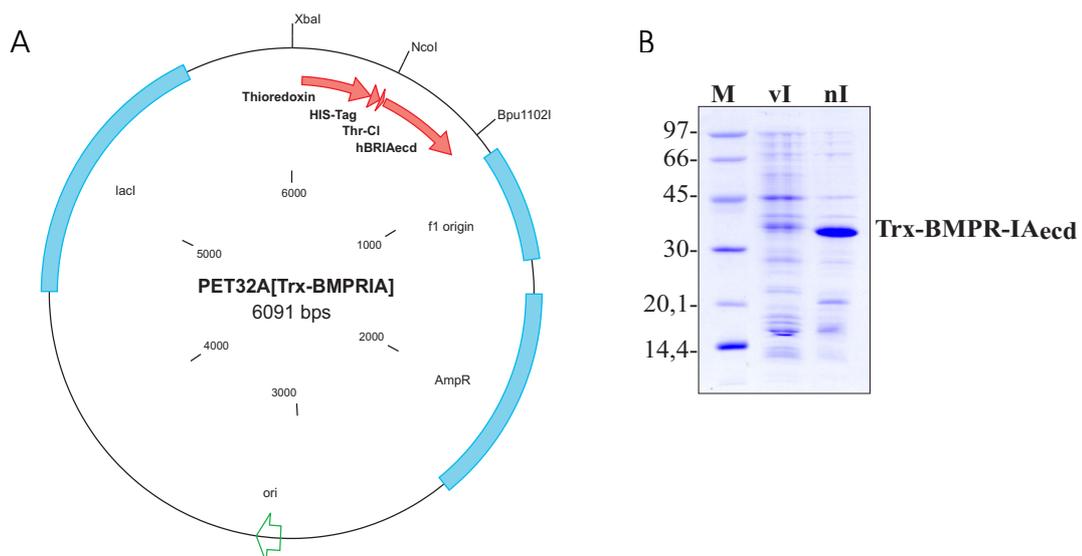


Abbildung 3.1: A: Expressionsvektor pET32a[Trx-BMPRIA]. Über die Schnittstellen *NcoI* und *Bpu1102I* wurde die Sequenz der extrazellulären Domäne von BMPR-IA eingefügt. $\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$ wird als Thioredoxin-Fusionsprotein mit einem Hexahistidin-Tag (HIS-Tag) und einer Thrombin-Schnittstelle (Thr-Cl) exprimiert B: Induktionskontrolle von $\text{Trx-BMPRI-A}_{\text{ecd}}$. SDS-PAGE (red.) des Zellaufschlusses vor (vI) bzw. 16 h nach Induktion (nI).

Die Expression des Fusionsproteins Trx-BM_{PR}-IA_{ecd} erfolgte im 6,4l Maßstab, wobei zwischen 3,3 und 4,0g Zellen pro Liter Kulturmedium geerntet werden konnten. Abbildung 3.1 zeigt eine SDS-PAGE des Zellaufschlusses vor und nach der Induktion mit 1mM IPTG. 14 Stunden nach Induktion ist eine starke Bande oberhalb der 30kD Markerbande sichtbar, welche der erwarteten Größe des Fusionsproteins entspricht.

Zellaufschluss, Nickel-Chelat Säule und Thrombinspaltung

8- 20g Zellpellet wurden in 100ml Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Da das Thioredoxin-BM_{PR}-IA_{ecd} Fusionsprotein in löslicher Form exprimiert wird, ist es nach Ultrazentrifugation zum größten Teil im Überstand zu finden (s. Abb. 3.2). Als erster Isolationsschritt und zur Konzentrierung des Fusionsproteins wurde die Metall-Affinitäts-Chromatographie an der Nickel-Chelat Säule durchgeführt. Das aufgrund des Hexahistidin-Tags an die Säule gebundene Fusionsprotein konnte mit 0,5M Imidazol von der Säule eluiert werden. Durch eine SDS-PAGE (s. Abb. 3.2) wurden die Trx-BM_{PR}-IA_{ecd}-haltigen Fraktionen ermittelt, vereinigt und zur Entfernung von anhaftenden Nickelionen gegen EDTA Puffer dialysiert. Die Ausbeute lag zwischen 35 und 45mg Fusionsprotein pro Gramm Zellen.

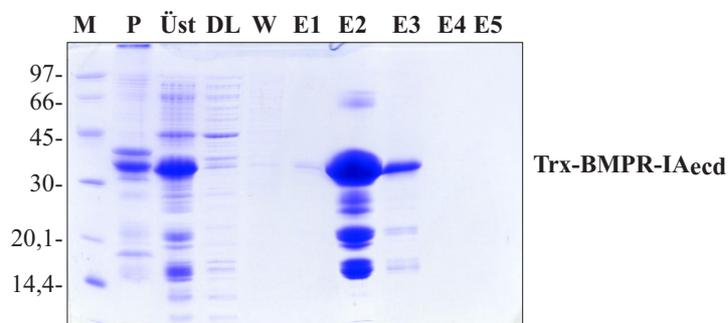


Abbildung 3.2: Chromatographie von Trx-BM_{PR}-IA_{ecd} an der Nickel-Chelat-Säule. SDS-PAGE (red.) von Pellet (P), Aufschlußüberstand (Üst); Durchlauf (DL), Waschschrift (W) und Elutionsfraktionen (E1-E5)

Eine Thrombinschnittstelle erlaubte es das Thioredoxin inklusive dem Hexahistidin-Tag von der extrazellulären Domäne von BM_{PR}-IA abzutrennen. Nach der Dialyse gegen den Thrombin-Spaltpuffer wurde die Konzentration der Proteinlösung auf 100µM eingestellt und mit Thrombin im Massenverhältnis von 500 zu 1 bei 30°C inkubiert. Nach vier Stunden wurde die Vollständigkeit der Proteolyse mittels SDS-PAGE (s. Abb. 3.3) überprüft. Nach quantitativer Spaltung erfolgte die Dialyse gegen den Puffer des nächsten Trennungsschrittes.

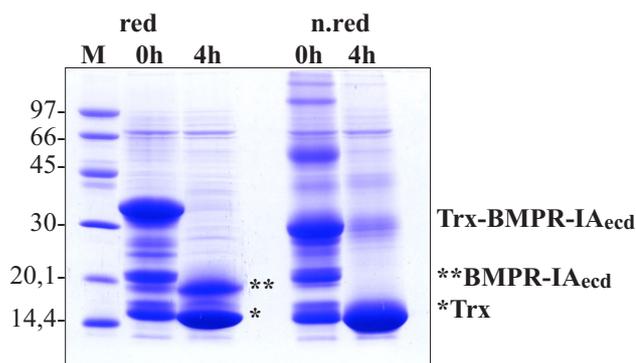


Abbildung 3.3: Analyse der Thrombinspaltung von Trx-BMPR-IA_{ecc}. SDS-PAGE des Spaltansatzes vor Zugabe von Thrombin (0h) und nach 4-stündiger Inkubation mit Thrombin (4h). Im nichtreduzierten (n.red) Zustand läuft das Thioredoxin auf der selben Höhe wie BMPR-IA_{ecc}. Im reduzierten (red) Zustand sind die Spaltprodukte unterscheidbar.

Anionenaustausch-Chromatographie an der Fractogel TMAE Säule

Die Anionenaustausch-Chromatographie an einer Trimethylaminoethyl-Matrix dient weitestgehend zur Abtrennung des Thioredoxins und von Rezeptormultimeren. Mit einem linearen Gradienten von 0-350mM NaCl innerhalb von 60 Minuten konnte das Proteingemisch fraktioniert werden. Das Chromatogramm in Abbildung 3.4A zeigt die Elution von Thioredoxin bis zu einer Salzkonzentration von 200mM. Zwischen 200-250mM NaCl eluiert monomerer BMPR-IA_{ecc}. Bei höheren Salzkonzentrationen konnten BMPR-IA_{ecc} Multimerenachgewiesen werden. Eine Analyse der Fraktionen des zweiten Peaks durch eine SDS-PAGE ist in Abbildung 3.4B dargestellt. In den Fraktionen 23-35 liegt BMPR-IA in angereicherter Form vor. Diese Fraktionen wurden vereinigt und gegen HBS₅₀₀-Puffer dialysiert. Die Ausbeuten an BMPR-IA_{ecc} lagen nach diesem Reinigungsschritt zwischen 2,2 und 2,5mg pro Gramm Zellen.

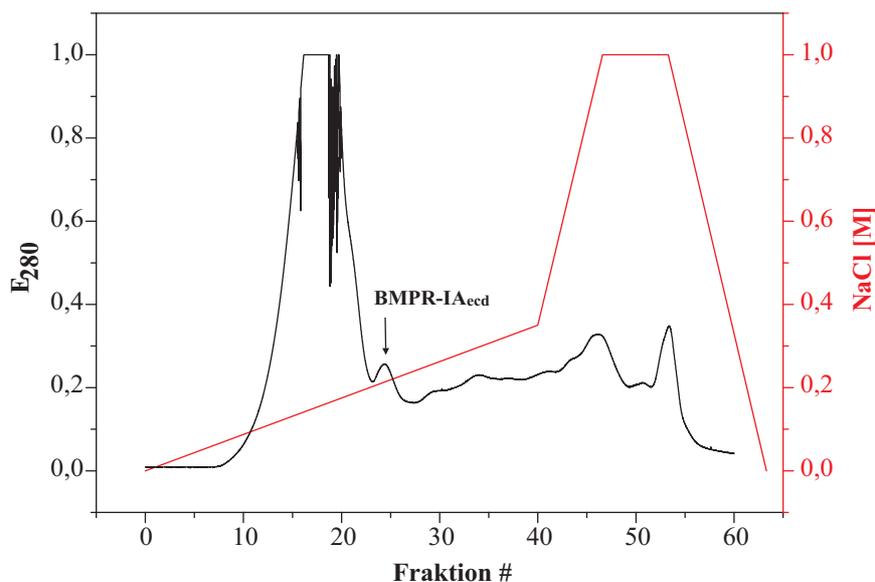


Abbildung 3.4A: Elutionsprofil (schwarz) der Anionenaustausch-Chromatographie von BMPR-IA_{ecc} an der TMAE- Säule. Der Salzgradient ist rot eingezeichnet.

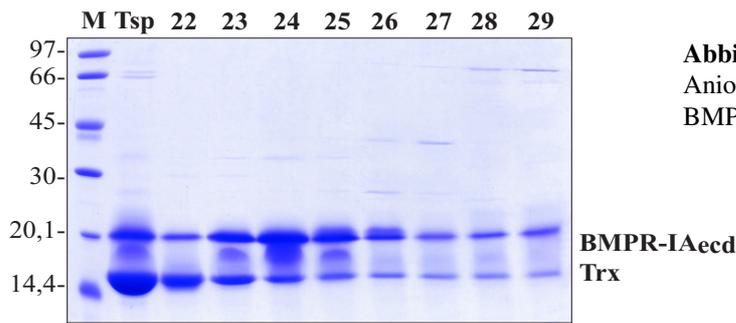


Abbildung 3.4B: SDS-PAGE (red.) der Anionenaustausch-Chromatographie von BMPR-IA_{eccd} an der TMAE- Säule

Affinitäts-Chromatographie an einer BMP-2 Affinitätssäule

Der finale Aufreinigungsschritt von BMPR-IA_{eccd} war die Auftrennung an einer BMP-2 Affinitätssäule. Es sollte hochreiner, biologisch aktiver Rezeptor aus den TMAE Fraktionen isoliert werden.

Dazu wurde zunächst der hochaffine Ligand BMP-2 an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die maximale Kapazität der verwendeten Matrix lag bei 2mg BMPR-IA_{eccd}.

Die vereinigten Fraktionen aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt wurden auf etwa 1ml aufkonzentriert und auf die Affinitätssäule aufgetragen. Nach dem Waschen mit HBS₅₀₀-Puffer wurde mit 4M MgCl₂ eluiert (s. Abb3.5 A). Das Eluat wurde spektralphotometrisch analysiert, proteinhaltige Fraktionen wurden zusammengefasst und gegen HBS₁₅₀-Puffer dialysiert.

Der Durchlauf wurde aufkonzentriert und erneut auf die Säule aufgetragen. Dieser Prozess wurde solange durchgeführt, bis keine Bindung mehr von Protein an die Matrix feststellbar war. Die Ausbeute nach diesem letzten Reinigungsschritt lag zwischen 0,6 und 0,9mg BMPR-IA_{eccd} pro Gramm Bakterienmasse. Abbildung 3.5A zeigt eine SDS-PAGE der vereinigten und konzentrierten Eluate. Es wird ersichtlich, dass BMPR-IA_{eccd} mit dieser Reinigungsstrategie bis zur Homogenität aufgereinigt werden konnte.

	Fermentation	Ni-Chelat Metall-Affinitäts- Chromatographie	TMAE Anionenaustausch- Chromatographie	BMP-2 Affinitäts- Chromatographie
BMPR- IA_{eccd}	3,3-4,0g Bakterien/l TB-Kulturmedium	35-45mg Fusionsprotein/g Bakterien	2,2-2,5mg Monomer/g Bakterien	0,6-0,9mg/g Bakterien

Tabelle 3.1: Proteinausbeuten der Präparation von BMPR-IA_{eccd}

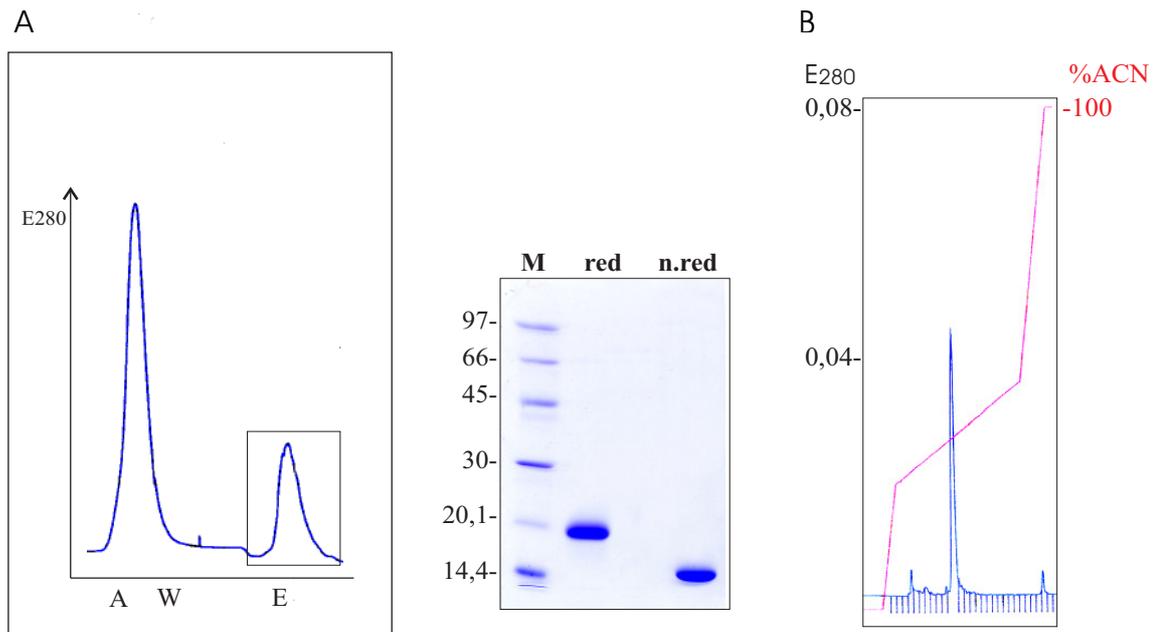


Abbildung 3.5: **A:** Affinitäts-Chromatographie von BMPR-IA_{ecd} an der BMP-2 Affinitätssäule. Links: Chromatogramm eines Durchganges. Nach Auftrag (A) wird ungebundenes Protein von der Säule gewaschen (W). Mit 4M MgCl₂ wird biologisch aktiver BMPR-IA_{ecd} eluiert (E). Rechts: SDS-PAGE des konzentrierten Eluates im reduzierten (red) und nichtreduzierten (n.red) Zustand. **B:** Elutionsprofil der analytischen HPLC von affinitätsgereinigtem BMPR-IA_{ecd}

Biochemische Charakterisierung von BMPR-IA_{ecd}

Die Homogenität des Proteins konnte durch eine analytische HPLC mit 100µg affinitätsgereinigtem BMPR-IA_{ecd} bestätigt werden. Im Acetonitrilgradienten (s. Abb. 3.5B) eluiert BMPR-IA_{ecd} als einzelner Peak.

Die massenspektrometrische Charakterisierung von BMPR-IA_{ecd} wurde bereits von Dr. T. Kirsch durchgeführt, dabei konnte die korrekte Aminosäuresequenz des Proteins bestätigt werden. Die Bindekompetenz des Rezeptors wurde durch Interaktionsanalysen mit der BIAcore-Technik an BMP-2 überprüft, auf die später eingegangen wird.

3.1.2 Expression und Reinigung von ActR-IIB_{ecd}

Klonierung und Expression

Die cDNA des Activin Typ IIB Rezeptors (*acvr2b*) lag in Form des Konstrukts pQKARBS-ActR-IIB vor. Aus diesem wurde die Sequenz codierend für die Reste 2-109 der extrazellulären Domäne von ActR-IIB plus einer N-terminalen GSGAMA Verlängerung mit den Primern pQE5' und ActR-IIBBpu-3' amplifiziert. Nach dem Restriktionsverdau mit den Enzymen *NcoI* und *Bpu1102I* wurde das Insert in den von T. Kirsch modifizierten Vektor pET32a ligiert. Im resultierenden Expressionsvektor pET32a[Trx-ActR-IIB] schließt nun die für ActR-IIB_{ecd} codierende Sequenz an eine Thrombinschnittstelle, einen His-6 Tag und das Thioredoxin Gen an (s. Abb. 3.6). Für initiale Expressionsversuche wurde das Plasmid zunächst in den *E.coli* Stamm AD494 transformiert. Die SDS PAGE in Abbildung 3.6B zeigt eine starke Induktion des Fusionsproteins vier Stunden nach Zugabe von 1mM IPTG.

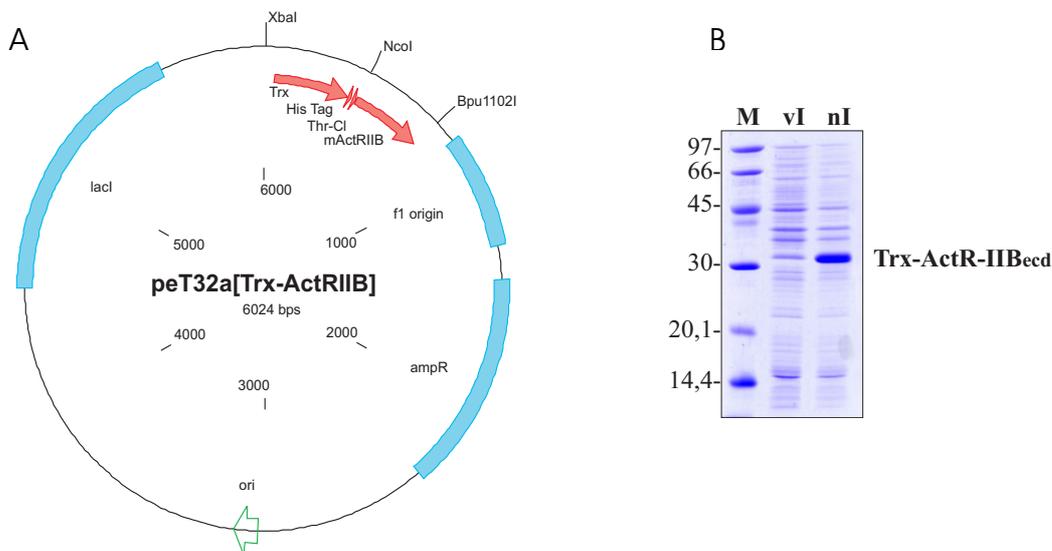


Abbildung 3.6: **A:** Expressionsvektor pET32a[Trx-ActR-IIB]. Über die Schnittstellen *NcoI* und *Bpu1102I* wurde die Sequenz der extrazellulären Domäne von ActR-IIB eingefügt. ActR-IIB_{ecd} wird als Thioredoxin-Fusionsprotein mit einem His6-Tag und einer Thrombin-Schnittstelle exprimiert. **B:** Induktionskontrolle von Trx-ActR-IIB_{ecd}. SDS-PAGE (red.) des Zellaufschlusses vor (vI) bzw. 16 h nach Induktion (nI).

Fermentation und Zellaufschluss

Zunächst wurde versucht das ursprüngliche Protokoll zur Präparation von BMPR-IA_{ecd} von Dr. T. Kirsch als Protokoll für die Herstellung von ActR-IIB_{ecd} zu verwenden. So wurden

die *E.coli* AD494 bei 30°C fermentiert, pelletiert und eingefroren. Die Ausbeute lag zwischen 3,5 und 4g Bakterien pro Liter Medium.

Jeweils 8-10g Bakterienpellet wurden in 50ml Aufschlusspuffer resuspendiert und sollten anschließend durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen werden. Nach der Ultraschallbehandlung (8x30s) war das Fusionsprotein nur zu einem geringen Teil im Überstand zu finden, der Hauptteil blieb im Pellet zurück (s. Abb. 3.7A). Das Pellet aus dem ersten Durchgang wurde resuspendiert und einer zweiten Ultraschallbehandlung unterworfen. Auch nach dieser war das Fusionsprotein zum größten Teil im Pellet verblieben.

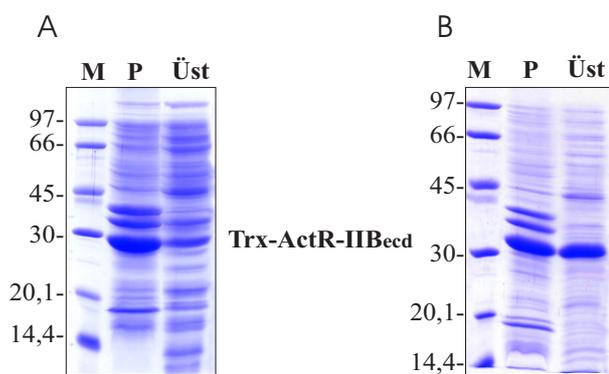


Abbildung 3.7: SDS-PAGEs (red.) des Ultraschallaufschlusses der Trx-ActR-IIB_{eccd} exprimierenden Bakterien. **A:** Bei *E.coli* AD494(DE3) verblieb der Großteil des Fusionsproteins im Pellet (P). **B:** Bei *E.coli* OrigamiB(DE3) konnte das Fusionsprotein in den Überstand (Üst) gebracht werden.

Die Aufschlussprozedur wurde systematisch geändert. So wurde zwischen 8 und 12 Beschallungsdurchgängen mit Beschallungszeiten zwischen 30 und 90 Sekunden und der Zugabe von Lysozym variiert. Diese Prozeduren und auch die Änderung der Aufschlussvolumina hatten jedoch keine nennenswerte Erhöhung des Fusionsproteingehalts im Überstand zur Folge.

Durch eine Änderung der Fermentationsbedingungen sollte der Anteil an löslichem Trx-ActR-IIB_{eccd} erhöht werden. Es wurden Fermentationsversuche bei 20, 30 und 37° durchgeführt, welche ebenfalls keine Verbesserung aufzeigten. Auch die Induktion mit IPTG bei verschiedenen Zelldichten hatte keine Auswirkung auf die Löslichkeit des Fusionsproteins.

Erst die Transformation des Expressionsplasmids in den Bakterienstamm *E.coli* OrigamiB(DE3) führte zu einer deutlichen Zunahme löslichen Trx-ActR-IIB_{eccd} Fusionsproteins. Die optimalen Fermentationsparameter für diesen Stamm wurden ermittelt. So wurden die Bakterien bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 30°C angezogen, daraufhin die Temperatur auf 20°C verringert. Nach Induktion mit 1mM IPTG wurde über Nacht (14-16h) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in Portionen zu 8 -

10g eingefroren. Die Ausbeuten der Fermentation lagen zwischen 1,9 bis 2,8g Zellmasse pro Liter Kulturmedium. Als optimale Aufschlussbedingung wurde die Resuspendierung von 8-16g Bakterienpellet in 100ml Aufschlusspuffer und 8 einminütige Ultraschallintervalle unter Eiskühlung in der Rosettenzelle ermittelt. Mit diesem Vorgehen konnte ein Großteil des Fusionsproteins in Lösung gebracht werden (s. Abb. 3.7B).

Nickel-Chelat Säule und Thrombinspaltung

Analog zur BMPR-IA_{ecd} Aufarbeitung wurde auch für das Trx-ActR-IIB_{ecd} Fusionsprotein die Chromatographie an der Nickel-Chelat Säule als erster Isolationschritt gewählt. Der Aufschlussüberstand wurde auf die Säule aufgetragen, unspezifisch gebundene Proteine mit 60mM Imidazol abgewaschen. Die Elution des über den His-Tag an die Matrix gebundenen Fusionsproteins erfolgte mit 0,5M Imidazol. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und gegen EDTA-haltigen Puffer dialysiert. Aus der SDS-PAGE in Abbildung 3.8 wird der Unterschied der beiden Bakterienstämme im Hinblick auf die Expression von löslichem Trx-ActR-IIB_{ecd} besonders deutlich. Die Ausbeute an Trx-ActR-IIB_{ecd} fällt bei OrigamiB(DE3) Zellen um ein vielfaches höher aus als bei dem Stamm AD494. Nach diesem Reinigungsschritt können die Ausbeuten spektralphotometrisch bestimmt werden. Die Ausbeute an Trx-ActR-IIB_{ecd} Fusionsprotein aus AD494(DE3) lag zwischen 6-14mg/g Zellpellet, bei OrigamiB(DE3) war die Ausbeute mit 21-40mg/g Bakterienmasse um ein dreifaches höher.

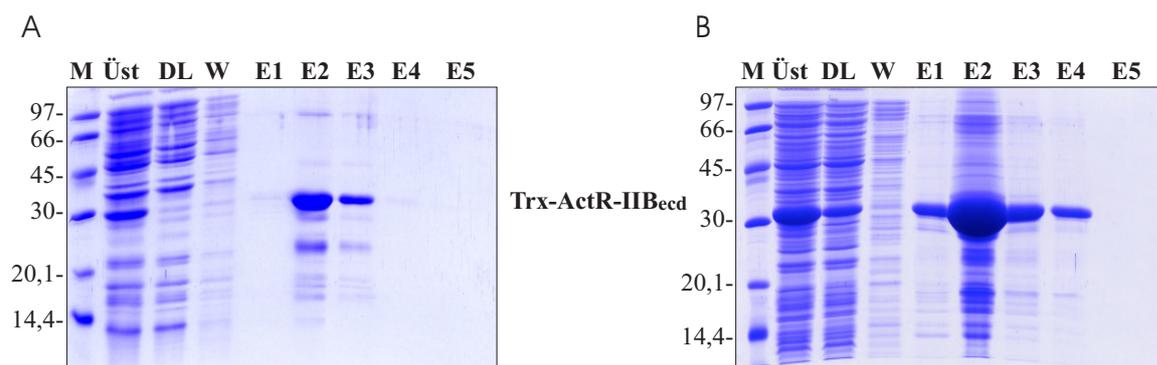


Abbildung 3.8: SDS-PAGEs (red.) der Chromatographie von Trx-ActR-IIB_{ecd} an der Nickel-Chelat-Säule. Im Gegensatz zu *E.coli* AD494(DE3) (A) konnten mit *E.coli* OrigamiB(DE3) (B) hohe Ausbeuten an Fusionsprotein erhalten werden. Aufschlußüberstand (Üst); Durchlauf des Auftrages (DL); Waschschrift (W); Elutionsfraktionen (E)

In ersten Versuchen wurde die Thrombinspaltung nach dem Protokoll für BMPR-IA_{ecd}-Fusionsprotein durchgeführt. Wegen nicht vollständiger Abspaltung des Thioredoxin-

Hexahistidin-Teils von ActR-IIB_{ecd} wurde das Verfahren geändert. So wurde die gegen den Thrombin-Spaltbuffer dialysierte Trx-ActR-IIB_{ecd} Proteinlösung auf eine Konzentration von 200µM eingestellt. Die proteolytische Trennung wurde mit 1/300 Massenteilen Thrombin vier Stunden bei 30°C durchgeführt um eine quantitative Spaltung von ActR-IIB_{ecd} von Thioredoxin inklusive Hexahistidin-Tag zu erreichen. Die Proteinlösung wurde anschließend gegen den TMAE-Auftragspuffer dialysiert.

Aus der SDS-PAGE in Abbildung 3.9 sieht man deutlich, dass der Rezeptor und das Thioredoxin unter nichtreduzierten Bedingungen die gleichen Laufeigenschaften aufweisen. Erst im reduzierten Zustand sind die beiden Proteine voneinander unterscheidbar.

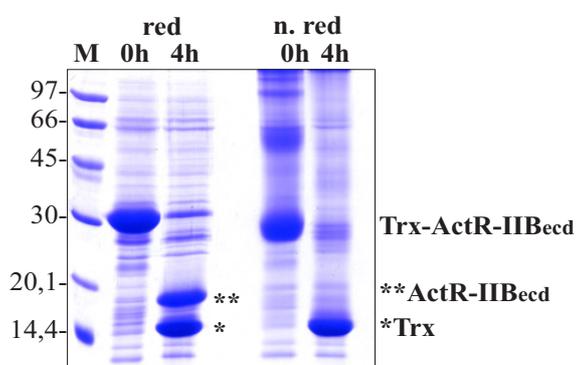


Abbildung 3.9: Analyse der Thrombinspaltung von Trx-ActR-IIB_{ecd}. SDS-PAGE des Spaltansatzes vor Zugabe von Thrombin (0h) und nach 4-stündiger Inkubation mit Thrombin (4h). Im nichtreduzierten (n.red) Zustand läuft das Thioredoxin auf derselben Höhe wie ActR-IIB_{ecd}. Im reduzierten (red) Zustand sind die Spaltprodukte unterscheidbar.

Chromatographie an der EMD-TMAE Säule und Renaturierung non ActR-IIB_{ecd}

Wie bei der Präparation von BMPR-IA_{ecd} war die Chromatographie an EMD-TMAE der nächste Reinigungsschritt für ActR-IIB_{ecd}. Am Tag nach der Thrombinspaltung wurde das Dialysat auf die Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0-350mM NaCl innerhalb von 60 Minuten aufgetrennt. Im Chromatogramm (s. Abb.3.10A) repräsentiert der zweite Peak monomeren ActR-IIB_{ecd}, welcher bei einem Salzgehalt von 200mM von der Matrix eluiert. Der dritte Peak zeigt Rezeptormultimere an, welche zwischen 0,8 und 1M NaCl von der Säule eluieren.

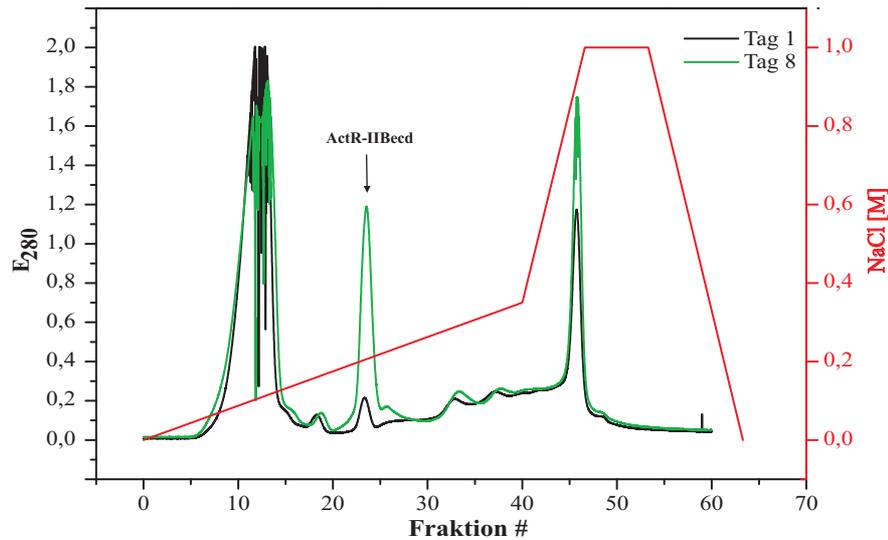


Abbildung 3.10A: Elutionsprofil der Chromatographie von ActR-IIB_{ecd} an der TMAE-Säule nach einer Inkubationszeit von 1 Tag (schwarz) und 8 Tagen (grün) zur Renaturierung.

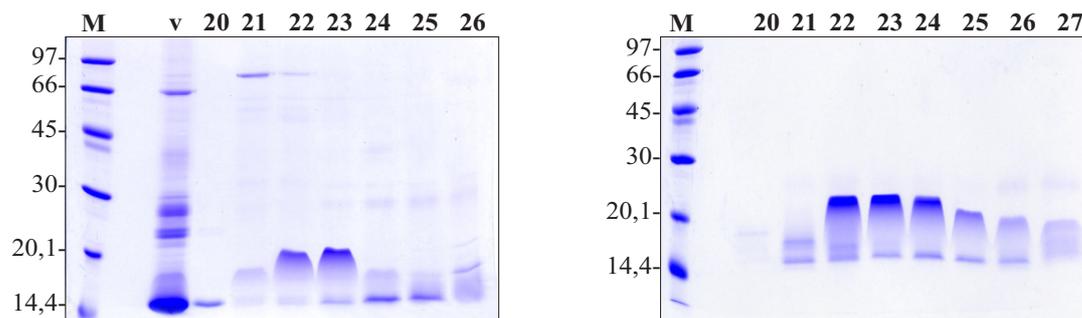


Abbildung 3.10B : SDS-PAGE (ox.) der Anionenaustausch-Chromatographie von ActR-IIB_{ecd} an der TMAE-Säule am Tag 1 (links) und am Tag 8 (rechts) der Renaturierung.

Nach diesem Reinigungsschritt wurde die relativ geringe Ausbeute an monomeren ActR-IIB_{ecd} deutlich. Aus einem Gramm Bakterien konnten lediglich zwischen 0,2 und 0,37mg ActR-IIB_{ecd} isoliert werden.

Beobachtungen zeigten, dass die Ausbeute an monomerem ActR-IIB_{ecd} durch eine mehrtägige Inkubation des Dialysats nach der Thrombinspaltung erhöht werden konnte. Die SDS-PAGE in Abbildung 3.11 zeigt die Analyse dieser Beobachtung über einen Zeitraum von 10 Tagen. Am Tag der Thrombinspaltung ist ActR-IIB_{ecd} kaum nachweisbar. Im Verlauf der Zeit nimmt der Anteil an korrekt gefaltetem Rezeptor zu, wobei nach 8 Tagen das Optimum der Rückfaltung erreicht ist. Der quantitative Effekt der Rückfaltung wird anhand der grünen Kurve im Chromatogramm der TMAE-Säule und der korrespondierenden SDS-PAGE in Abbildungen 3.10A und 3.10B besonders deutlich.

Durch die Rückfaltung konnte die Ausbeute an ActR-IIB_{ecd} nach der TMAE-Säule mit 2,2mg/g Zellpellet bis auf das Zehnfache gesteigert werden.

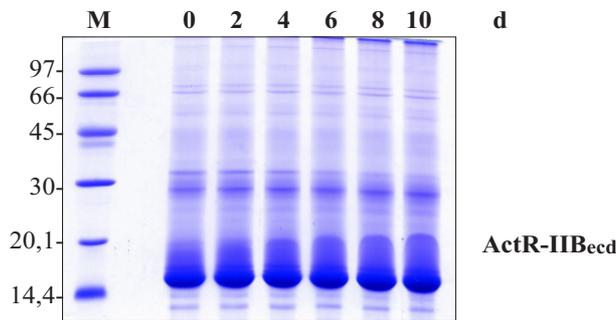


Abbildung 3.11: Analyse der Renaturierungslösung von ActR-IIB_{ecd}. SDS-PAGE (n.red.) von Proben des Tages der Thrombinspaltung (0) bis zum Tag 10 der Inkubation (2-10).

Affinitäts-Chromatographie von ActR-IIB_{ecd} an einer BMP-2 Affinitätssäule

Auch in der Präparation von ActR-IIB_{ecd} stellt die Affinitätschromatographie eine Möglichkeit für den letzten Reinigungsschritt dar. Dabei wurde das in HBS₅₀₀-Puffer vorliegende Protein auf die BMP-2 Affinitätssäule aufgetragen und nach Waschen unspezifisch gebundener Proteine mit 4M MgCl eluiert. In der SDS-PAGE in Abbildung 3.12 ist der Durchlauf den dialysierten und konzentrierten Eluaten gegenübergestellt. Hier ist zu erkennen, dass durch die Reinigungsprozedur ActR-IIB_{ecd} in homogen monomere Form gewonnen werden konnte. Die Ausbeuten beliefen sich zwischen 0,4-1,8mg/g Zellpellet.

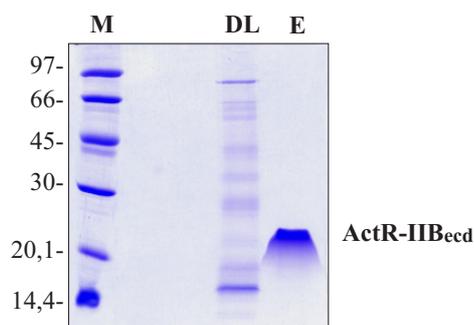


Abbildung 3.12: Affinitäts-Chromatographie von ActR-IIB_{ecd} an der BMP-2 Affinitätssäule. SDS-PAGE (n.red.) des Durchlaufs (DL) und des konzentrierten Eluats (E).

Präparative HPLC

Für Interaktionsstudien sollten bindungsdefiziente ActR-IIB_{ecd}-Mutanten hergestellt werden. So musste eine Alternative zur BMP-2 Affinitätschromatographie als letztem Aufreinigungsschritt gefunden werden. Da ActR-IIB_{ecd} schon nach der EMD-TMAE Säule zu einem hohen Prozentsatz von anderen Proteinen des Rohextrakts getrennt werden konnte, wurde als finaler Reinigungsschritt RP-HPLC im präparativen Maßstab gewählt.

Dabei wurde die Proteinlösung auf eine C4-Säulenmatrix geladen und mit einem linearen Acetonitril-Gradienten fraktioniert. Abbildung 3.13 zeigt das Chromatogramm und die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen. Die Elution von hochreinem ActR-IIB_{ecd} erfolgte bei 28% ACN, die übrigen Proteine eluierten erst ab 90% ACN von der Matrix.

Die Hauptfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Die Homogenität des so gereinigten Rezeptors wurde mittels SDS-PAGE geprüft. Die Ausbeute an ActR-IIB_{ecd} lag hier mit 0,5-1,5mg/g Bakterienmasse im Bereich der Affinitätschromatographie.

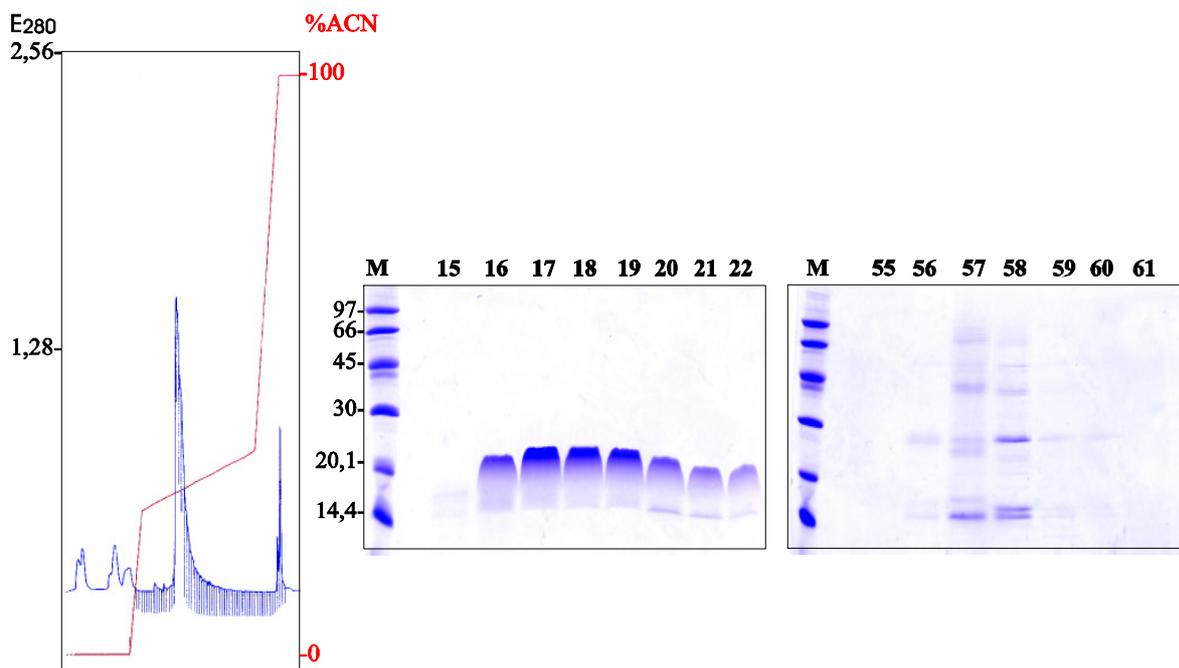


Abbildung 3.13: Chromatogramm und SDS-PAGE (n.red.) der präparativen HPLC von ActR-IIB_{ecd}. Die Fraktionen des ersten Peaks entsprechen monomerem ActR-IIB_{ecd}, im zweiten Peak finden sich Multimere und Verunreinigungen.

In den Tabellen 3.2 und 3.3 sind die Ausbeuten der einzelnen Schritte und Modifikationen der Reinigung von ActR-IIB_{ecd} zusammenfassend dargestellt. Hier wird deutlich wie durch die systematische Änderung der verschiedenen Parameter die anfangs geringe Ausbeute von 0,1mg auf ein Zehnfaches gesteigert werden konnte. Mit dieser Strategie war es nun möglich für die Kristallisation ausreichende Mengen an hochreinem ActR-IIB_{ecd} zu präparieren.

AD494(DE3) Fermentationsbed./ Ausbeute [g Bakterien/l]	Aufschluss	Ni-Chelat Metall-Affinitäts- Chromatographie [mg Fusionsprot./g Bakterien]	TMAE Anionenaustausch- Chromatographie [mg Monomer/g Bakterien]	BMP-2 Affinitäts- Chromatographie [mg Monomer/g Bakterien]
30°C 3,5 - 4,0	8x30s in 50ml Aufschlusspuffer	6,2	0,162	0,09 - 0,13
s.o.	<i>10x30s in 100ml</i>	10 - 12,2	0,15 - 0,27	
s.o.	<i>12x30s in 100ml</i>	6,3 - 12	0,12 - 0,2	
s.o.	<i>10x60s in 100ml</i>	7,1	0,13	
s.o.	<i>10x90s in 100ml</i>	7,5	0,12	
37°C 4,1	10x30s in 100ml	6,75	0,18	0,12 - 0,15
20°C 3,3	s.o.	11,7 - 14,3	0,2	
<i>bis 0,4 OD bei 37°C, Induktion bei 20°C</i> 3,8	s.o.	12,1	0,27 - 0,30	
<i>bis 0,4 OD bei 30°C, Induktion bei 20°C</i> 3,2 - 4,8	s.o.	12,2 - 13,0	0,35	

Tabelle 3.2: Fermentations- und Aufschlussvarianten der Expression von Trx-ActR-IIB_{ecd} in *E.coli* AD494(DE3). Die Änderungen zu den vorangegangenen Experimenten sind kursiv dargestellt.

OrigamiB(DE3)	Aufschluss	Ni-Chelat Metall-Affinitäts- Chromatographie	TMAE Anionenaustausch- Chromatographie	BMP-2 Affinitäts- Chromatographie bzw. HPLC
Fermentationsbed./ Ausbeute				
[g Bakterien/l]		[mg Fusionsprot./g Bakterien]	[mg Monomer/g Bakterien]	[mg Monomer/g Bakterien]
30°C 2,0 - 2,3	8x30s in 100ml Aufschlusspuffer	21,8 - 28,0	ohne Renaturierung: 0,25 - 0,37	0,15
<i>bis 0,5 OD bei 30°C, Induktion bei 20°C</i> 1,9 - 2,8	<i>8-16g Bakterien</i> 8x60s in 100ml Aufschlusspuffer	25,0 - 39,5	<i>nach 4d</i> <i>Renaturierung:</i> 0,6	0,47
bis 0,5 OD bei 30°C, Induktion bei 20°C 1,9 - 2,8	8-16g Bakterien 8x60s in 100ml Aufschlusspuffer	25,0 - 39,5	<i>nach 8d</i> <i>Renaturierung:</i> 0,6 - 2,2	BMP-2 Affinitäts-Chr.: 0,39 - 1,79
bis 0,5 OD bei 30°C, Induktion bei 20°C 1,9 - 2,8	8-16g Bakterien 8x60s in 100ml Aufschlusspuffer	25,0 - 39,5	0,8 - 2,2	HPLC: 0,5 - 1,5

Tabelle 3.3: Fermentations- und Aufschlussvarianten der Expression von Trx-ActR-IIB_{ecd} in *E.coli* OrigamiB(DE3). Die Änderungen zu den vorangegangenen Experimenten sind kursiv dargestellt. Die optimierten Bedingungen sind in blauer Schrift dargestellt.

Biochemische Charakterisierung von ActR-IIB_{ecd}

Die Homogenität des Proteins konnte durch die analytische HPLC mit 100µg ActR-IIB_{ecd} bestätigt werden. Im Acetonitrilgradienten (s. Abb. 3.14) eluierte sowohl der affinitäts- als auch der HPLC-gereinigte Rezeptor als einzelner Peak.

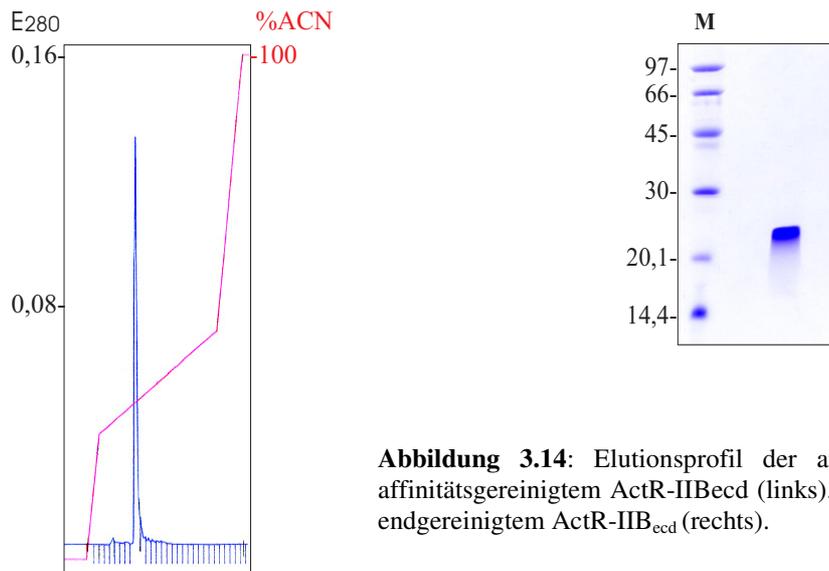


Abbildung 3.14: Elutionsprofil der analytischen HPLC von affinitätsgereinigtem ActR-IIB_{ecd} (links). SDS-PAGE (n.red) von endgereinigtem ActR-IIB_{ecd} (rechts).

Mit der massenspektrometrischen Analyse konnte das theoretische Molekulargewicht von 13072Da experimentell bestätigt werden (s. Abb. 3.15B). In den Rohdaten der Analyse (s. Abb. 3.15A) waren nur Signale von ActR-IIB_{ecd} mit unterschiedlichem Protonierungsgrad sichtbar, was ein Kriterium für die hohe Reinheit des Proteins ist.

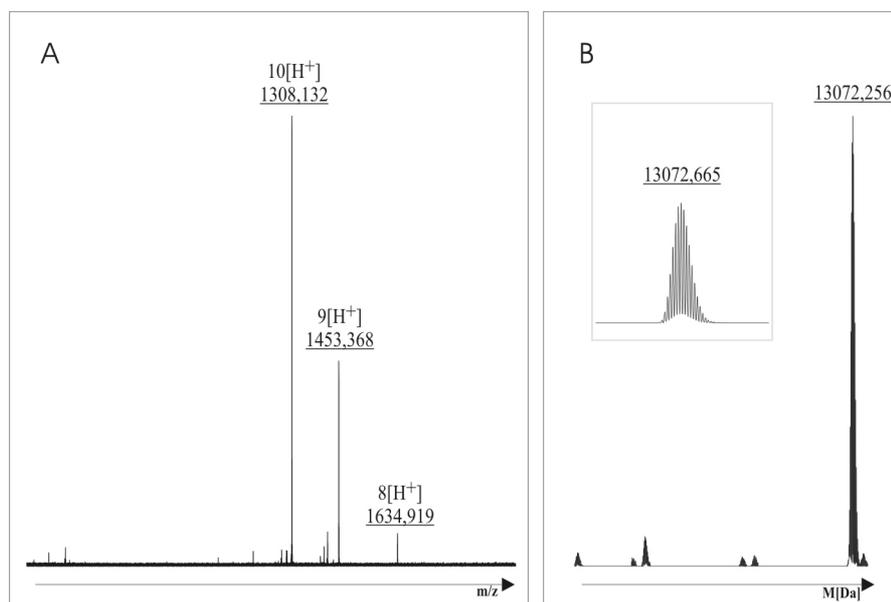


Abbildung 3.15: A: Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von ActR-IIB_{ecd}. B: Dekonvolvierte Daten der 10-fach geladenen Spezies mit korrespondierendem Molekulargewicht.

Die Bindungseigenschaften von ActR-IIB_{ecd} wurden durch Interaktionsanalysen mit BMP-2 und ActA durch die BIAcore-Technik überprüft, auf die im nächsten Kapitel eingegangen wird.

3.2 BIAcore Interaktionsanalyse der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung

Bindungsaktivitätstest von rekombinant hergestelltem ActR-IIB_{ecd}

Zunächst sollte durch die vergleichende Analyse mit eukaryotisch exprimiertem Referenzprotein die Aktivität von ActR-IIB_{ecd} getestet werden. Wie aus Tabelle 3.4 ersichtlich, lag die Bindungskonstante von prokaryotisch exprimiertem ActR-IIB_{ecd} an BMP-2 mit 2700-3100nM im selben Bereich wie die des in Sf-9 Zellen exprimierten ActR-IIB_{ecd}.

Die Verwendung der HPLC als finalem Aufarbeitungsschritt anstelle der BMP-2 Affinitäts-Chromatographie führte zu keiner Änderung der Bindungsaktivität. Auch bei der Bindung zu ActA konnte keine Änderung der Affinität beobachtet werden. Hier lag die Bindungskonstante unabhängig vom Expressionssystem und Aufarbeitung zwischen 50 und 90nM.

	K_d (eq) [nM]		
	ActR-IIB _{ecd} Sf-9	ActR-IIB _{ecd} E.coli; affinitätsgereinigt	ActR-IIB _{ecd} E.coli; HPLC-gereinigt
BMP-2 (E.coli)	2900-3100	2700 - 3100	2700 - 3100
ActA (Sf-9)	88	60	53-69

Tabelle 3.4: Affinität der unterschiedlich präparierten ActR-IIB_{ecd} zu BMP-2 und ActA

Vergleich der Affinität von ActR-IIB_{ecd} zu BMP-2 und zum Komplex aus BMP-2 und BMPR-IA_{ecd}

Der Activin Typ IIB Rezeptor zeigt unter den Typ II Rezeptoren der TGF- β Familie die höchste Affinität zu BMP-2. Diese Eigenschaft macht ActR-IIB_{ecd} zum optimalen Kandidaten zur Präparation eines ternären Komplexes mit BMP-2 und BMPR-IA_{ecd}.

Abbildung 3.16A zeigt ein Sensogramm der Interaktion von 1-50 μ M ActR-IIB_{ecd} mit immobilisiertem BMP-2. Der fast rechteckige Kurvenverlauf ist charakteristisch für die Interaktion von BMP-2 mit den Typ II Rezeptoren BMPR-II, ActR-IIB_{ecd} und ActR-II.

Das Sensogramm in Abbildung 3.16B zeigt die Interaktionsanalyse des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd}. Dazu wurde BMPR-IA_{ecd} auf der Chipoberfläche immobilisiert und mit 200nM BMP-2 bis zur Sättigung überspült. Dieser intermediäre Komplex wurde hernach mit 1-50 μ M ActR-IIB_{ecd} überspült.

In der graphischen Darstellung der dosisabhängigen Gleichgewichtsbindung (s. Abb. 3.16C) wird deutlich, dass kein Unterschied in der Bindung von ActR-IIB_{ecd} zu BMP-2 alleine oder zum Komplex des Liganden mit BMPR-IA_{ecd} vorliegt. Diese Beobachtung konnte durch die quantitative Analyse mittels Scatchard Plot (s. Abb.3.16D) bestätigt werden. Die apparenten Bindungskonstanten sind mit 9 und 10 μ M nahezu identisch.

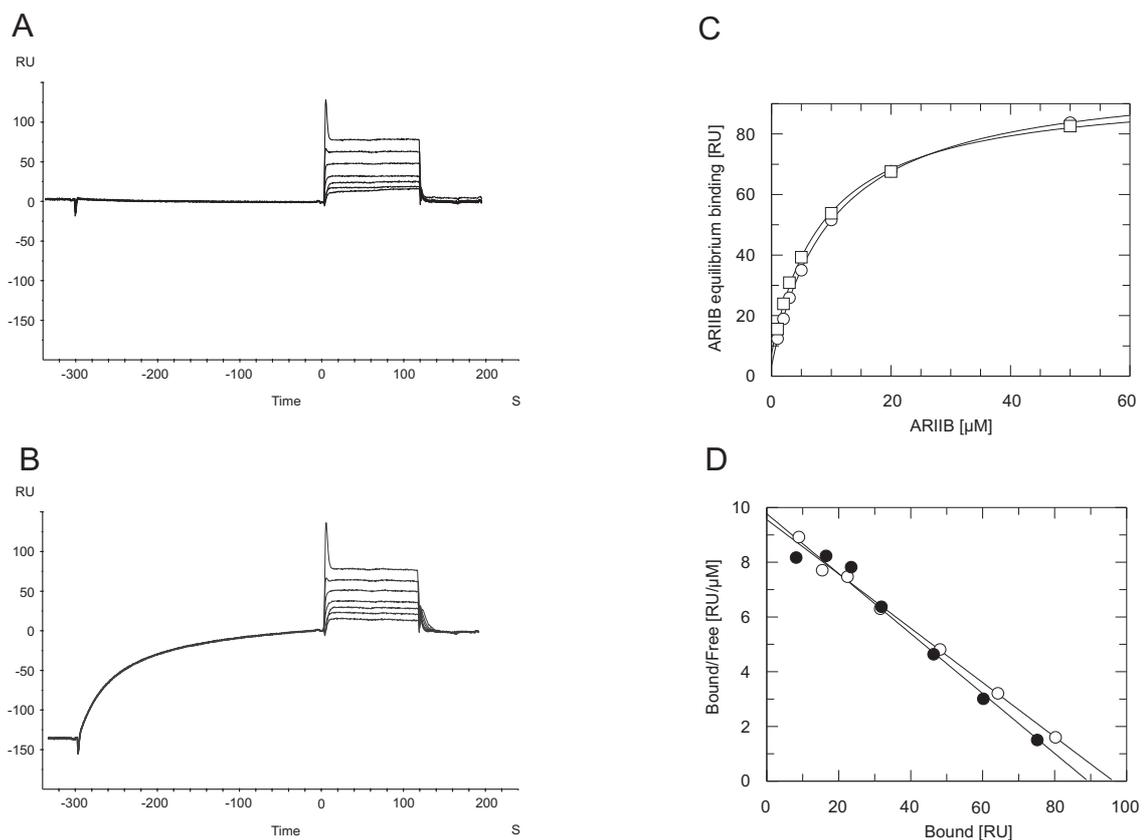


Abbildung 3.16: Vergleich der Affinität von ActR-IIB_{ecd} zu BMP-2 und zum Komplex aus BMP-2 und BMPR-IA_{ecd}. **A:** Sensogramm der Interaktion von ActR-IIB_{ecd} mit immobilisiertem BMP-2. **B:** Sensogramm der Interaktion von ActR-IIB_{ecd} mit BMP-2 im Komplex mit immobilisiertem BMPR-IA_{ecd}. **C:** Dosisabhängigkeit der Bindung von ActR-IIB_{ecd} an BMP-2 alleine (\circ) und an den BMP-2/BMPR-IA_{ecd} Komplex (\square). **D:** Scatchard Analyse der Dosis-Wirkungs Kurven für die Interaktion von ActR-IIB_{ecd} mit BMP-2 (\bullet) und dem BMP-2/BMPR-IA_{ecd} Komplex (\square).

Dieser Befund zeigt, dass die Bindung des Typ I Rezeptors keinen messbaren Einfluss auf die Affinität der Interaktion von BMP-2 mit ActR-IIB_{ecd} hat. Eine rezeptorinduzierte Kooperativität kann im physikalischen Bindungsexperiment somit nicht beobachtet werden.

3.3 Präparation der nativen Ligand-Rezeptor Komplexe

In diesem Kapitel soll der Weg der Komplexpräparation ausgehend von den Einzelkomponenten bis hin zur Gewinnung des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} aufgezeigt werden.

3.3.1 Analytische Komplexpräparation

Das generelle Problem bei der Komplexpräparation mit BMP-2 ist dessen geringe Löslichkeit im neutralen bis basischen Milieu in Anwesenheit von Salzen.

Um das Laufverhalten von BMP-2 in der Gelfiltrationschromatographie zu analysieren, wurden Löslichkeitsversuche mit dem Liganden durchgeführt. So konnte BMP-2 alleine bis zu einer maximalen Konzentration von 5,0µM in HBS₇₀₀-Puffer gelöst werden. Die grüne Kurve im Chromatogramm einer Gelfiltration zeigt die Fraktionierung von 100µl dieser „gesättigten“ BMP-2 Lösung. Das Protein eluiert zwischen 33 und 40 Minuten von der Säule. In der SDS-PAGE (s. Abb. 3.17A) wurden die korrespondierenden Fraktionen analysiert.

Die Löslichkeit von BMP-2 kann jedoch wie von Dr. T. Kirsch gezeigt (Kirsch et al. 2000), durch Komplexierung mit der extrazellulären Domäne des hochaffinen Typ I Rezeptors BMPR-IA bis in den millimolaren Bereich gesteigert werden.

BMPR-IA_{ecd} wurde dazu in einem 2,2-fachen Überschuss in HBS₁₄₀₀-Puffer vorgelegt, dann der in Wasser gelöste Ligand vorsichtig unter schnellem Mischen zupipettiert. Im Vergleich der Elutionsspektren (s. Abb. 3.17A) von BMP-2, BMPR-IA_{ecd} und deren Mischung wird die Bildung des binären Komplexes deutlich. Der Rezeptor alleine (orange) eluiert nach 31 Minuten, BMP-2 (grün) ist frühestens nach 33 Minuten nachzuweisen. Die blaue Kurve im Chromatogramm (s. Abb. 3.17A) und die dazugehörige SDS-PAGE (s. Abb. 3.17D/E) zeigen die Bildung des Komplexes aus 14nmol BMP-2 und 30,8nmol BMPR-IA_{ecd}. Der binäre Komplex eluiert nach 27-31 Minuten deutlich früher als seine Einzelkomponenten und kann somit von diesen abgetrennt werden. Die Ausbeute der Komplexbildung lag bei 50-60%.

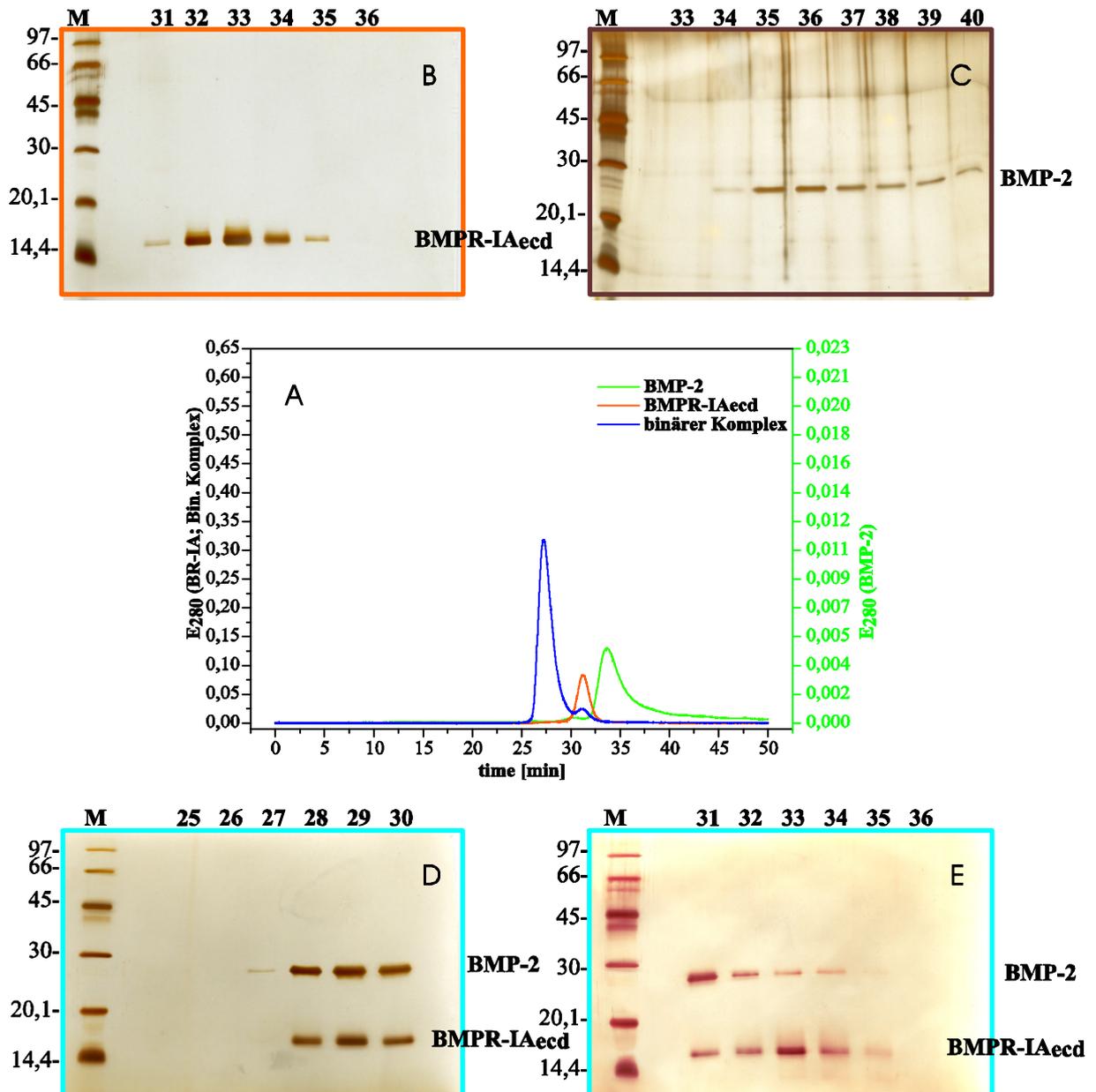


Abbildung 3.17: Bildung des binären Komplexes aus BMP-2 und BMPR-Iaecd. **A:** Chromatogramm der Gelfiltration von 0,5nmol BMP-2 (grün), 30,8nmol BMPR-Ia_{ecd} (rot) und der Präparation des binären Komplexes aus 14nmol BMP-2 und 30,8nmol BMPR-Ia_{ecd} (blau). **B-E:** SDS-PAGEs (n.red.) der korrespondierenden Gelfiltrationsfraktionen, Silberfärbung. **B:** BMPR-Ia_{ecd} **C:** BMP-2 **D+E:** Präparation des binären Komplexes aus BMP-2 und BMPR-Ia_{ecd}

Zur Bildung des ternären Komplexes wurde binärer Komplex aus BMP-2 und BMPR-Ia_{ecd} mit 2,2-fachem Überschuss an ActR-IIB_{ecd} in HBS₇₀₀-Puffer gemischt und erneut der Gelfiltrationschromatographie unterworfen. Die schwarze Kurve in Abb. 3.18A zeigt die Elution der Mischung aus 9,6nmol binärem Komplex mit 21,1nmol ActR-IIB_{ecd} nach 26 Minuten. Mit Hilfe einer SDS-PAGE (Abb.3.18C/D) konnte die Bildung des ternären Komplexes bestätigt werden. Der Komplex aus BMP-2/BMPR-Ia_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} ist in den Fraktionen 27-30 nachweisbar, in den Fraktionen 32-36 ist ungebundener ActR-IIB_{ecd} zu finden (vgl. Abb. 3.18B).

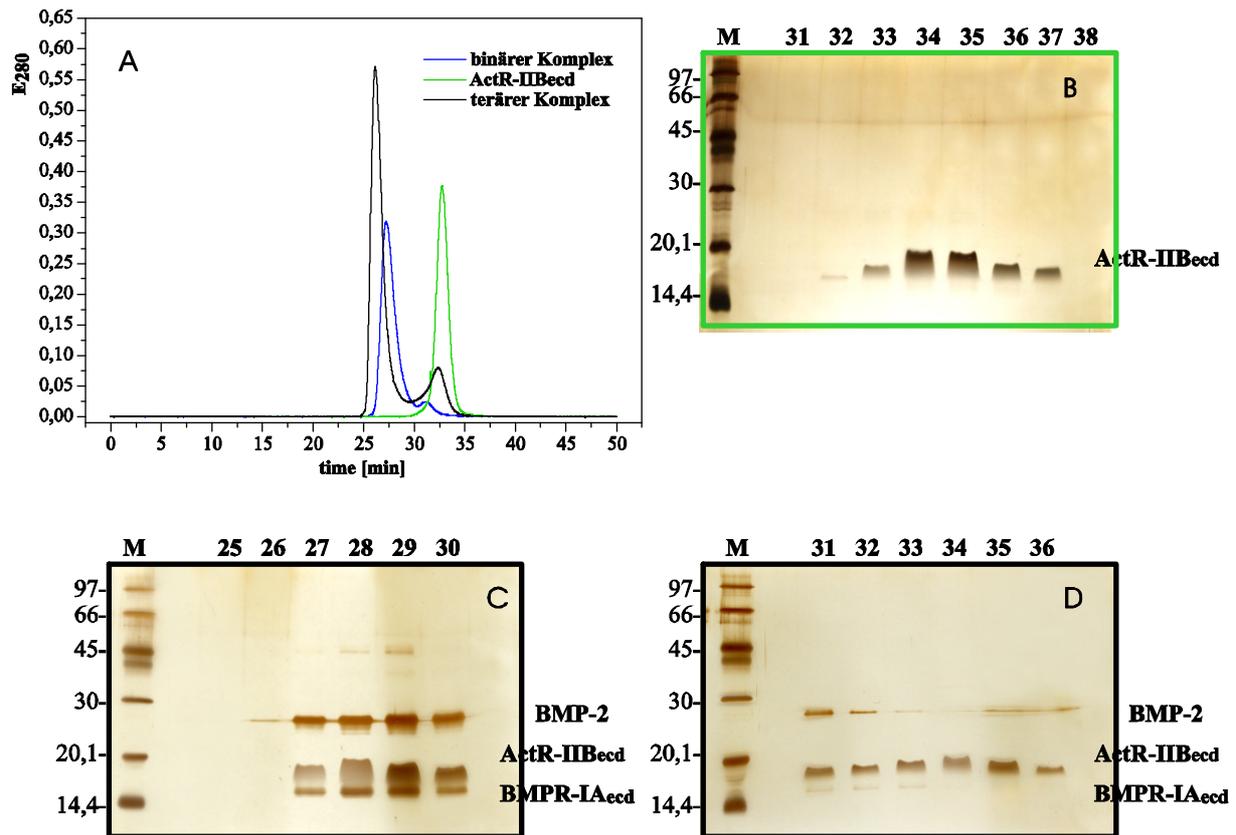


Abbildung 3.18: Bildung des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd}. **A:** Chromatogramm der Gelfiltration von 21,1nmol ActR-IIB_{ecd} (grün), der Präparation des binären Komplexes aus 14nmol BMP-2 und 30,8nmol BMPR-IA_{ecd} (blau) und der Präparation des ternären Komplexes aus 9,6nmol binärem Komplex und 21,1nmol ActR-IIB_{ecd} (schwarz). **B-D:** SDS-PAGEs (n.red.) der korrespondierenden Gelfiltrationsfraktionen, Silberfärbung. **B:** ActR-IIB_{ecd}. **C+D:** Präparation des ternären Komplexes aus binärem Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd}.

3.3.2 Präparative Komplexpräparation

Da für die Kristallisation eine sehr große Menge an ternärem Komplex notwendig ist, sollte die Komplexpräparation vereinfacht werden. Es zeigte sich, dass der Schritt der binären Komplexpräparation durch eine direkte Präparation des ternären Komplexes substituierbar war. Dabei wurde jeweils ein 2,2-facher molarer Überschuss von BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} in HBS₁₄₀₀-Puffer vorgelegt. Nach der Zugabe von in Wasser gelöstem BMP-2 wird das Gemisch 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Einengung der Proteinlösung folgte die Gelfiltration. In Abbildung 3.19A ist die SDS-PAGE eines Gelfiltrationslaufes mit einem Einsatz von 20nmol BMP-2 und der korrespondierenden Menge von jeweils 44nmol der Rezeptoren dargestellt. Der ternäre Komplex war auch hier in den Fraktionen 27-30 nachzuweisen. Diese Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert. Die SDS-PAGE in Abbildung 3.19B zeigt die Zusammensetzung von 10 bzw.

5µg des Konzentrates. Überschüssige Rezeptoren waren in den nachfolgenden Fraktionen zu finden und konnten quantitativ abgetrennt werden.

Mit diesem Verfahren war es nun möglich große Mengen an ternärem Komplex mit hohen Ausbeuten zwischen 65-75% herzustellen.

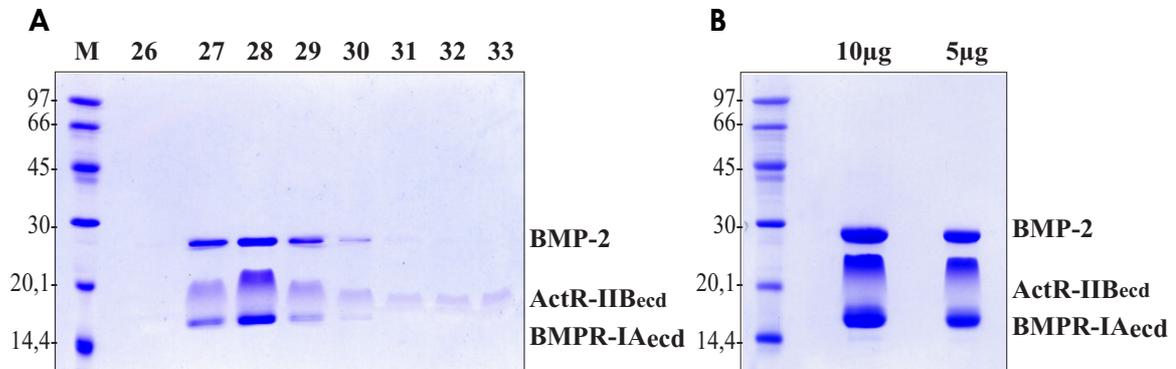


Abbildung 3.19: Präparative Komplexpräparation. **A:** SDS-PAGE (ox.) der Gelfiltrationsfraktionen der direkten Präparation des ternären Komplexes aus 20nmol BMP-2, 44nmol BMPR-IA_{ecd} und 44nmol ActR-IIB_{ecd}. **B:** SDS-PAGE von 5 bzw. 10µg des Konzentrats der vereinigten Fraktionen 27-29 der Gelfiltration zur Komplexpräparation.

3.4 Ermittlung der Stöchiometrie des ternären Komplexes

Zur Charakterisierung der Stöchiometrie des ternären Komplexes BMP-2/ActR-IIB_{ecd}/BMPR-IA_{ecd} wurde dieser wie unter 3.4.2 beschrieben präpariert. Mit 150pmol der vereinigten und aufkonzentrierten Fraktionen der Gelfiltration und Vergleichslösungen mit jeweils 150pmol BMP-2 und definierten molaren Verhältnissen der Rezeptoren wurde eine SDS-PAGE durchgeführt.

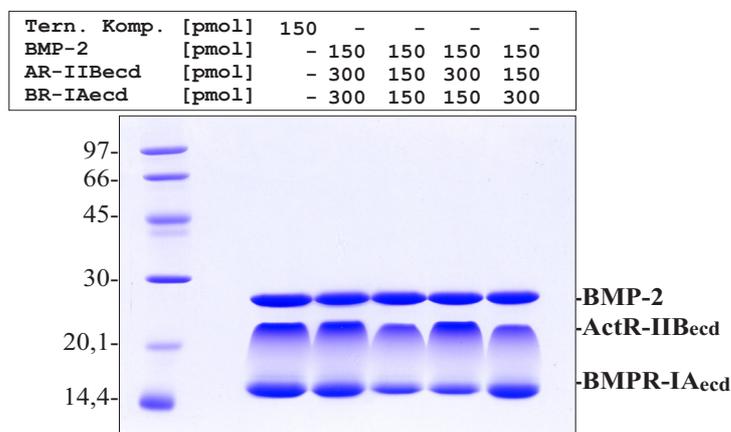


Abbildung. 3.20: SDS-PAGE (n.red.) zur Ermittlung der Stöchiometrie des ternären Komplexes. Die Tabelle gibt das Mischungsverhältnis der Einzelkomponenten wieder.

Aus dem Vergleich des Bandenmusters der SDS-PAGE in Abbildung 3.20 geht hervor, dass im präparierten ternären Komplex ein Verhältnis von einem BMP-2 Dimer zu je zwei Rezeptormonomeren vorliegt.

Auch mittels „Reversed Phase-HPLC“ konnte die Stöchiometrie bestätigt werden. 2,5nmol des präparierten Komplexes wurden im Acetonitrilgradient aufgetrennt (s. Abb. 3.21A). Als Vergleichsstandard wurden 2,5nmol BMP-2 mit je 5nmol BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} gemischt und ebenfalls aufgetrennt (s. Abb. 3.21B). In der Überlagerung der Chromatogramme (s. Abb. 3.21C) waren die Signale der beiden Läufe praktisch deckungsgleich.

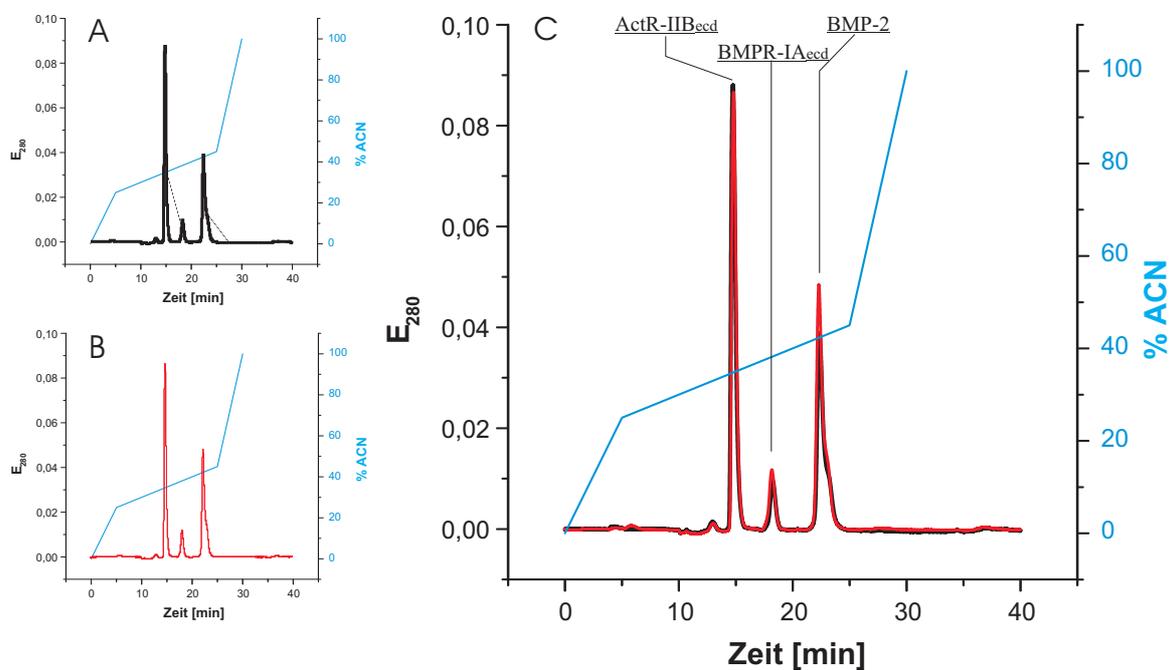


Abbildung 3.21: Ermittlung der Stöchiometrie des ternären Komplexes mittels RP-HPLC. **A:** Elutionsprofil von 2,5nmol ternärem Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd}. **B:** Elutionsprofil einer Mischung aus 2,5nmol BMP-2 mit je 5nmol BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd}. **C:** Überlagerung von A und B.

3.5 Isothermale Titrationskalorimetrie

Mit der isothermalen Titrationskalorimetrie sollte durch die Analyse der thermodynamischen Parameter die Bindung von ActR-IIB_{ecd} an BMP-2 näher charakterisiert werden.

Zur Messung wurde der binäre Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd} in der Messzelle mit einer Konzentration von 7,5µM vorgelegt. Die 150µM ActR-IIB_{ecd}-Lösung wurde nach einer einmaligen Injektion von 3µl in 56 Portionen zu je 5µl zugegeben. Die Zugabegeschwindigkeit betrug hierbei 0,5µl/s, als Äquilibrierungszeitraum wurden 240s zwischen den Injektionen gewählt.

Die Abbildung 3.22 zeigt die Rohdaten und die integrierten Signale der ITC bei 25, 30 und 35°C. Die daraus bestimmten Daten sind in Tabelle 3.5 zusammengestellt.

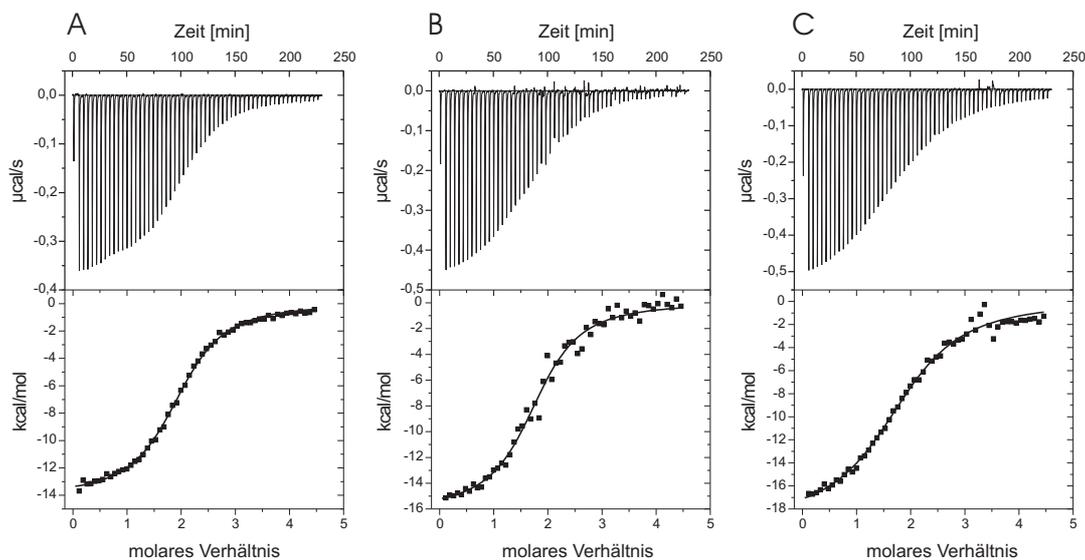


Abbildung 3.22: Titrationsexperimente mit ActR-IIB_{ecd} unter Vorlage von binärem Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd} bei 25°C (A); 30°C (B); 35°C (C)

T [K]	N	K _D [nM]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/molK]	TΔS [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]
298.15	2.01	752	-14.03 ± 0.07	-19.00	-5.67	-8.37
303.15	1.83	787	-16.06 ± 0.29	-25.10	-7.61	-8.45
308.15	1.93	1623	-18.99 ± 0.33	-35.10	-10,82	-8.17

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der aus den Titrationsexperimenten gewonnenen Daten

Die Stöchiometrie der Bindung (N) lässt sich direkt aus dem Umkehrpunkt der Titrationskurve bestimmen. Hier konnte erneut klar gezeigt werden, dass im binären Komplex aus BMP-2/BMP-IA_{ecd} und somit im Liganden zwei Bindungsstellen für den Typ II Rezeptor vorliegen.

Die Entropie (ΔS) nimmt negative Werte zwischen -19 und -35 ΔS cal/molK ein. Dieser entropisch ungünstige Prozess wird durch die Enthalpie kompensiert. So zeigt die BMP-2/ActR-IIB_{ecd} Interaktion eine die Komplexbildung begünstigende Reaktionsenthalpie (ΔH) zwischen -14,03 kcal/mol bei 25°C und -18,99 kcal/mol bei 35°C. Die Dissoziationskonstante (K_D) konnte aus der Messung bei 25°C mit etwa 750nM bestimmt werden. Mit steigender Messtemperatur war auch ein Anstieg der Dissoziationskonstante beobachtbar, bei 35°C entsprach diese 1623nM. Im Vergleich zu Plasmon-Resonanz Messungen lag hier eine 3-6-fach geringere Affinität des Rezeptors zum Liganden (bzw. zum binären Komplex) vor. Die freie Enthalpie (ΔG) ist temperaturunabhängig, ihr Wert variierte lediglich zwischen -8,75 und -8,17 kcal/mol.

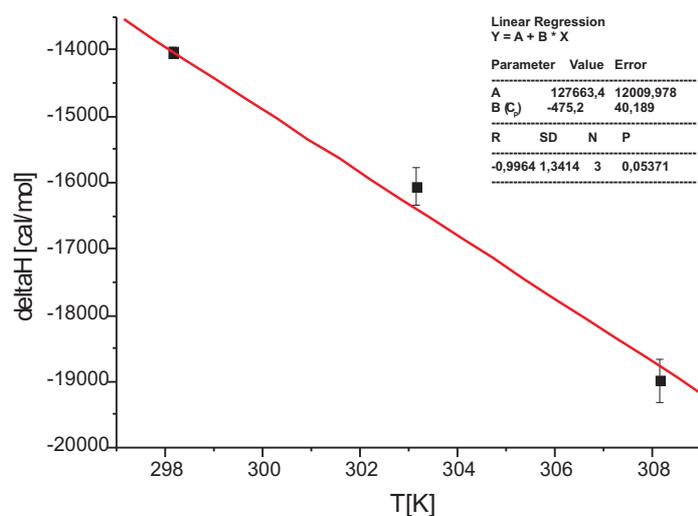


Abbildung 3.23 : Temperaturabhängigkeit der Änderung der Reaktionsenthalpie für die Bindung von ActR-IIB_{ecd} an den binären Komplex aus BMP-2/BMP-IA_{ecd}. Die Steigung aus der linearen Regression gibt den Wert der Änderung der Wärmekapazität (ΔC_p) wieder.

Die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p nimmt mit $-475 \text{ cal}^{-1}\text{K}^{-1}$ einen relativ hohen negativen Wert ein. Der Komplex hat folglich eine geringere Wärmekapazität als die Summe seiner Komponenten. Dies lässt auf große hydrophobe Flächen schließen, die durch die Komplexbildung bedeckt werden (Pearce et al. 1996).

3.6 Kristallisation der nativen Ligand-Rezeptor-Komplexe

Die Kristallisation wurde nach dem Prinzip der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen durchgeführt. In allen initialen Kristallisationstests lag der ternäre Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} mit einer Konzentration von 10mg/ml in 10mM HEPES, pH 7,4 und 700mM NaCl vor. Die Proteinlösung wurde im Verhältnis 1µl zu 1µl Reservoirflüssigkeit eingesetzt.

Erste Kristallisationsversuche wurden mit den beiden „Sparse-Matrix“ Screens HR-I und HR-II der Firma Hampton-Research durchgeführt. Nachfolgend wurden Tests mit den Screens I-V der Firma Jena Bioscience und folgenden Screens der Firma Hampton Research durchgeführt: Malonat-, Index-, PEG-Ion- und Cryoscreen. In Tabelle 3.6 sind die Zusammensetzungen der positiven Kristallisationsbedingungen aufgelistet. In Abbildung 3.24 sind Aufnahmen der korrespondierenden Kristalle dargestellt.

„Sparse-Matrix“ Screens HR-I und HR-II

Vier Bedingungen aus HR- und HR-II zeigten Kristallbildung. Ausgehend von Bedingung HR-I #7 (1,4M Na-Acetat; 0,1M Na-Cacodylat, pH 6,5) wurde der pH Bereich von 5,5 bis 7,0 und Natriumacetat in einem Konzentrationsbereich von 0,5 – 2M getestet, was aber keine Verbesserung hinsichtlich der Kristallgröße nach sich zog. Durch ein Volumenverhältnis 3µl Proteinlösung zu 1µl Reservoir konnten allerdings Kristalle bis zu einer Länge von 40µM erhalten werden. Das Messen möglicher Beugung war erschwert, da die Kristalle nicht tieftemperaturtauglich waren. Durch Eindiffundieren von Gefrierschutzmittel lösten sich die Kristalle auf, daher wurde diese Bedingung nicht weiterverfolgt. Aufgrund der Länge von 300µM war der Kristall aus Bedingung HR-I #41 (10% Isopropanol; 0,1M Na-HEPES, pH 7,5) groß genug um ein Diffraktionsbild aufzunehmen. Da dieses dieselbe Raumgruppe wie freies BMP-2 zeigte, wurde diese Bedingung nicht weiter optimiert. Die ausschließliche Kristallisation des freien Liganden kann auch von BIAcore Bindungsstudien abgeleitet werden, da hier in Anwesenheit von alkoholischen Lösungsmitteln wie Isopropanol keine Bindung zum Rezeptor gemessen werden kann (pers. Mitteilung Dr. J. Nickel). Das Kristallwachstum in Bedingung HR-I #44 (0,2M Mg-Formiat) konnte mit selbst angesetzten Reagenzien nicht reproduziert werden. Über einen Bereich von 0,05 – 0,6M Magnesium-Formiat war nur amorphes Präzipitat sichtbar. Die Bedingung HR-II #42 (1,5M (NH₄)₂SO₄; 0,1M Tris/HCl, pH 8,5; 12% Glycerol) wurde im pH Bereich von 7,0 bis 8,5 und von 1 bis 2M Ammoniumsulfat

variiert. Nur in der Ursprungsbedingung wurden Kristalle bis zu 80 μ M Länge erhalten. Da auch diese Bedingung nicht tiefempfahig war, konnten die Kristalle nicht auf Röntgenbeugung getestet werden.

Screen/ Bed.	Salz	Puffer	Fällungsmittel	Dauer	Beschreibung
HR-I #7		0,1M Na-Cacodylat, pH 6,5	1.4M Na-Acetat	16d	mikro-Kristalle
HR-I #41		0,1M Na-HEPES, pH 7,5	10 % Isopropanol	2d	einzelne Nadel
HR-I #44			0,2 M Mg-Formiat	4d	mikro-kristallines Präzipitat
HR-II #42	1,5M (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1M Tris/HCl, pH 8,5	12% Glycerol	4d	mikro-kristallines Präzipitat
HR-Index #58		0,1M Bis-Tris, pH 6,5	45%PPG400	2d	linsenförmige, kleine Einzelkristalle
HR-PEG #1	0,2M NaF		20% PEG3350	5d	mehrschichtiger Einzelkristall
HR-PEG #11	0,2M KI		20% PEG3350	5d	Konglomerat aus 4 Kristallen
HR-PEG #18	0,2M KNO ₃		20% PEG3350	2d	mehrschichtiger Einzelkristall
HR-PEG #29	0,2M KOAc		20% PEG3350	7d	mehrschichtiger Einzelkristall
HR-Cryo #28	0,17M NaOAc	0,08M Na-Cacodylat, pH 6,5	25,5% PEG8000, 15% Glycerin	4d	Kristallkonglomerat
HR-Cryo #42	0,04M KH ₂ PO ₄		16% PEG8000, 20% Glycerin	10d	einzelne abgerundete Kristalle
HR-Cryo #49	0,8M Li ₂ SO ₄		1,6% PEG8000, 20% Glycerin	12d	einzelne Kristalle
JBS-1 A2		0,1M NaMES, pH 6,5	15%PEG400	2d	linsenförmige, kleine Einzelkristalle
JBS-3 D2	0,1M NaOAc		25% PEG4000, 8% 2-Propanol	7d	einzelne mini-Kristalle
JBS-4 A6			15% PEG6000, 5% Glycerin	5d	vielschichtige Nadel
JBS-5 D3		0,1M Tris/HCl, pH 8,5	30% PEG10000	5d	kleine Kristallkonglomerate

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der Kristallisationsbedingungen des ternären Komplexes BMP-2/ActR-IIB_{ecd}/BMPR-IA_{ecd} in Structure-ScreenI (HR-I), Structure-ScreenII (HR-II), Index Screen (H-Index), PEGIon Screen (HR-PEG), CryoScreen (HR-Cryo), Jena Bioscience Screens 1-5 (JBS-1-5)

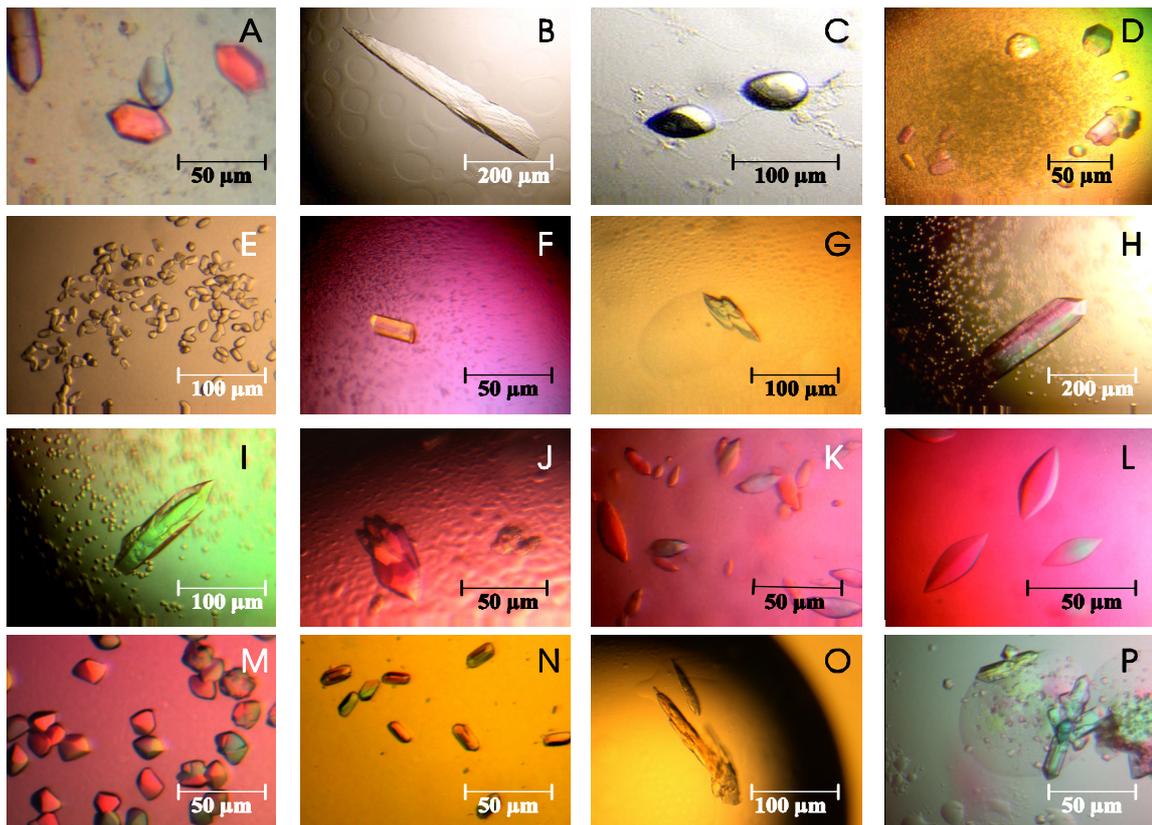


Abbildung 3.24: Kristalle des BMP-2/BMPR-IA_{eccd}/ActR-II_{B_eccd} Komplexes

- A: 0,1M Na-Cacodylat, pH 6,5; 1,4M Na-Acetat B: 0,1M Na-HEPES, pH 7,5; 10 % Isopropanol
 C: 0,2 M Mg-Formiat
 D: 1,5M (NH₄)₂SO₄; 0,1M Tris/HCl, pH 8,5; 12% Glycerin
 E: 0,1M Bis-Tris, pH 6,5; 45%PPG400 F: 0,2M NaF; 20% PEG3350
 G: 0,2M KI; 20% PEG3350 H: 0,2M KNO₃, 20% PEG3350
 I: 0,2M KOAc; 20% PEG3350
 J: 0,17M NaOAc; 0,08M Na-Cacodylat, pH 6,5; 25,5% PEG8000, 15% Glycerin
 K: 0,04M KH₂PO₄; 16% PEG8000, 20% Glycerin L: 0,8M Li₂SO₄; 1,6% PEG8000, 20% Glycerin
 M: 0,1M NaMES, pH6,5; 15%PEG400 N: 0,1M NaOAc; 25% PEG4000, 8% 2-Propanol
 O: 15% PEG6000, 5% Glycerin P: 0,1M Tris/HCl, pH 8,5; 30% PEG10000

„Hampton PEG-Ion-“ und „Hampton Cryo Screen“

Im „Hampton-PEG-Ion Screen“ zeigte sich unter 4 Bedingungen Kristallbildung (20% PEG3350 mit jeweils 0,2M der Salze NaF, KJ, KNO₃, KOAc). An der Morphologie der Kristalle war in allen Bedingungen eine mehrschichtige Zusammensetzung oder die Verwachsung zu Konglomeraten auffällig. Die Variation des PEG-Anteils von 10 bis 35% und der Salzkonzentration 0,1 bis 0,3M führte in keinem Fall zur Verbesserung der Morphologie. In allen 4 Bedingungen konnten nur in der Ursprungszusammensetzung Kristalle in einer Größenordnung von 75-250µm erhalten werden. Da diese Bedingungen

nicht tieftemperaturfähig sind, wurden die Kristalle in 35% PEG400 eingebracht und dann auf Diffraktion getestet. Alle aus diesen Bedingungen getesteten Kristalle zeigten keine Beugung der Röntgenstrahlen.

Im „Hampton-Cryo Screen“ wurden drei Kristallisationsbedingungen gefunden. In der Bedingung HR-Cryo#28 (0,17M NaOAc; 0,08M Na-Cacodylat, pH 6,5; 25,5% PEG8000, 15% Glycerin) war nach 4 Tagen die Bildung eines Kristallkonglomerats zu beobachten. Die Messung eines Fragments ergab ein Beugungsmuster mit einer maximalen Auflösung von 8-10Å. Diese Bedingung wurde im pH Bereich zwischen 5,5 und 7,0 und im PEG8000 Anteil von 15 bis 35% optimiert. Jedoch konnte die Kristallbildung nicht reproduziert werden.

Die Bedingung HR-Cryo#42 (0,04MKH₂PO₄; 16% PEG8000, 20% Glycerin) wurde durch Veränderung der des PEG8000- und Glycerin-Anteils verfeinert. Bei der Zusammensetzung aus 40mM KH₂PO₄; 10% PEG8000; 25% Glycerin wuchsen Kristalle bis zu einer Länge von 200µM die ein Beugungsmuster bis 8 Å zeigten. Das Beugungsmuster wies allerdings doppelte Reflexe auf, was auf die Verwachsung von Kristallen schließen lässt. Da sich diese Muster auch in der Röntgenbeugung von Kristallen weiterer Finescreens zeigte, wurde die Bedingung nicht weiterverfolgt.

Ausgehend von Bedingung HR-Cryo#49 (0,8M Li₂SO₄; 1,6% PEG8000, 20% Glycerin) wurde die Kristallisation bei Glycerinanteilen zwischen 10 und 30% und Lithiumsulfat Konzentrationen zwischen 0,25 und 1M getestet. Bei der Konzentration von 0,75M Li₂SO₄ und Glycerinanteilen von 15 und 20% konnten Kristalle von 75µm Länge erhalten werden. Die röntgenkristallographische Charakterisierung ergab eine Auflösung bis zu 3Å und die Raumgruppe P6₅ mit den Dimensionen a=b=107Å; c=101Å; α=β=90°; γ=120°. Da diese Daten absolut mit den Zellkonstanten des binären Komplexes aus BMP-2 und BMPR-IA_{ecd} (Kirsch et al. 2000) übereinstimmen, wurde diese Bedingung nicht weiter getestet.

„Jena Bioscience“ Screens 1-5

In den Screens 1-5 der Firma Jena Bioscience konnte für 4 Bedingungen Kristallisation beobachtet werden. Die Bedingung JBS-3D2 (0,1M NaOAc; 25% PEG4000, 8% 2-Propanol) wurde aufgrund des Isopropanolgehalts nicht weiterverfolgt. Die Bedingung JBS-4A6 (15% PEG6000; 5% Glycerin) zeigte nach 5 Tagen Wachstum von vielschichtigen Kristallen. Durch die Variation der Anteile von PEG6000 und Glycerin konnten keine Einzelkristalle gewonnen werden. Auch die Bedingung JBS-5D3 (Tris/HCl, pH 8,5; 30% PEG10000) zeigte Wachstum von Kristallkonglomeraten. Im Finescreen war

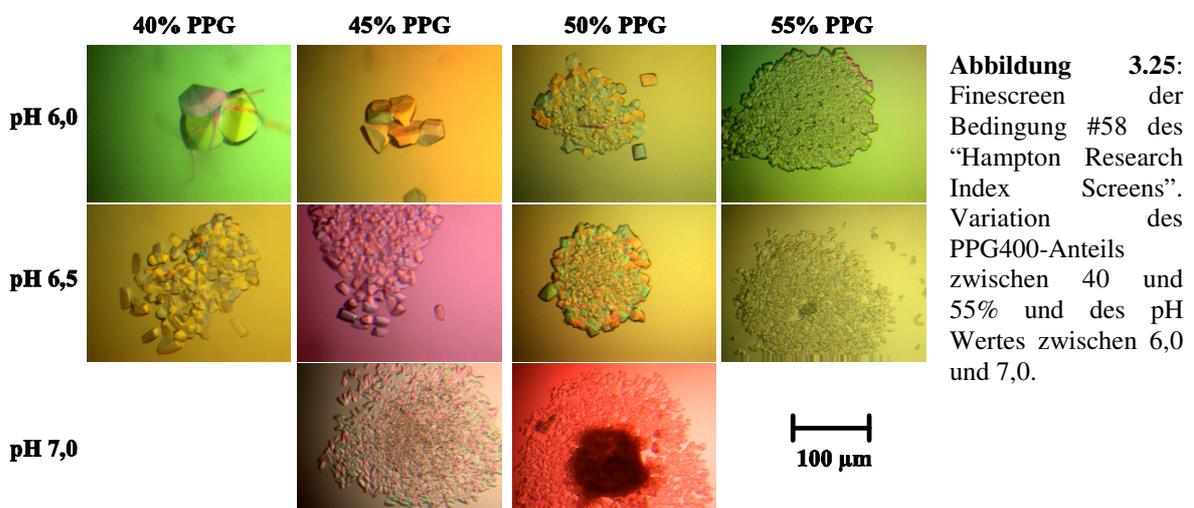
die Bedingung nicht reproduzierbar. Bei einem pH Wert über 7,5 und einem PEG10000 Anteil überhalb 25% war nur amorphes Präzipitat sichtbar.

In der Bedingung JBS-1A2 (0,1M NaMES, pH 6,5, 15% PEG400) entstanden nach 2 Tagen kleine, linsenförmige Kristalle. Durch die Variation des pH Bereichs von 5,5 bis 7 und des PEG400 Anteils von 10 bis 20% wurde die Kristallbildung optimiert. Ideale Bedingungen sind PEG400 Anteile zwischen 15 und 20% bei pH 6,5. Durch die Äquilibration der Kristalle auf 30% PEG400 waren diese tieftemperaturfähig und konnten auf Beugung getestet werden. Die Kristalle zeigten ein Beugungsbild mit einer maximalen Auflösung von 5Å. Die Charakterisierung ergab eine tetragonale Raumgruppe mit $a=b=65\text{Å}$; $c=114\text{Å}$ und $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

“Hampton Research Index Screen”

Im Index-Screen wurde in der Bedingung #58 nach 2 Tagen die Bildung von 5-10µm großen Kristallen beobachtet (s. Abb. 3.24). Die Zusammensetzung aus 0,1M Bis-Tris pH 6,5 und 45% Polypropylenglykol war tieftemperaturfähig. Abbildung 3.25 zeigt Aufnahmen von Kristallen im pH-Bereich zwischen 6 und 7 und eines Polypropylenglykol-(PPG) Anteils von 40 bis 55 Prozent.

Bei pH 6 und einer PPG-Konzentration von 40 und 50% hatten sich nach 2 Tagen Einzelkristalle gebildet, die jedoch nach 10 Tagen zu Konglomeraten von 100µm Durchmesser zusammengewachsen sind. Die Beugungsmessung eines solchen „Clusters“ am Strahlrohr des DESY-Synchrotrons in Hamburg ergab eine Auflösung zwischen 2,6 und 2,8Å. Erste Datensätze gaben Hinweise auf eine tetragonale Raumgruppe mit den Zellkonstanten $a=b=65\text{Å}$; $c=114\text{Å}$ und $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.



Da diese Konstanten weder im binären Komplex aus BMP-2 und BMPR-IA_{ecd} noch im Ligand alleine zu finden waren, sollten die Kristalle näher charakterisiert werden. Mittels SDS-PAGE (s. Abb. 3.26) konnte die Zusammensetzung des Kristalls aus den drei Komponenten BMP-2, BMPR-IA_{ecd}, ActR-IIB_{ecd}, gezeigt werden.

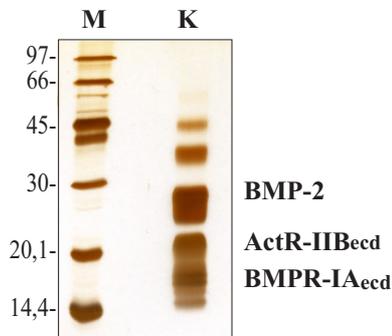


Abbildung 3.26: SDS-PAGE (ox.) eines Kristallkonglomerats entnommen aus der Kristallisationsbedingung Bis-Tris, pH 6,0 und 45% PPG₄₀₀.

Um optimale Kristallisationsbedingungen für die Bildung von Einzelkristallen zu finden, wurden verschiedene Parameter verändert. Als Kriterien wurden das Kristallwachstum und vor allem die Bildung von Einzelkristallen gewählt. Wie aus Tabelle 3.7 zu entnehmen ist, wurden diese Kriterien bei der Mischung von 1,5µl Reservoirlösung mit demselben Volumen einer 15mg/ml konzentrierten Proteinlösung und der Inkubation bei Raumtemperatur am besten erfüllt.

Parameter	Variation	Favorisierte Bed.
Temperatur [°C]	5, 15, RT, 30	RT (~20°C)
Mischungsverhältnis ($v_{\text{Protein}}/v_{\text{Reservoir}}$) [µl]	1/1; 1,5/1,5; 2/2; 3/3; 1/2; 2/1; 3/1	1,5/1,5
Proteinkonzentration [mg/ml]	8; 10; 15; 20	15
Zusammensetzung der Reservoirlösung	0,1M Bis-Tris, pH 5,25-7,0; 35-90% PPG400	0,1M Bis-Tris pH 5,5-6,0; 40-55% PPG400

Tabelle 3.7: Variationen der Kristallisationsbedingung des „Finescreens“ aus 0,1M Bis-Tris und PPG400

Abbildung 3.27 zeigt schematisch die Auswirkung der Reservoirzusammensetzung auf die Kristallbildung. Der rot/orange Bereich markiert das Fenster optimalen Kristallisationsbedingungen. Ein pH Wert zwischen 5,5 und 6,0 und eine Polypropylenkonzentration von 40-55% begünstigt das Kristallwachstum. Hier entstanden in einem Inkubationszeitraum zwischen 5 und 10 Tagen einzelne Kristalle (x= „x-tals“) mit einem Durchmesser von 50 bis 200µm. In Abbildung 3.28 sind beispielhaft Kristalle aus diesem Bereich gezeigt.

PPG pH	35%	40%	45%	50%	55%	60%	70%	80%	90%
5,25									
5,5				X	X	μX	μX	PS	PS
5,75			X	X	X	μX	μX	μX	PS
6,0	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	μX	μX	PS	PS
6,25	MX	MX	X	μX	μX	PS	PS	PS	PS
6,5	MX	MX	MX	μX	μX	PS	PS	PS	PS
6,75	μX	μX	μX	μX	μX	PS	PS	PS	PS
7,0									

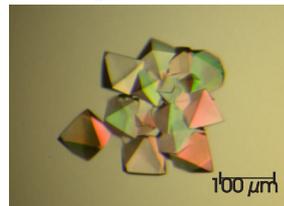
Abbildung 3.27: Schematische Darstellung des „Finescreens“ aus Bis-Tris und PPG400. Roter Bereich: Bevorzugte Kristallisationsbedingungen, hier konnten Kristalle zwischen 50 und 200μm erhalten werden. Grüner Bereich: Bedingungen führen zur Bildung von Mikrokristallen. Blauer Bereich: Bedingungen führen zu Phasentrennung oder Präzipitation. Hellgrauer Bereich: Tropfen bleiben klar.

Die in Abbildung 3.27 innerhalb des gelben Bereichs erzeugten Kristalle waren mit 10-30μM zu klein für eine Bestimmung von Kristallparametern. Bei einem PPG Anteil von mehr als 60% entstanden nur noch Mikrokristalle kleiner als 5μM (grüner Bereich) oder es kam zu Phasentrennung (hellblauer Bereich).

Bis-Tris pH 6,0; 45% PPG



Bis-Tris pH 5,75; 45% PPG



Bis-Tris pH 6,0; 50% PPG



Bis-Tris pH 6,0; 50% PPG



Abbildung 3.28: Einzelkristalle des ternären Komplexes aus BMP-2/BMPRI-IA_{eccd} und ActR-IIB_{eccd}. Die jeweiligen Kristallisationsbedingungen sind angegeben.

3.7 Messung von nativen Beugungsdatensätzen

Erste hochaufgelöste Röntgenbeugungsdaten konnten von einem Einzelkristall der Bedingung 45% Polypropylenglycol₄₀₀, 0,1M Bis-Tris pH 6,25 an einer Drehanoden Einrichtung aufgezeichnet werden.

Mit einer Belichtungszeit von 240s pro 0,5° und einer Gesamtaufnahme von 240° konnten Beugungsdaten bis zu einer Auflösung von 2,2Å erhalten werden (s. Abb 3.29). Die Statistik der Beugungsdaten ist in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

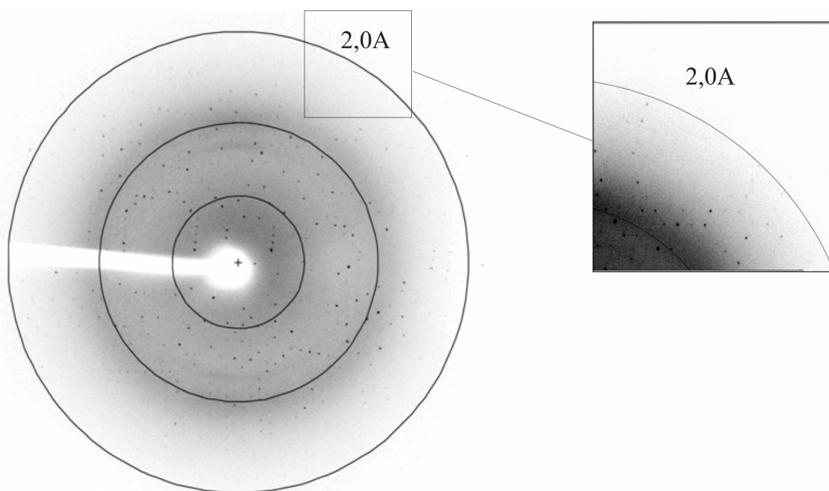


Abbildung 3.29: Beugungsbild eines Kristalls des ternären Komplexes aus der Bedingung 45% Polypropylenglycol₄₀₀, 0,1M Bis-Tris pH 6,25 mit einer Belichtungsdauer von 240s gemessen mit der Rigaku Drehanodenanlage.

Raumgruppe	P4 oder P2 bzw. P222 vermutet
Elementarzelle	a = 64.55 Å, b = 65.42 Å, c = 113,16 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Auflösung (Å)	20.0 – 2,1Å
Wellenlänge	1,5478 Å

Tabelle 3.8: Statistik des hochauflösenden Datensatzes des nativen ternären Komplexes BMP-2/ActR-IIB_{eccd}/BMPr-IA_{eccd}

3.8 Strukturlösungsansatz durch molekularen Ersatz

Zur Bestimmung/Analyse der Beugungsdaten wurde anfangs die Methode des molekularen Ersatzes eingesetzt. Dazu wurden Strukturmodelle der Einzelkomponenten BMP-2, BMP-7, ActR-II, BMPR-IA sowie für die binären Komplexe BMP-2/BMPR-IA und BMP-7/ActR-II als Suchmodelle herangezogen. Eine Lösung der Struktur des ternären Komplexes war jedoch mit dieser Methode unter Verwendung der Softwarepakete CNS und AMORE (CCP4) nicht möglich.

Als mögliche Ursachen für das Scheitern der Methode des molekularen Ersatzes wurde einerseits eine Änderung der Struktur oder der Architektur des ternären Komplexes bzw. einzelner Komponenten, andererseits ein Fall von „Twinning“ der Kristalle angenommen. Der Begriff „Twinning“ beschreibt eine mehr oder weniger regelmäßige Fehlordnung der Einheitszellen unter bestimmten Symmetrie- und Geometriebedingungen. In dem hier gegebenen Fall sind die Zellkonstanten a und b ($a = 64.55 \text{ \AA}$, $b = 65.42 \text{ \AA}$) nahezu identisch und deuten auf eine tetragonale Raumgruppe $P4$ oder Untergruppe hin. Eine Prozessierung in dieser Raumgruppe führte jedoch zu hohen R_{sym} -Werten in den Datenscalen mit hoher Auflösung. Eine mögliche orthorhombische oder monokline Raumgruppe hätte jedoch bei diesen Zellkonstanten die Möglichkeit von Twinning bedeutet, da eine Rotation um β einen Austausch von a und b bedeutet hätte, der unter diesen Umständen aufgrund der geringen Unterschiede möglich ist. Da alle Winkel bei freier Prozessierung nahezu 90° betragen, liegt es nahe, eine orthorhombische Raumgruppe anzunehmen ($P222$).

Daher wurden zwei Strategien in Betracht gezogen. Im möglichen Fall von „Twinning“, sollten durch weitere Kristallisationsversuche „neue“ Kristallisationsbedingungen mit einer anderen Raumgruppe gefunden werden. Falls eine Konformationsänderung einer oder mehrerer Komponenten des Komplexes vorliegt, so sollte die Strukturlösung mit der MAD-Methode erfolgreich sein. Diese Methode setzt den Einbau von Elementen mit einem anomalem Streueffekt voraus und erlaubt die Bestimmung experimenteller Phasen voraus.

3.9 Kristallisationstests unter Niedrigsalzbedingungen

Aufgrund des Scheiterns des molekularen Ersatzes und der Annahme, dass in den charakterisierten Kristallen ein seltener Fall von monoklinem oder orthorhombischem Twinning vorliegt, sollte versucht werden Kristalle mit einer anderen Raumgruppe zu finden.

3.9.1 Analyse der Komplexstabilität unter Niedrigsalzbedingungen

Bei initialen Screens wurde die Proteinlösung des ternären Komplexes durchweg im Puffer der Komplexpräparation bzw. Gelfiltration belassen. Die Zusammensetzung aus 10mM HEPES, pH 7,4 und 700mM NaCl favorisiert zwar die Bildung des Komplexes, die hohe Salzkonzentration könnte aber hinsichtlich der Kristallisation hinderlich sein. In der Mischung von 1µl Proteinlösung mit 1µl Reservoirlösung liegt anfänglich in jedem Tropfen eine NaCl Konzentration von 350mM vor. Da diese Salzkonzentration in Kombination mit den „Screen-Bedingungen bereits zur Fällung der Proteine führen kann, sollten weitere Kristallisationsexperimente unter geringeren Salzkonzentrationen durchgeführt werden.

Der ternäre Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} wurde wie unter 3.3.2 beschrieben präpariert und anschließend gegen 10mM HEPES, pH 7,4 und NaCl Konzentrationen von 50-150mM dialysiert. Mittels SDS-PAGE wurde auf das Vorhandensein der drei Komponenten geprüft. Wie Abbildung 3.30 zeigt, ist unter niedrigen Salzkonzentrationen kein Unterschied in der Intensität der Banden im Vergleich zur Hochsalzbedingung zu erkennen. Es befinden sich also alle Komponenten noch in Lösung. Die Stabilität des Komplexes wurde durch den Vergleich der Laufeigenschaften in der Gelfiltration geprüft. Hierbei war kein Unterschied zwischen den dialysierten und den Originallösungen erkennbar. So wurde die Proteinlösung in 10mM HEPES, pH 7,4; 50mM NaCl in den nachfolgenden Kristallisationsexperimenten eingesetzt.

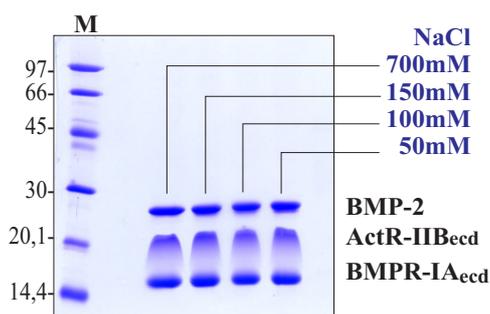


Abbildung 3.30: Analyse der Stabilität des ternären Komplexes unter Niedrigsalzbedingungen. SDS-PAGE (n.red) des ternären Komplexes unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

3.9.2 „Nanoliter-Kristallisationsscreening“ mit Kristallisationsroboter

Die Änderung der Salzkonzentration von 700 auf 50mM sollte zu neuen Kristallisationsbedingungen führen. So war es notwendig alle, auch die bisher verwendeten „Screens“ zu testen.

Durch den Kontakt zu Dr. Winfried Weissenhorn vom EMBL Grenoble konnte auf einen Kristallisationsroboter zurückgegriffen werden. Dieses System erlaubt 600 Kristallisationstests mit drei verschiedenen Proteinkonzentrationen unter Einsatz von je 100nl Lösung. So konnte die Kristallisation des ternären Komplexes mit vergleichsweise niedrigem Proteineinsatz mit den kompletten „Grid- und Matrix -Screens“ der Firma Hampton Research und weitere Screens des EMBL Grenoble getestet werden. Tabelle 3.9 zeigt die Zusammensetzung der Bedingungen, in denen Kristallwachstum beobachtet werden konnte. In Abbildung 3.31 sind Aufnahmen von Kristallen aus erfolgreichen Finescreens abgebildet. Im Vergleich der Bedingungen fällt auf, dass eine Proteinkonzentration von 5mg/ml für die Kristallisation nicht ausreichend ist. Wurde der Komplex mit 10mg/ml eingesetzt, war die Kristallisation ausschließlich in salzhaltigen Bedingungen favorisiert. Eine Proteinkonzentration von 20mg/ml führte zu weiteren, dann auch salzunabhängigen Kristallisationsbedingungen. Auffällig ist auch, dass nur wenige Bedingungen des mit 50mM NaCl eingesetzten Komplexes mit Kristallisationsbedingungen des Komplexes in 700mM NaCl übereinstimmen, nämlich HR-I#41 (0,1M HEPES, pH 7,5; 10 % Isopropanol); HR-PEG#11 (0,2M KI; 20% PEG3350); HR-PEG#18 (0,2M KNO₃; 20% PEG3350) und die Bedingung aus 0,1M MES, pH6,0; 1,6M Mg-Formiat. Da mit diesen Bedingungen bereits ausgedehnte Optimierungsversuche durchgeführt worden waren, wurden diese nicht weiter getestet. Ebenso wurden Bedingungen mit alkoholischen Lösungsmitteln nicht weiterverfolgt, da hier die Komplexstabilität nicht gegeben ist. Die beiden Malonat-haltigen Bedingungen (2,4M Malonat, pH 7,0; bzw. 1M Malonat, pH 6,0) sollten im „Hampton Research Malonat Screen“ verfeinert werden, es wurde aber in allen Bedingungen ausschließlich feinkristallines Präzipitat beobachtet. Die Bedingungen HR-PEG#6 (0,2M NaCl; 20% PEG3350) und HR-PEG#14 (0,2M KSCN; 20% PEG3350) wurden mit PEG3350 Anteilen zwischen 10 und 35% getestet. In beiden Bedingungen konnten große Kristallkonglomerate bei 25% PEG3350 erhalten werden. Fragmente der Konglomerate wurden in den Röntgenstrahl verbracht, zeigten hier aber nur sehr schwache Beugungsmuster bis maximal 20Å. Zum gleichen Ergebnis kommt die Verfeinerung der Bedingung mit 25% PEG3350 und 0,2M NaCl hinsichtlich des pH Wertes. Hier konnten

zwar große Kristallnadeln bei pH 7,0 und 7,5 erhalten werden, die aber keine Streuung des Röntgenstrahls zeigten. Hier sei erwähnt, dass auch unter Hochsalzbedingungen Kristalle mit PEG3350 erhalten wurden, die keine Beugungseigenschaften zeigten.

Screen/ Bed.	Salz	Puffer	Fällungsmittel	c [mg/ml]	t	Beschreibung
HR-I #8		0,1M Na-Cacodylat, pH 6,5	30% 2-Propanol, 0,2M Na-Citrat	20	5d	fächerförmige Plättchen
HR-I #11		0,2M Na-Citrat, pH 6,5	1M (NH ₄) ₂ HPO ₄	20	5d	Mikrokristalle
HR-I #41		0,1M HEPES, pH 7,5	10% 2-Propanol		5d	einzelne Kristalle
--		0,1M ADA, pH 6,5	1M (NH ₄) ₂ HPO ₄	20	5d	kleine Spherulite
--			2,4M Malonat, pH 7,0	20	5d	mikrokristallines Präzipitat
--	0,2M NaCl	0,1M Tris/HCl, pH 8,5	25% PEG3350	10/20	5d	haarnadelartige Minikristalle
HR-Nat #4	0,2M KCl	0,05M MES, pH 5,6	0,01M MgSO ₄ , 10% PEG400	10/20	7d	kleine Spherulite
HR-Nat #5	0,2M KCl	0,05M MES, pH 5,6	0,01M MgCl ₂ , 5% PEG8000	10/20	7d	Kristallplättchen
HR-Nat #14	0,2M KCl	0,05M Na- Cacodylat, pH 6,0	0,025 MgCl ₂ , 15% 2-Propanol	10/20	7d	einzelne Kristalle
HR-PEG #6	0,2M NaCl		20% PEG3350	10/20	10d	mikrokristallines Präzipitat
HR-PEG #11	0,2M KI		20% PEG3350	10/20	10d	schneeflocken- artige Kristalle
HR-PEG #14	0,2M KSCN		20% PEG3350	10/20	10d	schneeflocken- artige Kristalle
HR-PEG #18	0,2M KNO ₃		20% PEG3350	10/20	10d	schneeflocken- artige Kristalle
HR-CSL #22	0,2M NaOAc	0,1M Tris/HCl, pH 8,5	15%PEG4000	20	10d	plättchenförmige Kristalle
HR-CSL #24	0,2M CaCl ₂	0,1M NaOAc, pH 4,6	10% 2-Propanol	20	10d	Minikristalle
--		0,1M MES, pH 6,0	1,6M Mg-Formiat	20	20d	globuläre Kristalle
--			1M Malonat, pH 6,0	20	20d	mikrokristallines Präzipitat

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Kristallisationsbedingungen des ternären Komplexes BMP-2/ActR-IIBecd/BMP-2/ActR-IIBecd im Nanoliter-Screen. Der Komplex wurde in 10mM HEPES, pH 7,4; 50mM NaCl zur Kristallisation eingesetzt. Structure-Screen I (HR-I), PEG Ion Screen (HR-PEG), Matrix-Screen (HR-Nat), Crystal-Screen Light (HR-CSL)

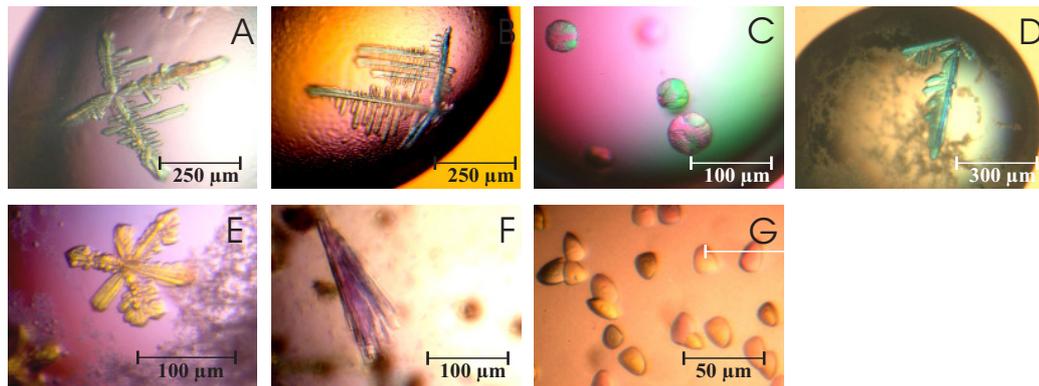


Abbildung 3.31: Kristalle aus Finescreens des BMP-2/BMPRI-IA_{ecd}/ActR-II-Be_{cd} Komplexes. Der Komplex wurde in 10mM HEPES, pH 7,4; 50mM NaCl zur Kristallisation eingesetzt.

A: 0,2M NaCl; 20% PEG3350

B: 0,2M KSCN; 20% PEG3350

C: 0,2M KCl; 0,05M MES, pH 5,6; 0,01M MgSO₄; 10% PEG400

D: 0,2M KCl; 0,05M MES, pH 5,6; 0,01M MgCl₂; 5% PEG8000

E: 0,2M NaOAc; 0,1M Tris/HCl, pH 8,5; 15% PEG4000

F: 0,2M NaCl; 0,1M Tris/HCl, pH 8,5; 25% PEG3350

G: 0,1M ADA, pH 6,5; 1M (NH₄)₂HPO₄

Aus dem Hampton Research Matrix Screen wurden zwei Kristallisationsbedingungen verfeinert. HR-Nat#4 (0,2M KCl; 0,05M MES, pH 5,6; 0,01M MgSO₄; 10% PEG400) wurde im pH Wert zwischen 5,0 und 7,0 und PEG400 Anteil zwischen 10 und 50% variiert. Kugelförmige Kristalle konnten bei 0,2M KCl; 0,05M MES, pH 6,0; 0,01M MgSO₄; 20% PEG400 erhalten werden, die aber keine Beugung der Röntgenstrahlen zeigten. Auch HR-Nat#5 (0,2M KCl; 0,05M MES, pH 5,6; 0,01M MgCl₂; 5% PEG8000) wurde nach diesem Muster verfeinert. Kristallkonglomerate fanden sich bei 0,2M KCl; 0,05M MES, pH 6,0; 0,01M MgCl₂; 15% PEG8000. Auch hier konnte kein Beugungsmuster erhalten werden.

Bedingung HR-CSL#22 (0,2M NaOAc; 0,1M Tris/HCl, pH 8,5; 15% PEG4000) wurde im pH-Bereich zwischen 7,5 und 9,0 und im PEG4000 Anteil zwischen 5 und 30% verändert. Unabhängig vom pH Wert entstanden bei einem 20%igen PEG4000 Anteil sternförmige Kristalle. Fragmente dieser Verwachsungen wurden auf Röntgenbeugung getestet, zeigten aber keine Streuung der Röntgenstrahlen.

3.10 Selenomethionin Markierung

Mit der Methode des molekularen Ersatzes war es nicht möglich, die Struktur des ternären Komplexes aufzuklären. Zum einen bestand aufgrund der ungewöhnlichen Zellkonstanten $a \approx b$, $\beta \approx 90^\circ$ die Annahme von monoklinen oder orthorhombischem Twinning, zum anderen die Möglichkeit der Änderung der Gesamtarchitektur des ternären Komplexes. Durch die MAD-Methode sollten Daten zur Strukturaufklärung unabhängig vom molekularen Ersatz gewonnen werden.

Die Voraussetzung für diese Methode ist der Einbau von Elementen, die unter den Versuchsbedingungen einen anomalen Streueffekt im Proteinkristall liefern. Durch die Substitution von Schwefel mit Selen in der Aminosäure Methionin ist dies möglich. Es muss hier beachtet werden, dass für die erfolgreiche Durchführung der MAD-Methode die Häufigkeit von einem Selenomethionin pro 100-150 Aminosäuren vorausgesetzt wird.

Das BMP-2 Dimer beinhaltet in seiner Zusammensetzung 4 Methionine, im BMPR-IA_{ecd} Monomer sind 8 und im ActR-IIB_{ecd} Monomer ein Methionin zu finden. Für den ternären Komplex wurde eine heterohexamere Zusammensetzung aus einem BMP-2 Dimer, und jeweils zwei BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} Monomeren angenommen. So würden auf die insgesamt 728 Aminosäuren 14 Methionine entfallen.

Von den Röntgenbeugungsdaten des binären Komplexes aus BMP-2 und BMPR-IA_{ecd} ist jedoch bekannt, dass im Rezeptor durch den flexiblen N-Terminus erst ab Aminosäure Thr32 eine geordnete Struktur vorliegt. So entfallen die drei dort lokalisierten Methionine für die MAD-Methode. Im ActR-IIB_{ecd} ist das einzige Methionin in der N-terminalen Verlängerung lokalisiert, von der ebenfalls eine hohe Flexibilität angenommen wurde. Somit stehen insgesamt nur sechs röntgenkristallographisch erfassbare Methionine im nativen Komplex zur Verfügung. Da diese Anzahl für die Anwendung der MAD-Methode zu gering ist, musste durch das Einführen von Mutationen in die Komponenten mit bekannter Struktur, BMP-2 und BMPR-IA_{ecd} der Methionin-Anteil erhöht werden. ActR-IIB_{ecd} als strukturell unbekanntes Komponente im Komplex mit BMP-2 wurde nativ belassen.

Um eine spätere Kombination der Komponenten zu ermöglichen, sollten in BMP-2 zwei und im Typ I Rezeptor drei Aminosäuren durch Methionin substituiert werden. In Tabelle 3.10 ist die Anzahl der Methionine in den wildtypischen und mutierten Proteinen gegenübergestellt.

		WT	Mutein
BMP-2	Dimer	(4) 4	(8) 8
BMPR-IA _{ecd}	Monomer	(4) 1	(7) 4
ActR-IIB _{ecd}	Monomer	(1) 0	--

Tabelle 3.10: Verteilung der Methionine auf die Komponenten des ternären Komplexes. Die Gesamtzahl der Methionine ist in Klammern angegeben. Die Anzahl der röntgenkristallographisch erfassbaren Methionine ist freigestellt.

3.10.1 Selenomethionin Markierung von BMPR-IA_{ecd}

Mutagenese von BMPR-IA_{ecd}

Durch drei Punktmutationen wurde die Anzahl der im Kristall geordneten Methionine im BMPR-IA_{ecd} von einem auf vier erhöht. Es sollten nur Aminosäuren mit ähnlichem Raumvolumen und gleichen chemischen Eigenschaften der Seitenketten gegen Methionin getauscht werden. Durch Modellierung der Muteine im binären Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd} wurde geprüft, ob die Mutationen auch außerhalb des Bindungsepitops lokalisiert sind. Die Methioninsubstitutionen von F35, L73 und L95 erfüllten diese Kriterien und sollten somit keine strukturellen Änderung hervorrufen.

Als Ausgangspunkt für die Klonierung diente das Expressionsplasmid pET32a[Trx-BMPRIA] von BMPR-IA_{ecd} in das die Mutationen eingeführt wurden. Als Produkt lag das Expressionsplasmid pET32a[Trx-BMPR-IA F35M/L73M/L95M] in *E.coli* BL21(DE3) vor und konnte wie das Wildtyp-Protein als Thioredoxin-Fusionsprotein überexprimiert werden. Das Genprodukt ist in Abbildung 3.32 skizziert.

mBMPRIA **F35M L73M L95M**

Thioredoxin-His6-SSGLVPRGSGAMA-

10 20 30 40 50 60 70
QNLD**S**MLHG**T**GMKSDSDQ**K**SENGVTLAP**E**DT**L**PM**L**KCYCSGHCPDDA**I**NN**T**CITNGHCF**A**II**E**EDD**Q**GE
 80 90 100 110 120
TT**M**ASG**C**MYEGSDF**Q**CKD**S**PK**A**Q**M**RR**T**IECCRTNLCN**Q**Y**L**Q**P**TL**P**P**V**V**I**G**P**FF**D**GS**I**R

Abbildung 3.32: Aminosäuresequenz von BMPR-IA_{ecd} F35M/L73M/L95M. Die eingeführten Methionine sind rot hervorgehoben.

Expression und Reinigung von Selenomethionin markierten *BMPR-IA_{ecd}* Spezies

Zur Strukturaufklärung nach der MAD-Methode sollte wildtypischer *BMPR-IA_{ecd}* und die Variante *BMPR-IA_{ecd}F35M/L73M/L95M* mit Selenomethionin markiert werden. Für den Einbau wurde die Expression unter metabolischer Repression gewählt. Die Bakterien wurden in 800ml Ansätzen in Schüttelkolben mit M9-Minimalmedium bis zu 0,3 OD₅₅₀ kultiviert. Eine Stunde nach Zugabe von Selenomethionin und der Aminosäuren zur Inhibition der bakteriellen Methionin Biosynthese wurde mit 1mM IPTG induziert. Nach 16 Stunden Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurden die Zellen geerntet. Die Ausbeuten lagen zwischen 1,8 und 2,3g Bakterien pro Liter Minimalmedium, wobei kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Mutein-exprimierenden Zellen festgestellt werden konnte. Im Vergleich zur Fermentation unter Standardbedingungen fällt die Bakterienausbeute etwa um 50% niedriger aus (vgl. Tabelle 3.11). Die Aufreinigungsstrategie des nativen *BMPR-IA_{ecd}* (s. Abschnitt 3.1.1) wurde auch für die mit Selenomethionin markierten Spezies angewandt. Abbildung 3.33 zeigt die gereinigten Rezeptorspezies und die dazugehörigen analytischen RP-HPLC-Läufe. Hier wird deutlich, dass sowohl der markierte wildtypische Rezeptor als auch das markierte Mutein bis zur Homogenität aufgereinigt werden konnte.

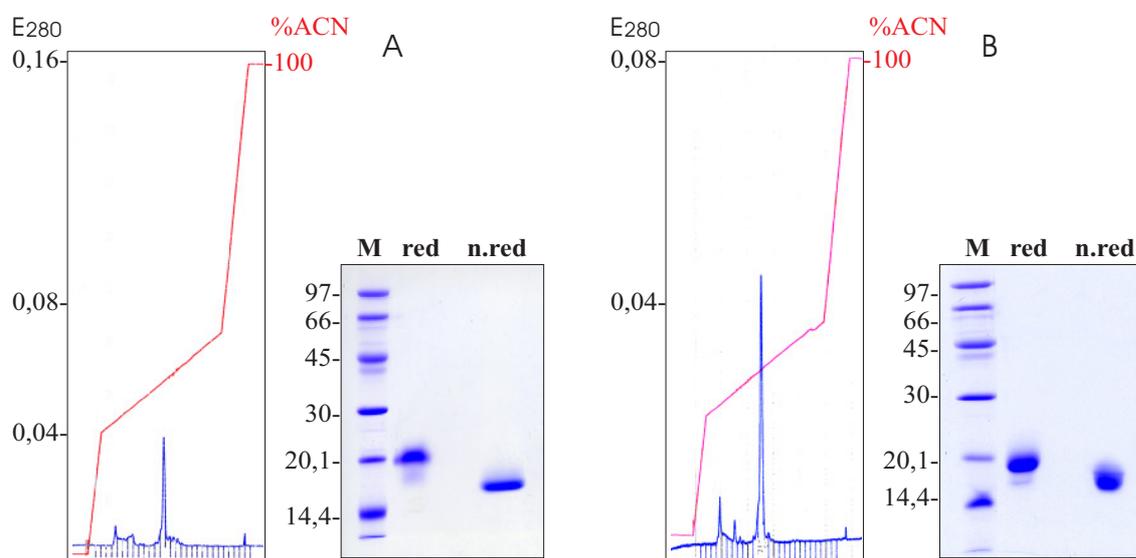


Abbildung 3.33: **A:** SDS-PAGE (red/n. red.) des affinitätsgereinigten SeMetBMPR-IA_{ecd}WT mit korrespondierendem Elutionsprofil der analytischen HPLC. **B:** SDS-PAGE (red./n. red.) des affinitätsgereinigten SeMetBMPR-IA_{ecd}F35M/L73M/L95M mit korrespondierendem Elutionsprofil der analytischen HPLC.

Die Ausbeuten der jeweiligen Schritte sind in Tabelle 3.11 dargestellt. Die Ausbeuten nach der Affinitätschromatographie des selenmarkierten wildtypischen Rezeptors liegen im Bereich des nativen Proteins. Die Ausbeuten des selenmarkierten Muteins lagen hier im Vergleich bei 50%.

Spezies	Fermentation	Ni-Chelat Metall-Affinitäts- Chromatographie	TMAE Anionenaustausch- Chromatographie	BMP-2 Affinitäts- Chromatographie
SeMetBMPR-IA _{eccd} F35M/L73M/L95M	2,2g Bakterien/l Minimalmedium	55mg Fusionsprotein/g Bakterien	7,9mg Monomer/g Bakterien	0,67mg/g Bakterien
SeMetBMPR-IA _{eccd} Wildtyp	1,8-2,3g Bakterien/l Minimalmedium	38-40mg Fusionsprotein/g Bakterien	7,7-7,9mg Monomer/g Bakterien	0,27-0,34mg/g Bakterien
nativer BMPR-IA _{eccd}	3,3-4,0g Bakterien/l TB- Kulturmedium	35-45mg Fusionsprotein/g Bakterien	2,2-2,5mg Monomer/g Bakterien	0,6-0,9mg/g Bakterien

Tabelle 3.11: Ausbeuten der Präparationsschritte von selenomethioninmarkiertem BMPR-IA_{eccd} im Vergleich zu nativen Protein.

Massenspektrometrische Analyse von SeMetBMPR-IA_{eccd}WT und SeMetBMPR-IA_{eccd}F35M/L73M/L95M

Durch die massenspektrometrische Analyse konnte das Molekulargewicht der selenmarkierten BMPR-IA_{eccd} Spezies bestätigt werden. Für den Hauptpeak von SeMetBMPR-IA_{eccd} WT wurde ein Molekulargewicht von 14838,702Da ermittelt, das mit dem theoretischen Wert von 14838,448Da übereinstimmt. Das theoretische Molekulargewicht des selenmarkierten Muteins SeMetBMPR-IA_{eccd}F35M/L73M/L95M von 14999,169Da konnte analytisch mit dem Wert 14999,730Da bestätigt werden.

Die Rohdaten in den Abbildungen 3.34 und 3.35 geben unterschiedliche Einbauraten und Oxidationsstufen des Selens wieder. Das Hauptsignal von SeMetBMPR-IA_{eccd}WT zeigt den erwarteten Einbau von 4 Selenatomen, die nur zu einem geringen Anteil in oxidiert Form vorliegen. Allerdings sind hier auch Spezies mit 2 oder 3 Selenatomen pro Rezeptormolekül detektierbar.

Im Mutein SeMetBMPR-IA_{eccd}F35M/L73M/L95M gibt das Hauptsignal den Einbau von 7 Selenatomen wieder, die zum Teil sehr stark oxidiert vorliegen. Ein geringer Anteil an Protein zeigt eine unvollständige Markierung mit 5 oder 6 Selenatomen.

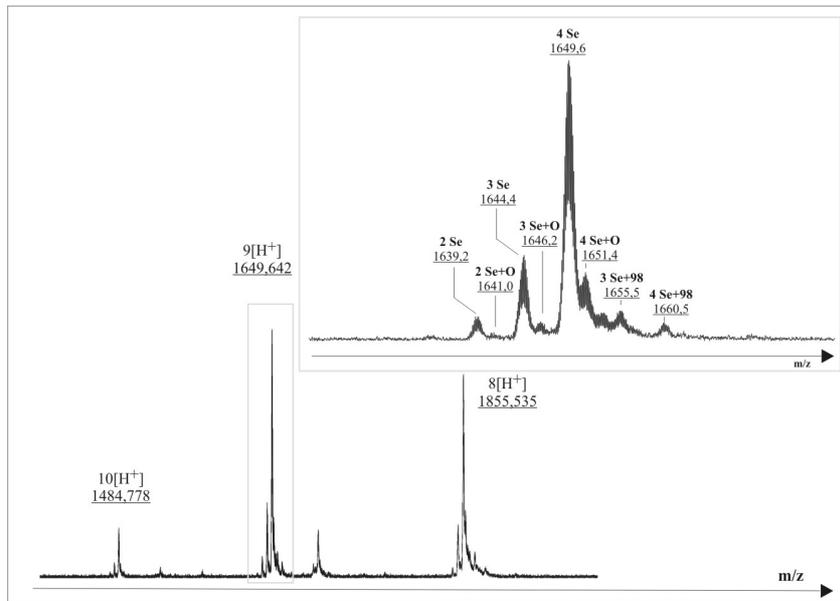


Abbildung 3.34: Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von SeMetBMPR-IA_{ecc} WT. Die Anzahl der inkorporierten Selenatome ist mit xSe, die Oxidation ist mit xO bezeichnet. Die 9-fach protonierten Spezies sind vergrößert dargestellt.

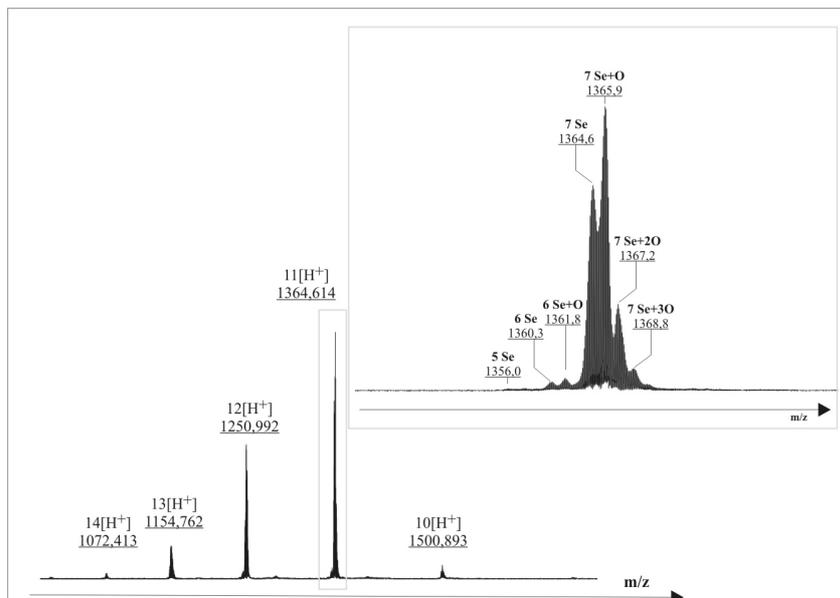


Abbildung 3.35: Massenspektrometrische Analyse von SeMetBMPR-IA_{ecc} F35M/L73M/L95M. Die Anzahl der inkorporierten Selenatome ist mit xSe, die Oxidation ist mit xO bezeichnet. Die 11-fach protonierten Spezies sind vergrößert dargestellt.

3.10.2 Selenomethionin Markierung von BMP-2

Mutagenese von BMP-2

Im BMP-2 Dimer sollte durch zwei Aminosäuresubstitutionen die Anzahl an Methioninen von 4 auf 8 erhöht werden. Auch hier sollten nur Aminosäuren mit ähnlichem Raumvolumen und gleichen chemischen Eigenschaften der Seitenketten gegen Methionin getauscht werden. Die Mutationen F41M und Y91M erfüllen diese Kriterien. Im Modell

eines ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA_{ecd} und ActR-II_{ecd} wurde geprüft, ob die Mutationen auch außerhalb der Bindungsepitope lokalisiert sind. Hier konnte kein direkter Einfluss auf die Typ I und die mutmaßliche Typ II Rezeptorbindungsstelle (Kirsch et al. 2000; Kirsch et al. 2000; Greenwald et al. 2003) festgestellt werden.

Als Ausgangspunkt der Klonierung diente der Vektor pQKA[BMP2], in welchen durch zyklische Mutagenese die Mutationen eingeführt wurden. Das resultierende Expressionsplasmid pQKA[BMP2F41MY91M] wurde in *E.coli* MM294 transformiert. Durch Sequenzierung des Plasmids wurden die Mutationen bestätigt. Das Genprodukt ist in Abbildung 3.36 skizziert.

hBMP2 F41M Y91M

```

      10      20      30      40      50      60      70
QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGVNDWIVAPPGYHAMYCHGECFPFLADHLNSTNHAIVQTLVNSV
      80      90     100     110
NSKIPKACCVPTELSAISMLMLDENEKVVVLKNYQDMVVEGCGCR

```

Abbildung 3.36: Aminosäuresequenz von BMP-2 F41M/Y91M. Die eingeführten Methionine sind rot gekennzeichnet

Expression und Reinigung von Selenomethionin-markiertem BMP-2 Spezies

Zur Strukturaufklärung mit der MAD-Methode sollten sowohl wildtypisches BMP-2 als auch BMP-2 F41M/Y91M mit Selenomethionin markiert werden. Auch hier wurde das Verfahren der Expression unter metabolischer Repression gewählt. Die Bakterien wurden in Schüttelkolben mit 800ml M9-Minimalmedium bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 angezogen. Nach Zugabe von Selenomethionin und der den Methionin Metabolismus inhibierenden Aminosäuren wurde bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 inkubiert, dann mit 1mM IPTG induziert. Nach 3,5 Stunden wurden die Bakterien geerntet. Die Ausbeuten lagen vom Expressionsprodukt unabhängig zwischen 4,4 und 4,7 g/l Minimalmedium. Verglichen mit der Fermentation unter TB-Vollmedium wurden hier 30% weniger Zellen erhalten.

Die Reinigung der selenmarkierten BMP-2 Spezies wurde nach der Publikation von R. Ruppert (Ruppert et al. 1996) durchgeführt. Die analytischen HPLC-Läufe und die SDS-PAGEs in Abbildung 3.37 zeigen, dass die SeMetBMP-2 Spezies bis zur Homogenität aufgereinigt werden konnten. Die Ausbeuten der einzelnen Schritte sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Hier sind nur marginale Unterschiede zwischen SeMetBMP-2WT und SeMetBMP-2 F41M/Y91M zu erkennen. Im Vergleich zum nativen Protein wurde für die

selenmarkierten BMP-2 Spezies eine 50% geringere Ausbeute im Bezug auf das Feuchtgewicht des Bakterienpellets erreicht.

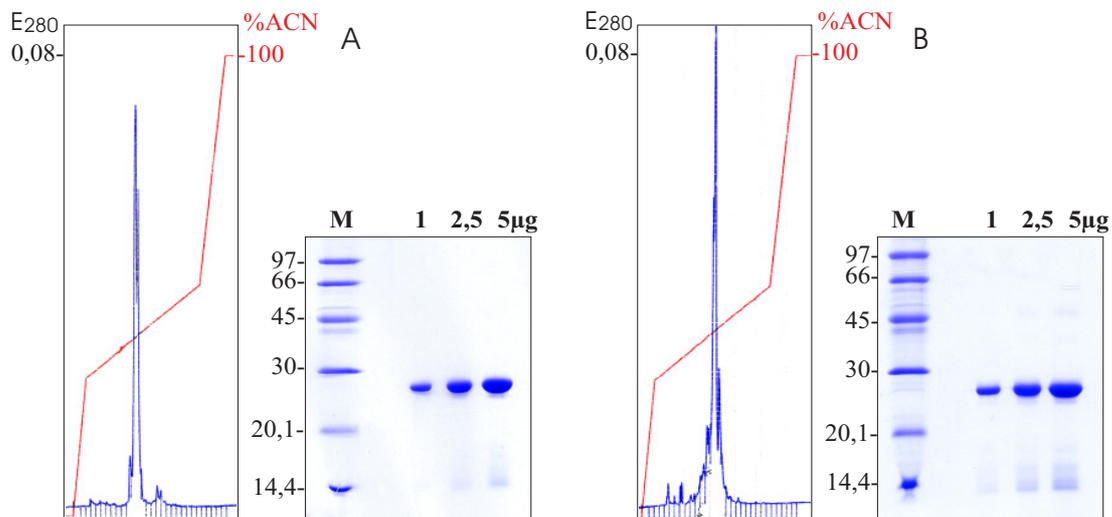


Abbildung 3.37: A: SDS-PAGE (n. red.) des affinitätsgereinigten SeMetBMP-2WT mit korrespondierendem Elutionsprofil der analytischen HPLC. B: SDS-PAGE (n. red.) des affinitätsgereinigten SeMetBMP-2 F41M/Y91M mit korrespondierendem Elutionsprofil der analytischen HPLC.

Spezies	Fermentation [g Bakterien/l]	Inclusion- bodies [g/g Bakterien]	S300 Gelfiltration [Abs _{280nm} /g Bakterien]	EMD (SO ₃) ⁻ Chromatographie [Abs _{280nm} /g Bakterien]	Final [mg/g Bakterien]
SeMetBMP-2 Wildtyp	4,7 (Minimal- medium)	0,3	20,0	3,1	1,6
SeMetBMP-2 F41M/Y91M	4,4 (Minimal- medium)	0,3	23,6	3,2	1,8
BMP-2 nativ	6,4 (Voll- medium)	0,2	23,0	5,9	3,2

Tabelle 3.12: Ausbeuten der Präparationsschritte von Selenomethionin-markiertem BMP-2 im Vergleich zu nativem BMP-2WT.

Massenspektrometrische Analyse von SeMetBMP-2WT und SeMetBMP-2F41M/Y91M

Das theoretische Molekulargewicht von SeMetBMP-2WT wurde mit 26125,47Da berechnet. Dies stimmt sehr gut mit dem experimentell ermittelten Molekulargewicht von 26122,96Da im Hauptsignal überein. Die Rohdaten in Abbildung 3.38 zeigen allerdings einen stark heterogenen Einbau von Selen. Der größte Anteil des Proteins ist mit den zu erwartenden 4 Selenatomen markiert. Ein geringer Teil zeigt eine niedrigere Einbaurrate mit 2 oder 3 Selenatomen. Die Inkorporation von 5, 6 und 7 Selenatomen pro Molekül lässt auf den Umbau von Selenomethionin zu Selenocystein schließen.

Für vollständig markiertes SeMetBMP-2 F41M/Y91M kann ein theoretisches Molekulargewicht von 26217,149Da errechnet werden. Dieser Wert korreliert sehr gut mit dem experimentell bestimmten Molekulargewicht von 26229,281Da im korrespondierenden Signal. Wie in den Rohdaten in Abbildung 3.39 zu entnehmen, ist aber nur ein geringer Teil des Proteins mit den zu erwartenden 8 Selenatomen markiert. Der Großteil zeigt einen teilweisen Einbau zwischen 0 und 7 Selenatomen. Auch auf den Umbau von Selenomethionin zu Selenocystein kann aus der Inkorporation von 9 und mehr Selenatomen geschlossen werden.

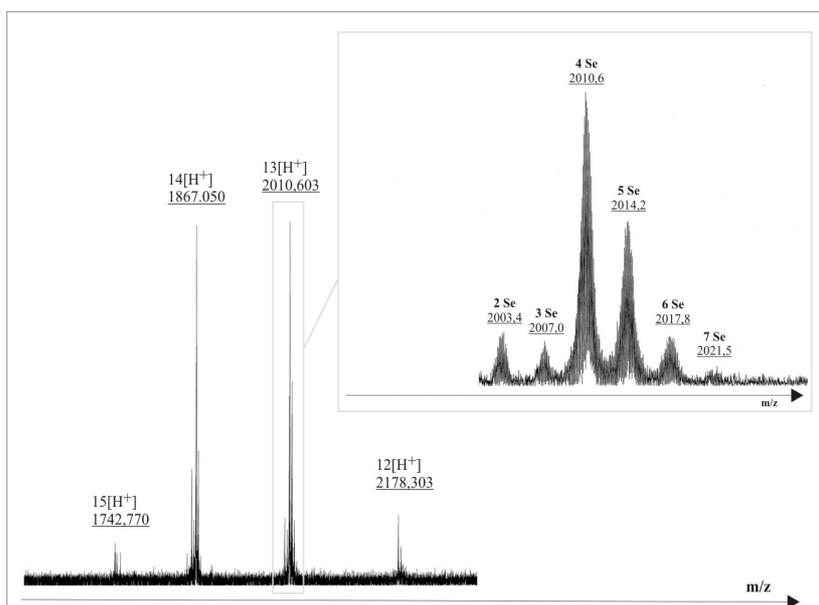


Abbildung 3.38: Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von SeMetBMP-2WT. Die Anzahl der inkorporierten Selenatome ist mit xSe bezeichnet. Die 13-fach protonierten Spezies sind vergrößert dargestellt.

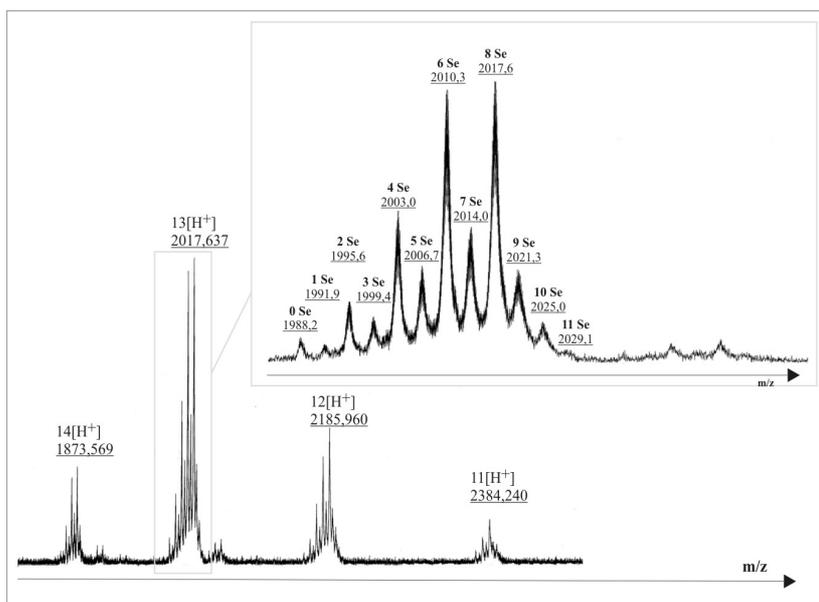


Abbildung 3.39: Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von SeMetBMP-2 F41M/Y91M. Die Anzahl der inkorporierten Selenatome ist mit xSe bezeichnet. Die 13-fach protonierten Spezies sind vergrößert dargestellt.

Expression von Selenomethionin-markiertem BMP-2 im methionin-auxotrophen Bakterienstamm E.coli B834(DE3)

Die Expression unter metabolischer Repression der bakteriellen Methionin-Biosynthese führte insbesondere bei BMP-2 F41M/Y91M zu einem heterogenen Einbau von Selenomethionin. Auch die Bildung von Selenocystein war hier verstärkt beobachtbar. Eine erneute Fermentation mit frischem Selenomethionin und der Zugabe von Cystein hatte keine Auswirkung auf die Homogenität des Einbaus. Die massenspektrometrische Analyse der Selenomethionin-markierten BMPR-IA_{eccd} Spezies zeigte zwar auch einen leicht heterogenen Seleneinbau, aber gerade im Liganden trat dieser verstärkt auf. Der Hauptunterschied der Überexpression und Aufreinigung der Protein-Spezies lag im Expressionsstamm. SeMetBMPR-IA_{eccd} wurde in *E.coli* BL21(DE3), SeMetBMP-2 in *E.coli* MM294 exprimiert. Durch die Expression des Liganden im methionin-auxotrophen Stamm *E.coli* B834(DE3) sollte homogen markiertes BMP-2 gewonnen werden.

Die Bakterien wurden in M9-Minimalmedium mit 50mg/l Methionin bis 0,7 OD₅₅₀ inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in frischem M9-Medium ohne Methionin resuspendiert und bis zum Stillstand des Wachstums inkubiert. 30 Minuten nach Zugabe von 50mg/l Selenomethionin wurde mit 1mM IPTG induziert. Nach weiteren 5 Stunden konnten die Bakterien geerntet werden, wobei eine Ausbeute von 3,1g Zellpellet pro Liter Minimalmedium erreicht wurde. Pro Gramm Bakterien konnten 0,27g bakterielle Einschlusskörper isoliert werden. Die Ausbeute an Protein nach der Gelfiltration an der S300-Säule lag bei 20 Abs_{280nm}/g Bakterienpellet. Die Proteinlösung wurde in den Renaturierungsansatz gegeben. Aus dem Vergleich der Renaturierungslösung von SeMetBMP-2 aus *E.coli* B834(DE3) mit einem Renaturierungsansatz des nativen Liganden aus *E.coli* MM294 (s. Abb. 3.40) geht deutlich hervor, dass im methionin-auxotrophen System durch den Standard-Renaturierungsansatz kein funktionelles Protein gewonnen werden konnte. Da auch in einer weiteren Fermentation kein dimeres BMP-2 isoliert werden konnte, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

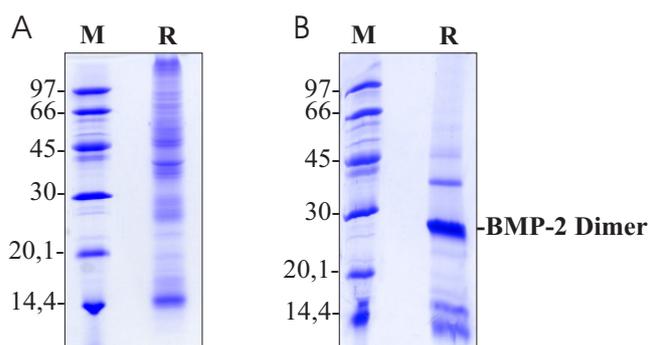


Abbildung 3.40: Überprüfung der Renaturierung von BMP-2. **A:** SDS-PAGE (n. red.) des Renaturierungsansatzes von SeMetBMP-2 aus *E.coli* B834(DE3). **B:** SDS-PAGE (n. red.) des nativen BMP-2 Renaturierungsansatzes aus *E.coli* MM294.

3.11 Präparation und Kristallisation von Selenomethionin-markiertem Komplex

Tabelle 3.13 soll die Kombinationen der selenmarkierten Komponenten zur Bildung des ternären Komplexes verdeutlichen. Für die MAD-Methode stehen demnach drei Kombinationen mit der erforderlichen Anzahl von mindestens 8 Selenomethioninen zur Verfügung:

- 1) SeMetBMP-2WT//SeMetBMPR-IA_{ecd}F35M/L73M/L95M//ActR-IIB_{ecd}
- 2) SeMetBMP-2 F41M/Y91M//SeMetBMPR-IA_{ecd}WT//ActR-IIB_{ecd}
- 3) SeMetBMP-2 F41M/Y91M//SeMetBMPR-IA_{ecd}F35M/L73M/L95M//ActR-IIB_{ecd}

	SeMetBMPR-IA _{ecd} WT	SeMetBMPR-IA _{ecd} F35M/L73M/L95M
SeMetBMP-2 WT	6	12
SeMetBMP-2 F41M/Y91M	10	16

Tabelle 3.13: Anzahl der Methionine durch die Kombination der selenomethioninmarkierten Komponenten zur Präparation des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA_{ecd}, ActR-IIB_{ecd}.

Komplexpräparation mit selenmarkierten Komponenten

Die Komplexpräparation wurde wie unter 3.3.2 beschrieben im präparativen Maßstab durchgeführt. Jeweils 34nmol der in doppeltkonzentriertem HBS₇₀₀-Puffer vorliegenden Rezeptoren wurden mit 16nmol des in Wasser gelösten Liganden gemischt. Nach Konzentrierung wurde der ternäre Komplex mittels Gelfiltration von ungebundenen Rezeptoren abgetrennt. Die Ausbeuten der jeweiligen Komplexpräparationen sind in Tabelle 3.14 dargestellt.

	SeMetBMP-2 WT SeMetBMPR-IA _{ecd} F35M/L73M/L95M ActR-IIB _{ecd}	SeMetBMP-2 F41M/Y91M SeMetBMPR-IA _{ecd} WT ActR-IIB _{ecd}	SeMetBMP-2 F41M/Y91M SeMetBMPR- IA _{ecd} F35M/L73M/L95M ActR-IIB _{ecd}
Aus- beute	47-63%	30-38%	39%

Tabelle 3.14: Ausbeuten der Komplexpräparationen des ternären Komplexes mit selenmarkierten Komponenten

Die Ausbeuten zwischen 47% und 63% des ternären Komplexes aus SeMetBMP-2WT, der SeMetBMPR-IA_{ecd} Dreifachmutante und ActR-IIB_{ecd} ist vergleichbar mit der Präparation

aus nativen Komponenten. Bei Komplexpräparationen unter Verwendung der selenmarkierten BMP-2 Doppelmutante konnten lediglich Ausbeuten zwischen 30%-40% erzielt werden. Als Ursache könnte eine geringere Affinität der Mutante zu den Rezeptoren oder das Vorhandensein von falsch zurückgefaltetem Liganden sein. Gründe dafür könnten die heterogene Markierung und/oder das Vorhandensein von Selenocystein darstellen.

Kristallisation der selenmarkierten Komplexe

Optimale Kristallisationsbedingungen für den nativen ternären Komplex konnten in Bedingungen aus 0,1M Bis-Tris im pH Bereich von 5,5 bis 6,25 und eines PPG400 Anteils zwischen 35% und 55% ermittelt werden. Diese „Finescreens“ sollten auch zur Kristallbildung des Selenomethionin-markierten Komplexes führen. Im Falle des ternären Komplexes aus SeMetBMP-2WT, der SeMetBMPR-IA_{ecd} F35M/L73M/L95M und ActR-IIB_{ecd} konnte die Kristallisation unter diesen Bedingungen reproduziert werden. Nach 10 Tagen konnten Kristalle erhalten werden, die in Größe und Morphologie mit den Kristallen des nativen Komplexes übereinstimmen (s. Abb. 3.41).

Die Komplexe SeMetBMP-2 F41M/Y91M/ SeMetBMPR-IA_{ecd}WT/ ActR-IIB_{ecd} und SeMetBMP-2 F41M/Y91M/ SeMetBMPR-IA_{ecd}F35M/L73M/L95M/ ActR-IIB_{ecd} zeigten kein Kristallwachstum unter diesen Bedingungen. Die Kristallisationsansätze waren auch nach 30 Tagen noch klar. Auch durch Variation der Proteinkonzentration und des Protein/Präzipitantverhältnisses konnte keine Kristallbildung herbeigeführt werden. Das Ausbleiben der Kristallisation unter Verwendung der Komponente SeMetBMP-2 F41MY91M kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen können Mutationen den Verlust von Kristall-Kristall-Kontakten hervorrufen, zum anderen könnten die heterogene Markierung mit Selenomethionin und die Bildung von Selenocystein ein Hemmnis der Kristallisation darstellen. Zur Klärung dieser Ansatzpunkte müsste unmarkiertes BMP-2 F41MY91M mit den Rezeptoren komplexiert und in die Kristallisation eingesetzt werden.

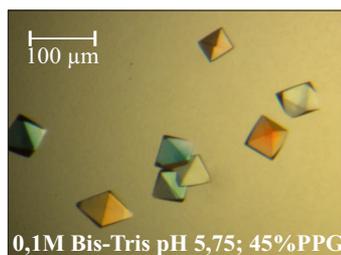


Abbildung 3.41: Kristalle des ternären Komplex aus SeMetBMP-2WT, SeMetBMPR-IA_{ecd} F35M/L73M/L95M und ActR-IIB_{ecd}.

3.12 Strukturlösung durch die MAD-Methode

Der MAD-Datensatz des Komplexes aus SeMetBMP-2WT, SeMetBMPR-IA_{ecd} F35M/L73M/L95M und ActR-IIB_{ecd} wurde am Strahlrohr BL14.1 der Proteinstrukturfabrik am BESSY (PSF, BESSY, Berlin) aufgenommen. Durch die Messung eines Fluoreszenzspektrums wurde die K-Absorptionskante des Selen im Proteinkristall bestimmt (Abb. 3.42). Der Datensatz wurde dann bei drei verschiedenen Wellenlängen („inflection“, „peak“, „remote“) von einem Einzelkristall aus der Bedingung 45% Polypropylenglycol₄₀₀ und 0,1M Bis-Tris pH 5,75 unter Tieftemperaturbedingungen bei 100K aufgezeichnet.

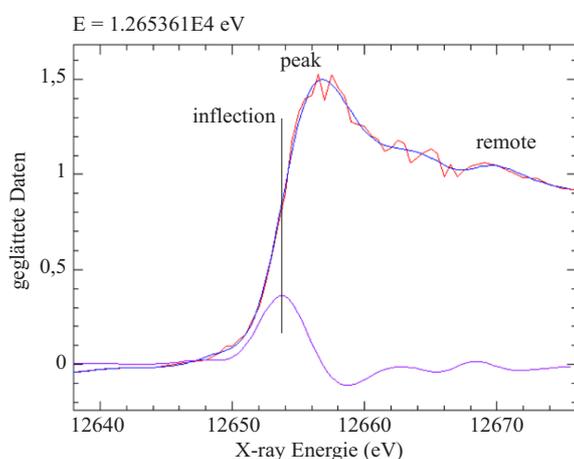


Abb 3.42.: Wellenlängenscan zur Bestimmung der K-Absorptionskante des Selen in einem Kristall aus SeMetBMP-2WT, SeMetBMPR-IA_{ecd} F35M/L73M/L95M und ActR-IIB_{ecd}

Der Kristall wurde dabei um 360° gedreht, wobei Beugungsbilder in 1° Schritten mit einer Belichtungsdauer von je 30s gemessen wurden. Die maximale Auflösung der Datensätze lag bei 2,7Å. Die Prozessierung und Integration der Daten erfolgte mit dem Programm MOSFLM in der Version 6.2.1 (Leslie 1992). Mit dem Programm SCALA CCP4 in der Version 4.2.1 (Project 1994) wurden die Datensätze der drei Wellenlängen zusammengefasst und skaliert. Die Statistik zur Datensammlung und Prozessierung dieser Messung sind in Tabelle 3.15 dargestellt.

Die Raumgruppe wurde zu P2₁2₁2₁ bestimmt. Die Zellkonstanten der Kristalle des selenmarkierten Komplexes betragen a = 64.36Å, b = 65.68Å, c = 113.97Å mit den Winkeln $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

Mit dem Programm SHELX C/D wurden die Positionen von 10 Selenatomen gefunden, von diesen konnten 7 mit dem Programm SOLVE (Version 2.06) verfeinert werden.

Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		
Elementarzelle	a = 64,36Å, b = 65,68Å, c = 113,97Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$		
	Se-Met (λ_1)	Se-Met (λ_2)	Se-Met (λ_3)
Wellenlänge	0,9799 Å	0,9796 Å	0,9079 Å
Auflösung	30,0 – 2,75 Å (2,90 – 2,75 Å)	30,0 – 2,75 Å (2,90 – 2,75 Å)	30,0 – 2,75 Å (2,90 – 2,75 Å)
Anzahl der aufgezeichneten Reflexe	λ_1 (inflection) 183773 (26598)	λ_2 (peak) 185933 (26610)	λ_3 (remote high) 188670 (27520)
Anzahl der einzigartigen Reflexe	13130 (1874)	13134 (1872)	13137 (1879)
Vollständigkeit	99,9 (99,9)	99,9 (99,9)	99,9 (99,9)
Multiplizität	14,0 (14,2)	14,2 (14,2)	14,4 (14,9)
R _{sym} aller Reflexe ^b	6,1 (16,6) %	7,1 (18,7) %	6,7 (17,4) %
<Intensität/ σ >	38,3 (14,8)	33,6 (13,2)	35,7 (14,8)
Phasierung			
R _{cullis} (a/c)	0,469/0,401	0,586/0,590	-
R _{kraut}	0,025	0,022	0,039
Phasing Power (a/c)	3,07/3,30	2,26/2,31	1,50/1,72
Gütefaktor	0,75		
() zeigt die Werte der höchsten Auflösungsschale			

Tabelle 3.15: Statistische Werte zur Datensammlung und Prozessierung für den ternären Komplex aus SeMetBMP-2WT, SeMetBMPr-IA_{eccd} F35M/L73M/L95M und ActR-IIB_{eccd}

Mit den Softwarepaketen RESOLVE und ARP/WARP wurde die Elektronendichte automatisiert interpretiert und ein erstes Modell erstellt. Auf dieses wurden die Strukturen von monomerem BMP-2 (PDB Eintrag 1REW), BMPr-IA_{eccd} (PDB Eintrag 1REW) und ActR-IIB_{eccd} (PDB Eintrag 1NYS) überlagert.

Das Modell, dem der MAD Datensatz zugrunde liegt, wurde anschließend bis zu einem kristallographischen R-Wert von 0,27 (R_{free} 0,30) verfeinert. Die weitere Verfeinerung und die endgültige Strukturlösung wurden, wie in Kapitel. 3.13 dargestellt, mit einem hochaufgelösten Datensatz des nativen Komplexes aus BMP-2/BMPr-IA_{eccd} und ActR-IIB_{eccd} durchgeführt.

3.13 Hochauflösender Datensatz und Verfeinerung der Struktur

Mit der MAD-Methode wurde wie unter 3.11 beschrieben ein Datensatz mit einer Auflösung bis zu 2,7Å erhalten, mit dem ein erstes Modell der Struktur des ternären Komplexes erstellt werden konnte.

Zur finalen Strukturlösung wurde jedoch ein hochaufgelöster nativer Datensatz des ternären Komplexes eingesetzt, der an der Rigaku Drehanodeneinrichtung gemessen wurde. Ein Einzelkristall aus der Bedingung 40% Polypropylenglycol₄₀₀ und 0,1M Bis-Tris pH 6,0 wurde hier bei 100K vermessen. Mit einer Belichtungszeit von 750s pro 0,5° konnten Beugungsdaten bis zu einer Auflösung von 1,75Å erhalten werden. Durch die Drehung des Kristalls um 85° wurde ein kompletter Datensatz aufgezeichnet, der anschließend mit dem Programm Crystal Clear (Rigaku Inc.) prozessiert wurde. Die Prozessierungsdaten sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst.

Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Elementarzelle	a = 64,13 Å, b = 65,37 Å, c = 114,07 Å α = β = γ = 90°
Auflösung	20,0 – 1,81Å (1,89 – 1,81Å)
Wellenlänge	1,5478 Å
Anzahl der aufgezeichneten Reflexe	134179 (11577)
Anzahl der einzigartigen Reflexe	43615 (4532)
Vollständigkeit	98,6 (93,7) %
Multiplizität	2,9 (2,6)
R _{sym} aller Reflexe	5,5 (38,9) %
<Intensität/σ>	9,6 (2,5)
() zeigt die Werte der höchsten Auflösungsschale	

Tabelle 3.16: Statistik der Prozessierung des hochauflösenden Datensatzes des nativen ternären Komplexes BMP-2/ActR-IIB_{ecd}/BMPR-IA_{ecd}

Die endgültige Strukturlösung des ternären Komplexes erfolgte durch die Methode des molekularen Ersatzes. Dazu wurde mit dem Modell des selenmarkierten Komplexes unter Verwendung des Programms CNS eine Rotations- und Translationsuche im hochaufgelösten Datensatz des nativen Komplexes durchgeführt. Mit dem Programmpaket REFMAC5 konnte die Struktur bis zu einer Auflösung von 1,85Å weiter verfeinert werden. Das finale Modell zeigte einen R-Wert von 0,216 und einen R_{free}-Wert von 0,225.

Die Statistik für die Verfeinerung und die geometrischen Parameter sind in Tabelle 3.17 wiedergegeben. Die hohe Qualität der $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte dem die Daten des hochaufgelösten Datensatzes zugrunde liegen, wird im Vergleich mit der Elektronendichtekarte die aus den experimentellen Phasen des MAD Datensatzes gewonnen wurde deutlich (Abb 3.43).

Im unteren Bereich von Tabelle 3.17 ist das Ergebnis der Phi/Psi Torsionswinkel Analyse aufgelistet. So befinden sich mehr als 86% der Aminosäurereste in favorisierten Regionen.

Auflösung	20 – 1,85 Å (1,92 – 1,85 Å)
R_{cryst}	21,6 (36,7) %
R_{free} (Test set 5%)	22,5 (41,3) %
Bindungslänge	0,013 Å
Bindungswinkel	1,572°
Impropers	1,084°
mittlerer B-Wert	38,7 Å ²
Koordinatenfehler (cross-validated sigma)	0,37 Å
Lösungsmittelgehalt	52,8%
Phi/Psi Torsionswinkel Analyse	
Reste in der am meisten favorisierten Region	86,1% (290)
Reste in zusätzlich erlaubter Region	12,5% (42)
Reste in generell erlaubter Region	1,5% (5)
Reste in nicht erlaubter Region	0% (0)
() zeigt die Werte der höchsten Auflösungsschale	

Tabelle 3.17: Statistik der Verfeinerung der Struktur des nativen ternären Komplexes BMP-2/ActR-IIB_{ecd}/BMP-2/ActR-IIB_{ecd}

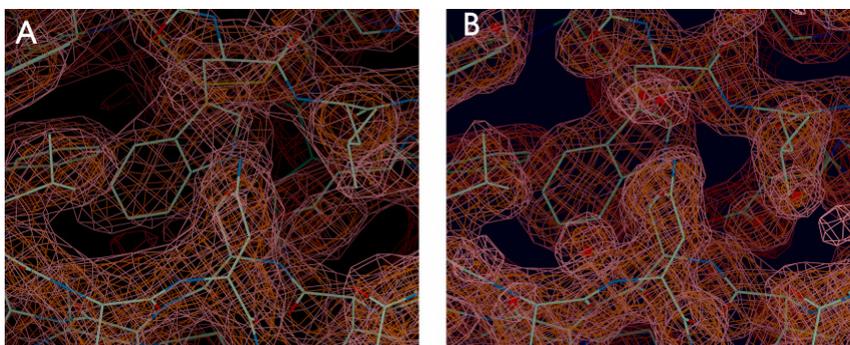


Abbildung 3.43: **A:** $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte der experimentellen Phasen der MAD Daten. Die Region der ActR-IIB_{ecd}/BMP-2 Bindungsfläche mit Trp60 im Zentrum. **B:** Dieselbe Region wie in A, aus dem hochauflösenden nativen Datensatz (max. Auflösung: 1,8 Å)

3.14 Beschreibung der Struktur des Komplexes aus BMP-2/BMPR-IA/ActR-IIB

3.14.1 Allgemeine Beschreibung des ternären Komplexes

In der Elektronendichtekarte $2F_{\text{obs}}-T_{\text{calc}}$ konnten die Komponenten des ternären Komplexes eindeutig identifiziert werden. Abbildung 3.44 zeigt die asymmetrische und zugleich biologische Einheit des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_ecd/ActR-IIB_ecd in der Draufsicht und der Seitenansicht.

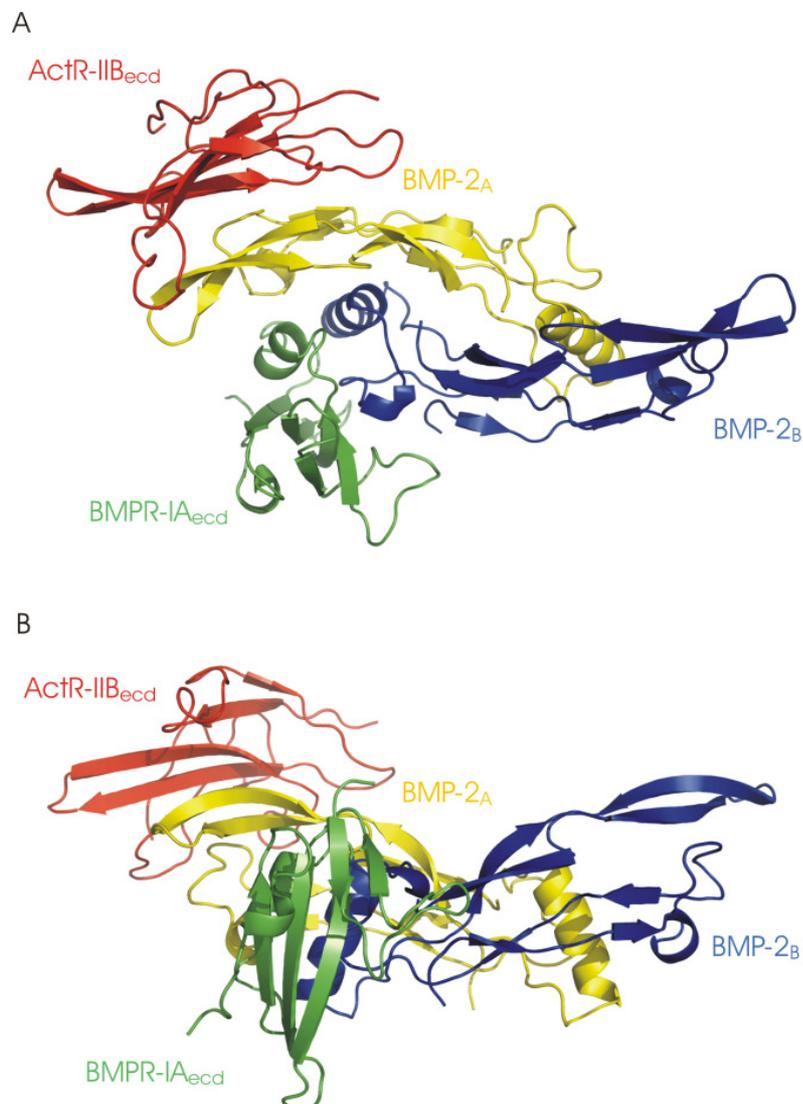


Abbildung 3.44: Kristallstruktur des ternären Komplexes aus BMP-2 (gelb/blau), BMPR-IA_ecd (grün) und ActR-IIB_ecd (rot). Bänderdarstellung in der Draufsicht (A) und der Seitenansicht mit der zur Membran zeigenden Seite nach unten (B).

Wie aus der Struktur des binären Komplexes zu erwarten (Kirsch et al. 2000; Keller et al. 2004), ist der Typ I Rezeptor BMPR-IA_{ecd} im „wrist“-Epitop von BMP-2 lokalisiert. Der Typ II Rezeptor ActR-IIB_{ecd} befindet sich auf dem durch Mutationsanalysen (Kirsch et al. 2000) charakterisierten „knuckle“-Epitop von BMP-2. Der Ort der Bindung korreliert nahezu perfekt mit dem Bindungsepitop von ActR-IIB_{ecd} an ActA (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004). Der Vergleich mit der Typ II Ligand-Rezeptor Interaktion in der Struktur des binären Komplexes BMP-7/ActR-II_{ecd} (Greenwald et al. 2003) zeigt, dass die Bindungsstelle von ActR-II_{ecd} um etwa 2Å in Richtung der Fingerspitzen verschoben ist. Dieser Befund könnte möglicherweise einen Hinweis auf den Mechanismus für die Erkennung der verschiedenen Typ II Rezeptoren geben.

Die Struktur von BMPR-IA_{ecd} beginnt beim Aminosäurerest Pro34 und endet bei Pro117. Die fehlenden 33 N-terminalen und 12 C-terminalen Reste waren auch im binären Komplex (Kirsch et al. 2000) aufgrund fehlender interpretierbarer Elektronendichte nicht sichtbar, was auf eine hohe Flexibilität dieses vor der Transmembrandomäne lokalisierten Peptids deutet. Im ActR-IIB_{ecd} war für Ala6 bis Leu98 eine klare Elektronendichte erkennbar, der 18 Aminosäuren umfassende C-terminale Teil konnte nicht erfasst werden. Auch hier kann von einer hohen Flexibilität ausgegangen werden, da diese Reste unmittelbar vor der Transmembrandomäne liegen. Im BMP-2 waren, übereinstimmend mit dem binären Komplex (Kirsch et al. 2000), 10 bzw. 11 Aminosäuren im N-Terminus nicht sichtbar.

Unerwarteterweise hat sich die Stöchiometrie der Komponenten des ternären Komplexes verändert. So ist im Kristall nur eine „Seite“ des BMP-2 Dimers von jeweils einem Typ I und einem Typ II Rezeptor besetzt. An die andere Seite des Liganden sind keine Rezeptoren gebunden. Sowohl die biochemische Charakterisierung des präparierten Komplexes mittels SDS-PAGE und RP-HPLC (s. Abschnitt 3.5) als auch die isothermale Mikrokalorimetrie (s. Abschnitt 3.5) zeigen die Existenz eines heterohexameren Komplexes aus einem BMP-2 Dimer und jeweils zwei Ektodomänen von BMPR-IA und ActR-IIB in Lösung. Auch in den Kristallstrukturen der binären Komplexe BMP-2/BMPR-IA_{ecd} (Kirsch et al. 2000), und BMP-7/ActR-II (Greenwald et al. 2003) sind jeweils zwei Rezeptorketten symmetrisch an den Liganden gebunden. Diese Indizien zeigen, dass das Fehlen der beiden Rezeptorketten auf einer Seite von BMP-2 nur auf Packungskräfte im Kristall zurückgeführt werden kann. Tatsächlich ist im Kristall für die fehlenden Rezeptoren kein Platz, da deren Bindungsstellen von symmetrieverwandten BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} Molekülen aus anderen asymmetrischen Einheiten blockiert werden. So

kann der in Lösung vorliegende ternäre Ligand-Rezeptor Komplex mit einem heterohexameren Arrangement beschrieben werden, wie in Abbildung 3.45 dargestellt.

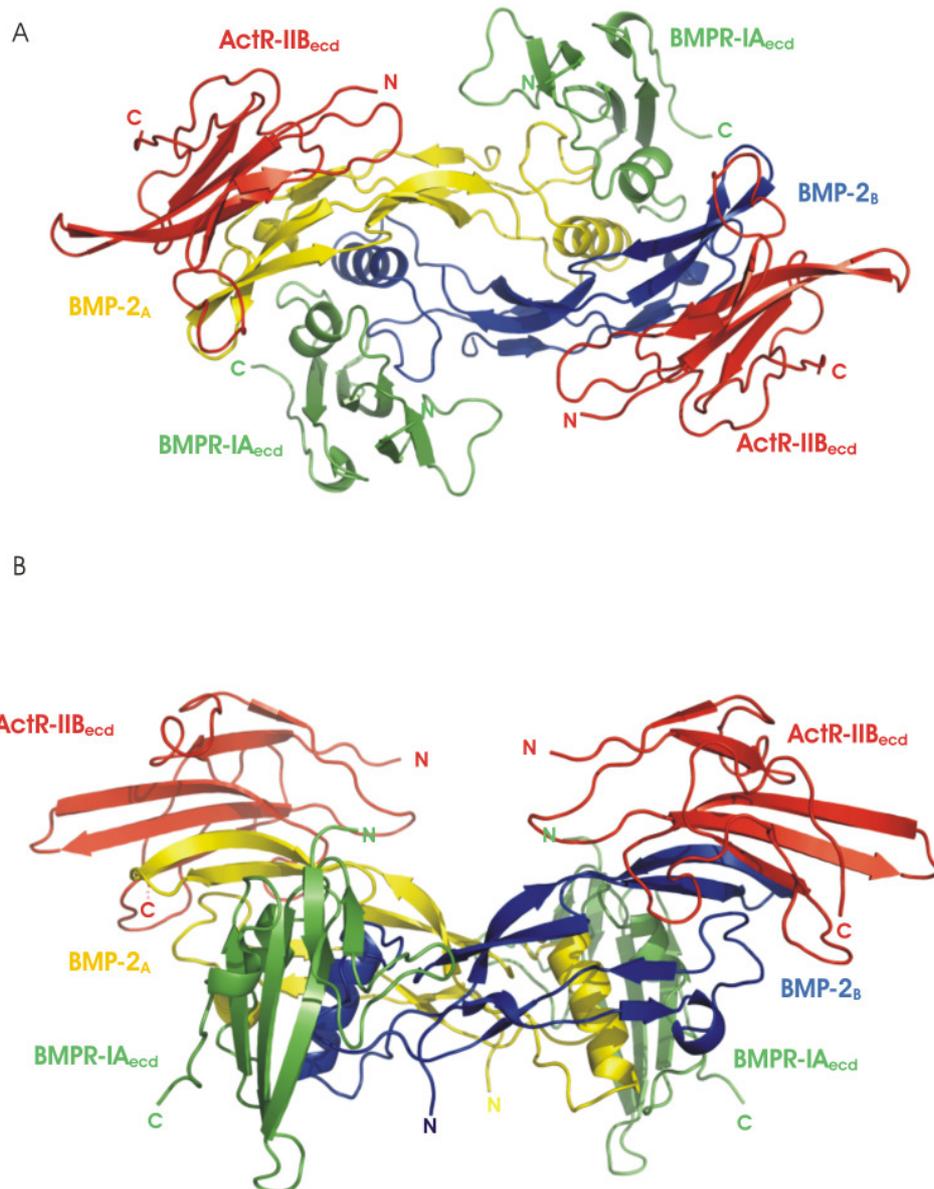


Abbildung 3.45: Strukturmodell des heterohexameren Komplexes im stöchiometrischen Verhältnis von 1 BMP-2 Dimer (blau, gelb); 2 BMPR-IA_{ecd} (grün); 2 ActR-IIB_{ecd} (rot) in der Draufsicht (A) und der Seitenansicht (B) mit der zur Membran zeigenden Seite nach unten. Die Typ I Rezeptoren sind in den „wrist“- Epitopen, die Typ II Rezeptoren in den „knuckle“-Epitopen des Liganden gebunden.

Dieser heterohexamere Komplex repräsentiert den signalaktiven ternären Komplex der TGF- β Superfamilie. Hier sind beide „wrist“-Epitope von jeweils einem Typ I Rezeptor und die beiden „knuckle“-Epitope von jeweils einem Typ II Rezeptor gebunden. Entsprechend der Voraussetzung für transaktivierende Rezeptoren zeigen die C-Termini

der beiden Rezeptor-Subtypen $\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$ und $\text{ActR-IIB}_{\text{ecd}}$ in Richtung der Membranoberfläche. Der Abstand zwischen den C-Termini der beiden $\text{ActR-IIB}_{\text{ecd}}$ Moleküle beträgt 85\AA , die beiden Typ I Rezeptorketten sind 70\AA voneinander entfernt (s. Abb. 3.46A). Fügt man die fehlenden Aminosäuren an die flexiblen C-Termini an, so beträgt der Abstand des BMP-2 zur Zelloberfläche etwa 20\AA . Abbildung 3.46B zeigt deutlich, dass die Typ I und Typ II Rezeptorketten nicht miteinander in Kontakt stehen. Die kürzeste Entfernung zwischen $\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$ und $\text{ActR-IIB}_{\text{ecd}}$ beträgt 12\AA , die Entfernung zwischen den jeweiligen C-Termini 38\AA .

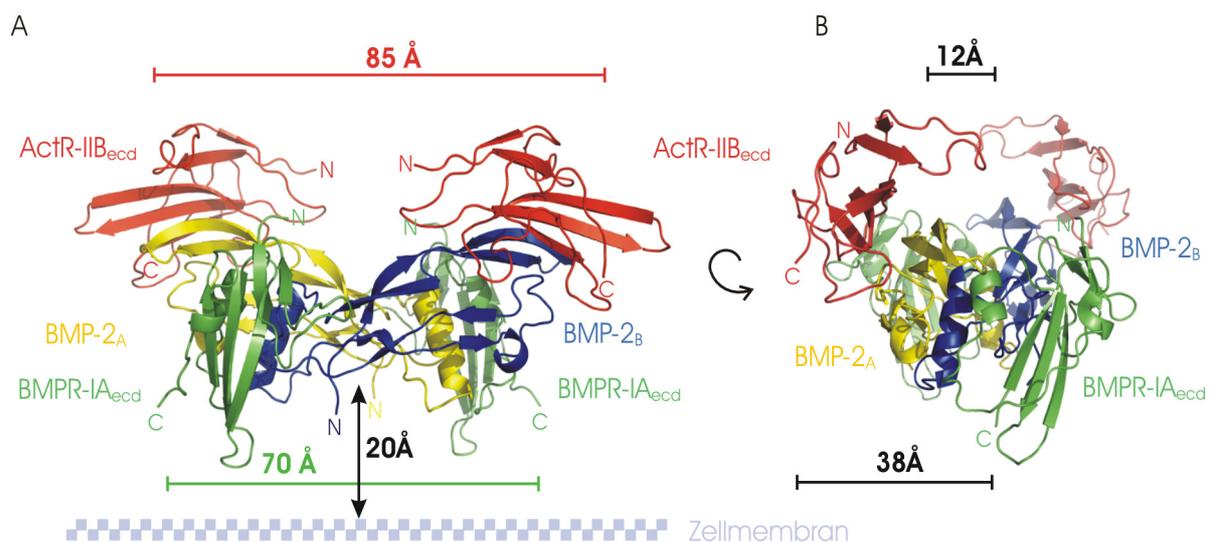


Abbildung 3.46: **A:** Strukturmodell des heterohexameren Komplexes BMP-2 (blau, gelb)/ $\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$ (grün)/ $\text{ActR-IIB}_{\text{ecd}}$ (rot) in der Seitenansicht. Die Abstände zwischen den C-Termini der jeweiligen Rezeptoren und der Abstand des Liganden zur Zellmembran sind eingezeichnet. **B:** Struktur des heterohexameren Komplexes um 60° um die y -Achse gedreht. Der Abstand zwischen den C-Termini von $\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$ und $\text{ActR-IIB}_{\text{ecd}}$, bzw. der kürzeste Abstand der Rezeptoren untereinander ist eingezeichnet.

Die 1:1:1 Stöchiometrie des ternären Komplexes im Kristall erlaubt einen Vergleich der vier Rezeptorbindeepitope im gebundenen mit dem ungebundenen Zustand unter gleichen Bedingungen in einer einzigen Struktur. Abbildung 3.47 zeigt die Überlagerung der Kristallstruktur des ternären Komplexes $\text{BMP-2/BMPR-IA}_{\text{ecd}}/\text{ActR-IIB}_{\text{ecd}}$ mit den publizierten Strukturen des binären Komplexes $\text{BMP-2/BMPR-IA}_{\text{ecd}}$ (Kirsch et al. 2000; Keller et al. 2004) und des freien BMP-2 (Scheufler et al. 1999). Hier wird deutlich, dass die globale Architektur von BMP-2 durch die Bindung von $\text{BMPR-IA}_{\text{ecd}}$ oder $\text{ActR-IIB}_{\text{ecd}}$ nicht verändert wird.

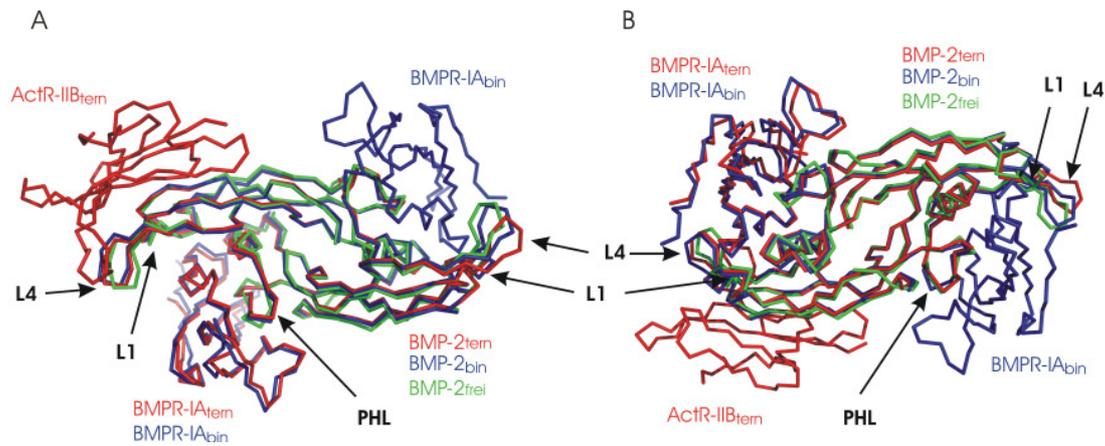


Abbildung 3.47: Überlagerung der Hauptketten der Kristallstrukturen des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{ecc}/ActR-II_{B_{ecc}} (tern), des binären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{ecc} (bin) und des ungebundenen BMP-2 (frei) in der Draufsicht (A) und der Aufsicht (B). Die globale Struktur von BMP-2 bleibt auch nach der Bindung von Typ I und Typ II Rezeptoren erhalten. Es sind lediglich kleine, lokale Konformationsänderungen in Schleife 1 und 4 (L1 und L4), sowie in der pre-Helix Schleife (PHL) zu beobachten.

Im Vergleich des ternären Komplexes mit dem ungebundenen Liganden können lediglich kleine, lokal beschränkte Konformationsänderungen beobachtet werden. So sind in den Schleifenregionen L1 (Aminosäurereste Ser24 - Val26, Asn29) und L4 (Aminosäurereste Asp93 - Lys97) Veränderungen in der Hauptkettenkonformation bis zu 4Å festzustellen.

Auch in der „Pre-Helix“ Schleife (Aminosäurereste Pro48- Asn56) sind die Positionen der C α -Atome des gebundenen im Vergleich zum freien Liganden um bis zu 3Å verschoben. Diese lokal begrenzten Änderungen sind bereits im binären Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecc} beschrieben (Kirsch et al. 2000; Keller et al. 2004) und können auf einen „induced-fit“ Mechanismus zurückgeführt werden. So weisen die Aminosäurereste in diesem Segment von freiem BMP-2 sehr hohe Temperaturfaktoren auf. Durch die Bindung an den Typ I Rezeptor sinken diese auf vergleichsweise niedrige Werte ab, was auf eine Fixierung der Schleifen durch die Rezeptorbindung hinweist.

Der Vergleich der Struktur des ternären mit der des binären Komplexes durch die Überlagerung der C α -Positionen von BMP-2 zeigt eine relative Verschiebung des Typ I Rezeptors an (s. Abb. 3.48A). Im ternären Komplex ändert sich der Neigungswinkel von BMPR-IA_{ecc} um 8° in Richtung des Typ II Rezeptors. Die Rotationsachse befindet sich im Zentrum der Typ I Rezeptor Interaktionsfläche in der Nähe der Hauptbindungs-determinanten BMPR-IA Gln86 und BMP-2 Leu51.

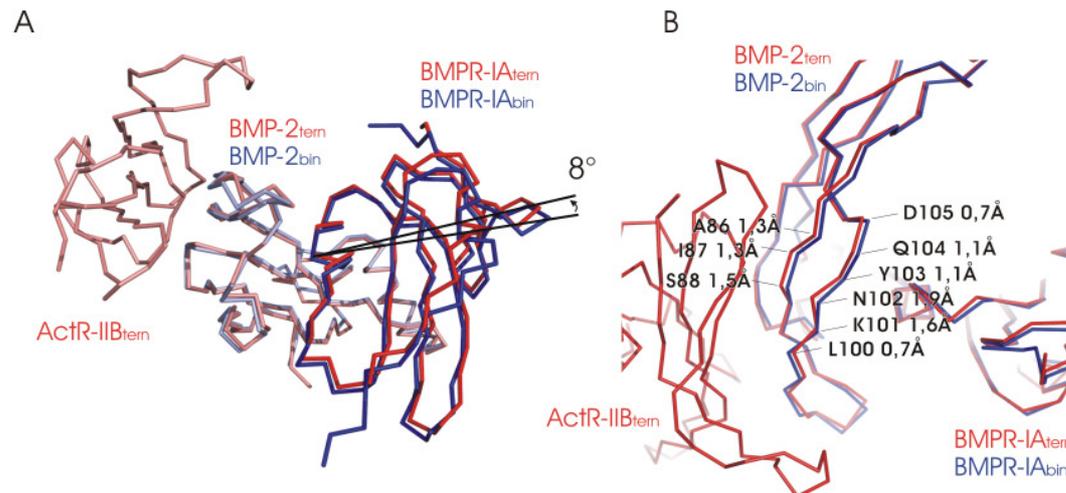


Abbildung 3.48: Überlagerung der Hauptketten der Kristallstrukturen des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{eccd}/ActR-IIB_{eccd} und des binären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{eccd}. **A:** Der Neigungswinkel vom BMPR-IA_{eccd} ist im ternären um 8° verändert. **B:** Die Änderung des Neigungswinkels kommt durch geringe Konformationsänderungen der Aminosäurereste 86 bis 88 und 100 bis 105 im BMP-2 zustande.

Die r.m.s Abweichung der C α -Atome der Typ I Rezeptoren aus dem binären und dem ternären Komplex beträgt lediglich 0,3Å. Somit kann diese Bewegung nicht das Resultat von konformationellen Änderungen im BMPR-IA_{eccd} selbst sein. Vielmehr kommt die Änderung der Orientierung von BMPR-IA_{eccd} durch geringe Konformationsänderungen der Aminosäurereste Ala86 bis Ser88 und Leu100 bis Asp105 in den β -Strängen 6 und 7 des zweiten Fingers von BMP-2 zustande (s. Abb. 3.48B). Die C α -Atome dieses Segments sind im ternären Komplex um 0,7-1,9 Å in Richtung des ActR-IIB_{eccd} verschoben. Diese geringfügige Verschiebung wird zum „wrist“-Epitop weitergeleitet und führt dort zur Änderung des Neigungswinkels von BMPR-IA_{eccd}.

3.14.2 Das Typ I Ligand-Rezeptor Bindungsepitop

In der Typ I Ligand-Rezeptor Bindungsstelle stehen beide Monomere des BMP-2 mit einem BMPR-IA_{ecd} Molekül in Kontakt. Wie bereits beschrieben, kommt es im ternären Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} zu einer Änderung des Neigungswinkels von BMPR-IA_{ecd} auf dem Liganden.

Von der Rotation sind die am weitesten von der Drehachse entfernten Aminosäurereste am meisten betroffen, so sind die Aminosäurereste in den äußeren Schleifen $\beta 1\beta 2$ und $\beta 3\beta 4$ von BMPR-IA_{ecd} um bis zu 4Å verschoben. Da die Drehachse durch die Hauptbindungs determinanten BMPR-IA_{ecd} Gln86 und BMP-2 Leu51 verläuft und BMPR-IA_{ecd} eine starre Einheit bildet, hat die Neigung keine Auswirkung auf das Typ I Ligand-Rezeptor Bindungsepitop. So entsprechen Lage und Fläche des Typ I Ligand-Rezeptor Bindungsepitopes des ternären Komplexes der für den binären Komplex (Kirsch et al. 2000; Keller et al. 2004) beschriebenen Kontaktfläche.

Zur Analyse der polaren Interaktionen wurde das Programm HBPLUS (McDonald and Thornton 1994) verwendet. In Tabelle 3.18 sind die intermolekularen Wasserstoffbrücken in der Interaktionsfläche von BMP-2 und BMPR-IA_{ecd} im ternären Komplex zusammengefasst. In Abbildung 2.49 ist das Typ I Ligand-Rezeptor Bindungsepitop graphisch dargestellt. Von den zehn Wasserstoffbrücken die für den binären Komplex BMP-2/ BMPR-IA_{ecd} (Keller et al. 2004) beschrieben sind, sind neun im ternären Komplex konserviert. Lediglich eine schwache Interaktion zwischen BMP-2 Asn59 (OD1) mit BMPR-IA_{ecd} Gly82 (N) fehlt aufgrund einer minimalen Änderung der Konformation des Liganden. Die geometrische Anordnung der konservierten Interaktionen ist im binären und im ternären Komplex identisch. Zusätzlich können in der Typ I Interaktionsfläche des ternären Komplexes 4 neue Wasserstoffbrücken beobachtet werden. Diese liegen aber alle an der für Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche, was auf eine untergeordnete Rolle für die Bindungsenergetik schließen lässt.

Bemerkenswerterweise finden sich auch die für den binären Komplex beschriebenen zentralen Wassermoleküle in der Typ I Rezeptor Ligand Interaktionsfläche des ternären Komplexes wieder. Ihre identische räumliche Verteilung könnte einen Hinweis auf die wichtige Rolle zur Typ I Rezeptor Erkennung liefern. Wie von Keller et al. (Keller et al. 2004) diskutiert, könnten diese Wassermoleküle die Anpassung der Oberflächengeometrie und die Stabilisierung des Wasserstoffbrückennetzwerkes begünstigen.

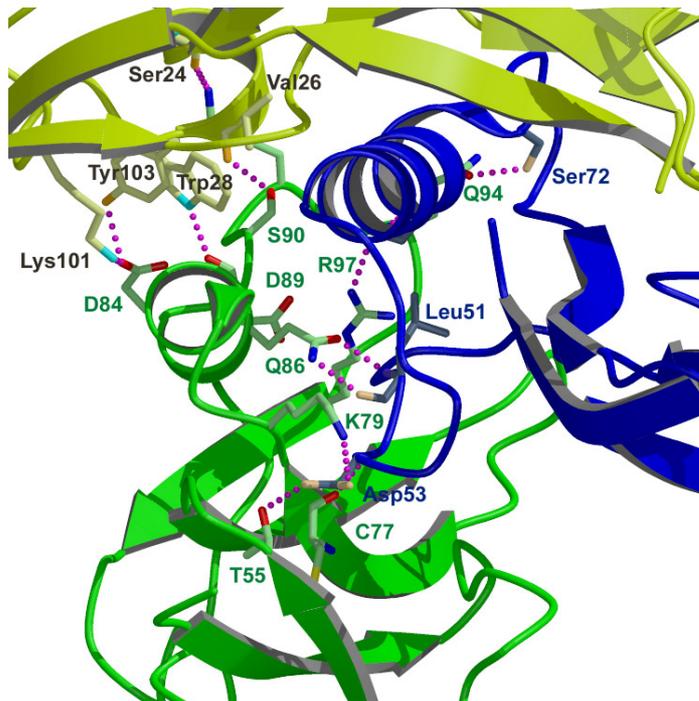


Abbildung 3.49: Darstellung des Typ I Rezeptor Bindeepitopes des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd}. Die BMP-2 Monomere sind gelb bzw. blau, die BMPR-IA Ektodomäne ist grün dargestellt. Intermolekulare Wasserstoffbrücken sind als gepunktete Linien skizziert. Die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren sind eingezeichnet.

BMP-2	BMPR-IA _{ecd}	Abstand [Å]	DAC _(a) Winkel ^{a)}	H-Brücke ^{b)}
Ser24 _A (O)	Lys92 (NZ)	3,06	152	HK-SK
Val26 _A (O)	Ser90 (OG)	2,59	133	HK-SK
Trp28 _A (NE1)	Asp89 (O)	2,79	136	SK-HK
Leu51 _B (N)	Gln86 (OE1)	2,86	128	HK-SK
Leu51 _B (O)	Gln86 (NE2)	2,98	135	HK-SK
Asp53 _B (N)	Cys77 (O)	2,80	129	HK-HK
Asp53 _B (OD1)	Lys79 (NZ)	3,01	111	SK-SK
Asp53 _B (OD2)	Thr55 (OG1)	2,61	132	SK-SK
Ser69 _B (O)	Gln94 (N)	2,86	151	HK-HK
Ser69 _B (OG)	Arg97 (NH2)	3,07	92	SK-SK
Ser72 _B (OG)	Gln94 (OE1)	2,97	129	SK-SK
Lys101 _A (NZ)	Asp84 (OD2)	2,95	146	SK-SK
Tyr103 _A (OH)	Asp84 (OD2)	2,97	116	SK-SK

Tabelle 3.18: Geometrie des Wasserstoffbrückennetzwerks im Typ I Ligand-Rezeptor Bindungsepitop. Die im binären Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd} (Keller et al. 2004) konservierten Interaktionen sind schwarz, die ausschließlich im ternären Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} vorliegenden H-Brücken sind blau dargestellt. a) DAC sind die Donor-/Akzeptor Atome; Der Winkel zwischen den Atomen beträgt 149 +/- 15° für HK/HK und 129 +/- 18° für SK/SK Wasserstoffbrücken; b) HK (Hauptketten) und SK (Seitenketten) Donor- bzw. Akzeptoratome.

3.14.3 Das Typ II Ligand-Rezeptor Bindungsepitop

In Analogie zum Modell der offenen linken Hand erfolgt die Bindung der konkaven Seite des ActR-IIB_{ecd} auf der konvexen „knuckle“-Region von BMP-2. Die Lage des Typ II Rezeptor Bindeepitopes korreliert sehr gut mit dem durch Mutationsstudien ermittelten funktionellen Bindeepitop von BMPR-II bzw. ActR-II mit BMP-2 (Kirsch et al. 2000). Die β -Stränge 3,4 und 6 von ActR-IIB_{ecd} bilden ein β -Faltblatt und verlaufen nahezu parallel zu den β -Strängen 6 und 7 im zweiten Finger von BMP-2. Die Seitenketten dieser β -Stränge stehen über eine Kopf-zu-Kopf Anordnung in Kontakt zueinander. Weiterhin steht auch die große Schleife im ersten Finger von BMP-2 in Kontakt mit dem Typ II Rezeptor. Durch die Bindung werden 770\AA^2 der Oberfläche von ActR-IIB_{ecd} und 800\AA^2 des gebundenen BMP-2 Monomers von der Umgebung abgeschirmt. Die Lage des Typ II Rezeptor Bindeepitopes ist in Abbildung 3.50 anhand der Oberflächenzugänglichkeit der an der Bindung beteiligten Aminosäurereste dargestellt.

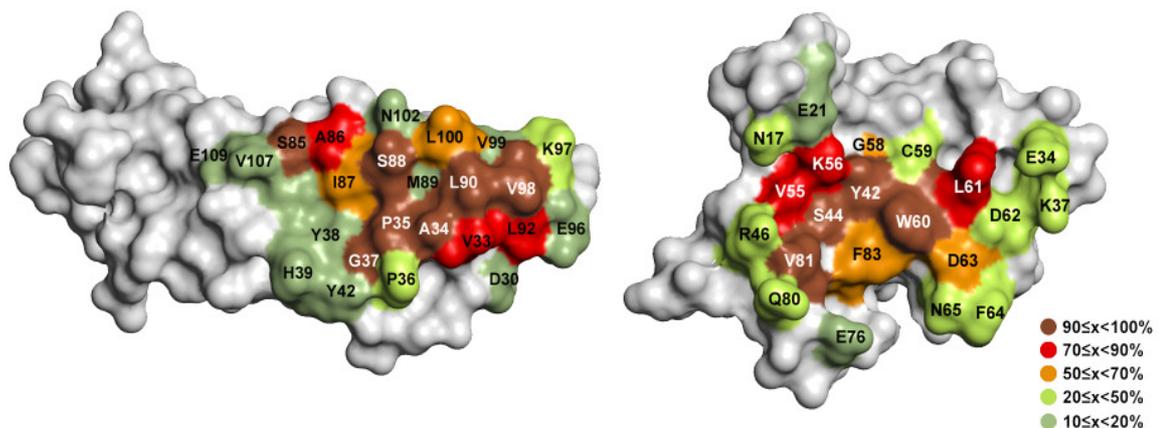


Abbildung 3.50: Lage des Typ II Rezeptor Bindeepitopes. Die Farben geben den Änderung der Oberflächenzugänglichkeit nach der Typ II Rezeptorbindung wieder ((freie Oberfläche – gebundene Oberfläche)/freie Oberfläche). Die braunen Aminosäurereste werden durch die Komplexbildung komplett verdeckt und markieren das Zentrum des Bindeepitopes. Die grünen Reste markieren den äußeren Rand des Bindeepitopes.

Im BMP-2 werden die Aminosäurereste Ala34, Pro35, Ser88, Leu90 und Val98 nahezu komplett durch den gebundenen ActR-IIB_{ecd} bedeckt und liegen somit im Zentrum der Interaktionsfläche. Im ActR-IIB_{ecd} liegen die Aminosäurereste Tyr42, Ser44, Lys56, Trp60 und Leu 61 im Mittelpunkt der Kontaktfläche.

Das BMP-2 Bindeepitop für ActR-IIB_{ecd} hat eine konvexe Form ohne große Vertiefungen. Der Ligand weist lediglich eine leicht ausgeprägte Tasche auf, die von den Resten Ala34, Pro35, Ser88, Leu90 und Leu100 begrenzt wird. Bereits in der BMP-2 Mutationsstudie von Kirsch et al (Kirsch et al. 2000) wurden diese Reste als wichtige Determinanten der Typ II Rezeptorbindung beschrieben. Diese Vertiefung des Liganden wird vom zentralen Trp60 des ActR-IIB_{ecd} ausgefüllt.

In Abbildung 3.51 sind die an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste anhand ihrer chemischen Eigenschaften dargestellt. Hier wird der hydrophobe Charakter (in grau dargestellt) der Bindung deutlich. Der Anteil der hydrophoben Aminosäuren liegt im Bindungsepitop von BMP-2 bei 60%. Im ActR-IIB_{ecd} sind zu 45% hydrophobe Reste an der Bindung beteiligt.

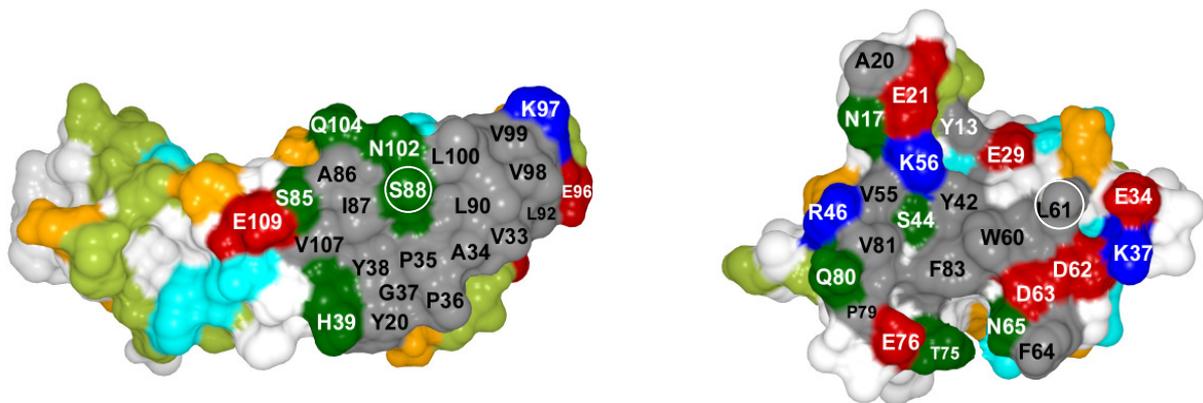


Abbildung 3.51: Oberflächendarstellung des BMP-2/ActR-IIB_{ecd} Bindeepitops in der „open book“ Ansicht. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrer Eigenschaften gefärbt: hydrophob: grau, polar: grün, positiv geladen: blau, negativ geladen: rot. Die Interaktionspartner der zentralen Wasserstoffbrücke sind mit einem weißen Kreis gekennzeichnet.

Das Zentrum der hydrophoben Interaktion liegt im Druckknopf-Motiv zwischen der Vertiefung in der Ligandenoberfläche und dem Trp60 der ActR-IIB Ektodomäne. Auf der Ligandenseite wird diese Interaktion durch den hydrophoben Rand der Vertiefung abgeschirmt. Auf der Rezeptorseite verhindern die Aminosäuren Tyr42, Asp63 und Phe83 den Zugang von Lösungsmittel. Auf einer Fläche von 12x12Å ist diese Region frei von Wassermolekülen. Dies lässt den Schluss zu, dass hydrophobe Interaktionen für den Hauptteil der freien Bindungsenergie verantwortlich sind.

Mit dem Programm HBPLUS (McDonald and Thornton 1994) konnten fünf direkte intermolekulare Wasserstoffbrücken identifiziert werden. 12 weitere Wasserstoffbrücken

werden über ein Wassermolekül verbrückt. In Tabelle 3.19 sind die Wasserstoffbrücken mit ihren geometrischen Parametern sowie einer Einteilung entsprechend der zur H-Brücke beitragenden Seiten- oder Hauptkettenatome aufgelistet. Abbildung 3.52 gibt Aufschluss über die Lage des Wasserstoffbrücken-Netzwerks. Hieraus wird ersichtlich, dass sich vier der direkten H-Brücken an der Peripherie der Typ II Bindungsstelle befinden. Im Zentrum dieser hydrophoben Umgebung findet sich ähnlich der Typ I Rezeptorbindung eine polare Wechselwirkung. Diese zentrale Wasserstoffbrücke zwischen BMP-2 Ser88 (O γ) und ActR-IIB_{ecd} Leu61 (N) könnte somit ebenfalls eine Hauptbindungs determinante darstellen, da diese auch in den binären Komplexen BMP-7/ActR-II und ActA/ActR-IIB konserviert ist.

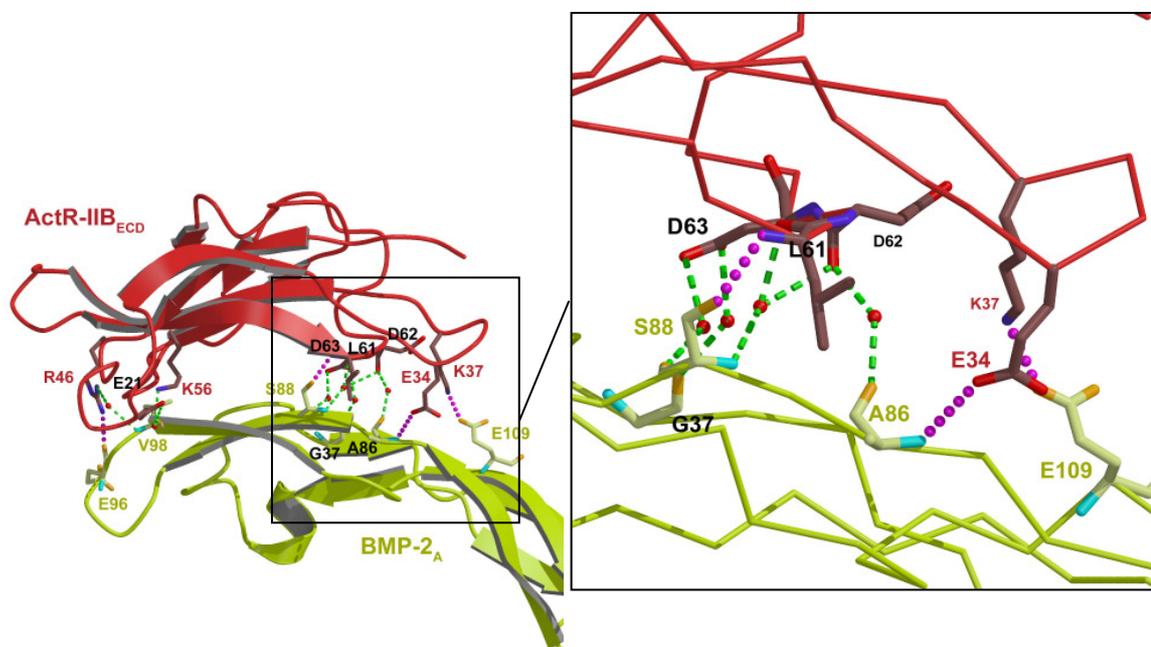


Abbildung 3.52: Links: Bänderdarstellung des BMP-2/ActR-IIB_{ecd} Bindeepitopes. Die gestrichelten Linien bezeichnen Wasserstoffbrücken. Direkte Interaktionen sind magentafarben, indirekte grün gefärbt. Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt. Rechts: Vergrößerter Ausschnitt des Wasserstoffbrückennetzwerks um BMP-2 Ser88.

<i>Direkte Wasserstoffbrücken zwischen BMP-2 and ActR-IIB_{ecd}</i>				
BMP-2	ActR-IIB_{ecd}	Abstand [Å]	DAC_(α)Winkel^{a)}	H-Brücke^{b)}
Ala86A (N)	Glu34 (OE2)	3.24	147	HK-SK
Ser88A (OG)	Leu61 (N)	2.82	131	SK-HK
Glu96A (O)	Arg46 (NH2)	2.96	171	HK-SK
Glu96A (OE1)	Gln80 (NE2)	3.05	147	SK-SK
Glu109A (OE2)	Lys37 (NZ)	2.62	140	SK-SK
<i>Wasserstoffbrücken zwischen BMP-2 and ActR-IIB_{ecd} über ein Wassermolekül</i>				
BMP-2	ActR-IIB_{ecd}	Abstand [Å] (BMP-2 – HOH)	Abstand [Å] (HOH – ActR-IIB_{ecd})	
Val33A (O)	Glu76 (OE1)	2,41	2,75	
Gly37A (O)	Asp63 (OD1)	2,80	2,86	
Ser85A (OG)	Lys37 (NZ)	2,59	3,00	
Ala86A (O)	Asp62 (O)	2,71	2,72	
Ser88A (N)	Leu61 (N)	2,81	2,96	
Ser88A (N)	Asp62 (O)	2,81	3,26	
Ser88A (O)	Asp63 (OD2)	2,76	2,95	
Val98A (N)	Arg46 (NH1)	3,19	3,24	
Val98A (O)	Glu21 (OE1)	2,88	2,41	
Val98A (O)	Lys56 (NZ)	2,88	3,14	
Asn102A (ND2)	Cys59 (O)	3,08	2,97	
Asn102A (OD1)	Cys59 (O)	3,03	2,97	

Tabelle 3.19: Geometrie des Wasserstoffbrückennetzwerks im Typ II Ligand-Rezeptor Bindungssepitop a) DAC sind die Donor-/Akzeptor Atome; Der Winkel zwischen den Atomen beträgt 149 +/- 15° für HK/HK und 129 +/- 18° für SK/SK Wasserstoffbrücken; b) HK (Hauptketten) und SK (Seitenketten) Donor- bzw. Akzeptoratome

3.15 Analyse der Struktur-Funktions-Beziehungen durch Mutagenesestudien von ActR-IIB_{ecd}

In Kapitel 3.14 wurde die Typ II Ligand-Rezeptor Interaktionsfläche strukturell charakterisiert. Um den Beitrag der einzelnen Aminosäuren zur Bindung zu untersuchen, wurde eine Mutagenesestudie der extrazellulären Domäne von ActR-IIB durchgeführt. Potentiell für die Bindung verantwortliche Aminosäurereste wurden gegen Alanin ausgetauscht. Zur näheren Charakterisierung der Bedeutung der zentralen Wasserstoffbrücke von BMP-2 Ser 88 O γ zum Hauptkettenamid von ActR-IIB_{ecd} Leu61 wurde diese Wechselwirkung durch eine Prolinsubstitution von Leu61ActR-IIB_{ecd} zerstört. Im Rahmen der Mutationsanalyse sollten auch drei weitere Aminosäurereste von ActR-IIB_{ecd} untersucht werden, die lediglich im Kristall (aber nicht in der biologischen Einheit) potentielle Kontakte zu BMP-2 bzw. BMPR-IA_{ecd} aufweisen. So wurden die Aminosäuren ActR-IIB_{ecd} Glu10 und Leu28 mutiert, die im Kristall einen potentiellen Rezeptor-Rezeptor Kontakt zu BMPR-IA_{ecd} zeigen. Die Mutation von Arg94 gründet in einem potentiellen Kontakt mit BMP-2 außerhalb des „wrist“-Epitopes, der ebenfalls nur im Kristall zu beobachten ist.

3.15.1 Mutagenese und Isolierung der ActR-IIB_{ecd} Varianten

In den Vektor pET32a[Trx-ActR-IIB] wurden die Mutationen durch die 2-Schritt PCR Methode eingefügt. Fermentation und Isolierung der jeweiligen Muteine wurde nach der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen optimierten Methode durchgeführt. In Tabelle 3.20 sind die Ausbeuten der einzelnen Schritte vergleichend dargestellt. Bei der Fermentation waren keine gravierenden Unterschiede zwischen Wildtyp- oder Mutein-exprimierenden Bakterien feststellbar. Die Ausbeuten an Fusionsprotein nach der Metall-Affinitätschromatographie entsprachen weitgehend dem Wildtyp-Niveau. Lediglich bei den Muteinen E10R und W60A konnte etwa 50% weniger Produkt erhalten werden.

Für die Inkubationsphase zur Rückfaltung wurde ein Zeitraum zwischen 6 bis 10 Tage gewählt. Eine Ausnahme stellten hier die Muteine D63A und F83A dar. Da in diesen

Fällen im ersten Durchgang kein funktionelles Protein gewonnen werden konnte, wurde die Rückfaltung über einen längeren Zeitraum mittels SDS-PAGE beobachtet. Erst nach 20 Tagen konnte eine Verschiebung des Bandenmusters beobachtet werden.

ActR-IIB_{ecd} Variante	Fermentation [g Bakterien/l]	Ni-Chelat Metall-Affinitäts- Chromatographie [mg Fusionsprotein/g Bakterien]	TMAE Anionenaustausch- Chromatographie [mg Monomer/g Bakterien]	HPLC [mg Monomer/g Bakterien]
E10R	3,4	8,72	0,28	0,07
L28W	2,5	22,13	0,74	0,21
E34A	2,8	19,10	0,45	0,19
K37A	2,5	25,00	1,62	0,10
Y42A	3,1	19,40	0,53	0,09
R46A	3,8	13,59	0,18	0,09
K56A	2,8	23,70	1,03	0,37
W60A	3,9	11,37	0,91	0,22
L61A	2,6	14,52	0,98	0,81
L61P	2,5	27,17	1,97	1,33
D63A	3,0	33,33	0,14 (20d Rückf.)	0,06
Q80A	2,6	19,35	0,74	0,56
F83A	3,8	17,96	0,22 (20d Rückf.)	0,12
R94A	4,2	12,87	0,48	0,21
WT	1,9-2,8g	25,0-39,5	0,8-2,2	0,5-1,5

Tabelle 3.20: Ausbeuten der Präparation der ActR-IIB_{ecd} Varianten

Die Proteinausbeute nach der Anionenaustauschchromatographie an der TMAE-Säule gibt den Anteil an nativem Protein wieder. Neben D63A und F83A lagen hier die Proteinmengen von E10R und R46A mehr als 50% unter der Minimalausbeute des Wildtyps. Die Ausbeuten nach der HPLC differieren zum Teil sehr stark vom Wildtyp-Protein. Zum Teil kann dieser Unterschied auf die Wahl des „Pools“ der HPLC-Elution zurückgeführt werden. Um die Homogenität zu gewährleisten wurden hier nur Fraktionen des größten Einzelsignals zusammengefasst.

Der Reinheitsgrad der isolierten Proteine wird in der SDS-PAGE in Abbildung 3.54 deutlich. Alle Muteine konnten bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Die Varianten D63A und F83A zeigten ein abweichendes Laufverhalten im Polyacrylamidgel, was auf eine unzureichende oder falsche Rückfaltung hindeuten könnte.

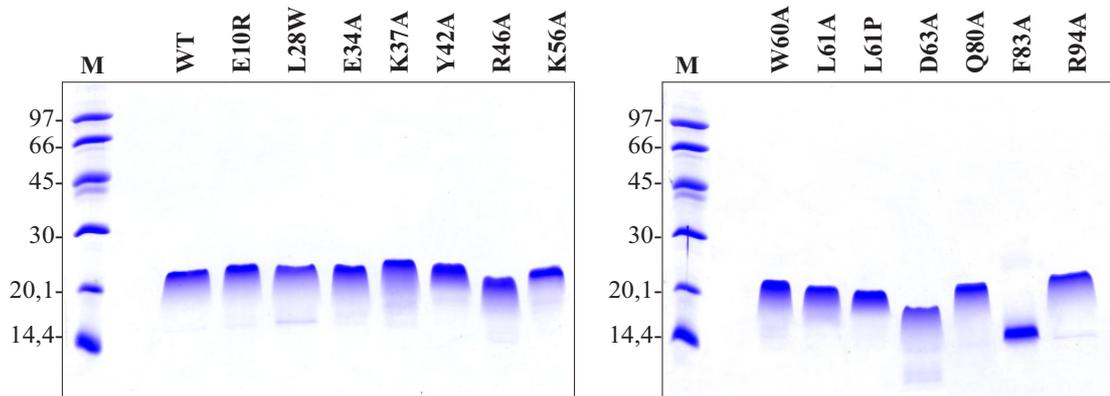


Abbildung 3.54: SDS-PAGE (ox.) der ActR-IIB_{ecd} Varianten nach der präparativen HPLC

Massenspektrometrische Analyse der ActR-IIB_{ecd} Varianten

In Tabelle 3.21 sind die Werte für die Hauptsignale der massenspektrometrische Analyse der ActR-IIB_{ecd} Varianten zusammengestellt. Bei einem Großteil der Muteine entsprach die Analyse dem theoretisch bestimmten Molekulargewicht.

Bei den Varianten R46A, K56A und D63A war im einzigen Signal eine Änderung des Molekulargewichts um ca. 475Da messbar. Bei den Varianten K37A und Y42A wurden zwei Signale detektiert. Eines davon entsprach dem theoretischen Molekulargewicht, im anderen wurde auch hier eine Änderung des Molekulargewichts um ca. 475 Da festgestellt. Diese Änderung kann durch die Verkürzung des Proteins um die N-terminalen Aminosäuresequenz GSGAMA erklärt werden. In K56A und D63A wurde ein zusätzliches Signal mit einer Differenz zum theoretischen Molekulargewicht von ca. 404 Da gemessen. Diese Differenz lässt sich auf die fehlende N-terminalen Aminosäuresequenz GSGAM zurückführen. Da der N-Terminus von ActR-IIB_{ecd} keinen Einfluss auf die Bindung zu BMP-2 hat, sollte das Fehlen dieser Aminosäuren keine Auswirkung auf Interaktionsanalysen haben.

ActR-IIB_{ecd} Variante	M [Da]	M _{theor} [Da]	Differenz [Da]	
E10R	13099,723	13099,92	-0,20	√
L28W	13145,66	13145,83	-0,17	√
E34A	13014,659	13014,766	-0,11	√
K37A	13015,607	13015,755	-0,15	√
		12540,557	475,05	- GSGAMA (N-terminal)
Y42A	12980,639	12505,44	475,20	- GSGAMA (N-terminal)
		12980,774	-0,14	√
R46A	12987,601	12513,654	473,95	- GSGAMA (N-terminal)
K56A	13015,607	12540,582	475,03	- GSGAMA (N-terminal)
		12611,624	403,98	- GSGAM (N-terminal)
W60A	12957,623	12957,536	0,09	√
L61A	13030,618	13030,685	-0,07	√
L61P	13056,634	13056,7	-0,07	√
D63A	13028,632	12553,647	474,98	- GSGAMA (N-terminal)
		12625,719	402,91	- GSGAM (N-terminal)
Q80A	13015,643	13015,815	-0,17	√
F83A	12996,634	12996,76	-0,13	√
R94A	12987,601	12987,751	-0,15	√

Tabelle 3.21: Massenspektrometrische Analyse der ActR-IIB_{ecd} Varianten

3.15.2 Interaktionsanalysen mit den ActR-IIB_{ecd} Varianten

Der Activin Typ IIB Rezeptor zeigt eine Promiskuität in der Bindung von BMPs und Activinen. Das „knuckle“-Epitop von BMP-2 überlappt mit der ActR-IIB Bindungsstelle von ActA (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004) und dem Bindeepitop von ActR-II mit BMP-7 (Greenwald et al. 2003). Durch Interaktionsanalysen der ActR-IIB_{ecd} Varianten mit den Liganden BMP-2, BMP-7 und ActA sollten die Typ II Rezeptorbindung charakterisiert und die Ursache für die unterschiedlichen Affinitäten näher untersucht werden. Für die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Untersuchungen wurden jeweils ca. 200 Resonanz-Einheiten der biotinylierten Liganden an die Flußzellen 2, 3 und 4 des Biosensorchips gekoppelt und mit dem jeweiligen ActR-IIB_{ecd}-Mutein überspült.

ActR-IIB _{ecd}	K_D [nM]			relativ zu K_D der WT-Liganden		
	BMP-2 (CHO)	BMP-7	ActA	BMP-2	BMP-7	ActA
WT	7900	3700	68	1	1	1
WT	7500	3500	61			
E10R	12500	5700	95	1,6	1,6	1,5
L28W	10500	4000	80	1,4	1,1	1,3
E34A	7500	6300	65	1,0	1,8	1,0
K37A	47000	1100	45	6,1	0,3	0,7
Y42A	469000	176000	18850	61,0	49,0	290,0
R46A	64700	11900	190	8,4	3,3	2,9
K56A	84000	50400	180	11,0	14,0	2,7
W60A	>1000000	>1000000	>1000000	k. B.	k. B.	k. B.
L61A	49300	23040	1560	6,4	6,4	24,0
L61P	60800	68400	163150	7,9	19,0	2510,0
D63A**	73900	24120	559	9,6	6,7	8,6
Q80A	10000	3600	72	1,3	1,0	1,1
F83A**	>1000000	>1000000	>1000000	k. B.	k. B.	k. B.
R94A	10500	3900	80	1,4	1,1	1,3

Tabelle 3.22: Bindungsanalyse der ActR-IIB_{ecd} Varianten mit BMP-2 (in CHO-Zellen exprimiert), BMP-7 und ActA. Auf der linken Seite der Tabelle sind die Bindungskonstanten von ActR-IIB_{ecd} Wildtyp und der Varianten zusammengefasst. Auf der rechten Seite sind die relativen Änderungen der Affinitäten der Varianten zu den Liganden in Bezug auf die K_D mit wildtypischem ActR-IIB_{ecd} dargestellt. (**=zeigen ein abweichendes Laufverhalten in der SDS-PAGE)

Die linke Seite von Tabelle 3.22 gibt die apparenten Dissoziationskonstanten von ActR-IIB_{ecd} Wildtyp und den Varianten zu den Liganden BMP-2, BMP-7 und ActA wieder. Auf der rechten Seite der Tabelle und in Abbildung 3.55 ist die Veränderung der Affinitäten der Rezeptorvarianten in Bezug auf die Bindung der jeweiligen Liganden zum wildtypischen ActR-IIB_{ecd} dargestellt. Abbildung 3.56 gibt die Änderung der freien Bindungsenergie ($\Delta\Delta G = RT \cdot \ln [K_D^{\text{Variante}} / K_D^{\text{WT}}]$) in der Interaktion mit BMP-2 durch die Alaninsubstitution des jeweiligen Restes in ActR-IIB_{ecd} graphisch wieder.

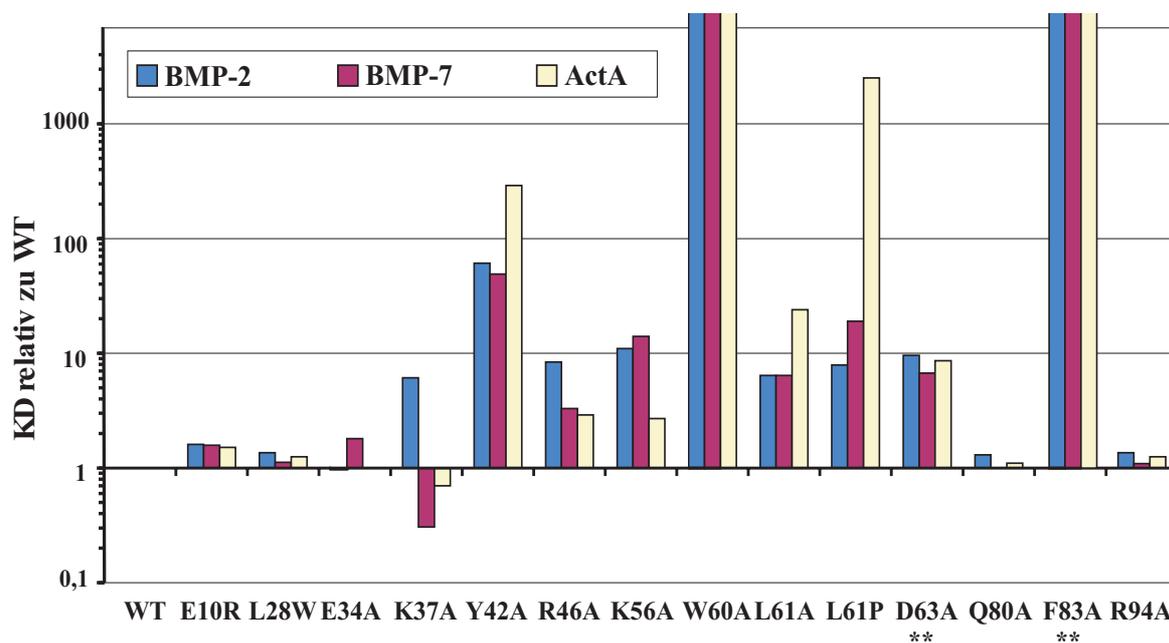


Abbildung 3.55: Änderung der Bindungskonstanten der ActR-IIB_{ecd} Varianten zu BMP-2, BMP-7 und ActA relativ zu wildtypischem ActR-IIB_{ecd}

Der K_D -Wert von ActR-IIB_{ecd}WT mit ActA wurde zu etwa 65nM bestimmt, was den hochaffinen Charakter dieser Ligand-Rezeptor Interaktion widerspiegelt. Die Bindungskonstante des wildtypischen Rezeptors mit eukaryotisch exprimierten BMP-2 lag im Bereich zwischen 7500 - 7900nM. Für die Bindung von BMP-7 an ActR-IIB_{ecd}WT wurden K_D -Werte zwischen 3500 und 3700nM ermittelt.

Die Mutationsanalyse von ActR-IIB_{ecd} zeigt, dass das exponierte, hydrophobe Tryptophan die zentrale Bindungsdeterminante für die Interaktion mit Activin und den BMPs darstellt. Diese Aminosäure ist in allen BMP/Activin Typ II Rezeptoren hochkonserviert (ActR-IIB W60, ActR-II W60, BMPR-II W58). Die Substitution von Trp60 durch Alanin in ActR-IIB_{ecd} führt, verglichen mit der Bindung zum wildtypischen Rezeptor, zu einem drastischen

Affinitätsverlust in den Interaktionen mit allen drei Liganden. Die Dissoziationskonstanten der Variante W60A liegen sowohl für die BMPs als auch für ActA im millimolaren Bereich und konnten somit nicht mehr zuverlässig genau bestimmt werden.

Die Alaninsubstitution von Phe83 führt ebenfalls zu einem dramatischen Verlust der Affinität zu allen drei Liganden. Die F83A Variante zeigt allerdings, wie unter 6.16.1 beschrieben, ein abweichendes Laufverhalten in der SDS-PAGE. So ist nicht eindeutig zu bestimmen, ob der Affinitätsverlust auf einen funktionellen Beitrag der Seitenkette oder möglicherweise auf eine unkorrekte Faltung des Muteins zurückzuführen ist.

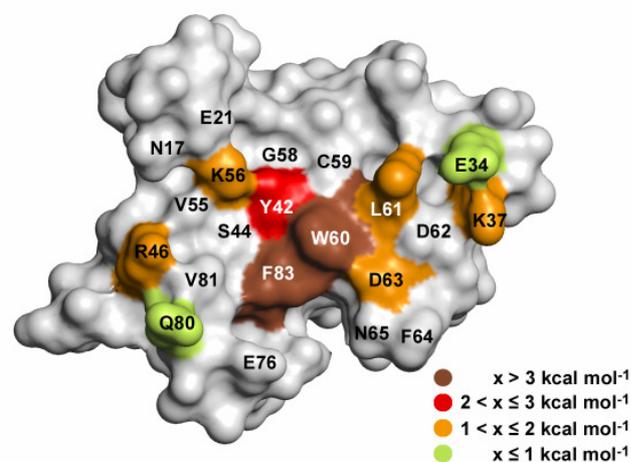


Abbildung 3.56: Oberflächendarstellung von ActR-IIB_{eccd}. Die Änderung der freien Bindungsenergie ($\Delta\Delta G$) in der Interaktion mit BMP-2 durch die Alaninsubstitution des jeweiligen Restes im ActR-IIB_{eccd} ist farblich gekennzeichnet.

Der Verlust der Seitenkette des Tyr42 führte in der Wechselwirkung mit den beiden BMPs zu einer Verringerung der Affinität um das 50- bis 60-fache. In der Bindung zu ActA verschlechterte sich die Affinität um ein 270-faches im Vergleich mit der Interaktion mit ActR-IIB_{eccd}WT.

Bei der Variante L61A führt die Verkürzung der hydrophoben Seitenkette zu einer signifikanten Reduzierung der Affinität. Verglichen mit der Bindung des wildtypischen Rezeptors liegt bei den BMPs eine Abnahme der Affinität um den Faktor 6 vor. Die Bindung zu ActA wird um ein 23-faches beeinträchtigt.

Die Interaktionsanalyse der Variante K37A mit den Liganden zeigt eine ausgeprägte ligandenspezifische Bindungscharakteristik. Die Affinität zu BMP-2 verringert sich im Vergleich zu ActR-IIB_{eccd}WT um das 6-fache. Der Affinitätsverlust kann hier auf die Aufhebung der Salzbrücke zwischen ActR-IIB_{eccd} Lys37 und BMP-2 Glu109 zurückgeführt werden. In der Komplexstruktur von BMP-7 mit ActR-II_{eccd} (Greenwald et al. 2003) ist

diese polare Interaktion zum Lys37 nicht vorhanden. Stattdessen ist eine Wasserstoffbrücke vom BMP-7 Arg134 (entspricht BMP-2 Glu109) zu ActR-II_{ecd} Asp36 ausgebildet. Die Übertragung dieses Befundes auf die BMP-7/ActR-IIB Interaktion könnte erklären warum die Alaninsubstitution von ActR-IIB_{ecd} Lys37 zu keiner Verringerung der Affinität zum BMP-7 führt. Auch in der Wechselwirkung mit ActA zeigt die Variante K37A keine Auswirkung auf die Affinität. Hier befindet sich in nächster Nähe des korrespondierenden Glutamats (ActA Glu111) ein Arginin (ActA Arg87), welches intramolekular um die Wasserstoffbrücke konkurrieren könnte.

Der Verlust der Seitenkette in der Variante R46A verhindert die Ausbildung einer H-Brücke zu BMP-2 Glu96 und führt somit zu einer 8-fach geringeren Bindung zu diesem Liganden. Die Alaninsubstitution von ActR-IIB_{ecd} Arg46 führt zu einer 3-fach geringeren Affinität zu BMP-7 und ActA.

Die Variante K56A zeigt im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor in der Bindung zu ActA eine etwa 3-fache Erhöhung des K_D -Wertes. Bei der Bindung zu BMP-2 und BMP-7 sind 10- bis 14-fach höhere K_D -Werte zu messen. Im Falle der BMP-2/ActR-IIB_{ecd} Interaktion tritt an dieser Stelle eine Wasserstoffbrückenbindung über ein Wassermolekül auf, die aber in den Komplexen BMP-7/ActR-II und ActA/ActR-IIB (Greenwald et al. 2003; Thompson et al. 2003) nicht vorhanden ist. Jedoch bildet die Lysin-Seitenkette in allen drei Fällen einen hydrophoben Kontakt mit den Resten der Liganden. Die Verschlechterung der Affinität von K56A kann somit primär auf die Störung dieser hydrophoben Interaktion und nicht auf die Elimination der Wasserstoffbrücke zurückgeführt werden.

Die Variante D63A weist eine 7- bis 9-fach schwächere Bindung zu allen drei Liganden auf. Allerdings muss auch hier das abweichende Laufverhalten der Variante in der SDS-PAGE beachtet werden (s. Abschnitt 6.16.1). So kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob der Affinitätsverlust auf einen funktionellen Beitrag der Seitenkette oder möglicherweise auf eine unkorrekte Faltung des Muteins zurückzuführen ist.

Die Alaninsubstitution von Glu34 und Gln80 zeigt weder in der Bindung mit den BMPs noch mit ActA eine Affinitätsänderung. Im Falle der ActR-IIB/BMP-2 Interaktion ist dies ein Indiz für die schwache Ausprägung dieser an der Peripherie lokalisierten Wasserstoffbrücken. Im Komplex mit BMP-7 und ActA tritt diese Wasserstoffbrücke zum Typ II Rezeptor nicht auf.

Wie bereits erläutert wurden die Varianten E10R und L28W aufgrund potentieller Rezeptor-Rezeptor Kontakte hergestellt, die in einer möglichen asymmetrischen Einheit

des Kristalls beobachtet wurden. Sie befinden sich nicht im Typ II Ligand-Rezeptor Bindeepitop. Die Interaktionsanalyse mit den Liganden zeigt wie erwartet keine Abweichungen von der wildtypischen Bindung. Des Weiteren wurden Bindungsanalysen dieser Varianten mit der extrazellulären Domäne von BMPR-IA durchgeführt. Hier konnte grundsätzlich keine Bindung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Auch die Bindungsanalyse von R94A zeigte, verglichen mit der Interaktion von ActR-IIB_{ecd}WT mit den Liganden, keine Änderung der Affinität. Die ausschließlich im Kristall beobachtbare Proximität dieser Aminosäure zu BMP-2 außerhalb des „knuckle“-Epitops kann somit auf die Kristallisationsbedingungen zurückgeführt werden, ein biologisch relevanter Kontakt liegt aber nicht vor.

Mit den bisher beschriebenen Mutationen der ActR-IIB Ektodomäne konnte der Unterschied in hoch- und niederaffiner Bindung zu ActA bzw. den BMPs nicht erklärt werden. Für alle hier getesteten Liganden ist das zentrale Trp60 die Hauptdeterminante der Bindung. Auch die Elimination der hydrophoben Seitenketten in Phe83 Tyr42, und Leu61 führt zu einer starken Schwächung der Bindung in ActA und den BMPs gleichermaßen. Die Alaninsubstitutionen der an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten Aminosäuren zeigen im Vergleich mit den hydrophoben Wechselwirkungen nur einen geringen Beitrag zu der Bindung (s. Abb 3.56). Eine ausgeprägte Ligandenspezifität ist auch hier nicht zu beobachten.

Im Rahmen der Analyse der Kontaktfläche von ActR-IIB_{ecd} zu BMP-2 wurde die Wasserstoffbrücke zwischen dem Hauptkettenamid von ActR-IIB_{ecd} Leu61 und BMP-2 Ser88 bereits beschrieben. Diese zentrale Wasserstoffbrücke tritt nicht nur in dieser Wechselwirkung auf, sie ist sowohl in der Interaktion von ActA mit ActR-IIB_{ecd} (Thompson et al. 2003) als auch in der Bindung von ActR-II an BMP-7 (Greenwald et al. 2003) konserviert. Die Alaninsubstitution von Ser88 im BMP-2 zeigt jedoch nur eine minimale Verringerung der Affinität zu BMPR-II oder ActR-II (Kirsch et al. 2000). Um die Diskrepanz zwischen dem einerseits hohen Konservierungsgrad der Wasserstoffbrücke und andererseits deren geringen Beitrag zur Typ II Rezeptorbindung näher zu erforschen, wurde die ActR-IIB_{ecd} Variante L61P hergestellt. Mit diesem Mutein ist die Ausbildung der charakteristischen Wasserstoffbrücke nicht mehr möglich, da die Protonen-Donorfunktion des Hauptkettenamids nicht mehr zur Verfügung steht.

Die Zerstörung der Wasserstoffbrücke zeigt, analog der Mutation S88 in BMP-2, in der Bindung zu den BMPs nur einen marginalen Effekt. Die Dissoziationskonstanten von BMP-2 mit ActR-IIB_{ecd} L61A und L61P sind nahezu gleich, in der Bindung von BMP-7 weist die Prolinvariante eine 3-fach geringere Affinität als die Alaninvariante auf.

Doch in der Interaktion mit ActA zeigt die Variante ActR-IIB_{ecd} L61P einen dramatischen Affinitätsverlust. Die Affinität von ActA zu ActR-IIB_{ecd} L61P ist um mehr als das 100-fache geringer als zu ActR-IIB_{ecd} L61A. Der K_D -Wert der ActR-IIB_{ecd}L61P/ActA Interaktion (163 μ M) liegt nun im gleichen Bereich wie die K_D -Werte der Interaktion von ActR-IIB_{ecd}L61P mit BMP-2 (61 μ M) bzw. BMP-7 (68 μ M). Die zentrale Wasserstoffbrücke scheint folglich die spezifische Determinante der hochaffinen Bindung zwischen ActR-IIB_{ecd} und ActA darzustellen.

Um den Einfluss dieser Aminosäuren auf die Bindung des Typ II Rezeptors zu untersuchen, wurde ein partieller Domänen-Austausch durchgeführt. An die Positionen 85, 86, 100 und 102 von BMP-2 wurden die korrespondierenden Aminosäurereste von ActA eingeführt. Zusätzlich wurden auch Doppel- und Vierfachmutanten generiert um potentielle kooperative Effekte zu testen.

3.16.1 Mutagenese und Isolierung der BMP-2 Varianten

In die BMP-2 Sequenz, vorliegend im Expressionsplasmid pQKA[BMP-2], wurde über eine PCR die jeweilige Mutation eingeführt. Die Fermentation und Aufreinigung der BMP-2 Varianten erfolgte wie von R. Ruppert et al. beschrieben (Ruppert et al. 1996). In Tabelle 3.23 sind die Ausbeuten der jeweiligen Schritte aufgeführt. Die relative Masse an Einschlusskörpern der Muteine lag im Bereich von wildtypischem BMP-2. Die Proteinmenge im S300-Extrakt lag bei den Einfachmutanten und L100K/N102D um die Hälfte niedriger als beim Wildtyp-Protein. Für die Vierfachmutante und S85R/A86P wurden hier 75% der Ausbeute des Wildtyps erzielt.

BMP-2 Variante	Fermentation [g FG/l]	Inclusion- bodies [g/g FG]	S300 Gelfiltration [OD/g FG]	EMD (SO ₃) ⁻ Kationenaustausch- Chromatographie [OD/g FG]	Final [mg/g FG]
S85R	13,1	0,2	9,5	0,24	0,04
A86P	11,9	0,3	9,5	0,42	0,23
L100K	12,4	0,2	9,1	0,40	0,27
N102D	12,6	0,2	8,9	1,14	0,27
S85R/A86P	6,1	0,3	15,3	0,51	0,29
L100K/N102D	5,9	0,3	10,6	1,06	0,66
S85R/A86P/L100K/N 102D	6,1	0,4	17,3	0,82	0,37
WT	6,4	0,2	23,0	5,90	3,17

Tabelle 3.23: Ausbeuten der Präparation der BMP-2 Varianten

Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen nach der Kationenaustauschchromatographie korrelierte mit den jeweiligen Endausbeuten. Für S85R wurde eine um den Faktor 100

niedrigere Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp erzielt. Für die Muteine A86P, L100K, N102D, S85R/A86P und die Vierfachmutante lag die Ausbeute um ein zehnfaches, bei der Doppelmutante L100K/N102D um ein fünffaches unter der des wildtypischen Liganden. Abbildung 3.58 zeigt eine SDS-PAGE der BMP-2 Varianten. Hier weisen alle Muteine einen hohen Reinheitsgrad auf. Monomeres BMP-2 und Fremdproteine konnten nur in geringsten Mengen beobachtet werden.

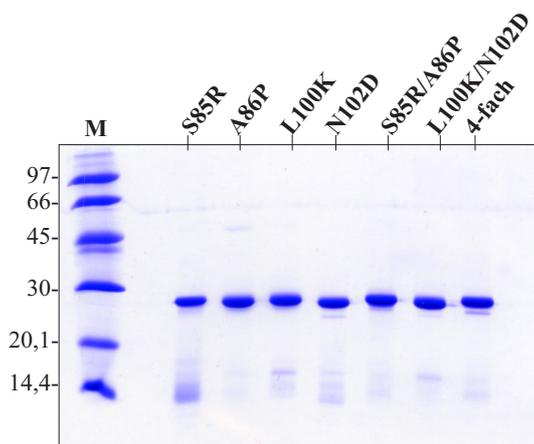


Abbildung 3.58: SDS-PAGE (n.red.) der endgereinigten BMP-2 Varianten.

Massenspektrometrische Analyse der ActR-IIB_{ecd} Varianten

Aus Tabelle 3.24 geht hervor, dass bei allen BMP-2 Varianten die durch massenspektrometrische Analyse ermittelten Molekulargewichte mit den theoretischen Werten übereinstimmen.

BMP-2 Variante	M [Da]	M _{theor} [Da]	Differenz [Da]	
S85R	26075,922	26076,742	0,820	√
A86P	25989,729	25989,690	-0,039	√
L100K	25967,808	25968,550	0,742	√
N102D	25939,751	25940,438	0,687	√
S85R/A86P	26127,953	26128,752	0,799	√
L100K/N102D	25969,772	25970,510	0,738	√
S85R/A86P/L100K/N102D	26159,943	26160,826	0,883	√

Tabelle 3.24: Massenspektrometrische Analyse der BMP-2 Varianten

3.16.2 Interaktionsanalysen mit den BMP-2 Varianten

Für die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Untersuchungen wurden jeweils ca. 200 Resonanz-Einheiten von biotinyliertem BMP-2, ActA bzw. der BMP-2 Varianten an die Messzellen 2, 3 und 4 des Sensorchips gekoppelt und mit den extrazellulären Domänen von ActR-IIB, ActR-II, BMPR-II sowie BMPR-IA in verschiedenen Konzentrationen überspült.

	K_D [nM]			
	ActR-IIB _{ecd}	ActR-II _{ecd}	BMPR-II _{ecd}	BMPR-IA _{ecd}
BMP-2 WT	2700	5500	24000	12,5
ActA	61	230	8700	>250000
BMP2 L100K	405	4600	30000	20
BMP2 N102D	21000	19500	23000	38
BMP2 L100K/N102D	140	1600	22000	34,5
BMP2 S85R	3450	4700	2900	29
BMP2 A86P	7100	7950	12000	17
BMP2 S85R/A86P	3900	7000	4600	31,5
BMP2 L100K/N102D/S85R/A86P	325	2700	4800	45

	relativ zu K_D von BMP WT			
	ActR-IIB _{ecd}	ActR-II _{ecd}	BMPR-II _{ecd}	BMPR-IA _{ecd}
BMP-2 WT	1,00	1,00	1,00	1,00
ActA	0,02	0,04	0,36	>2E+4
BMP2 L100K	0,15	0,84	1,25	1,60
BMP2 N102D	7,78	3,55	0,96	3,04
BMP2 L100K/N102D	0,05	0,29	0,92	2,76
BMP2 S85R	1,28	0,85	0,12	2,32
BMP2 A86P	2,63	1,45	0,50	1,36
BMP2 S85R/A86P	1,44	1,27	0,19	2,52
BMP2 L100K/N102D/S85R/A86P	0,12	0,49	0,20	3,60

Tabelle 3.25: Bindungsanalyse von ActA, BMP-2 bzw. der BMP-2 Varianten an ActR-IIB_{ecd}, ActR-II_{ecd}, BMPR-II_{ecd} und BMPR-IA_{ecd}. Im oberen Teil sind die K_D -Werte der jeweiligen Interaktionen dargestellt. Im unteren Teil sind die K_D -Werte der Varianten auf die Dissoziationskonstante der einzelnen Rezeptoren zu wildtypischem BMP-2 normiert.

Der obere Teil von Tabelle 3.25 gibt die apparenten Dissoziationskonstanten von BMP-2 WT bzw. den Varianten mit den jeweiligen Rezeptoren wieder, ActA wurde zum Vergleich in die Messung miteinbezogen. Im unteren Teil der Tabelle 3.25 sind die Affinitätsänderungen der Varianten im Vergleich zur Bindung der Rezeptoren mit wildtypischem BMP-2 normiert. Auch hier ist ActA als Vergleichswert aufgeführt. Die relativen Änderungen der K_D -Werte wurden in Abbildung 3.59 graphisch aufbereitet.

Im Rahmen des Domänen-Austausches wurden nur Aminosäurereste im Typ II Rezeptorbindeepitop von BMP-2 mutiert. Somit dient die Interaktionsanalyse der BMP-2 Varianten mit dem Typ I Rezeptor BMPR-IA der Qualitätssicherung. Bezogen auf die Wechselwirkung von BMP-2 WT mit BMPR-IA zeigen die Varianten eine leichte Erhöhung der Dissoziationskonstante.

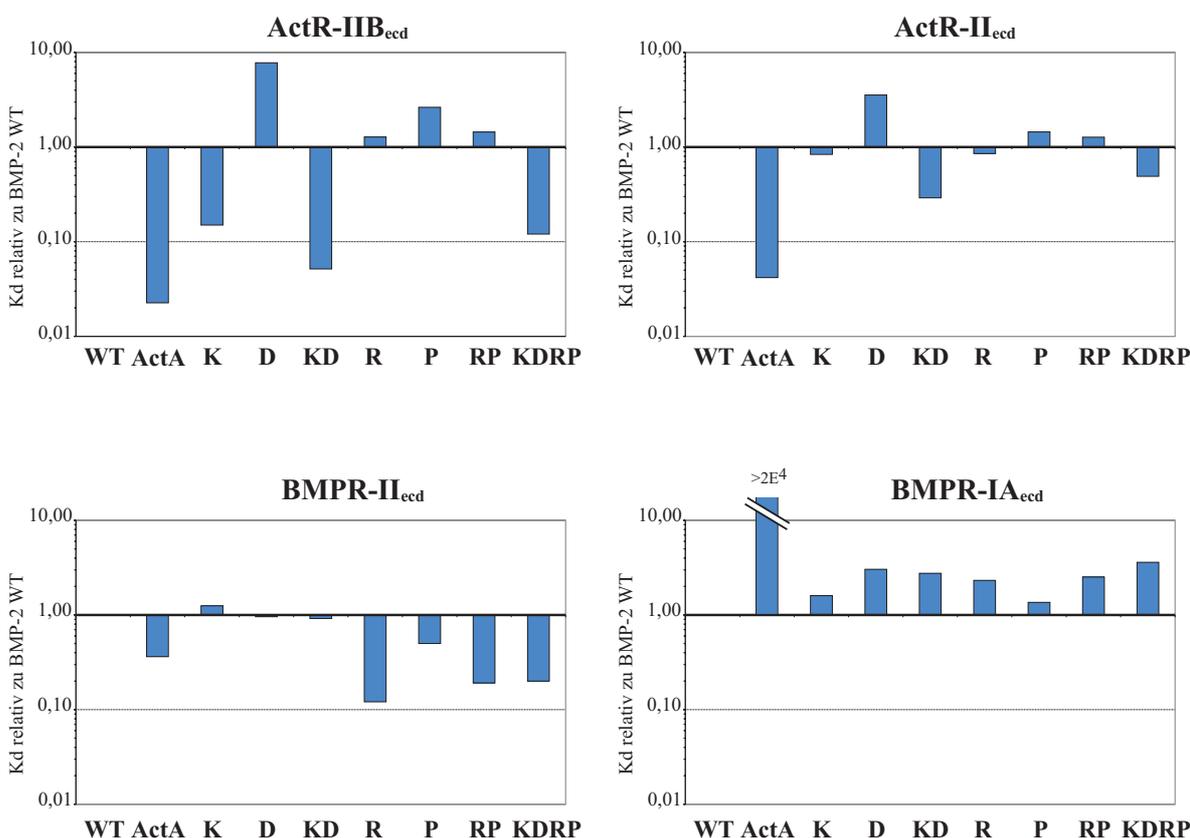


Abbildung 3.59: Relative Affinitätsänderungen der Varianten im Vergleich der Bindung der jeweiligen Rezeptoren zu wildtypischem BMP-2. K= BMP-2 L100K; D= BMP-2 N102D; KD= BMP-2 L100K/N102D; R= BMP-2 S85R; P= BMP-2 A86P; RP= BMP-2 S85R/A86P; KDRP= BMP-2 L100K/N102D/S85R/A86P

In der Interaktion von ActR-IIB_{ecd} mit den BMP-2 Varianten S85R und A86P bzw. der Doppelmutante S85R/A86P ist im Vergleich zum wildtypischen Liganden keine Änderung der Affinität zu beobachten. Auch auf die Wechselwirkung mit ActR-II_{ecd} haben diese Substitutionen keine Auswirkungen. Jedoch zeigen besonders BMP-2 S85R und BMP-2 S85R/A86P eine ausgeprägte Spezifität für BMPR-II_{ecd}. Hier ist eine 5 bzw. 8-fache Erhöhung der Affinität messbar, verglichen mit der Bindung von BMP-2WT messbar.

Die alleinige Substitution von Asn102 mit Asp führt zu einer 8-fach geringeren Affinität zu ActR-IIB_{ecd}. Die Bindung an ActR-II_{ecd} ist um das 3,6-fache beeinträchtigt, dagegen bleibt die Bindung zu BMPR-II von der Mutation unbeeinflusst.

Die Bindung zu ActR-II_{ecd} und BMPR-II_{ecd} wird durch die alleinige Substitution von BMP-2 Leu 100 mit Lys nicht beeinflusst. Die Doppelvariante BMP-2 L100K/N102D zeigt eine leichte Erhöhung der Affinität zu ActR-II_{ecd}. Die Interaktion mit BMPR-II_{ecd} bleibt unbeeinflusst. Die Vierfachmutante BMP2 L100K/N102D/S85R/A86P zeigt keine Rezeptorspezifität. Sie zeigt sowohl eine 10-fache Erhöhung der Affinität zum ActR-IIB_{ecd} als auch zum BMPR-II_{ecd}, die Bindung mit ActR-II_{ecd} bleibt nahezu unbeeinflusst.

Verglichen mit der wildtypischen Interaktion zeigt die Variante BMP-2 L100K eine ActR-IIB_{ecd}-spezifische Erhöhung der Affinität um den Faktor 6. Durch die zusätzliche Mutation von BMP-2 Asn102 mit Asp ist eine 20-fache Steigerung der Affinität zu ActR-IIB_{ecd} zu messen. Die Bindungskonstante der BMP-2 Doppelvariante L100K/N102D mit ActR-IIB_{ecd} ($K_D=140\text{nM}$) entspricht nahezu der hochaffinen Interaktion von ActA mit ActR-IIB_{ecd} ($K_D=60\text{nM}$). Der Austausch von nur zwei Aminosäureresten führt folglich zu einer Umwandlung einer niederaffinen in eine hochaffine Interaktion zwischen BMP-2 und ActR-IIB_{ecd}. Hierbei scheint die Seitenkette des Lysins die Schlüsseldeterminante darzustellen.

Es stellt sich die Frage, durch welchen Sachverhalt die massive Erhöhung der Affinität zu ActR-IIB_{ecd} durch die Substitution von BMP-2 Leu100 mit Lys erklärt werden kann. Bei der Überlagerung der Hauptkette der betreffenden Region aus der Struktur des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ ActR-IIB_{ecd} mit der des binären Komplexes aus ActA und ActR-IIB_{ecd} ist lediglich eine r.m.s Abweichung von $0,1\text{\AA}$ festzustellen. So scheint es unwahrscheinlich, dass Konformationsänderungen die Ursache für die hochaffine Bindung der BMP-2 Variante L100K an ActR-IIB_{ecd} darstellen.

3.16.3 Gegenüberstellende Interaktionsanalyse von BMP-2 und ActR-IIB_{ecd} Varianten („double-mutant-cycle“)

Der Austausch von BMP-2 Leu100 mit Lys führt zu einer hochaffinen Bindung mit ActR-IIB_{ecd}. Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben ist es unwahrscheinlich, dass konformationelle Änderungen die Ursache für diesen Sachverhalt darstellen. Interaktionsanalysen der ActR-IIB_{ecd} Varianten mit BMP-2 und ActA (s. Abschnitt 3.15.2) weisen darauf hin, dass der Charakter von hoch- und niederaffiner Bindung von der zentralen Wasserstoffbrücke zwischen ActR-IIB_{ecd} Leu61 und BMP-2 Ser88 O γ (ActA Ser90 O γ) abhängig ist. Um einen Einblick in den molekularen Mechanismus der Affinitätssteigerung durch die Lysinsubstitution von BMP-2 Leu100 zu erlangen, wurde eine gegenüberstellende Interaktionsanalyse von BMP-2 und ActR-IIB_{ecd} Varianten (engl.: „double-mutant-cycle“) durchgeführt. Im Rahmen dieser Analyse wurden die Affinitäten von BMP-2 Varianten des Domänen-Austausches in der Interaktion mit den ActR-IIB_{ecd} Rezeptorvarianten L61A und L61P bestimmt. BMP-2WT und ActA wurden als Vergleichswerte in die Messung einbezogen. Die apparenten Dissoziationskonstanten sind in der linken Hälfte von Tabelle 3.26 zusammengefasst. Im rechten Teil der Tabelle ist das Verhältnis der Dissoziationskonstante der Interaktion des Liganden mit ActR-IIB_{ecd}L61P zur Dissoziationskonstante der Interaktion des Liganden mit ActR-IIB_{ecd} L61A angegeben. Die Daten sind in Abbildung 3.60 graphisch aufbereitet.

	K_D [nM]			K_D^{L61P}/K_D^{L61A}
	ActR-IIB WT	ActR-IIB L61A	ActR-IIB L61P	
BMP-2 WT	2700	42000	76000	1,8
BMP-2 K	400	28000	130000	4,6
BMP-2 D	21000	53000	74000	1,4
BMP-2 KD	140	14000	160000	11,4
BMP-2 KDRP	320	18000	91000	5,1
BMP-2 RP	3900	42000	67000	1,6
ActA	60	2000	180000	90

Tabelle 3.26: Gegenüberstellende Analyse von BMP-2 und ActR-IIB_{ecd} Varianten. Links sind die apparenten Dissoziationskonstanten zusammengefasst. Rechts ist das Verhältnis der Dissoziationskonstante der Interaktion des Liganden mit ActR-IIB_{ecd}L61P zur Dissoziationskonstante der Interaktion des Liganden mit ActR-IIB_{ecd} L61A angegeben. K= L100K; D= N102D; KD= L100K/N102D; RP= S85R/A86P; KDRP= L100K/N102D/S85R/A86P

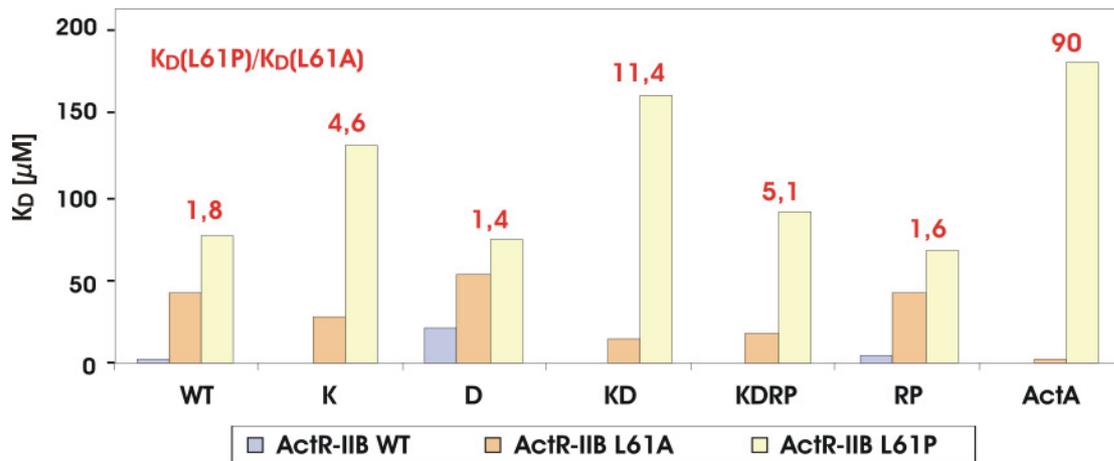


Abbildung 3.60: Gegenüberstellende Interaktionsanalyse von BMP-2 und ActR-IIB_{ecd} Varianten. Graphische Darstellung der apparenten Dissoziationskonstanten. Das Verhältnis der Dissoziationskonstante der Interaktion des Liganden mit ActR-IIB_{ecd}L61P zur Dissoziationskonstante der Interaktion des Liganden mit ActR-IIB_{ecd} L61A ist in roter Schrift angegeben. K= BMP-2 L100K; D= BMP-2 N102D; KD= BMP-2 L100K/N102D; RP= BMP-2 S85R/A86P; KDRP= BMP-2 L100K/N102D/S85R/A86P

Wie bereits im Abschnitt 3.15.2 beschrieben, resultiert die Prolinsubstitution von ActR-IIB_{ecd} Leu61 im Verlust der zentralen Wasserstoffbrücke mit BMP-2 Ser88 O γ , beziehungsweise ActA Ser90 O γ . Die Alaninsubstitution von ActR-IIB_{ecd} Leu61 führt zur Verkürzung der hydrophoben Seitenkette. Das Verhältnis der Dissoziationskonstante der Interaktion des Liganden mit ActR-IIB_{ecd}L61P zur Dissoziationskonstante der Interaktion des Liganden mit ActR-IIB_{ecd} L61A gibt somit den Einfluss der zentralen Wasserstoffbrücke auf die Interaktion wieder.

In der Interaktion mit BMP-2 WT hat die zentrale Wasserstoffbrücke nur einen geringen Einfluss auf die Affinität. Die K_D -Werte mit ActR-IIB_{ecd} L61A und ActR-IIB_{ecd} L61P unterscheiden sich hier nur um den Faktor 1,8.

Auch in der Bindung von BMP-2 N102D und BMP-2 S85R/A86P zeigt die Zerstörung dieser polaren Wechselwirkung nur einen geringen Effekt. Die Affinitäten dieser Varianten zu ActR-IIB_{ecd} L61A und ActR-IIB_{ecd} L61P unterscheiden sich nur um den Faktor 1,4 und 1,6.

Bei der Bindung von ActA an ActR-IIB_{ecd} ist die Wasserstoffbrücke hingegen von zentraler Bedeutung. Die Zerstörung der polaren Interaktion durch die Prolinsubstitution zeigt im Vergleich der Interaktion mit ActR-IIB_{ecd} L61A eine 90-fach geringere Affinität.

Das Einführen des Lysinrestes an Position 100 im BMP-2 generiert eine hochaffine Bindung von ActR-IIB_{ecd}. Dieser Wechsel von einer nieder- zu einer hochaffinen Bindung

scheint mit einer gesteigerten Bedeutung der zentralen Wasserstoffbrücke zu korrelieren. So zeigt die BMP-2 Variante L100K in der Bindung von ActR-IIB_{ecd} L61P eine 5-fach geringere Affinität als zu der alaninsubstituierten Variante. In der Doppelvariante L100K/N102D führt die zusätzliche Mutation N102D zu einer Verstärkung dieses Effekts. Hier führt der Verlust des Hauptkettenamids von ActR-IIB_{ecd} L61 sogar zu einer 11-fach geringeren Affinität und zeigt somit ein ActA-ähnliches Bindungsmuster.

4. Diskussion

4.1 Der signalaktive Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd}

Die BMP-2 Signaltransduktion wird durch die hochaffine Bindung des Liganden an den Typ I Rezeptor und die anschließende Rekrutierung des Typ II Rezeptors initiiert. Zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung dieser Arbeit waren lediglich die Strukturen des ungebundenen Liganden und des intermediären binären Komplexes zwischen BMP-2 (Scheufler et al. 1999) und BMPR-IA_{ecd} (Kirsch et al. 2000; Keller et al. 2004) bekannt. Weiterhin existierten die Kristallstrukturen von intermediären Komplexen aus BMP-7/ActR-II_{ecd}, ActA/ActR-IIB_{ecd} und TGF- β 3/T β R-II_{ecd} (Hart et al. 2002; Greenwald et al. 2003; Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004). Diese Strukturen erlaubten zwar die Modellierung eines ternären Ligand-Rezeptor Komplexes, der experimentelle Beweis stand aber bis dato aus.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Präparation des ternären Komplexes aus BMP-2 und den extrazellulären Domänen von BMPR-IA und ActR-IIB. Das Testen von mehr als 2400 Kristallisationsbedingungen führte zu Kristallen des ternären Komplexes die einen bis zu 1,75 Å hochaufgelösten Datensatz lieferten und die Lösung der Struktur des ternären Komplexes erlaubte.

Die Kristallstruktur zeigt ein BMP-2 Dimer an welches der BMPR-IA_{ecd} im propagierten „wrist“-Epitop und der ActR-IIB_{ecd} auf dem „knuckle“-Epitop gebunden ist. Durch die Art der Kristallpackung wurde allerdings eine Änderung der Stöchiometrie des Komplexes erzwungen. So ist nur eine Seite des dimeren BMP-2 mit jeweils einem Typ I und einem Typ II Rezeptor besetzt (s. Abb. 4.1A). Die Darstellung des physiologischen ternären Komplexes als Heterohexamer (s. Abb. 4.1B) aus einem BMP-2 Dimer und jeweils zwei Molekülen BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} resultiert aus der folgenden Argumentationskette: (1) Durch den symmetrische Aufbau des Liganden stehen jeweils zwei „knuckle“- und „wrist“-Epitope zur Verfügung. In den Kristallstrukturen BMP-2/BMPR-IA_{ecd} (Kirsch et al. 2000) und BMP-7/ActR-II_{ecd} (Greenwald et al. 2003) sind beide Bindeepitope durch den jeweiligen Rezeptor besetzt. (2) Funktionelle Studien mit BMP-2 Heterodimeren zeigen, dass eine vollständige Rezeptoraktivierung nur durch ein heterohexameres

Arrangement erreicht werden kann. (3) Alle biochemischen und biophysikalischen Analysen des in Lösung vorliegenden Komplexes (SDS-PAGE, Reverse Phase HPLC, ITC) zeigen die 1:2:2 (BMP-2: BMPR-IA_{ecd}: ActR-IIB_{ecd}) Stöchiometrie. (4) In unserer Arbeitsgruppe konnte Dr. T. Müller zusammen mit S. Harth die Kristallstruktur des ternären Komplexes der BMP-2 Variante L100K/N102D mit BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} aufklären (Weber et al. 2006). Diese Variante zeigt im Vergleich zum wildtypischen BMP-2 eine 20-fach höhere Affinität zu ActR-IIB_{ecd} und forciert somit die Bildung eines stabileren Komplexes. Dieser Komplex kristallisiert unter neuen Bedingungen (0,2M Ammonium Acetat; 0,1M Tris/HCl, pH 8,5; 25% PEG₃₃₅₀) und die Kristalle weisen im Vergleich zum wildtypischen Komplex eine unterschiedliche Kristallmorphologie aus.

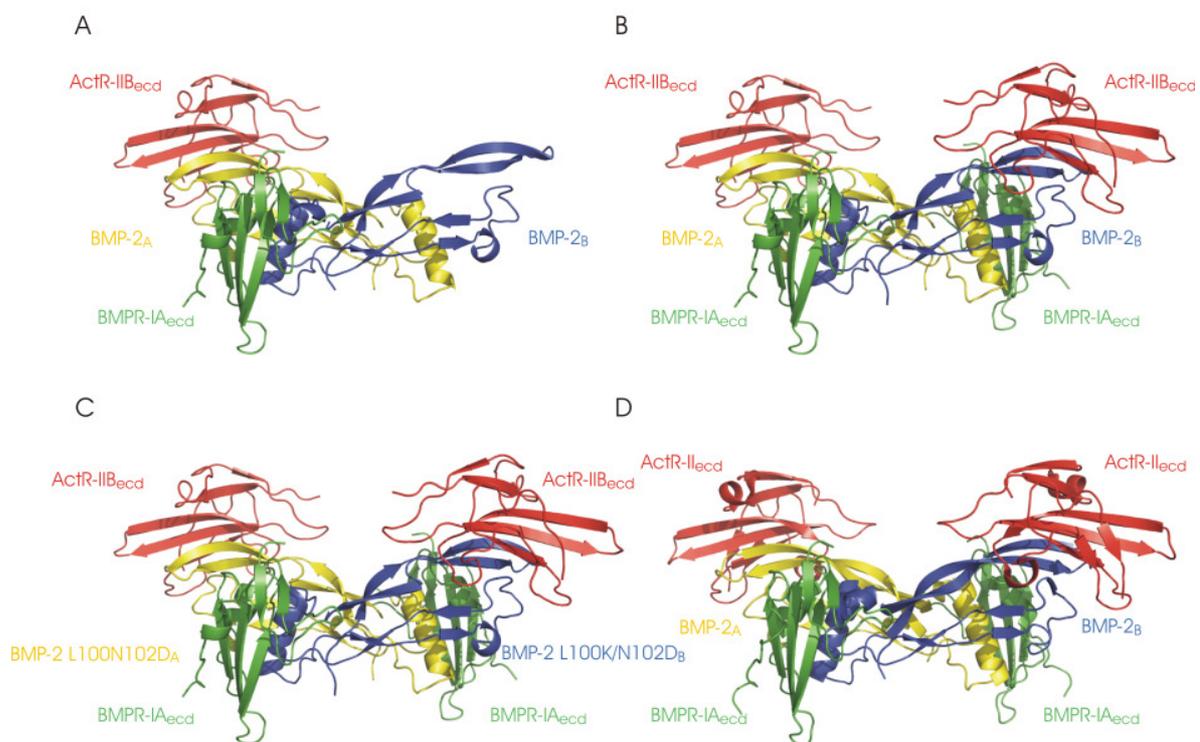


Abbildung 4.1: **A:** Kristallstruktur des ternären Komplexes im stöchiometrischen Verhältnis von 1 BMP-2 Dimer (blau, gelb): 1 BMPR-IA_{ecd} (grün): 1 ActR-IIB_{ecd} (rot). **B:** Strukturmodell des heterohexameren Komplexes im stöchiometrischen Verhältnis von 1 BMP-2 Dimer: 2 BMPR-IA_{ecd} : 2 ActR-IIB_{ecd}. **C:** Kristallstruktur des ternären Komplexes im stöchiometrischen Verhältnis von 1 BMP-2 L100K/N102D Dimer (blau, gelb): 1 BMPR-IA_{ecd} (grün): 1 ActR-IIB_{ecd} (rot) (Weber et al. 2006). **D:** Kristallstruktur des ternären Komplexes aus BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-II_{ecd} (Allendorph et al. 2006).

Die Struktur dieses Komplexes zeigt eindeutig die heterohexamere Zusammensetzung aus einem BMP-2 L100K/N102D Dimer mit jeweils zwei extrazellulären Domänen von BMPR-IA und ActR-IIB (s. Abb. 4.1C). Die Überlagerung der C α -Positionen des heterohexameren Strukturmodells, das aus den experimentellen Daten dieser Arbeit erstellt wurde, mit der Kristallstruktur des „affinitätsgesteigerten“ Komplexes weist eine r.m.s

Abweichung von lediglich $0,3\text{\AA}$ auf. Dieser Wert befindet sich im Bereich des experimentellen Koordinatenfehlers für beide Strukturen. (5) Erst kürzlich wurde die Struktur eines weiteren ternären Komplexes beschrieben. Dieser setzt sich aus den Komponenten BMP-2, BMPR-IA und ActR-II im Verhältnis 1:2:2 zusammen (s. Abb. 4.1D) (Allendorph et al. 2006).

All diese Befunde bestätigen die Gültigkeit der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Charakterisierung der Kristallstruktur oder des Strukturmodells des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd}.

4.2 Spezifität im promiskuitiven „knuckle“-Epitop

Die hier präsentierte Kristallstruktur des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} sowie die Kristallstrukturen der intermediären Komplexe zwischen BMP-7/ActR-II_{ecd} (Greenwald et al. 2003) und ActA/ActR-IIB_{ecd} (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004) wie auch Mutations-/Interaktionsanalysen zwischen BMP-2 und BMPR-II_{ecd} (Kirsch et al. 2000) zeigen die Bindung der Typ II Rezeptoren an das „knuckle“-Epitop der Liganden. Auch das Modulatorprotein Noggin steht mit dem hydrophoben Bereich des „knuckle“-Epitops von BMP-7 in Kontakt (Groppe et al. 2003). Das „knuckle“-Epitop ist offensichtlich promiskuitiv in der Interaktion mit verschiedenen Liganden und Proteintypen. Die Affinitäten dieser Interaktionen weisen allerdings eine sehr hohe Bandbreite auf. So ist die Affinität von ActR-II/ActR-IIB_{ecd} zu ActA ($K_D = \sim 230$ bzw. ~ 60 nM) 100- bis 200-fach höher als die Affinität der beiden Activin Typ II Rezeptoren zu BMP-2 oder BMP-7. Der BMP Typ II Rezeptor besitzt keine ausgeprägte Ligandenspezifität. Hier liegt die apparente Dissoziationskonstante der Wechselwirkung mit allen Liganden um $10\mu\text{M}$. Noggin bindet BMP-2 und BMP-7 mit hoher Affinität ($K_D = 120\text{pM}$). Da dieser Antagonist zusätzlich weitere Kontakte zum Liganden aufweist, kann der Beitrag einer 1:1 Interaktion mit dem „knuckle“-Epitop jedoch nicht genau bestimmt werden (Groppe et al. 2003).

Ein Teilaspekt dieser Arbeit war es, die molekularen Grundlagen von Spezifität und Affinität im „knuckle“-Epitop zu untersuchen. In Tabelle 4.1 sind die wichtigsten intermolekularen hydrophoben und polaren Kontakte der Ligand-Typ II Rezeptor Interaktionen zusammengestellt, die aus den Strukturen der Komplexe BMP-

2/BMPRIA/ActR-IIB, ActA/ActR-IIB (Thompson et al. 2003) und BMP-7/ActR-II (Greenwald et al. 2003) ermittelt werden konnten. Hier wird deutlich, dass die Ligand-Rezeptor Interaktionen in allen drei Fällen von hydrophoben Kontakten dominiert werden, die sowohl auf Liganden als auch auf Rezeptorseite einen hohen Konservierungsgrad aufweisen.

BMP-2	ActR-IIB	ActA	ActR-IIB	BMP-7	ActR-II
direkte Wasserstoffbrücken im Typ II Ligand-Rezeptor Bindeepitop					
A86	E34				
S88	L61	S90 [S88]	L61	S113 [S88]	L61
E96	R46				
	Q80				
E109	K37	E111 [E109]	K37	R134 [E109]	D36
		R87 [S85]	D62	G61 [G37]	N65
		K102 [L100]	C59		
hydrophobe Kontakte im Zentrum des Typ II Ligand-Rezeptor Bindeepitop					
L90	Y42	L92 [L90]	Y42	L115 [L90]	F42
L100		K102 [L100]		L125 [L100]	
L90	S44	L92 [L90]	S44	L115 [L90]	T44
V98	V55	I100 [V98]	V55	V123 [V98]	V55
L90	K56	L92 [L90]	K56	L115 [L90]	K56
V98		I100 [V98]		V123 [V98]	
L100		K102 [L100]		L125 [L100]	
A34	W60	A31 [A34]	W60		W60
S88		P32 [P35]		S113 [S88]	
L90		S90 [S88]		L115 [L90]	
L100		L92 [L90]		L125 [L100]	
A86	L61	P88 [A86]	L61	A111 [A86]	L61
I87				I112 [I87]	
N102		D104 [N102]		K127 [N102]	
P35	D63	P32 [P35]	D63	P59 [P35]	D63
V33	V81	I30 [V33]	V81	F117 [L92]	V81
L90		L92 [L90]		V123 [V98]	
V33	F83	I30 [V33]	F83		F83
A34		A31 [A34]		A58 [A34]	
L90		L92 [L90]		L115 [L90]	

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der wichtigsten polaren Interaktionen und hydrophoben Kontakte (innerhalb 4,5Å) der Ligand-Typ II Rezeptorinteraktionen zwischen BMP2/ActR-IIB_{ecd} (aus dieser Arbeit), ActA/ActR-IIB_{ecd} (Thompson et al. 2003) und BMP-7/ActR-II_{ecd} (Greenwald et al. 2003). Nichtkonservierte Aminosäurereste sind rot hervorgehoben.

Durch Mutations-/Interaktionsanalysen und der isothermalen Titrationskalorimetrie konnte gezeigt werden, dass bei der niederaffinen Interaktion von ActR-IIB_{ecd} mit BMP-2 bzw. BMP-7 der Hauptteil der freien Bindungsenergie von diesen hydrophoben Interaktionen getragen wird. Auch bei der hochaffinen Bindung von ActA an ActR-IIB_{ecd} spielen diese hydrophoben Kontakte eine tragende Rolle.

Das zentrale exponierte Trp60 im ActR-IIB_{ecd} wurde als Hauptdeterminante der Bindung identifiziert. Die Verkürzung der exponierten Seitenkette durch die Alaninsubstitution führt in der Wechselwirkung mit allen drei Liganden zu einem Verlust der freien Bindungsenergie von mehr als 5kcal·mol⁻¹. Die umgebenden Aminosäurereste Phe83, Tyr42, Leu61 und Asp63 tragen durch Abschirmung des Tryptophans vom Lösungsmittel zur Stärkung der Bindung bei. All diese Reste sind in ActR-II absolut konserviert und stellen auch in der Interaktion dieses Rezeptors mit BMP-7 (Greenwald et al. 2003) die Hauptdeterminanten der Bindung. Die wichtige Rolle hydrophober Wechselwirkung konnte auch auf Ligandenseite aufgezeigt werden. In der Mutations-/Interaktionsanalyse von BMP-2 wurden die Reste Ala34, Pro35, Leu90 und Leu100 als Hauptdeterminanten der Bindung zu ActR-II und BMPR-II charakterisiert (Kirsch et al. 2000). Die Abbildung 4.2 soll einen Eindruck über den Aufbau der zentralen hydrophoben Kontaktfläche vermitteln.

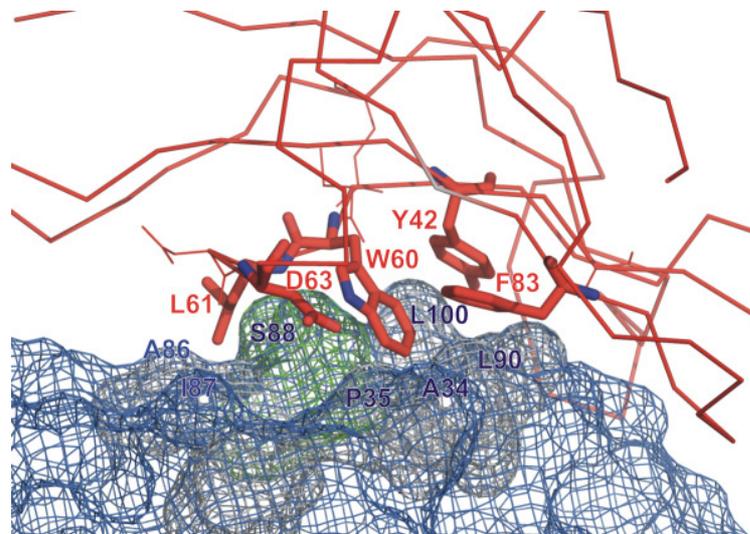


Abbildung 4.2: Ausschnitt aus der Typ II Ligand-Rezeptor Interaktionsfläche aus dem ternären Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd}. Die Oberfläche von BMP-2 ist als Netz abgebildet, das Rückgrat von ActR-IIB_{ecd} ist als rote Linie dargestellt. Die zentralen hydrophoben Aminosäurereste sind rot eingezeichnet.

Zusätzlich können in der Kontaktfläche zwischen BMP-2 und ActR-IIB_{ecd} zahlreiche polare Wechselwirkungen identifiziert werden. Sie spielen aber bei dieser niederaffinen Interaktion nur eine untergeordnete Rolle, da deren Eliminierung nur geringe Affinitätsänderungen zur Folge haben. Insbesondere die peripheren Wasserstoffbrücken liefern nur einen marginalen Beitrag zur Bindung. Aber auch die zentrale Wasserstoffbrücke zwischen BMP-2 Ser88(OG) und ActR-IIB_{ecd} Leu61(N) stellt keine Hauptbindungs determinante dar. Eine Eliminierung dieser polaren Interaktion durch die Alaninsubstitution von BMP-2 Ser88 (Kirsch et al. 2000) oder die Prolinsubstitution von ActR-IIB_{ecd} Leu61 führt lediglich zu einer Reduktion der Affinität um den Faktor 3 - 8.

Im Gegensatz zur niederaffinen Interaktion der BMPs mit ihren Typ II Rezeptoren kommt der zentralen Wasserstoffbrücke in der hochaffinen Bindung von ActA mit ActR-IIB_{ecd} eine Hauptrolle zu. Die Prolinsubstitution von ActR-IIB_{ecd} L61 führt zu einem Verlust der freien Bindungsenergie von $4,7\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, was diese Wasserstoffbrücke als Hauptbindungs determinante klassifiziert. Auch bei der Mutationsanalyse von ActA wurde die tragende Rolle dieser polaren Interaktion beschrieben. Die Punktmutation von ActA Ser90 (entspricht BMP-2 Ser88) führt zu einer dramatischen Einbuße der biologischen Aktivität des Liganden (Harrison et al. 2003).

Die Ursache dieses ligandenspezifischen Beitrages der zentralen Wasserstoffbrücke wurde mit einem partiellen Domainswapping näher untersucht. Dazu wurden BMP-2 Chimären mit nichtkonservierten Aminosäureresten aus ActA hergestellt. So kann gezeigt werden, dass die Umwandlung des BMP-2 „knuckle“-Epitops von einer niedrigen zu einer hochaffinen Interaktionsfläche von nur einem Aminosäurerest bestimmt wird. Hier führt die Substitution von BMP-2 Leu100 mit Lysin zu einer 10-fach höheren Affinität zu ActR-IIB_{ecd}. Wird im BMP-2 zusätzlich Asn102 durch Asp ersetzt, entspricht die Interaktion nahezu der hochaffinen Interaktion von ActA mit dem Typ II Rezeptor.

Anhand eines „double-mutant-cycles“ kann gezeigt werden, dass die Erhöhung der Affinität durch die Lysinsubstitution von Leu100 mit der Stabilisierung der zentralen Wasserstoffbrücke zwischen BMP-2 S88(OG) und ActR-IIB_{ecd} Leu61(N) korreliert. Durch den Vergleich der Strukturen von BMP-2/BMPRII_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} und ActA/ActR-IIB_{ecd} in Abbildung 4.3A/B kann dieses Phänomen erklärt werden. In den Strukturen des binären Komplexes ActA/ActR-IIB_{ecd} bilden ActA Lys102 und Asp104 eine stabile intramolekulare Salzbrücke (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004). Dadurch werden diese Reste im Vergleich der umgebenden Aminosäuren fixiert. Die immobilisierte Seitenkette des Lysins stellt einen besseren hydrophoben Kontakt zur Verfügung und kann

zusammen mit weiteren hydrophoben Resten die zentrale Wasserstoffbrücke abschirmen. Die korrespondierenden Reste von BMP-2 Leu100 und Asn102 zeigen eine vergleichsweise hohe Flexibilität, da sie im Vergleich mit Aminosäureresten in ihrer unmittelbaren Umgebung erhöhte Temperaturfaktoren aufweisen.

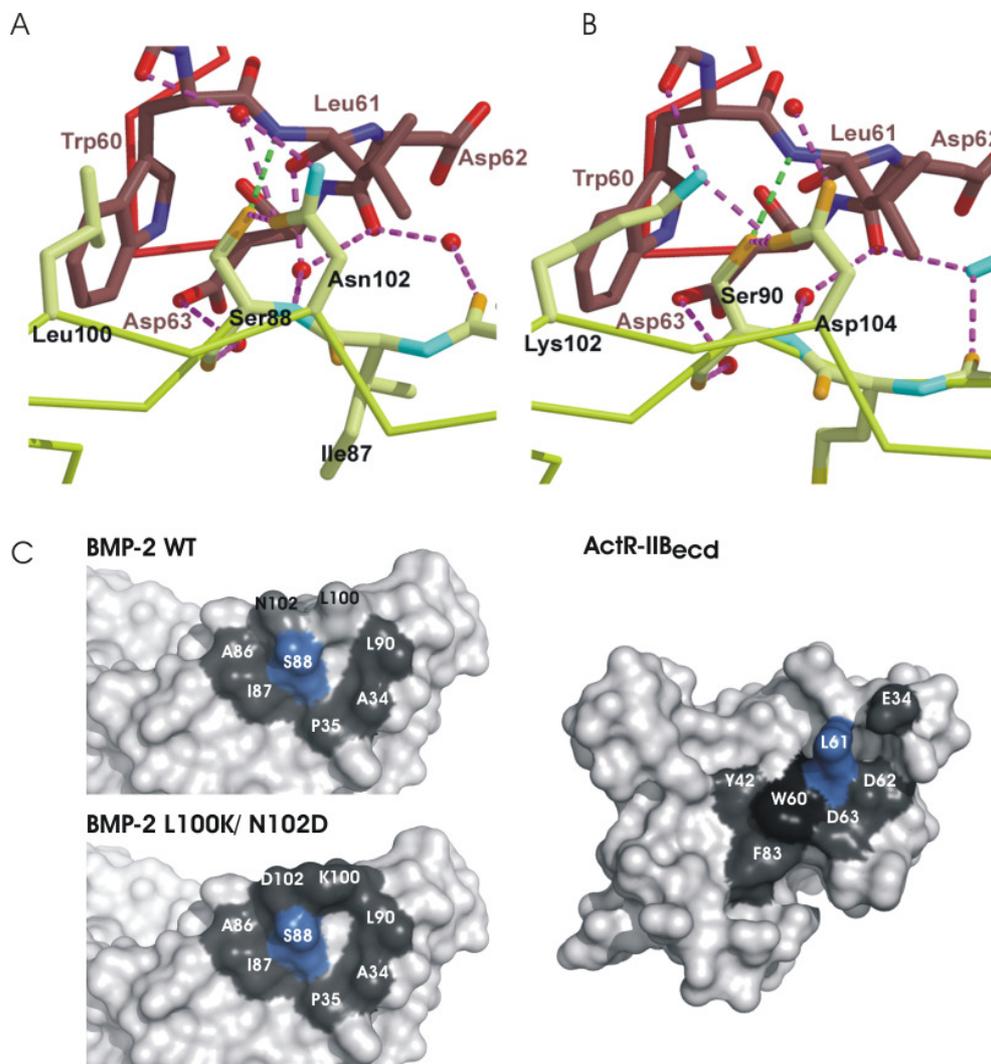


Abbildung 4.3: Vergleich der strukturellen Umgebung der zentralen Wasserstoffbrücke in den Komplexen zwischen (A) BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd}, (B) ActA/ActR-IIB_{ecd} (Greenwald et al. 2004)

C: Oberflächenmodell zur Darstellung der Hauptdeterminanten der Interaktion zwischen ActR-IIB_{ecd} mit BMP-2 WT (oben) oder BMP-2 L100K/N102D (unten). Der O-Ring aus hydrophoben Aminosäureresten ist dunkelgrau dargestellt, das „knob into hole“-Motiv zwischen Trp60 und der Vertiefung im BMP-2 ist schwarz eingezeichnet. Die blau hervorgehobenen Aminosäurereste BMP-2 S88 und ActR-IIB_{ecd} L61 bilden die Wasserstoffbrücke im Zentrum des O-Rings.

Durch die Substitution von BMP-2 L100 mit Lysin kann dieses nun eine Wasserstoffbrücke mit BMP-2 Asn102 ausbilden, was zur Fixierung des Restes führt. Durch eine zusätzliche Substitution von Asn102 durch Asp wird diese Wasserstoffbrücke in eine Salzbrücke umgewandelt, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung führt. Diese Hypothese konnte von T. Müller durch die Kristallstruktur des ternären Komplexes BMP-2

L100K/N102D/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} bestätigt werden. Im Vergleich zu den korrespondierenden Resten im wildtypischen BMP-2 zeigen Lys100 und Asp102 erniedrigte Temperaturfaktoren, was auf eine Immobilisierung schließen lässt (Weber et al. 2006). Die Organisation der hochaffinen Bindung zwischen ActA bzw. BMP2 L100K/N102D mit ActR-IIB_{ecd} der Bindung kann durch das „O-Ring-Prinzip“ (Bogan and Thorn 1998) erklärt werden (s. Abb 4.3C). Hier ist eine polare Interaktion im Zentrum eines meist glatten Bindeepitopes lokalisiert, die von hydrophoben Aminosäureresten umgeben ist. Die Abschirmung vom Lösungsmittel führt zur Stärkung der Wasserstoffbrücke. Diese Hypothese wird durch Mutationsanalysen von ActA gestützt. Dabei führt die Substitution von Lys102 oder Ser90 (entspricht BMP-2 Ser88) zu Ala zum Bindungsverlust zu ActR-IIB_{ecd} und einer dramatischen Einbuße der biologischen Aktivität (Wuytens et al. 1999; Harrison et al. 2004; Cook et al. 2005).

An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass die Lysinsubstitution von Leu100 ausschließlich zur Erhöhung der Affinität zum ActR-IIB_{ecd} führt. Die Bindung zu ActR-II_{ecd} oder BMPR-II_{ecd} bleibt unbeeinflusst. Die Doppelvariante BMP-2 L100K/N102D zeigt ein ähnliches Bindungsmuster. Die Affinität zu ActR-IIB_{ecd} wird durch die Substitutionen stark erhöht, die Bindung zu BMPR-II_{ecd} bleibt unbeeinflusst. Die Änderung der Spezifität im „knuckle“-Epitop durch den Austausch von nur einer Aminosäure kann auch bei der Substitution Ser85 mit Arginin oder in weniger ausgeprägter Form bei der Variante BMP-2 A86P beobachtet werden. Die BMP-2 Varianten mit diesen Mutationen zeigen eine erhöhte Affinität zum BMPR-II, die Bindung der Activin Typ II Rezeptoren bleibt aber unbeeinflusst. Durch die Kombinatorik des Austausches von nur 4 Aminosäureresten können folglich Varianten hergestellt werden, die im Vergleich mit wildtypischen BMP-2 völlig unterschiedliche Präferenzen in der Typ II Rezeptor Bindung aufweisen. Während wildtypisches BMP-2 bevorzugt an ActR-IIB_{ecd} bindet, zeigt die Variante BMP-2 S85R eine Präferenz für BMPR-II. Diese hochspezifischen BMP-2 Varianten könnten als Werkzeuge zur Aufklärung von Typ II Rezeptor spezifischen Signalwegen dienen.

So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass trotz der beobachteten Promiskuität der Interaktion von BMP-2 mit ActR-II, ActR-IIB oder BMPR-II die spezifische Erkennung und Bindung eines bestimmten Typ II Rezeptors von einzelnen Aminosäuren abhängig sind. Hier ist zu betonen, dass diese Änderungen nicht durch die Manipulation der zentralen Wasserstoffbrücke oder wichtiger hydrophober Kontaktreste entstehen, sondern durch den Austausch einzelner peripherer Reste zustande kommen.

4.3 Die Rezeptoraktivierung von BMP-2 unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie

In den letzten Jahren rückte der Mechanismus der Aktivierung von Rezeptoren mit einer einfachen Transmembrandomäne in den Blickpunkt wissenschaftlichen Interesses. Für die unterschiedlichen Liganden der TGF- β Superfamilie wurden verschiedene Modelle zur Zusammenlagerung der signalaktiven Ligand-Rezeptor Komplexe vorgeschlagen (Hart et al. 2002; Greenwald et al. 2003; Zuniga et al. 2005). Anhand dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammenlagerung von BMP-2 mit BMPR-IA_{ecd} und ActR-IIB_{ecd} in wichtigen Aspekten von anderen TGF- β Familienmitgliedern unterscheidet.

In der experimentell ermittelten Struktur des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd} lassen sich keine direkten Kontakte zwischen den extrazellulären Domänen der Typ I und Typ II Rezeptoren feststellen (s. Abb 4.4A). Die geringste Entfernung zwischen den jeweiligen C-Termini beträgt hier 38Å. Im Gegensatz dazu scheinen für die TGF- β -Rezeptoraktivierung Kontakte zwischen den unterschiedlichen Rezeptorketten essentiell zu sein.

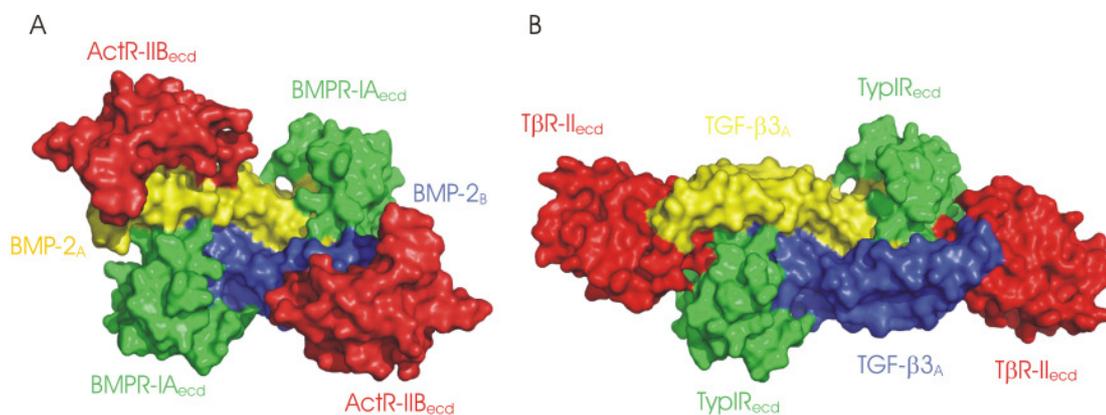


Abbildung 4.4: A: Oberflächendarstellung der Struktur des ternären Komplexes BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd}. B: Modell eines hypothetischen ternären TGF- β Komplexes. Das Modell basiert auf der Überlagerung des Komplexes TGF- β 3/T β R-II_{ecd} (Hart et al. 2002) mit dem ternären Komplex BMP-2/BMPR-IA_{ecd}/ActR-IIB_{ecd}.

Unter der Annahme, dass auch TGF- β s den T β R-I im „wrist“-Epitop binden, kann ein Modell aus der Kombination der intermediären Komplexes TGF- β /T β R-II (Hart et al. 2002) und BMPR-IA_{ecd} (Kirsch et al. 2000) erstellt werden (s. Abb. 4.4B). Aufgrund der

Lage des Bindeepitops für den T β R-II auf den Fingerspitzen des Liganden stehen hier die Typ I und Typ II Rezeptoren in Kontakt miteinander (Hart et al. 2002). *In vitro* Bindungsstudien zeigen, dass der niederaffine T β R-I nur die intermediären Komplexe aus TGF- β und T β R-II aber nicht den Liganden oder den Typ II Rezeptor alleine binden kann (Zuniga et al. 2005). Folglich ist hier für die Rekrutierung der niederaffinen Rezeptorkette eine kombinierte Wechselwirkung mit Ligand und Rezeptor notwendig (Zuniga et al. 2005).

Ein weiterer Unterschied liegt in der Reihenfolge der Bindung der beiden Rezeptortypen. Im Gegensatz zu TGF- β s und Activinen wird BMP-2 zuerst hochaffin von den Typ I Rezeptoren BMPR-IA oder BMPR-IB auf der Zelloberfläche gebunden (Sebald et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Bindungsanalysen mit immobilisiertem BMP-2 die 1:1 Interaktionen des Liganden mit seinen Rezeptoren untersucht. Diese Versuchsanordnung repräsentiert den ersten Schritt der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung auf der Zellmembran. Hier zeigt die Bindung von BMP-2 an BMPR-IA_{ecd} eine 100-fach höhere Affinität ($K_D \approx 12 - 30\text{nM}$) als die Interaktion des Liganden mit seinen Typ II Rezeptoren ActR-II_{ecd}/-IIB_{ecd} und BMPR-II_{ecd} ($K_D \approx 3 - 25\mu\text{M}$). Eine Messanordnung mit immobilisierten Rezeptoren entspricht einer 2:1 Interaktion, da hier der Ligand an zwei Rezeptorketten gleichzeitig binden kann. Unter diesen Bedingungen liegen die Affinitäten von BMP-2 für die Bindungen der Typ I und Typ II Rezeptoren im selben Bereich (BMP-2/BMPR-IA_{ecd}: $K_D \approx 1\text{nM}$; BMP-2/ActR-IIB_{ecd}: $K_D \approx 5\text{nM}$). Allerdings beruht dieser enorme Aviditätseffekt größtenteils auf einer unverhältnismäßig hohen Rezeptordichte auf der Oberfläche des Biosensor-Chips (Greenwald et al. 2003), die keinesfalls der Rezeptordichte auf einer Zelloberfläche entspricht. Als weiteres Kriterium für die initiale Bindung von BMP-2 an BMPR-IA_{ecd} kann die Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) angeführt werden. Im intermediären Ligand-Typ I Rezeptorkomplex ist die Dissoziationsgeschwindigkeit um ein 100-faches langsamer als bei Interaktion von BMP-2 mit ActR-IIB_{ecd} (BMP-2/BMPR-IA_{ecd}: $k_{\text{off}} \approx 1 \cdot 10^{-3}\text{s}^{-1}$; BMP-2/ActR-IIB_{ecd}: $k_{\text{off}} \approx 1 \cdot 10^{-1}\text{s}^{-1}$; Nickel & Sebald, unpublizierte Daten). Diese Werte resultieren in einer Halbwertszeit zwischen 10-15min für den BMP-2/Typ I Rezeptorkomplex und weniger als 5s für die BMP-2/ActR-IIB_{ecd} Wechselwirkung. Somit kann eine effiziente Rekrutierung von BMP-2 auf die Zellmembran nur durch den hochaffinen BMPR-IA_{ecd} und nicht durch den Typ II Rezeptor erfolgen. Dieser Befund kann mit Experimenten in Zellen unterstrichen werden. Hier kann die Quervernetzung von Typ II Rezeptoren mit BMP-2/-4 durch die Anwesenheit von Typ I Rezeptoren stark verstärkt werden (Koenig et al. 1994; Letsou et

al. 1995; Macias-Silva et al. 1998; Rebbapragada et al. 2003). Im Activin oder TGF- β System repräsentieren die Typ II Rezeptoren den bevorzugten Interaktionspartner, was verglichen mit BMP-2 zu einer umgekehrten Bindungsreihenfolge führt. Diese Liganden zeigen eine hohe Affinität zu den Typ II Rezeptoren während die Bindung der Typ I Rezeptoren T β RI bzw. ActR-IB in Abwesenheit der Typ II Rezeptoren nicht nachweisbar ist (Attisano et al. 1993; Ebner et al. 1993; Bassing et al. 1994). BMP-7 scheint im Zusammenhang der Bindungsreihenfolge einen speziellen Fall darzustellen, da für diesen Liganden bisher kein Rezeptortyp mit den Eigenschaften eines hochaffinen Bindungspartners gefunden werden konnte. Die Bindung von BMP-7 an ActR-IIB weist ähnlich dem BMP-2 eine Bindungskonstante im niedrigen mikromolaren Bereich auf. Zusätzlich hat dieser Ligand nur eine geringe Affinität zu den Typ I Rezeptoren BMPR-IA sowie BMPR-IB, vermittelt sein Signal aber über ActR-I, zu dem der Ligand keine messbare Affinität zeigt (Macias-Silva et al. 1998). Vielleicht ist hier, analog dem Zusammenwirken von Cripto und Nodal (Yeo and Whitman 2001), ein Korezeptor notwendig um die Affinität von BMP-7 zu ActR-II oder ActR-IIB zu erhöhen.

Eine dritte Besonderheit des BMP-2-Systems ist das Ausbleiben tiefgreifender Änderungen der Rückgrat-Konformation bei der Bildung des signalgebenden Ligand-Rezeptor Komplexes. Sowohl die Tertiärstruktur des Monomers als auch die Architektur des Dimers ist im ungebundenen BMP-2 (Scheufler et al. 1999) nahezu identisch mit dem intermediären binären Komplex mit BMPR-IA (Kirsch et al. 2000; Keller et al. 2004) und dem hier vorgestellten ternären Komplex (s. Abb. 4.5C). Auch zwischen der freien und der im Komplex mit ActR-II vorliegenden Form von BMP-7 sind außer der lokal begrenzten Umlagerung einer Schleife keine umfassenden strukturellen Änderungen festzustellen (Greenwald et al. 2003). Die Starrheit von BMP-2 und BMP-7 bildet einen gravierenden Unterschied im Vergleich zu ActA und TGF- β 3. Wie in Abbildung 4.5A/B dargestellt, können diese in sehr unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Das ungebundene TGF- β 3 liegt in einer gestreckten schmetterlingsartigen Konformation vor (Mittl et al. 1996). In der Kristallstruktur des binären Komplexes TGF- β 3/T β R-II_{ecd} sind die Untereinheiten des Liganden um 101° zueinander verdreht (Hart et al. 2002). Im Modell des ternären Komplexes nimmt der TGF- β Ligand erneut eine gestreckte Konformation ein. ActA liegt im ungebundenen Zustand in einer gestreckten Konformation vor (Harrington et al. 2006). Im binären Komplex mit ActR-IIB_{ecd} zeigt ActA eine hohe Flexibilität (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004), während für den ternären Komplex wieder eine gestreckte Konformation angenommen wird.

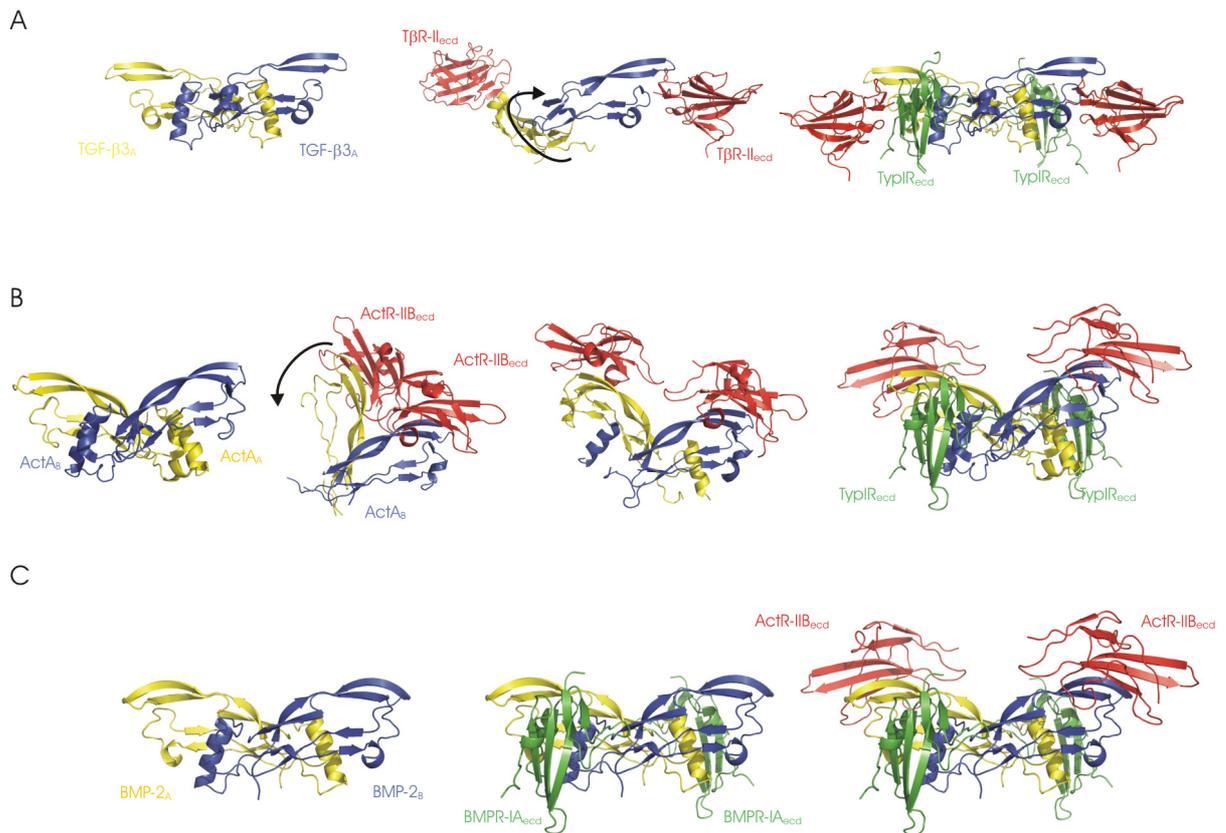


Abbildung 4.5: Bänderdarstellungen zur Veranschaulichung der Rezeptoraktivierung durch Mitglieder der TGF- β Superfamilie. **A:** von links nach rechts: Ungebundenes TGF-3 (Mittl et al. 1996). Binärer Komplex TGF- β 3/T β R-II_{eccd} (Hart et al. 2002). Modell des ternären Komplexes TGF- β 3/T β R-II_{eccd}/BMPR-IA_{eccd}. Das Modell basiert auf der Überlagerung des Komplexes TGF- β 3/T β R-II_{eccd} (Hart et al. 2002) dem ternären Komplex BMP-2/BMPR-IA_{eccd}/ActR-IIB_{eccd}. Als Typ I Rezeptor wurde der BMPR-IA_{eccd} in das „wrist“-Epitop des Liganden modelliert. **B:** von links nach rechts: Ungebundenes ActA (Harrington et al. 2006). Zwei unterschiedliche binäre Komplexe ActA/ActR-IIB_{eccd} (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004). Modell des ternären Komplexes ActA/ActR-IIB_{eccd}/BMPR-IA_{eccd}. Das Modell basiert auf der Überlagerung des dimeren ActA (Harrington et al. 2006) mit einem ActA-Monomer gebunden an ActR-IIB_{eccd} (Greenwald et al. 2004). Als Typ I Rezeptor wurde der BMPR-IA_{eccd} in das „wrist“-Epitop des Liganden modelliert. **C:** von links nach rechts: Ungebundenes BMP-2 (Scheufler et al. 1999). Binärer Komplex BMP-2/BMPR-IA_{eccd} (Kirsch et al. 2000; Keller et al. 2004). Ternärer Komplex BMP-2/BMPR-IA_{eccd}/ActR-IIB_{eccd}.

Hier wird deutlich, dass die Umlagerungen in ActA und TGF- β immer in den mutmaßlichen Typ I Rezeptorbindeepitopen stattfinden. Die Typ II Bindungsepitope von ActA („knuckle“-Epitop) oder TGF- β 3 (Fingerspitzen) sind von den Änderungen nicht betroffen. Das „wrist“-Epitop von TGF- β 3 liegt im binären Komplex mit T β R-II ungeordnet vor (Hart et al. 2002). In der geschlossenen Konformation des binären Komplexes von ActA mit ActR-IIB ist das „wrist“-Epitop sogar zweigeteilt (Thompson et al. 2003). Ob die in den Kristallstrukturen auftretenden Konformationsänderungen direkte Auswirkungen auf die Bindung des Typ I Rezeptors haben, konnte bisher nicht eindeutig

geklärt werden. Mit den vorliegenden funktionellen Daten kann nicht klar gezeigt werden, ob die Lage der Typ I Rezeptorbindungsstellen in BMP-2, ActA und TGF β 3 identisch sind (Harrison et al. 2004; Cook et al. 2005). Weiterhin lassen Bindungsanalysen von TGF- β 3 mit T β R-I und T β R-II den Schluss zu, dass die Struktur sowohl der Typ II als auch der Typ I Bindungsstellen aufrechterhalten werden (Zuniga et al. 2005; De Crescenzo et al. 2006). Wie beschrieben, führt die Bindung von BMP-2 an die Rezeptoren zu keinen tiefgreifenden strukturellen Veränderungen im Rückgrat des Liganden. Allerdings zeigt der Vergleich der freien und gebundenen Konformation von BMP-2 kleinere Umlagerungen in der Pre-Helix Schleife im „wrist“-Epitop und im β -Faltblatt des zweiten Fingers. Die Flexibilität der Pre-Helix Schleife wurde bereits für BMP-2 und BMP-7 in ihren jeweiligen binären Komplexen beschrieben (Kirsch et al. 2000; Greenwald et al. 2003) und kann auch im ternären Komplex beobachtet werden. Die Pre-Helix Schleife befindet sich direkt im Typ I Rezeptor Bindeepitop. Sie beinhaltet die Hauptbindungs determinanten zum BMPR-IA_{ecd} (BMP-2 L51, D53) (Keller et al. 2004). Im GDF-5 ist die Seitenkette von Arg57 für die Diskriminierung zwischen BMPR-IA und BMPR-IB verantwortlich, welches ebenfalls in dieser Schleife liegt (Nickel et al. 2005). Bei den TGF- β s ist diese Schleife um drei Aminosäuren kürzer, in ActA ist sie um drei Aminosäuren länger als in BMP-2. Die Flexibilität und die Variabilität dieser Schleife scheinen somit sehr wichtig für die Spezifität der Typ I Rezeptor Interaktion zu sein. Gerade die Verformbarkeit dieses Segments erlaubt den von Keller et al. vorgeschlagenen lokalen „Induced-Fit“ Mechanismus für die Typ I Rezeptorbindung (Keller et al. 2004). Die Flexibilität dieser Schleife könnte auch die ausgesprochen niedrige Assoziationsgeschwindigkeit der BMPR-IA_{ecd}/BMP-2 Interaktion von $k_{on} = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erklären, die durch Mutationen in diesem Bereich (z.B. BMP-2 F49, P50) weiter gesenkt werden kann (Kirsch et al. 2000). An dieser Stelle ist aber unbedingt zu betonen, dass die Umlagerung der Pre-Helix Schleife lokal auf das „wrist“-Epitop beschränkt ist und sich nicht über das β -Faltblatt fortsetzt. Die Interaktion von BMPR-IA_{ecd} mit BMP-2 hat somit keinen allosterischen Effekt auf die Bindung des Typ II Rezeptors.

Im ternären Komplex sind auch im β -Faltblatt des zweiten Fingers kleine Konformationsänderungen zu beobachten. Die Verschiebung der C α -Atome der Aminosäurereste Ala86 bis Ser88 und Leu100 bis Asp105 um 0,7-1,9 Å wird zum „wrist“-Epitop weitergeleitet und führt zur Änderung des Neigungswinkels von BMPR-IA_{ecd} um 8°. Die Möglichkeit eines kooperativen Einflusses der Reorientierung von BMPR-IA_{ecd} auf die Bindung des Typ II Rezeptors konnte durch Interaktionsanalysen ausgeschlossen

werden. Hier konnte klar gezeigt werden, dass die Affinität von ActR-IIB_{ecd} zu BMP-2 von der Wechselwirkung mit BMPR-IA_{ecd} nicht beeinflusst wird. So bleibt die physiologische Konsequenz der Bewegung des Typ I Rezeptors auf BMP-2 durch die Bildung des ternären Komplexes mit ActR-IIB_{ecd} unklar und bedarf weiterer Untersuchung. Interessanterweise kann in der Struktur des Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA_{ecd} und ActR-II_{ecd} (Allendorph et al. 2006) diese Reorientierung des Typ I Rezeptors nicht beobachtet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Verschiebung des C α -Rückgrats im zweiten Finger des Liganden möglicherweise von der Natur des gebundenen Typ II Rezeptors abhängig ist.

4.4 Die Rezeptorbindung von BMP-2 repräsentiert einen minimalen Mechanismus der Kooperativität innerhalb der TGF- β Superfamilie

Die Mechanismen der Rezeptoraktivierung von BMPs, Activinen und TGF- β s wurden bereits im Abschnitt 4.3 beschrieben. Trotz der hier auftretenden Unterschiede liegt in allen drei Systemen eine auf Zellen beobachtete Kooperativität für die Interaktion mit den niederaffinen Rezeptoren in der Membran vor. BMPs, Activine und TGF- β s binden ihre niederaffinen Rezeptoren erst mit hoher Effizienz, wenn der Ligand an die hochaffinen Rezeptoren gebunden hat (Massague 1998).

Nach dem gegenwärtigen Modell kann ActA in seiner geknickten Konformation lediglich an eine einzige hochaffine ActR-IIB Rezeptorkette auf der Membranoberfläche binden (Thompson et al. 2003; Greenwald et al. 2004). In dieser geschlossenen Konformation ist das funktionelle Typ I Rezeptor Bindeepitop noch nicht ausgeformt. Die Teilung in zwei Hälften macht die Bindung des Typ I Rezeptors unwahrscheinlich. Durch die Bindung einer zweiten ActR-IIB Rezeptorkette wird die Struktur von ActA in der gestreckten Form stabilisiert. In dieser Konformation wird das funktionelle „wrist“-Epitop gebildet; die Bindung des niederaffinen ActR-IB kann nun bewerkstelligt werden. Dieser Mechanismus schließt die Zellmembran als wichtige Komponente zum Zustandekommen der Bindung und somit der Initiation des Signals mit ein.

Für das TGF- β System wird ein anderer Mechanismus zur Erklärung der Kooperativität vorgeschlagen (Zuniga et al. 2005). Die Kontaktfläche zwischen TGF- β 3 und T β R-II unterscheidet sich vom Kontakt zwischen Activinen und BMPs mit ihren Typ II

Rezeptoren. Bei BMPs und Activinen liegt die Typ II Rezeptor-Bindungsstelle im „knuckle“-Epitop, während sie beim TGF- β 3 in Richtung der Fingerspitzen verschoben ist. Das Modell des ternären Komplexes zwischen TGF- β 3, T β R-II und BMPR-IA (s. Abb. 4.4B) lässt einen direkten Kontakt zwischen den Ektodomänen der Typ I und Typ II Rezeptoren erkennen, mit dem sich das kooperative Verhalten erklären lässt (Hart et al. 2002). Die Bindung von T β R-I zu TGF- β 3 wird also erst durch die gleichzeitige Interaktion mit dem Typ II Rezeptor ermöglicht (Zuniga et al. 2005).

Auf die Ligand-Rezeptor Komplexbildung von BMP-2 ist weder der für ActA, noch der für die TGF- β s vorgeschlagene Mechanismus übertragbar. Hier muss ein weiterer Mechanismus des Zustandekommens der Kooperativität bei der Rekrutierung des niederaffinen Rezeptors in Betracht gezogen werden. Die Zusammenlagerung von BMP-2 mit seinen Rezeptoren könnte hier einen minimalen Mechanismus repräsentieren, bei dem allein die Reduktion der Freiheitsgrade durch Lokalisation in der Membran die Rekrutierung der niederaffinen Rezeptorkette erlaubt (s. Abb. 4.6)

Dabei wird zunächst die lokale BMP-2 Konzentration auf der Membranoberfläche durch die Bindung an den hochaffinen Rezeptor BMPR-IA erhöht (Schritt 1). Die bivalente Interaktion des dimeren Liganden mit zwei hochaffinen Rezeptorketten erhöht zusätzlich die effektive Affinität (Avidität) und führt so zu einem sehr stabilen intermediären Komplex mit einer langen Halbwertszeit. Die Möglichkeit einer Begegnung dieses intermediären Komplexes mit dem niederaffinen Typ II Rezeptor ist nun auf der Membranoberfläche durch die Reduktion der Freiheitsgrade durch Lokalisation stark erhöht (Schritt 2) (Schlessinger et al. 1995; Sebald and Mueller 2003; Sebald et al. 2004).

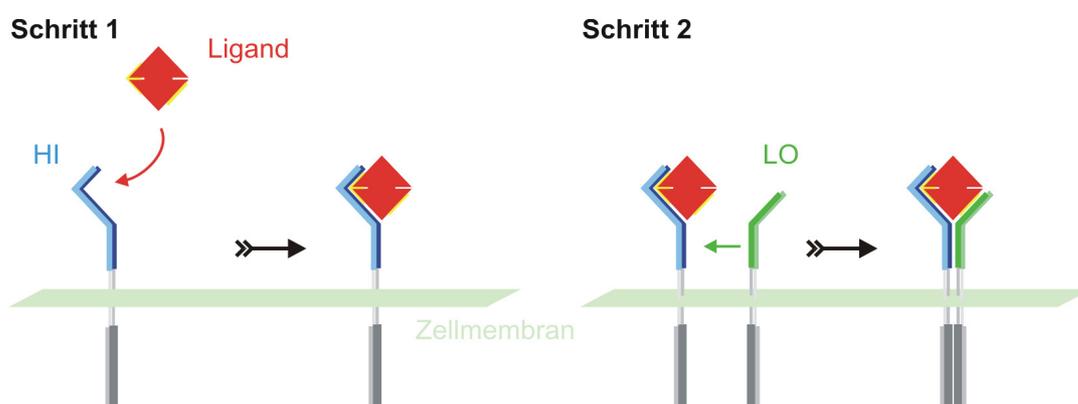


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Basismechanismus der Kooperativität die Reduktion der Freiheitsgrade durch Lokalisation in der Membran nach Sebald et al. (Sebald et al. 2004). HI: hochaffiner Rezeptor; LO: niederaffiner Rezeptor.

Diese Reduktion der Freiheitsgrade durch Lokalisation ist natürlich nicht ausschließlich auf die BMPs beschränkt. Auch Activine und TGF- β s folgen diesem Prinzip, aber bei diesen Familien kommen zusätzliche kooperative Mechanismen wie große Konformationsänderungen (ActA) oder zusammengesetzte Bindungsstellen (TGF- β 3) hinzu. Das Fehlen zusätzlicher kooperativer Effekte könnte die vergleichsweise gering ausgeprägte Kooperativität von BMP-2 zu den niederaffinen Typ II Rezeptoren erklären. Denn während BMP-2 seine niederaffinen Rezeptoren ActR-II/-IIB, bzw. BMPR-II mit einer Affinität im mikromolaren Bereich bindet, zeigen die niederaffinen Typ I Rezeptoren der Activine oder TGF- β keine messbare Affinität zu ihren Liganden.

5. Zusammenfassung

„Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) kontrollieren eine Vielzahl unterschiedlichster Prozesse bei der Embryonalentwicklung und der postnatalen Gewebemöostase. Wie TGF- β s, Activine und andere Mitglieder der TGF- β Superfamilie vermitteln BMPs ihr Signal durch die Bildung eines aus dem Liganden und zwei Rezeptorsubtypen bestehenden Signalkomplexes. Für die Rezeptoraktivierung ist ein Zwei-Schritt Mechanismus allgemein akzeptiert. Bisher wurde nur der erste Schritt, die Bindung des Liganden an seinen hochaffinen Rezeptor, strukturell untersucht. Der molekulare Mechanismus der anschließenden Rekrutierung des niederaffinen Rezeptortyps war bisher nicht bekannt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Präparation, Kristallisation und Strukturaufklärung des ternären Komplexes aus BMP-2 und den extrazellulären Domänen von BMPR-IA und ActR-IIB. Mit der Kristallstruktur dieses ternären Komplexes kann erstmals der Mechanismus der BMP Rezeptoraktivierung von der Bindung des Liganden bis hin zur Transaktivierung untersucht werden. Der Ligand BMP-2 präsentiert sich hier, im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie, als nahezu starre Komponente, um welche die beiden Rezeptortypen symmetrisch angelagert werden. Zwischen den extrazellulären Domänen der Rezeptoren können keine direkten Kontakte beobachtet werden. Die in Zellen beobachtete Kooperativität bei der Rekrutierung des niederaffinen Rezeptors im BMP-2 System ist folglich weder durch allosterische Effekte, noch durch direkte Rezeptor-Rezeptor-Kontakte erklärbar. Vielmehr repräsentiert die Bindung des niederaffinen Rezeptors von BMP-2 einen Minimalmechanismus, bei dem Kooperativität über die Verringerung der Freiheitsgrade durch Lokalisation des Liganden in der Zellmembran erzeugt wird.

Die durchgeführten Mutations-/Interaktionsanalysen erlauben vertiefende Einblicke wie Affinität und Spezifität im BMP/Activin-System generiert werden. Es zeigt sich, dass sowohl bei der niederaffinen Interaktion von ActR-IIB_{ecd} mit BMP-2 bzw. BMP-7 als auch bei der hochaffinen Bindung von ActA mit ActR-IIB_{ecd} ein Großteil der freien Bindungsenergie von denselben hydrophoben Interaktionen getragen wird. Während polare Interaktionen bei der niederaffinen Bindung der BMPs an ActR-IIB_{ecd} kaum eine Rolle spielen, stellt die zentrale Wasserstoffbrücke zwischen ActA Ser90(OG) und ActR-IIB Leu61(N) bei der Bildung des Komplexes ActA/ActR-IIB_{ecd} eine entscheidende Determinante der hochaffinen Bindung dar.

BMP-2 bindet an die Typ II Rezeptoren BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB mit nahezu identischer Affinität, daher wird eine promiske Verwendung dieser Rezeptoren angenommen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die spezifische Erkennung und Bindung der Typ II Rezeptoren durch den Austausch einzelner Aminosäuren modulierbar ist. Mit den hier gewonnenen Kenntnissen über den molekularen Mechanismus der Typ II Rezeptorerkennung ist nun eine Generierung von BMPs mit definierter Typ II Rezeptorspezifität möglich. Diese BMP-2 Varianten können als Werkzeuge zur Aufklärung von Typ II Rezeptor-spezifischen Signalwegen verwendet werden. Ebenso wäre es denkbar, BMP-2 Varianten mit ausgeprägter Typ II Rezeptor Spezifität in vivo zur Modulation TypII Rezeptor spezifischer Signalwege zu benutzen. Beispielsweise könnte ein auf BMP-2 basierendes ActR-IIB-spezifisches Protein als Myostatin-Antagonist zur Behandlung von Muskeldystrophie eingesetzt werden.

6. Summary

Bone morphogenetic proteins are key regulators of embryonic development and postnatal homeostasis of tissues and organs. Like TGF- β s, Activins, GDFs and other members of the TGF- β superfamily, BMPs transmit their signals by assembling two types of serine-/threonine-kinase receptors. A two-step mechanism for receptor activation is generally accepted. To date, only the molecular basis of the first step, binding of the ligand to a high affinity receptor has been analyzed by structure determination. The molecular mechanism of the subsequent low affinity receptor recruitment remained elusive.

This study describes the preparation, crystallization and structure determination of the ternary ligand-receptor complex consisting of BMP-2 and the extracellular domains of BMPR-IA and ActR-IIB. The structure of this ternary complex allowed us to study BMP-2 receptor activation from ligand recruitment to transactivation. In contrast to other ligands of the TGF- β superfamily, BMP-2 acts as a nearly rigid scaffold binding to the extracellular domains of both receptor subtypes. There are no direct contacts observed between the extracellular domains of the receptors. Therefore the cooperativity observed for BMP-2 low affinity receptor recruitment on whole cells could not be explained by allosteric effects nor by direct receptor-receptor contacts. The BMP receptor assembly possibly presents a basic mode for generating cooperativity employing the reduction of dimensionality in the membrane to facilitate low affinity receptor recruitment

Mutagenesis/interaction studies enabled us to understand how affinity and specificity in the BMP/Activin system are generated. A majority of the free binding energy in low and high affinity interaction of ActR-IIB_{ecd} with BMP-2/-7 or ActR-IIB_{ecd} with ActA, respectively, is dominated by the same subset of hydrophobic residues. Polar interactions play only a minor role in low-affinity binding of BMPs to ActR-IIB_{ecd}. However in the complex ActA/ActR-IIB_{ecd}, the central hydrogen bond between ActA Ser90(OG) and ActR-IIB_{ecd} Leu61(N) is the key determinant for switch from low to high affinity binding.

Type II receptor binding is termed promiscuous since BMP-2 binds to its type II receptors BMPR-II, ActR-II and ActR-IIB with almost similar affinity. This study clearly shows that binding and recruitment of a particular type II receptor could be modulated just by the exchange of single amino acid residues.

These insights into the molecular mechanism of type II receptor recognition allow the generation of highly type II receptor specific BMPs. These BMP-2 variants could serve as valuable tools for the determination or the modulation of type II receptor specific signaling pathways. A BMP-2 based mutant protein which is highly specific for ActR-IIB binding could be used for example as a myostatin antagonist for the treatment of muscle dystrophy.

7. Literaturverzeichnis

Allendorph, G. P., W. W. Vale and S. Choe (2006). "Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(20): 7643-8.

Attisano, L., J. Carcamo, F. Ventura, F. M. Weis, J. Massague and J. L. Wrana (1993). "Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors." Cell **75**(4): 671-80.

Attisano, L. and J. L. Wrana (2002). "Signal transduction by the TGF-beta superfamily." Science **296**(5573): 1646-7.

Attisano, L., J. L. Wrana, S. Cheifetz and J. Massague (1992). "Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors." Cell **68**(1): 97-108.

Attisano, L., J. L. Wrana, E. Montalvo and J. Massague (1996). "Activation of signalling by the activin receptor complex." Mol Cell Biol **16**(3): 1066-73.

Balemans, W. and W. Van Hul (2002). "Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators." Dev Biol **250**(2): 231-50.

Bassing, C. H., J. M. Yingling, D. J. Howe, T. Wang, W. W. He, M. L. Gustafson, P. Shah, P. K. Donahoe and X. F. Wang (1994). "A transforming growth factor beta type I receptor that signals to activate gene expression." Science **263**(5143): 87-9.

Bogan, A. A. and K. S. Thorn (1998). "Anatomy of hot spots in protein interfaces." J Mol Biol **280**(1): 1-9.

Brown, M. A., Q. Zhao, K. A. Baker, C. Naik, C. Chen, L. Pukac, M. Singh, T. Tsareva, Y. Parice, A. Mahoney, V. Roschke, I. Sanyal and S. Choe (2005). "Crystal structure

- of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors." J Biol Chem **280**(26): 25111-8.
- Burmester, J. K., S. W. Qian, D. Ohlsen, S. Phan, M. B. Sporn and A. B. Roberts (1998). "Mutational analysis of a transforming growth factor-beta receptor binding site." Growth Factors **15**(3): 231-42.
- Burmester, J. K., S. W. Qian, A. B. Roberts, A. Huang, S. Amatayakul-Chantler, L. Suardet, N. Odartchenko, J. A. Madri and M. B. Sporn (1993). "Characterization of distinct functional domains of transforming growth factor beta." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8628-32.
- Cheng, S. K., F. Olale, J. T. Bennett, A. H. Brivanlou and A. F. Schier (2003). "EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1." Genes Dev **17**(1): 31-6.
- Constam, D. B. and E. J. Robertson (1999). "Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases." J Cell Biol **144**(1): 139-49.
- Cook, R. W., T. B. Thompson, S. P. Kurup, T. S. Jardetzky and T. K. Wookdruff (2005). "Structural basis for a functional antagonist in the transforming growth factor beta superfamily." J Biol Chem **280**(48): 40177-86.
- Cunningham, B. C., M. Ultsch, A. M. De Vos, M. G. Mulkerrin, K. R. Clauser and J. A. Wells (1991). "Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule." Science **254**(5033): 821-5.
- Daopin, S., K. A. Piez, Y. Ogawa and D. R. Davies (1992). "Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily." Science **257**(5068): 369-73.
- de Caestecker, M. (2004). "The transforming growth factor-beta superfamily of receptors." Cytokine Growth Factor Rev **15**(1): 1-11.

- De Crescenzo, G., C. S. Hinck, Z. Shu, J. Zuniga, J. Yang, Y. Tang, J. Baardsnes, V. Mendoza, L. Sun, F. Lopez-Casillas, M. O'Connor-McCourt and A. P. Hinck (2006). "Three key residues underlie the differential affinity of the TGFbeta isoforms for the TGFbeta type II receptor." J Mol Biol **355**(1): 47-62.
- Ebendal, T., H. Bengtsson and S. Soderstrom (1998). "Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain." J Neurosci Res **51**(2): 139-46.
- Ebisawa, T., K. Tada, I. Kitajima, K. Tojo, T. K. Sampath, M. Kawabata, K. Miyazono and T. Imamura (1999). "Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation." J Cell Sci **112** (Pt 20): 3519-27.
- Ebner, R., R. H. Chen, L. Shum, S. Lawler, T. F. Zioncheck, A. Lee, A. R. Lopez and R. Derynck (1993). "Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor." Science **260**(5112): 1344-8.
- Eigenbrot, C. and N. Gerber (1997). "X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 A resolution and implications for receptor binding." Nat Struct Biol **4**(6): 435-8.
- Franzen, P., P. ten Dijke, H. Ichijo, H. Yamashita, P. Schulz, C. H. Heldin and K. Miyazono (1993). "Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor." Cell **75**(4): 681-92.
- Gill, S. C. and P. H. von Hippel (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Anal Biochem **182**(2): 319-26.
- Graff, J. M. (1997). "Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question." Cell **89**(2): 171-4.
- Gray, P. C., J. Greenwald, A. L. Blount, K. S. Kunitake, C. J. Donaldson, S. Choe and W. Vale (2000). "Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin." J Biol Chem **275**(5): 3206-12.

- Greenwald, J., W. H. Fischer, W. W. Vale and S. Choe (1999). "Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase." Nat Struct Biol **6**(1): 18-22.
- Greenwald, J., J. Groppe, P. Gray, E. Wiater, W. Kwiatkowski, W. Vale and S. Choe (2003). "The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly." Mol Cell **11**(3): 605-17.
- Greenwald, J., M. E. Vega, G. P. Allendorph, W. H. Fischer, W. Vale and S. Choe (2004). "A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors." Mol Cell **15**(3): 485-9.
- Griffith, D. L., H. Oppermann, D. C. Rueger, T. K. Sampath, R. F. Tucker and W. D. Carlson (1994). "Crystallization and preliminary crystallographic data of recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1)." J Mol Biol **244**(5): 657-8.
- Groppe, J., J. Greenwald, E. Wiater, J. Rodriguez-Leon, A. N. Economides, W. Kwiatkowski, K. Baban, M. Affolter, W. W. Vale, J. C. Belmonte and S. Choe (2003). "Structural basis of BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein." J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 3**: 52-8.
- Harland, R. M. (2001). "Developmental biology. A twist on embryonic signalling." Nature **410**(6827): 423-4.
- Harrington, A. E., S. A. Morris-Triggs, B. T. Ruotolo, C. V. Robinson, S. Ohnuma and M. Hyvonen (2006). "Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin." Embo J **25**(5): 1035-45.
- Harrison, C. A., P. C. Gray, W. H. Fischer, C. Donaldson, S. Choe and W. Vale (2004). "An activin mutant with disrupted ALK4 binding blocks signaling via type II receptors." J Biol Chem **279**(27): 28036-44.

- Harrison, C. A., P. C. Gray, S. C. Koerber, W. Fischer and W. Vale (2003). "Identification of a functional binding site for activin on the type I receptor ALK4." J Biol Chem **278**(23): 21129-35.
- Hart, P. J., S. Deep, A. B. Taylor, Z. Shu, C. S. Hinck and A. P. Hinck (2002). "Crystal structure of the human TbetaR2 ectodomain--TGF-beta3 complex." Nat Struct Biol **9**(3): 203-8.
- Hatta, T., H. Konishi, E. Katoh, T. Natsume, N. Ueno, Y. Kobayashi and T. Yamazaki (2000). "Identification of the ligand-binding site of the BMP type IA receptor for BMP-4." Biopolymers **55**(5): 399-406.
- Hinck, A. P., S. J. Archer, S. W. Qian, A. B. Roberts, M. B. Sporn, J. A. Weatherbee, M. L. Tsang, R. Lucas, B. L. Zhang, J. Wenker and D. A. Torchia (1996). "Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2." Biochemistry **35**(26): 8517-34.
- Hogan, B. L. (1996). "Bone morphogenetic proteins in development." Curr Opin Genet Dev **6**(4): 432-8.
- Hoodless, P. A., T. Haerry, S. Abdollah, M. Stapleton, M. B. O'Connor, L. Attisano and J. L. Wrana (1996). "MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways." Cell **85**(4): 489-500.
- Imamura, T., M. Takase, A. Nishihara, E. Oeda, J. Hanai, M. Kawabata and K. Miyazono (1997). "Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily." Nature **389**(6651): 622-6.
- Jones, W. K., E. A. Richmond, K. White, H. Sasak, W. Kusmik, J. Smart, H. Oppermann, D. C. Rueger and R. F. Tucker (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.

- Kawabata, M., T. Imamura and K. Miyazono (1998). "Signal transduction by bone morphogenetic proteins." Cytokine Growth Factor Rev **9**(1): 49-61.
- Keller, S., J. Nickel, J. L. Zhang, W. Sebald and T. D. Mueller (2004). "Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA." Nat Struct Mol Biol **11**(5): 481-8.
- Kirsch, T., J. Nickel and W. Sebald (2000). "BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II." Embo J **19**(13): 3314-24.
- Kirsch, T., J. Nickel and W. Sebald (2000). "Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2." FEBS Lett **468**(2-3): 215-9.
- Kirsch, T., W. Sebald and M. K. Dreyer (2000). "Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex." Nat Struct Biol **7**(6): 492-6.
- Koenig, B. B., J. S. Cook, D. H. Wolsing, J. Ting, J. P. Tiesman, P. E. Correa, C. A. Olson, A. L. Pecquet, F. Ventura, R. A. Grant and et al. (1994). "Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells." Mol Cell Biol **14**(9): 5961-74.
- Lee, S. J. and A. C. McPherron (2001). "Regulation of myostatin activity and muscle growth." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9306-11.
- Leslie, A. G. (1992). "Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data." Newsletter on Protein Crystallography **26**.
- Letsou, A., K. Arora, J. L. Wrana, K. Simin, V. Twombly, J. Jamal, K. Staehling-Hampton, F. M. Hoffmann, W. M. Gelbart, J. Massague and et al. (1995). "Drosophila Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family." Cell **80**(6): 899-908.
- Lewis, K. A., P. C. Gray, A. L. Blount, L. A. MacConell, E. Wiater, L. M. Bilezikjian and W. Vale (2000). "Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling." Nature **404**(6776): 411-4.

- Liu, F., F. Ventura, J. Doody and J. Massague (1995). "Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs." Mol Cell Biol **15**(7): 3479-86.
- Lopez-Casillas, F., S. Cheifetz, J. Doody, J. L. Andres, W. S. Lane and J. Massague (1991). "Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system." Cell **67**(4): 785-95.
- Macias-Silva, M., P. A. Hoodless, S. J. Tang, M. Buchwald and J. L. Wrana (1998). "Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2." J Biol Chem **273**(40): 25628-36.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-34.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-91.
- Massague, J., L. Attisano and J. L. Wrana (1994). "The TGF-beta family and its composite receptors." Trends Cell Biol **4**(5): 172-8.
- Massague, J. and Y. G. Chen (2000). "Controlling TGF-beta signaling." Genes Dev **14**(6): 627-44.
- Mathews, L. S. and W. W. Vale (1993). "Characterization of type II activin receptors. Binding, processing, and phosphorylation." J Biol Chem **268**(25): 19013-8.
- McDonald, I. K. and J. M. Thornton (1994). "Satisfying hydrogen bonding potential in proteins." J Mol Biol **238**(5): 777-93.
- McDonald, N. Q. and W. A. Hendrickson (1993). "A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif." Cell **73**(3): 421-4.

- Mittl, P. R., J. P. Priestle, D. A. Cox, G. McMaster, N. Cerletti and M. G. Grutter (1996). "The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding." Protein Sci **5**(7): 1261-71.
- Miyazawa, K., M. Shinozaki, T. Hara, T. Furuya and K. Miyazono (2002). "Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling." Genes Cells **7**(12): 1191-204.
- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2005). "Non-Smad TGF-beta signals." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3573-84.
- Moustakas, A., S. Souchelnytskyi and C. H. Heldin (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4359-69.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin and E. J. Dodson (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **53**(Pt 3): 240-55.
- Nakao, A., M. Afrakhte, A. Moren, T. Nakayama, J. L. Christian, R. Heuchel, S. Itoh, M. Kawabata, N. E. Heldin, C. H. Heldin and P. ten Dijke (1997). "Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling." Nature **389**(6651): 631-5.
- Newfeld, S. J., R. G. Wisotzkey and S. Kumar (1999). "Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers." Genetics **152**(2): 783-95.
- Nickel, J., A. Kotsch, W. Sebald and T. D. Mueller (2005). "A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB." J Mol Biol **349**(5): 933-47.
- Oh, S. P., C. Y. Yeo, Y. Lee, H. Schrewe, M. Whitman and E. Li (2002). "Activin type IIA and IIB receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning." Genes Dev **16**(21): 2749-54.

- Onichtchouk, D., Y. G. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Delius, J. Massague and C. Niehrs (1999). "Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI." Nature **401**(6752): 480-5.
- Pallaghy, P. K., K. J. Nielsen, D. J. Craik and R. S. Norton (1994). "A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides." Protein Sci **3**(10): 1833-9.
- Pearce, K. H., Jr., M. H. Ultsch, R. F. Kelley, A. M. de Vos and J. A. Wells (1996). "Structural and mutational analysis of affinity-inert contact residues at the growth hormone-receptor interface." Biochemistry **35**(32): 10300-7.
- Project, C. C. (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **50**(Pt 5): 760-3.
- Qian, S. W., J. K. Burmester, M. L. Tsang, J. A. Weatherbee, A. P. Hinck, D. J. Ohlsen, M. B. Sporn and A. B. Roberts (1996). "Binding affinity of transforming growth factor-beta for its type II receptor is determined by the C-terminal region of the molecule." J Biol Chem **271**(48): 30656-62.
- Rebbapragada, A., H. Benchabane, J. L. Wrana, A. J. Celeste and L. Attisano (2003). "Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis." Mol Cell Biol **23**(20): 7230-42.
- Ruppert, R., E. Hoffmann and W. Sebald (1996). "Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity." Eur J Biochem **237**(1): 295-302.
- Scheufler, C., W. Sebald and M. Hulsmeyer (1999). "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 A resolution." J Mol Biol **287**(1): 103-15.
- Schlessinger, J., I. Lax and M. Lemmon (1995). "Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors?" Cell **83**(3): 357-60.

- Schreuder, H., A. Liesum, J. Pohl, M. Kruse and M. Koyama (2005). "Crystal structure of recombinant human growth and differentiation factor 5: evidence for interaction of the type I and type II receptor-binding sites." Biochem Biophys Res Commun **329**(3): 1076-86.
- Sebald, W. and T. D. Mueller (2003). "The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly." Trends Biochem Sci **28**(10): 518-21.
- Sebald, W., J. Nickel, J. L. Zhang and T. D. Mueller (2004). "Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction." Biol Chem **385**(8): 697-710.
- Shen, M. M. and A. F. Schier (2000). "The EGF-CFC gene family in vertebrate development." Trends Genet **16**(7): 303-9.
- Shi, Y. and J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell **113**(6): 685-700.
- Stroud, R. M. and J. A. Wells (2004). "Mechanistic diversity of cytokine receptor signaling across cell membranes." Sci STKE **2004**(231): re7.
- ten Dijke, P., K. Miyazono and C. H. Heldin (1996). "Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 139-45.
- ten Dijke, P., H. Yamashita, T. K. Sampath, A. H. Reddi, M. Estevez, D. L. Riddle, H. Ichijo, C. H. Heldin and K. Miyazono (1994). "Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4." J Biol Chem **269**(25): 16985-8.
- Thompson, T. B., T. F. Lerch, R. W. Cook, T. K. Woodruff and T. S. Jardetzky (2005). "The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding." Dev Cell **9**(4): 535-43.

- Thompson, T. B., T. K. Woodruff and T. S. Jardetzky (2003). "Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions." Embo J **22**(7): 1555-66.
- Tsang, M., R. Kim, M. P. de Caestecker, T. Kudoh, A. B. Roberts and I. B. Dawid (2000). "Zebrafish nma is involved in TGFbeta family signaling." Genesis **28**(2): 47-57.
- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." Science **150**(698): 893-9.
- Ventura, F., J. Doody, F. Liu, J. L. Wrana and J. Massague (1994). "Reconstitution and transphosphorylation of TGF-beta receptor complexes." Embo J **13**(23): 5581-9.
- Weber, D., K. A., J. Nickel, S. Harth, A. Seher, U. Mueller, W. Sebald and T. D. Mueller (2006). "A single H-bond determines binding affinity and specificity for BMP-2 type II receptor interaction." N.N.
- Wieser, R., J. L. Wrana and J. Massague (1995). "GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex." Embo J **14**(10): 2199-208.
- Wozney, J. M. (1998). "The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult." Eur J Oral Sci **106 Suppl 1**: 160-6.
- Wozney, J. M., V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick and E. A. Wang (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." Science **242**(4885): 1528-34.
- Wrana, J. L., L. Attisano, J. Carcamo, A. Zentella, J. Doody, M. Laiho, X. F. Wang and J. Massague (1992). "TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex." Cell **71**(6): 1003-14.
- Wrana, J. L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura and J. Massague (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." Nature **370**(6488): 341-7.

- Wuytens, G., K. Verschueren, J. P. de Winter, N. Gajendran, L. Beek, K. Devos, F. Bosman, P. de Waele, M. Andries, A. J. van den Eijnden-van Raaij, J. C. Smith and D. Huylebroeck (1999). "Identification of two amino acids in activin A that are important for biological activity and binding to the activin type II receptors." J Biol Chem **274**(14): 9821-7.
- Yamashita, H., P. ten Dijke, P. Franzen, K. Miyazono and C. H. Heldin (1994). "Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta." J Biol Chem **269**(31): 20172-8.
- Yamashita, H., P. ten Dijke, D. Huylebroeck, T. K. Sampath, M. Andries, J. C. Smith, C. H. Heldin and K. Miyazono (1995). "Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects." J Cell Biol **130**(1): 217-26.
- Yeo, C. and M. Whitman (2001). "Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms." Mol Cell **7**(5): 949-57.
- Zimmerman, C. M. and L. S. Mathews (1996). "Activin receptors: cellular signalling by receptor serine kinases." Biochem Soc Symp **62**: 25-38.
- Zuniga, J. E., J. C. Groppe, Y. Cui, C. S. Hinck, V. Contreras-Shannon, O. N. Pakhomova, J. Yang, Y. Tang, V. Mendoza, F. Lopez-Casillas, L. Sun and A. P. Hinck (2005). "Assembly of TbetaRI:TbetaRII:TGFbeta ternary complex in vitro with receptor extracellular domains is cooperative and isoform-dependent." J Mol Biol **354**(5): 1052-68.

Schriftenverzeichnis

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht:

Weber, D.A., Kotzsch, A., Nickel, J., Harth, S., Seher, A., Mueller, U., Sebald, W. & Mueller, T.D. (2006). A single H-bond determines binding affinity and specificity for BMP-2 type II receptor interaction, Manuskript in Vorbereitung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Sebald, der mir diese Arbeit ermöglichte. Sein großes Interesse am Fortgang der Forschung und seine Diskussionsbereitschaft waren eine große Hilfe bei deren Erstellung. Der andauernde Ansporn, Themen und Problemstellungen nicht als starres Objekt zu betrachten, sondern von unterschiedlichen Seiten zu beleuchten und anzugehen, waren und sind mir Motivation und Vorbild - nicht nur im wissenschaftlichen Bereich. Vielen Dank für die intensive Betreuung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. R. Benz danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Biologie.

Besonders möchte ich mich auch bei Dr. T. Müller für seine besondere Unterstützung bei der Kristallographie und der Röntgenstrukturanalyse bedanken. Sein offenes Ohr für Fragen und Diskussionen sowie sein unermüdlicher Optimismus und freundschaftlicher Umgang waren eine Triebfeder bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. J. Nickel möchte ich mich für seine umfassende Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft bedanken. Besonders für seine Geduld und die Bereitschaft neue Ansätze mitzuspinnen möchte ich ihm herzlichst danken.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Herrn Christian Söder. Die Arbeit mit Ihm hatte „Dream Team“ Charakter und machte manch triste Laborarbeit zum besonderen Ereignis. Vielen Dank nicht nur für molekularbiologische und biochemische Hilfestellungen, sondern besonders für den freundschaftlichen Umgang in B337.

Herrn Dr. Sascha Keller danke ich für die Starthilfe in der Proteinbiochemie. Alexander Kotzsch, Stefan Harth, Susanne Gebhardt und Birgit Midloch danke ich für die angenehme Zusammenarbeit.

Des Weiteren danke ich allen Kolleginnen und Kollegen aus der Physiologischen Chemie II und der jetzigen „Außenstation Berlin“ für die tolle Zusammenarbeit und die besondere Atmosphäre auf der MS Sebald.

Lebenslauf

ZUR PERSON

- Dionys Anton Weber
- Geboren am 11.06.1976 in Mussenhausen im Allgäu
- Nationalität: deutsch
- Familienstand: ledig, keine Kinder

HOCHSCHULAUFBILDUNG

- 02/03 - heute Promotion bei Prof. W. Sebald am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Titel: „Aufklärung der Struktur und Charakterisierung des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA und ActR-IIB“
- 04/02 - 01/03 Diplomarbeit bei Prof. W. Sebald am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Titel: „Herstellung und Beschreibung von rekombinantem Activin A und der extrazellulären Domäne des Activin Rezeptors IIB“
- 03/02 Diplomprüfungen. Hauptfach: Biochemie; Nebenfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie, Immunbiologie/ Virologie
- 10/98 Diplomvorprüfung: Botanik, Zoologie, Chemie, Physik
- 09/99 - 06/00 Graduiertenstudium des Faches „Biomedical Sciences“ an der School of Public Health der State University of New York (SUNY) in Albany/USA
- 09/99 - 05/00 Projektarbeit im Rahmen eines DAAD-Stipendiums am Wadsworth Center, am New York State Department of Health. Titel: „Study of coxsackieviral pathogenicity in a mouse model.“
- 10/96 - 01/03 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

SCHULBILDUNG/ GRUNDWEHRDIENST

- 10/95 – 07/96 Gebirgsjägerbataillon 233 in Mittenwald/ Oberbayern
- 09/86 - 06/95 Internat und Gymnasium der Salesianer Don Boscós (SDB) „Marianum Buxheim“ in Buxheim/ Iller, Allgemeine Hochschulreife
- 09/82 - 07/86 Grundschule Markt Rettenbach

ASSISTENZ

- 02/03 - 04/06 Wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Erklärungen

Erklärungen gemäß §4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999

Ich erkläre ehrenwörtlich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt zu haben und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ich erkläre des Weiteren, daß die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre weiterhin, daß ich früher keine akademischen Grade erworben habe oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Dionys A. Weber