

**DIE DYNAMIK DER PRIMÄREN ERKENNUNGSSCHRITTE
VON BMP-REZEPTOREN**

The seal of the University of Würzburg is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, surrounded by a circular border containing the Latin text 'SIGILLUM UNIVERSITATIS HERRIBOLENSIS'. The shield itself is divided into four quadrants, each containing a different symbol, and is flanked by two figures holding a banner.

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

VORGELEGT VON

KAI HEINECKE

AUS CELLE

WÜRZBURG, IM APRIL 2010

*Meinen Eltern
und Judith*

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Walter Sebald, Physiologische Chemie II

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Schulz, Bioinformatik

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Grundlagen	7
1.2 Zeitliche und räumliche Verteilung der Liganden und Rezeptoren	12
1.3 Regulation der Signalübertragung.....	14
1.4 Mechanismen der Signalkomplexformierung	16
1.5 Zielsetzung der Arbeit	23
2. Material & Methoden	24
2.1 Abkürzungen	24
2.2 Ausgangsmaterialien	25
2.2.1 Chemikalien & Enzyme	25
2.2.2 Molekularbiologische Kits	25
2.2.3 Bakterienstämme	25
2.2.4 Vektoren	25
2.2.5 Oligonukleotide	26
2.2.6 Wachstumsfaktoren	27
2.2.7 Zelllinien	28
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.3.2 Rekombinante PCR	30
2.3.3 Zyklische Mutagenese	30
2.3.4 Restriktionsverdau.....	31
2.3.5 Ligation	32
2.3.6 Transformation	32
2.3.7 Plasmid-DNA-Aufreinigung	32
2.3.8 Sequenzierung	33
2.4 Zellbiologische Methoden.....	34
2.4.1 Zellkultur	34
2.4.2 Zellzahlbestimmung	34
2.4.3 Transfektion	34
2.4.4 Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren zum Nachweis der SMAD- und MAPK-Phosphorylierung.....	34
2.4.5 Herstellung von Zellextrakten	35
2.4.6 Proteinmengenbestimmung nach Redinbaugh (BCA-Assay)	35
2.4.7 Luciferase-Assay	36
2.4.8 Radioligandenassays	37
2.4.9 Alkalische-Phosphatase-Assays	37
2.5 Mikroskopische Methoden	39
2.5.1 Beschichtung von Deckgläsern.....	39
2.5.2 Zellkulturverfahren für die Mikroskopie.....	39
2.5.3.1 Grundlagen: Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	39
2.5.3.2 FRET-Mikroskopie	42
2.5.3.3 Analyse von FRET-Daten	42
2.5.4.1 Grundlagen: Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP).....	43
2.5.4.2 FRAP-Mikroskopie	45
2.5.4.3 Analyse von FRAP-Daten	46
2.6 Proteinchemische Methoden	47
2.6.1 Herstellung von rekombinantem TGF- β 2	47
2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48

2.6.3 Western Blot.....	49
2.6.4 Entwicklung von Western Blots (Chemolumineszenz).....	50
2.6.5 Analyse von Western Blots	50
2.6.6 Iodierung von Liganden	50
3. Ergebnisse	52
3.1 Austausch von Rezeptordomänen und Änderung des Signalweges.....	52
3.1.1 Herstellung von chimären Rezeptoren	52
3.1.2 Untersuchung der SMAD-abhängigen Luciferaseaktivität	54
3.2 Untersuchung der Ligandenbindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche.....	57
3.2.1 Verwendete Rezeptorkonstrukte	57
3.2.2 Ligandenbindung an wildtypische Rezeptoren	58
3.2.3 Induktion hochaffiner Bindestellen durch Rezeptordimerisierung	61
3.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	63
3.3.1 Herstellung von Rezeptorkonstrukten	63
3.3.2 Rezeptorexpression in HEK-tsA201-Zellen.....	64
3.3.3 Lokalisation der fusionierten Rezeptoren	66
3.3.4 Mobilität der Rezeptoren in der Zellmembran	67
3.3.4.1 Mobilität der Einzelrezeptoren	68
3.3.4.2 Veränderung der Mobilität durch Austausch der Transmembrandomäne	70
3.3.4.3 Veränderung der Mobilität durch Anwesenheit beider Rezeptortypen.....	71
3.3.4.4 Veränderung der Mobilität durch Anwesenheit des Liganden.....	73
3.3.5.1 Unterschiede zwischen nativen und trunkierten Rezeptorkonstrukten	76
3.3.5.2 Neubildung von Rezeptorkomplexen.....	79
3.3.5.3 Spezifität der Rezeptorkomplexbildung.....	82
3.3.5.4 Unterschiede bei Verwendung von verschiedenen Typ-II-Rezeptoren	83
3.3.5.5 Analyse von BMP-2-Mutanten mit verringerter Affinität	85
3.3.5.6 Analyse von BMP-2-Mutanten mit höherer Typ-II-Rezeptoraffinität	87
3.3.5.7 Untersuchung der Eigenschaften von GDF-5	88
3.3.5.8 Untersuchung der Eigenschaften von Activin-A.....	90
3.4 Untersuchung der ligandeninduzierten SMAD-Phosphorylierung	92
3.4.1 BMP-2-induzierte Phosphorylierung von SMAD-1/5	93
3.4.2 GDF-5R57A-induzierte Phosphorylierung von SMAD-1/5	94
4. Diskussion	96
4.1 Abhängigkeit des aktivierten Signalweges von den Rezeptordomänen.....	96
4.2 Ligandenbindung an hoch- und niederaffine Bindungsstellen in Zellkultur.....	98
4.3 Mobilität der Rezeptoren in der Zellmembran	100
4.4 Untersuchung der ligandeninduzierten Komplexbildung.....	104
4.5 Ligandeninduzierte Phosphorylierung von SMAD-1/5/8	111
5. Schlussfolgerung	112
6. Literatur	114
7.1 Zusammenfassung	123
7.2 Abstract	124
Anhang	125
Danksagung	125
Lebenslauf	128
Schriftenverzeichnis	129
Erklärung	130

1. Einleitung

1.1 Grundlagen

Bei Proteinen der Transforming Growth Factor β (TGF- β -) Superfamilie handelt es sich um sekretierte, multifunktionelle Wachstumsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Homöostase und Regeneration von Geweben und Organen spielen (Hogan, 1996; Massague, 1998; Reddi, 1998, Reddi, 2005). Mitglieder dieser Familie sind in allen Vertebraten und Nicht-Vertebraten zu finden, wobei die Anzahl unterschiedlicher Vertreter mit der Komplexität der Organismen steigt. In *C. elegans* konnten vier (Savage-Dunn, 2001), in *D. melanogaster* (Parker et al., 2004) sieben verschiedene TGF- β -Faktoren nachgewiesen werden. In Vertebraten sind mehr als 30 Mitglieder dieser Familie bekannt (Miyazawa et al., 2002). Aufgrund von Homologien ihrer Aminosäuresequenzen können die einzelnen Vertreter in Unterfamilien unterteilt werden (Newfeld et al., 1999; Sebald et al., 2004), wobei die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) zusammen mit den Growth and Differentiation Factors (GDFs) die größte Gruppe bilden. Weitere Unterfamilien bilden die Transforming Growth Factors (TGFs), die der Familie ihren Namen gaben, Activine, Inhibine, Nodal, Myostatin, die Mullerian Inhibiting Substance (MIS) sowie der Glial-Derived Neurotrophic Growth Factor (GDNF). Eine Übersicht über die Verwandtschaftsgrade der Aminosäuresequenzen zeigt Abbildung 1.

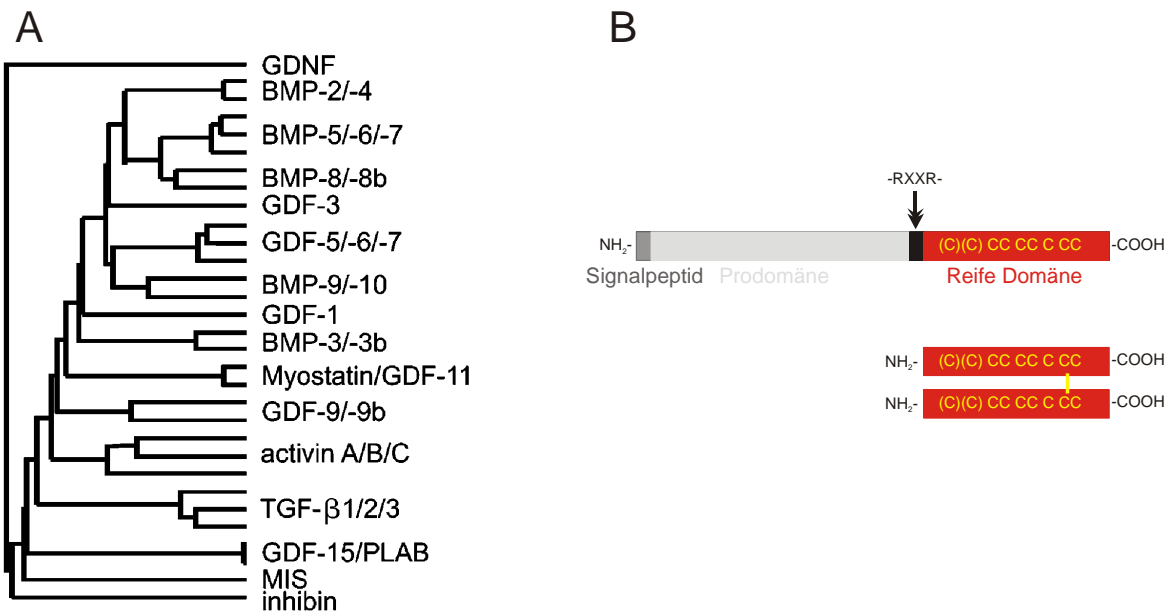


Abb. 1: (A) Übersicht über die Verwandtschaftsgrade der Aminosäuresequenzen der reifen Domänen verschiedener Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (Sebald et al. 2004). (B) Schematische Darstellung von Präprotein (oben) und reifem dimeren Liganden (unten).

Alle Proteine der TGF- β -Superfamilie werden als Vorläuferproteine exprimiert, die aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer Prodomäne und einer C-terminalen reifen Domäne bestehen (Abbildung 1). Nach Abspaltung der Prodomänen durch furinähnliche Proteasen, welche C-terminal nach einem konservierten RXXR-Motiv erfolgt, entsteht schließlich das reife, dimere Protein, wobei jedes Monomer jeweils 100-140 Aminosäuren umfasst (Constam and Robertson, 1999; Jones et al., 1994). Ein charakteristisches strukturelles Merkmal aller Proteine der TGF- β -Superfamilie ist ein Cystinknoten-Motiv, welches aus drei Disulfid-Brücken gebildet wird (Daopin et al., 1992; McDonald and Hendrickson, 1993). Diese Struktur ist außer in den Proteinen der TGF- β -Superfamilie auch in anderen Cytokinen wie dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und dem Nerve Groth Factor (NGF) zu finden, kommt aber auch in nicht verwandten Proteinen wie den ω -Conotoxinen vor (Pallaghy et al., 1994).

Die Struktur der monomeren Untereinheiten von TGF- β Faktoren wird im Allgemeinen mit dem Modell der „offenen linken Hand“ beschrieben (Daopin et al., 1992). Sie ist am Beispiel der Struktur von BMP-2 in Abbildung 2 dargestellt. Dabei repräsentiert der N-Terminus den Daumen und die beiden β -Faltblätter die Finger, welche als Finger 1 und 2 bezeichnet werden. Des weiteren wurde in Analogie zum Modell einer Hand für die konvexe Oberfläche der Finger der Begriff "Knöchel" („knuckle“) und für die Helix-Region "Handballen"

(„wrist“) definiert. Im dimeren Protein liegt der Handballen eines Monomers in der konkaven Seite der Finger des anderen Monomers.

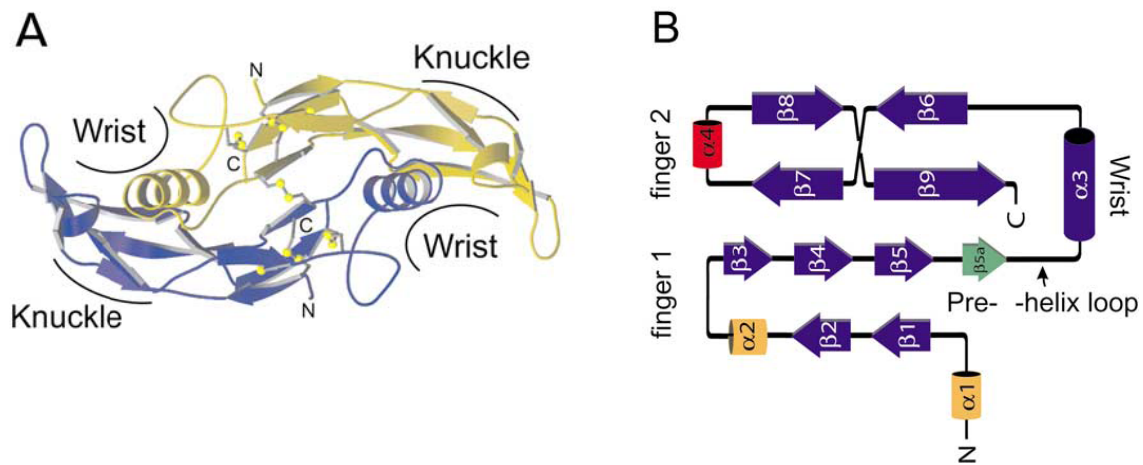


Abb. 2: Übersicht über die Nomenklatur der Bindeepitope der Liganden. (A) Lage der Wrist- und Knuckle-Epitope in der Kristallstruktur von BMP-2. Ein Monomer des Liganden ist in Gelb, das andere in Blau dargestellt. (B) Schematische Darstellung der α -Helices und β -Sheets von BMP-2 (Sebald et al. 2004).

Die Signalübertragung der Vertreter der TGF- β -Superfamilie erfolgt über die Bindung und Oligomerisierung zweier verschiedener Typen von membranständigen Serin-/Threonin-Kinaserezeptoren, die aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften in zwei Unterfamilien, die Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, unterteilt werden (Carcamo et al., 1994; Massague et al., 2000; ten Dijke et al., 1996). Insgesamt konnten bisher 12 dieser Rezeptoren im menschlichen Genom identifiziert werden. Zur Gruppe der Typ-I-Rezeptoren werden dabei die Activin Like Kinase 1 (ALK1), die Activin Typ-I- und Typ-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 (TGF- β R-I = ALK5) sowie die Activin Like Kinase 7 (ALK7) gezählt. Der BMP Typ-II-Rezeptor (BMPR-II), der TGF- β Typ-II-Rezeptor (TGF- β R-II), die Activin Typ-II und Typ-IIB-Rezeptoren (ActR-II und ActR-IIB) sowie der Mullerian Inhibiting Substance Rezeptor (MISR-II) bilden die Gruppe der Typ-II-Rezeptoren (de Caestecker, 2004). Die Rezeptoren beider Unterfamilien bestehen aus einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einer Single-Spanning-Transmembrandomäne sowie einem zytosolischen Teil, der die Kinasedomäne enthält. Als Unterscheidungsmerkmal besitzen Typ-I-Rezeptoren eine zusätzliche, als GS-Box bezeichnete, Glycin-Serin-reiche Domäne (Abbildung 3).

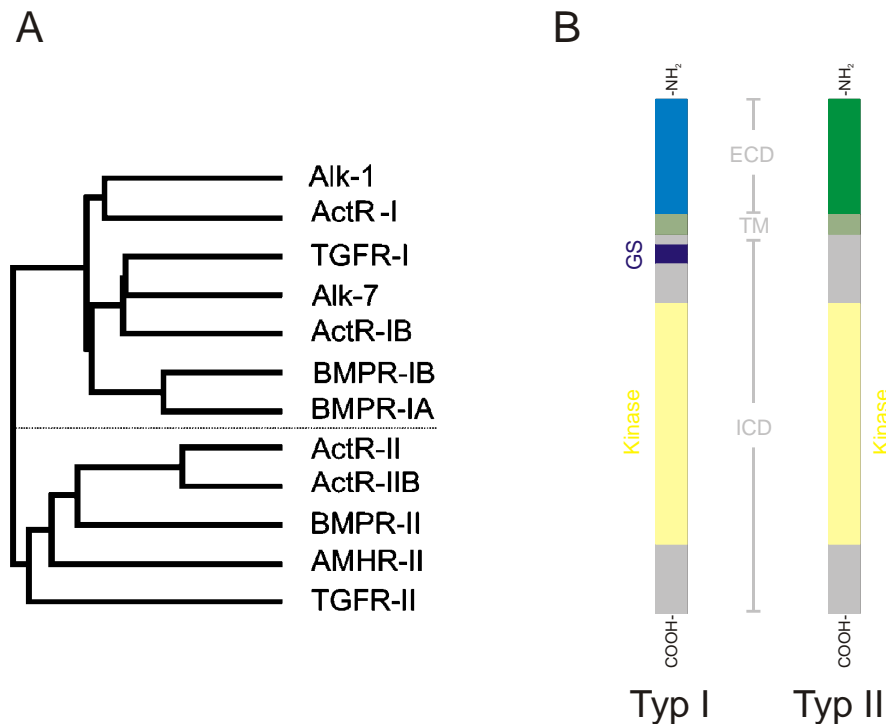


Abb. 3: (A) Übersicht über die Verwandtschaftsgrade der Aminosäuresequenzen der Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie (Sebal et al., 2004). (B) Schematischer Aufbau von Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren (ECD: Extrazelluläre Domäne; TM: Transmembrandomäne; ICD: Intrazelluläre Domäne; Kinase: Kinasedomäne; GS: Glycin/Serin-reiche Domäne).

Die Signalvermittlung wird durch die Bildung eines Ligand-Rezeptor Komplexes initiiert. Nach erfolgter Rezeptoroligomerisierung transphosphoryliert die konstitutiv aktive Kinase des Typ-II-Rezeptors den Typ-I-Rezeptor im Bereich der so genannten GS-Box, wodurch dessen Kinase ebenfalls aktiviert wird (Shi and Massague, 2003). Die aktivierte Typ-I-Rezeptorkinase kann nun ihrerseits intrazelluläre Mediatorproteine der SMAD-Familie phosphorylieren. (Heldin et al., 1997; Massague et al., 2005). Bei den SMAD-Proteinen unterscheidet man zwischen den rezeptorregulierten SMADs (R-SMADs), den Common-Mediator-SMADs (Co-SMADs) und den inhibitorischen SMADs (I-SMADs) (Moustakas et al., 2001). Ihr Aufbau ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Die R-SMADs 1, 2, 3, 5 und 8 können direkt von den Typ-I-Rezeptoren phosphoryliert und somit aktiviert werden und werden in zwei Klassen unterteilt (Shi and Massague, 2003). SMAD-1, SMAD-5 und SMAD-8 können durch die Typ-I-Rezeptoren ALK1, ActR-I (ALK2), BMPR-IA (ALK3) und BMPR-IB (ALK6) aktiviert werden (Hoodless et al., 1996). SMAD-2 und SMAD-3 werden dagegen durch die Typ-I-Rezeptoren ActR-IB (ALK4), TGF- β -I (ALK5) und ALK7 phosphoryliert (Nakao et al., 1997; Miyazawa et al., 2002). Die Rezeptorspezifität der R-SMADs wird dabei durch den so genannten L45-Loop in der Kinasedomäne der Typ-I-Rezeptoren, welcher mit dem jeweiligen R-SMAD interagiert (Massague et al., 2005), bestimmt.

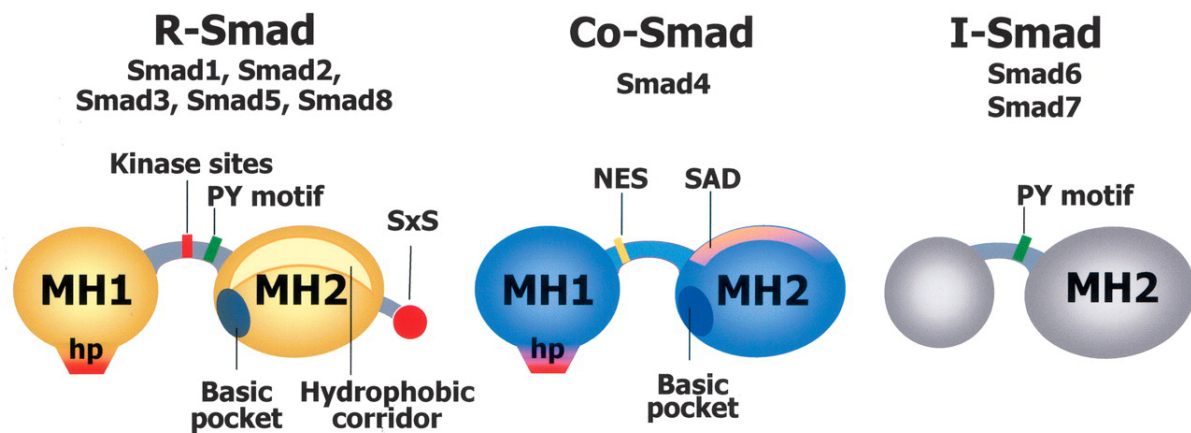


Abb. 4: Darstellung der Strukturen von R-, Co- und I-SMADs. R- und Co-SMADs bestehen aus den hochkonservierten MH1- und MH2-Domänen, die durch eine flexible Linker-Region verbunden sind. Die MH1-Domäne fehlt bei den I-SMADs. Das PY-Motiv dient zur Identifizierung der SMADs durch Smurf Ubiquitin-Ligasen. Die Interaktion von R-SMADs mit den Typ-I-Rezeptoren und von R-SMADs untereinander bzw. mit dem Co-SMAD SMAD-4 wird über die basische Tasche vermittelt (Massague et al., 2005).

Im unphosphorylierten Zustand werden R-SMADs durch die Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) für die Liganden der TGF- β -Untergruppe (Tsukazaki et al., 1998) oder Endofin für die BMPs (Chen et al., 2007; Murphy, 2007; Shi et al., 2007) an der Translokation in den Zellkern gehindert und in räumlicher Nähe zu den Kinasedomänen der Rezeptoren gehalten (Tsukazaki et al., 1998). Die Phosphorylierung durch den Typ-I-Rezeptor bewirkt die Dissoziation der R-SMADs vom Rezeptorkomplex und den Ankerproteinen und anschließend die Bildung eines heteromeren Komplexes mit SMAD-4, dem einzigen Vertreter der Co-SMADs. SMAD-4 unterliegt im ungebundenen Zustand in der Zelle einem Kreislauf zwischen Cytosol und Zellkern. Der Komplex aus R-SMADs und SMAD-4 wandert in den Zellkern und kann direkt an die DNA binden (Abbildung 5). Für die Spezifität der genregulatorischen Funktion ist aber die Interaktion mit verschiedenen anderen DNA-bindenden Molekülen wie Koaktivatoren bzw. –repressoren der Transkription nötig (Attisano and Wrana, 2002).

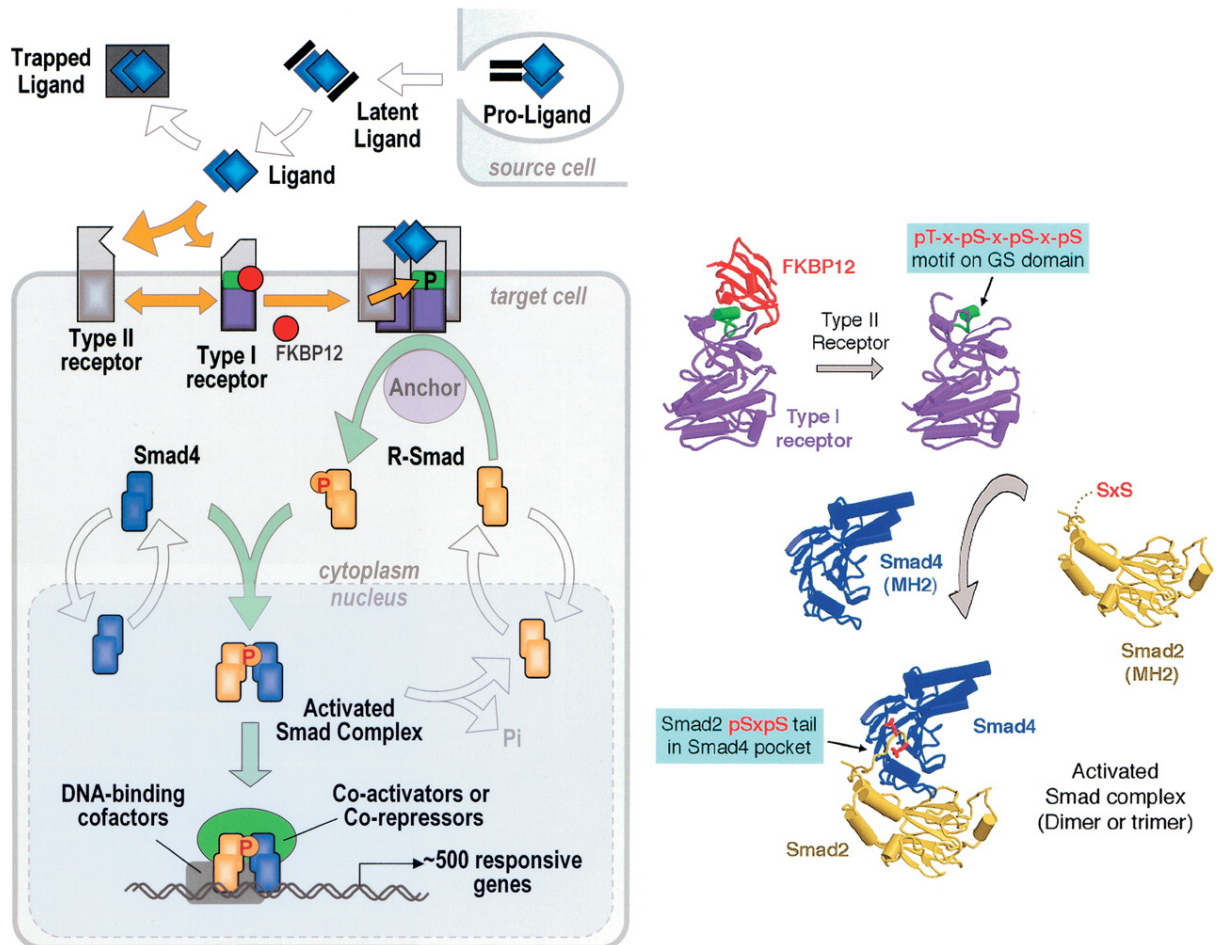


Abb. 5: Funktionelle und strukturelle Eigenschaften des TGF-β-SMAD-Signalweges. Nach der Bindung des Liganden durch den Rezeptorkomplex wird die GS-Box der Typ-I-Rezeptoren durch die konstitutiv aktive Kinase der Typ-II-Rezeptoren transphosphoryliert und somit die Kinase der Typ-I-Rezeptoren aktiviert. Diese kann nun ihrerseits R-SMADs phosphorylieren, die sich mit Co-SMADs zusammenlagern, in den Zellkern wandern und dort zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription SMAD-abhängiger Gene regulieren (Massague et al., 2005).

Neben der SMAD-vermittelten Signaltransduktion können die Liganden der TGF-β-Superfamilie Signale auch SMAD-unabhängig übertragen. So konnte neben der Aktivierung der kleinen GTPase Ras auch die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERKs, p38 und c-Jun nachgewiesen werden. Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass auch diese Signalwege durch Interaktionen mit SMAD-Proteinen moduliert werden können (Moustakas and Heldin, 2005).

1.2 Zeitliche und räumliche Verteilung der Liganden und Rezeptoren

Betrachtet man die möglichen Interaktionen der Liganden der TGF-β-Superfamilie mit den zugehörigen Rezeptoren, so fällt auf, dass bis heute in Vertebraten zwar mehr als 30 Liganden, aber nur sieben Typ-I- und fünf Typ-II-Rezeptoren bekannt sind, durch welche primär zwei Signalwege (über SMAD-1/5/8 oder SMAD-2/3) aktiviert werden. Diese starke

Konvergenz von einer großen Anzahl von Liganden hin zu wenigen Signalübertragungsmöglichkeiten führt unweigerlich zu der Frage, wie durch diese Proteine eine Fülle von unterschiedlichen zellulären Funktionen und diverse Abläufe während der Embryonalentwicklung gesteuert werden können (Abbildung 6).

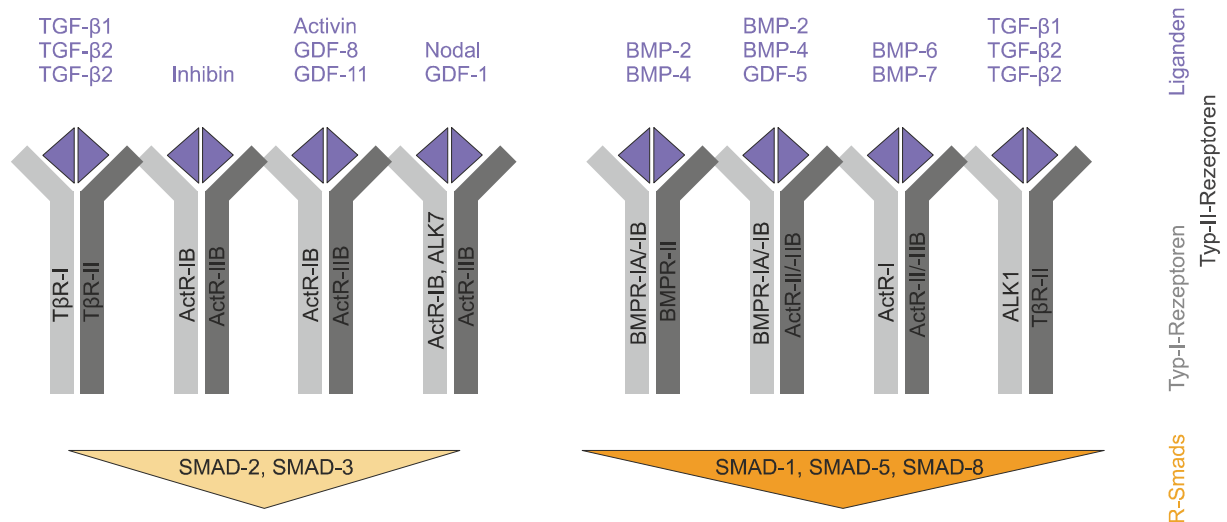


Abb. 6: Signalkonvergenz in der TGF-β-Superfamilie. Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht der Interaktionen zwischen ausgewählten Liganden mit verschiedenen Rezeptortypen und die Signalspezifität der R-SMADs.

Ein spezifischer, von einem einzelnen Liganden induzierter Stimulus kann mit einem solch konvergenten Signalsystem theoretisch nur dann erzeugt werden, wenn die einzelnen Ligand-Rezeptor-Kombinationen entweder zeitlich oder räumlich voneinander separiert wirken, oder die Signaltransduktion durch weitere mit den Liganden und/oder Rezeptoren interagierenden Molekülen moduliert wird. Es ist ebenfalls denkbar, dass durch unterschiedliche Bindeaffinitäten individueller Ligand-Rezeptor-Interaktionen eine Vielzahl aktivierter Rezeptorkomplexe entstehen können, die sich in ihren Signalaktivitäten sowohl qualitativ als auch quantitativ voneinander unterscheiden.

Unterschiede in der Geometrie und/oder Stöchiometrie der gebildeten Ligand-Rezeptor Komplexe können ebenfalls zur Generierung unterschiedlicher Signale führen.

Durch die Herstellung von Mausmodellen, in denen Gene mutiert wurden, die für Liganden, Rezeptoren oder nachgeschaltete Signalmoleküle der TGF-β-Superfamilie kodieren, konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Gene redundant erfolgt, andere Gene jedoch zeitlich und/oder räumlich getrennt voneinander exprimiert werden. So zeigt zum Beispiel die Expression von BMP-4 während der frühen Embryonalentwicklung der Maus eine hohe Dynamik und verschiebt sich in den ersten Entwicklungstagen vom Ektoderm (Cocouvanis

and Martin, 1999; Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000; Ying and Zhao, 2001) hin zum Mesoderm. Im Gegensatz dazu wird BMP-2, das zu mehr als 90 % mit der Aminosäuresequenz von BMP-4 übereinstimmt und in den meisten biologischen Systemen mit BMP-4 funktionell austauschbar ist, nur in späteren Entwicklungsphasen im Endoderm exprimiert. Tatsächlich weisen BMP-2-Knock-out-Mäuse gegenüber BMP-4-Knock-out-Mäusen einen anderen Phänotyp auf, der sich durch die unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden Proteine während der Embryonalentwicklung erklären lässt.

Die funktionelle Verwandtschaft der Liganden konnte auch dadurch bestätigt werden, dass der Phänotyp von Rezeptor-Knock-out-Mäusen häufig deutlichere Missbildungen zeigt als der Phänotyp von Liganden-Knock-out-Mäusen (Ying and Zhao, 2001). Im letzteren Fall können offensichtlich andere Liganden die Funktion des fehlenden Liganden zumindest teilweise übernehmen, was bei einem fehlenden Rezeptor nicht möglich ist.

Diese Beispiele zeigen, dass trotz starker Signalkonvergenz in einzelnen Fällen durch die räumliche und zeitliche Verteilung der Expression bestimmter Rezeptor-/Ligandenkombinationen spezifische Signale erzeugt werden können.

1.3 Regulation der Signalübertragung

Im extrazellulären Raum finden sich diverse Proteine, die die biologische Aktivität des Liganden modulieren, indem sie prinzipiell die Bindekompetenz des Liganden an membranständige Strukturen verändern. Im einfachsten Fall wird durch die Interaktion mit einem solchen Modulatorprotein die Bindung des Liganden an die Rezeptoren verhindert und somit die Konzentration des "freien" Liganden erniedrigt. Beispiele hierfür sind das an diverse BMPs bindende Modulatorprotein Noggin (Groppe et al., 2002) oder Follistatin, welches z.B. an Activine bindet (Harrington et al., 2006). Eine kompliziertere Möglichkeit der Signalmodulation konnte anhand der Embryonalentwicklung von *D. melanogaster* gezeigt werden. Hier bewirkt das Zusammenspiel der drei Faktoren Sog (short gastrulation), das zur Chordin-Familie gehört (Francois et al., 1994), Tolloid (Finelli et al., 1994) und Tsg (twisted gastrulation) (Ross et al., 2001) einerseits eine Inaktivierung des Liganden, und andererseits einen Transport und eine Reaktivierung des Liganden an anderer Stelle (Shimmi and O'Connor, 2003). Dies wird dadurch erreicht, dass Sog direkt an BMPs binden kann und dadurch eine Interaktion des Liganden mit den zugehörigen Rezeptoren antagonisiert (Marques et al., 1997). Die Transportfunktion wird von Tsg unterstützt, das den Komplex aus Sog und BMP bindet (Marques et al., 1997; Ross et al., 2001). Tolloid, eine Metalloprotease, kann dann an anderer Stelle diesen inhibitorischen Komplex zerstören und den Liganden

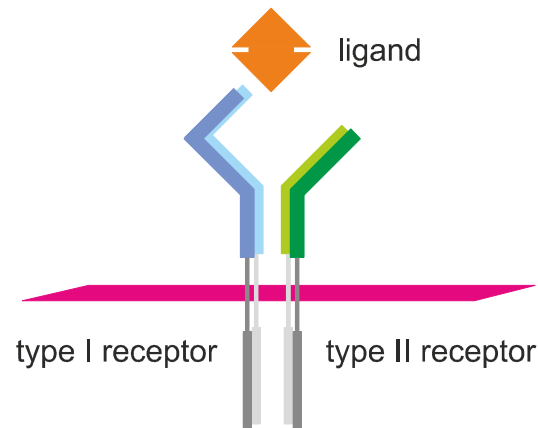
II nur in Gegenwart von Betaglycan stattfinden kann. Auf diese Weise ist Inhibin in der Lage, nicht nur die Activin-vermittelte Signalübertragung, sondern auch die Signalübertragung durch BMP-2, BMP-7, GDF-5 und einige andere BMPs zu inhibieren (Wiater and Vale, 2003).

Auch für BMPs wurden Co-Rezeptoren identifiziert, wie z.B. RGMa, RGMb (Dragon) und RGMc (Hemojuvelin) (Lin et al., 2007; Samad et al., 2005; Xia et al., 2007). Bei diesen sogenannten Repulsive Guidance Molecules handelt es sich um GPI-verankerte Proteine, welche in allen Fällen die Liganden direkt binden, aber unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen (Halbrooks et al., 2007).

Intrazellulär stehen für die Regulation der SMAD-vermittelten Signalübertragung ebenfalls verschiedene Wege zur Verfügung. Neben den bereits erwähnten inhibitorischen SMADs SMAD-6 und SMAD-7 kann die Signalübertragung durch Phosphatasen, die die Kinaseaktivität der Rezeptoren beeinflussen (Chen et al., 2006), durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse (Zhu et al., 1999) oder durch Transkriptionsrepressoren (Wotton and Massague, 2001) beeinflusst werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, den Transport der aktivierten SMADs in den Zellkern durch Interaktion mit anderen Proteinen (MAN1) zu verhindern (Bengtsson, 2007). Inwieweit diese Mechanismen zur Erhöhung der Spezifität des Liganden induzierten Signals beitragen ist jedoch weitgehend unerforscht.

1.4 Mechanismen der Signalkomplexformierung

Der Gegensatz zwischen einer Vielzahl von Liganden auf der einen und nur wenigen für die Signalvermittlung vorhandenen Rezeptoren auf der anderen Seite lässt eine Promiskuität in der Liganden-/Rezeptor-Interaktion vermuten (Abbildung 8). Tatsächlich konnte durch Reporteranalysen und Quervernetzungsexperimente gezeigt werden, dass sowohl einzelne Liganden mit mehreren verschiedenen Rezeptoren, als auch ein einzelner Rezeptor mit verschiedenen Liganden interagieren kann. Die unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen Rezeptor-/Liganden-Interaktionen und die Tatsache, dass die Signalübertragung einen heterooligomeren Rezeptorkomplex erfordert, deuten darauf hin, dass auf diese Weise eine Vielzahl von Liganden-Rezeptor-Komplexen mit unterschiedlichen Signaleigenschaften gebildet werden können.



Alk-I TβR-I	low	TGFβ-1/2/3	high	TβR-II
TβR-I ActR-IB	low	GDF-8/-11	high	ActR-II ActR-IIB
ActR-IB	low	Activin-A Inhibin	high	ActR-II ActR-IIB
ActR-I	low	BMP-6/-7	high	ActR-II ActR-IIB
BMPR-IA BMPR-IB	high	BMP-2/-4 GDF-5	low	ActR-II ActR-IIB BMPR-II

Abb. 8: Übersicht über die Promiskuität in der Liganden-Rezeptor-Interaktion. Die Abbildung zeigt die bevorzugten Rezeptorkombinationen für ausgewählte Liganden sowie Unterschiede in den Affinitäten zu den einzelnen Rezeptorsubtypen (Nickel et al., 2009).

Neben AMHR-II, der nur das Antimüllerian Hormon (AMH) bindet, zeigt der TGF-β-Typ-II-Rezeptor die höchste Bindespezifität, da er nur mit den drei TGF-β-Isoformen TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3 mit hoher Affinität interagiert (Wrana et al., 1994). Im Gegensatz dazu interagieren die Typ-II-Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB mit einer Vielzahl von Liganden verschiedener Unterfamilien. Bemerkenswert für die beiden Activin Typ II Rezeptoren ist ihre duale Signalspezifität. So kann Activin-A von beiden Rezeptoren mit hoher Affinität gebunden werden, was nach Rekrutierung des Typ-I-Rezeptors ActR-IB zur Aktivierung des SMAD-2/3-Signalwegs führt. ActR-IIB kann aber auch mit BMP-2 interagieren, was eine Aktivierung des SMAD-1/5/8-Signalwegs zur Folge hat (Nagaso et al., 1999). Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass einzelne Rezeptoren in unterschiedliche Signalkomplexe eingebunden werden können, wobei der aktivierte Signalweg vom jeweils verwendeten Typ-I-Rezeptor abhängt.

In Endothelzellen konnte zudem gezeigt werden, dass TGF-βs in Abhängigkeit von der Präsenz der Typ-I-Rezeptoren Alk-1 oder TGF-βR-I beide SMAD-2/3 und SMAD-1/5/8 Signalwege aktivieren können. Die Zusammensetzung der Ligand-Rezeptor-Komplexe ist allerdings bis heute nicht vollständig bekannt. Die Aktivierung beider Signalwege kann durch

zwei verschiedene Signalkomplexe erfolgen, die jeweils aus dem Liganden und homodimeren Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren bestehen. Es ist aber ebenfalls möglich, dass beide Signalwege durch einen einzigen Ligand-Rezeptor-Komplex aktiviert werden, welcher zwei verschiedene Typ-I-Rezeptorketten beinhaltet.

Neben den beschriebenen qualitativen Unterschieden in der Zusammensetzung der Signalkomplexe sind auch die Affinitäten der individuellen Liganden-Rezeptor-Interaktionen von großer Bedeutung. Dies wird besonders deutlich am Beispiel von GDF-5. GDF-5 interagiert bevorzugt mit dem Typ-I-Rezeptor BMPR-IB ($K_D \sim 1\text{nM}$). Eine Interaktion mit BMPR-IA ist ebenfalls möglich, erfolgt allerdings mit etwa 15-fach geringerer Affinität (K_D 15- 20nM). Mutationen in GDF-5, die entweder in einer Erhöhung oder einer Verminderung der Bindeaffinitäten zu mindestens einem der beiden Typ I Rezeptoren resultieren, sind *in vivo* mit Störungen in der Entwicklung einzelner Fingergelenke (Symphalangien oder Brachydactylien) korreliert (Nickel et al., 2005; Seemann et al., 2005).

Die dimere Struktur des Liganden impliziert einen heterohexameren Ligand-Rezeptor-Komplex (ein Ligandendimer und jeweils zwei Typ-I- und Typ-II-Rezeptorketten) als biologisch funktionelle Einheit. Eine solche Zusammensetzung konnte *in vitro* durch Strukturanalysen für Komplexe aus BMP-2 und den extrazellulären Domänen von BMPR-IA und ActR-II bzw. ActR-IIB sowie für Komplexe aus TGF- β 3 und den extrazellulären Domänen der Rezeptoren TGF- β R-I und TGF- β R-II nachgewiesen werden (Allendorph et al., 2006; Groppe et al., 2008; Weber et al., 2007). Um herauszufinden, wie *in vivo* die Rezeptoren auf Zelloberflächen angeordnet sind, wurden die ersten Experimente gegen Ende der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Dabei fand man heraus, dass sowohl TGF- β R-I als auch TGF- β R-II in Abwesenheit des Liganden bereits als präformierte Homodimere vorliegen, die schon im endoplasmatischen Retikulum gebildet werden (Gilboa et al., 1998). Für die Dimerisierung sind die Transmembran- und die zytoplasmatische Domäne essentiell. Lediglich ein geringer Anteil der Rezeptoren liegt als heteromerer Komplex bestehend aus Rezeptoren beider Subtypen vor. Durch Zugabe des Liganden nimmt dieser Anteil jedoch stark zu (Wells et al., 1999). Im Gegensatz dazu liegen die BMP-Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-II unabhängig vom Vorhandensein des Liganden als unterschiedlich zusammengesetzte präformierte Komplexe auf der Zelloberfläche vor (Gilboa et al., 2000). Diese PFCs (Pre-formed complexes) lassen vermuten, dass hier die Signalvermittlung durch eine durch die Bindung des Liganden ausgelöste Änderung der Konformation der Rezeptoren stattfindet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe des Liganden sowohl die Anzahl heteromerer Rezeptorkomplexe

bestehend aus beiden Rezeptorsubtypen, als auch die Anzahl homomerer Typ-I-Rezeptorkomplexe deutlich ansteigt. Hieraus lassen sich also zwei Wege für die Rezeptoroligomerisierung ableiten, die schematisch in Abbildung 9 wiedergegeben sind: ligandenunabhängig in Form von präformierten Komplexen und ligandenabhängig über so genannte BISCs (BMP-induced signaling complexes). Die BISC-vermittelte Signalübertragung scheint dabei an die Lokalisation der Rezeptoren in Lipid Rafts oder Cavaeolae gebunden zu sein, wohingegen die Signalübertragung über präformierte Rezeptorkomplexe unabhängig von diesen zellulären Strukturen ist (Hartung et al., 2006).

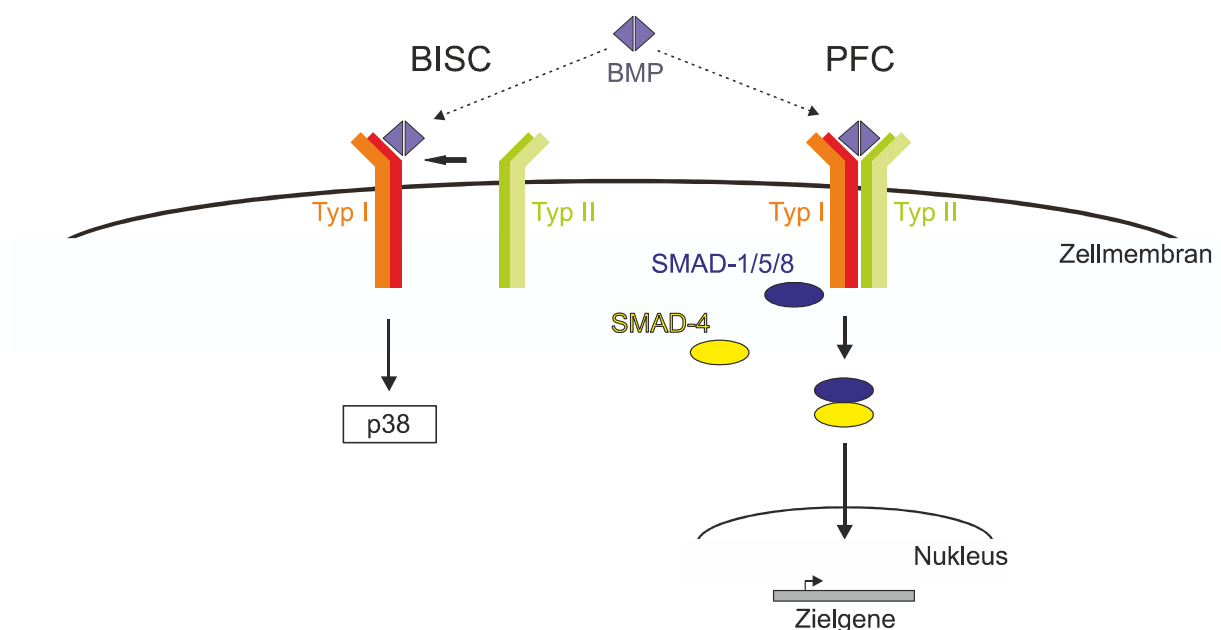


Abb. 9: Schematische Darstellung der SMAD- und MAPK-Signalwege. Bei der Bindung von BMP an präformierte Rezeptorkomplexe (PFC, Pre-Formed Complex) kommt es zur Induktion des SMAD-abhängigen Signalweges. Die Bindung an die Typ-I-Rezeptoren und die anschließende Rekrutierung der Typ-II-Rezeptoren in den Komplex (BISC, BMP-Induced Signaling Complex) führt zur Induktion des p38-MAPK-Signalweges.

Aus den gewonnenen Daten lassen sich Rückschlüsse ziehen auf die Art und Weise, wie Rezeptoren auf der Zelloberfläche angeordnet sind und wie durch unterschiedliche Arten der Rezeptorkomplexbildung unterschiedliche Signale in die Zelle geleitet werden können.

Von besonderer Bedeutung ist dabei die Tatsache, dass die Rekrutierung von Rezeptoren zu einem heterohexameren Komplex, wie er durch Strukturanalyse einzelner Ligand-Rezeptor Komplexe beschrieben wurde, auf Zelloberflächen die Auflösung präformierter Komplexe zumindest eines Rezeptorsubtyps fordert. Dies stellt natürlich die Frage nach dem Sinn solcher präformierten Komplexe. Als Lösung dieses Dilemmas wurde kürzlich das Vorhandensein eines multimeren Rezeptorpatches vorgeschlagen (Nickel et al., 2009). In diesem Modell liegen mehrere Rezeptoren in einer höher geordneten Struktur vor. Allerdings

bringt dies wiederum den Nachteil mit sich, dass dadurch die Flexibilität, mit welcher Liganden ein Signal ausgelöst werden kann, eingeschränkt wird. Dieser Nachteil kann aber dadurch ausgeglichen werden, dass in Systemen, die eine hohe Flexibilität benötigen, verstärkt andere Möglichkeiten zur Signalvermittlung benutzt werden wie zum Beispiel die bereits angesprochenen induzierten Rezeptorkomplexe. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Rezeptoren TGF- β R-I und TGF- β R-II größtenteils als präformierte Komplexe vorliegen, diese allerdings auch nur die Signale von drei TGF- β -Isoformen vermitteln müssen. Im Gegensatz dazu liegen die BMP-Rezeptoren nur in geringer Zahl als präformierte Komplexe auf der Zelloberfläche vor. Auf diese Weise sind sie in der Lage, mit einer größeren Anzahl von Liganden flexibel zu interagieren.

Neben der beschriebenen Kolokalisation der Rezeptoren ist die Bindung des Liganden durch den Rezeptorkomplex für die Generierung eines Signals notwendig. Es wird vermutet, dass dabei Konformationsänderungen des Liganden und/oder der Rezeptoren eine Rolle spielen. Außerdem lässt sich annehmen, dass die Rezeptoren zumindest zu einem gewissen Teil mobil in der Membran vorliegen müssen. Nach dem Modell von Singer und Nicolson kann man sich die Zellmembran als eine Doppelschicht aus Phospholipiden vorstellen, die sowohl flüssige als auch kristalline Eigenschaften aufweisen kann. In diese Doppelschicht sind Membranproteine eingelagert, die die Doppelschicht ganz oder teilweise durchspannen können und ähnlich wie Eisberge im Meer in dieser zweidimensionalen Schicht treiben (Singer and Nicolson, 1972). Wenn die Proteine nicht mit anderen zellulären Bestandteilen interagieren, liegt eine freie laterale Diffusion vor und ihre Bewegung zeigt die Eigenschaften der Brownschen Molekularbewegung (Einstein, 1905). Im Gegensatz zu einer lateralen Diffusion von Teilchen auf einer Wasseroberfläche, wie sie Robert Brown beschrieben hat, zeigen Membranproteine aufgrund des höheren Widerstandes der Membran allerdings eine deutlich niedrigere Mobilität, die bei einer Interaktion der Proteine mit zellulären Bestandteilen wie dem Zytoskelett nochmals abnimmt (Cherry et al., 1998). Dieses Verhalten wird auch als anormale Diffusion bezeichnet (Saxton, 2007, Saxton, 2008).

Die Mobilität von Membranproteinen kann durch verschiedene Interaktionen beeinflusst werden. Diese Interaktionen können dabei sowohl zwischen extrazellulären Domänen mit Faktoren außerhalb der Zelle, als auch zwischen den intrazellulären Domänen mit zytosolischen Zellbestandteilen stattfinden (Zhang et al., 1991, Zhang et al., 1992). Es wurde außerdem gezeigt, dass weitere Mikrostrukturen existieren, die einen Einfluss auf die Mobilität der Membranproteine haben (Sheetz et al., 1980; Zhang et al., 1993). Diese

Restriktionen schränken die Mobilität häufig soweit ein, dass ein Teil einer Proteinpopulation immobil erscheint (Zhang et al., 1993).

Die signalvermittelnden Rezeptoren für bestimmte Liganden wurden anfänglich durch die Analyse der Spezifität und Affinität einzelner Liganden und Rezeptoren durch Quervernetzungsexperimente bestimmt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Bindungsmechanismen postuliert. Für TGF- β s und die Activine wurde ein sequentieller Weg vorgeschlagen, bei dem der Ligand zuerst mit hoher Affinität an den Typ-II-Rezeptor bindet und dieser Komplex anschließend mit niedriger Affinität mit dem Typ-I-Rezeptor interagiert (Attisano et al., 1996). Bei Liganden, die diesem Mechanismus unterliegen, ist eine direkte Quervernetzung nur mit dem hochaffinen Typ-II-Rezeptor möglich; eine Quervernetzung mit dem Typ-I-Rezeptor gelingt nur in Gegenwart des Typ-II-Rezeptors. Der zweite, für BMPs diskutierte Weg, wird kooperativ genannt und zeichnet sich dadurch aus, dass hier eine Quervernetzung sowohl mit dem Typ-I- als auch mit dem Typ-II-Rezeptor auch in Abwesenheit des jeweils anderen Rezeptorsubtyps möglich ist (Liu et al., 1995). Sind beide Rezeptorsubtypen präsent, ist die Quervernetzungseffizienz deutlich erhöht. Die molekularen Grundlagen dieser Beobachtungen sind allerdings bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Aus den Regeln der Thermodynamik lässt sich aber ableiten, dass die Bindung eines Liganden an membranständige Rezeptoren – so diese nicht als präformierter Komplex oder Rezeptorpatch vorliegen – schrittweise erfolgen muss, da eine gleichzeitige Bindung energetisch ungünstig ist und nur äußerst selten vorkommt. Daraus ergibt sich, dass der erste Schritt in der Bildung eines ligandeninduzierten Signalkomplexes die Bindung des Liganden an einen einzelnen Rezeptor oder ein präformiertes Rezeptorhomodimer sein muss. Der zweite Rezeptorsubtyp muss dann im Anschluss in den Komplex rekrutiert werden. Ein sequentieller Bindungsmechanismus muss daher für alle ligandeninduzierten Rezeptorkomplexe angenommen werden.

Für BMP-2 konnte mit Hilfe von Oberflächenresonanzmessungen bestätigt werden, dass eine Bindung an beide Rezeptorsubtypen möglich ist. Dabei war die Affinität der Bindung an die Typ-I-Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB höher als bei der Bindung an die Typ-II-Rezeptoren (Kirsch et al., 2000). Die hohe Affinität der Typ-I-Rezeptorinteraktion wird dabei hauptsächlich durch eine niedrige Dissoziation verursacht, die eine lange Halbwertszeit der einzelnen Komplexe vermuten lässt. Die Bindung an die Typ-II-Rezeptoren zeichnet sich dagegen durch deutlich schnellere Bindekinetiken aus. Die Typ-I-Rezeptoren scheinen also eine Ankerfunktion für den Liganden auszuüben, während die Typ-II-Rezeptoren für die Aktivierung des Signalkomplexes zuständig sind. Außerdem lässt die Tatsache, dass in BMP-

2 nur Mutationen im Bindeepitop für die Typ-II-Rezeptoren einen antagonistischen Effekt haben, darauf schließen, dass auch BMP-2 einem sequentiellen Bindungsmechanismus unterliegt. Interessanterweise zeigen sich antagonistische Effekte bereits in Mutanten, bei denen die Bindungsaffinität nur relativ gering (um den Faktor 3-10) verringert wurde (Kirsch et al., 2000). Auch heterodimere Mutanten mit nur einem veränderten Typ-II-Bindeepitop blockieren die BMP-2-vermittelte Signalübertragung komplett (Knaus and Sebald, 2001). Im Gegensatz dazu zeigen heterodimere Typ-I-Epitop-Mutanten, bei denen die Bindungsaffinität zu BMPR-IA 50-fach niedriger ist als im wildtypischen Protein, nur einen geringen Effekt in Alkalischen Phosphatase- und Reporterstudien. Der entscheidende Faktor für die Formierung eines funktionalen BMP-2-Signalkomplexes scheint also die Dissoziationskonstante der Ligand:Typ-II-Rezeptor-Interaktion zu sein. Biosensoranalysen haben außerdem gezeigt, dass die Affinität der ActR-IIB:BMP-2-Interaktion unabhängig von der Anwesenheit des Typ-I-Rezeptors BMPR-IA ist. Es ist daher unwahrscheinlich, dass es energetisch vorteilhafte Kontakte zwischen den extrazellulären Rezeptordomänen oder durch den Typ-I-Rezeptor verursachte Konformationsänderungen im Liganden-Bindeepitop des Typ-II-Rezeptors gibt. Dies konnte durch Strukturanalyse von ternären Komplexen bestätigt werden (Allendorph et al., 2006; Weber et al., 2007). Bis heute konnten rezeptorvermittelte Konformationsänderungen und Rezeptor:Rezeptor-Kontakte nur im ternären Komplex aus TGF- β 3, TGF- β R-I und TGF- β R-II nachgewiesen werden (Groppe et al., 2008). Die Affinität der TGF- β 3:TGF- β R-I-Interaktion steigt in Anwesenheit des Typ-II-Rezeptors etwa 60-fach an.

Diese Unterschiede zwischen dem TGF- β -/Activin- und dem BMP-System könnten auch die Grundlage für Unterschiede in der biologischen Aktivität sein. Die lange Halbwertszeit des BMP-2:BMPR-IA-Komplexes legt nahe, dass die rekrutierten Typ-II-Rezeptoren lediglich eine geringe Anzahl an ligandengebundenen Typ-I-Rezeptoren aktivieren können. Betrachtet man dagegen TGF- β und Activin, findet die Verankerung des Liganden hier durch die hochaffine Bindung des Typ-II-Rezeptors statt. Der Typ-I-Rezeptor kann dann im Anschluss gebunden und aktiviert werden, wobei die geringe Affinität der Bindung vermuten lässt, dass der Typ-I-Rezeptor im Anschluss aus dem Komplex wieder entlassen werden kann. Auf diese Weise kann selbst bei geringer Anzahl ligandengebundener Typ-II-Rezeptoren eine große Anzahl an Typ-I-Rezeptoren aktiviert werden, was die in zellbasierten Untersuchungen beobachteten sehr niedrigen EC₅₀-Werte von TGF- β und Activin erklären könnte (Cheifetz et al., 1990; Ling et al., 1986). Durch die sehr niedrigen Bindeaffinitäten der extrazellulären Domänen der Typ-I-Rezeptoren ActR-I, ActR-IB und TGF- β R-I zu den jeweiligen Liganden

stellt sich jedoch die Frage, wie hier die Spezifität der Bindung generiert wird. Wie im Fall der Rekrutierung von ActR-I durch BMP-7 oder ActR-IB durch Activin-A gezeigt wurde, scheint der intrazelluläre Teil der Rezeptoren keine Rolle zu spielen (Greenwald et al., 2003). Dass eine ligandenunabhängige Heterooligomerisierung auch bei Activin-Rezeptoren beobachtet wurde (Attisano et al., 1996) lässt vermuten, dass Transmembrandomänen von Rezeptoren verschiedener Subtypen miteinander interagieren. Es ist aber auch möglich, dass weitere, bisher nicht identifizierte Komponenten in der Zellmembran für die Erzeugung von Spezifität in der Rekrutierung signalaktiver Komplexe verantwortlich sind.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Grundlagen der Rezeptorkomplexbildung aufgeklärt werden. Insbesondere sollte dabei untersucht werden, ob die bereits in früheren Arbeiten postulierte Kooperativität der BMP-2-vermittelten Signalkomplexbildung bestätigt werden kann. Am Anfang stand dabei die Fragestellung, wie bestimmte Rezeptoren trotz nicht messbarer oder nur geringer Affinität zu den Liganden trotzdem in einen signalaktiven Komplex rekrutiert werden können. Der erste Schritt der Untersuchungen bestand daher darin, mit Hilfe von Rezeptormutanten herauszufinden, wovon die Erkennung und Rekrutierung des „korrekten“ Rezeptors für den Signalkomplex abhängig ist. Als Grundlage hierfür dienten die in früheren Untersuchungen ermittelten Rezeptor-Liganden-Affinitäten. Da es sich bei diesen Experimenten um *in vitro*-Versuche handelte, sollte außerdem untersucht werden, inwieweit diese früheren Messungen mit Messungen von Rezeptor-Liganden-Aktivitäten auf ganzen Zellen vergleichbar sind.

Da für die ligandeninduzierte Komplexbildung zumindest eine gewisse Mobilität der Rezeptoren in der Zellmembran angenommen werden muss, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um diese Mobilität quantifizieren zu können und die sie bestimmenden Parameter herauszufinden. Im letzten Teil der Arbeit wurde schließlich die eigentliche ligandeninduzierte Komplexbildung durch fluoreszenzmikroskopische Experimente untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Unterschiede in der stöchiometrischen Zusammensetzung der Rezeptor-Liganden-Komplexe gelegt.

2. Material & Methoden

2.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ActR-IA	Activin Typ IA Rezeptor
ActR-IB	Activin Typ IB Rezeptor
ActR-II	Activin Typ II Rezeptor
ActR-IIB	Activin Typ IIB Rezeptor
ALK	Activin receptor-like kinase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR-IA	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Typ IA
BMPR-IB	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Typ IB
BMPR-II	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Typ II
dest.	destilliert
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GDF	Growth and Differentiation Factor
M	Molar (Mol pro Liter)

mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
ROI	Region of Interest
sec	Sekunde
TGF-β	Transforming Groth Factor β
TGF-βR-I	Transforming Groth Factor β Rezeptor Typ I
TGF-βR-II	Transforming Groth Factor β Rezeptor Typ II
W	Watt

2.2 Ausgangsmaterialien

2.2.1 Chemikalien & Enzyme

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

2.2.2 Molekularbiologische Kits

DNA Präparation:	Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
Sequenzierung	GenomeLab DTCS Quickstart Kit (Beckman Coulter)
Agarose-Gelextraktion:	Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
Luciferase-Assay:	Luciferase Assay System (Promega)
β -Galaktosidase-Assay:	β -Galaktosidase Enzyme Assay System (Promega)

2.2.3 Bakterienstämme

Escherichia coli

JM109 (ATCC 53323): F' traD36 proA⁺ proB⁺ lacIq delta(lacZ)M15
delta(lac-proAB) supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 thi-
1 endA1 relA1 e14- lambda-

2.2.4 Vektoren

Zur Herstellung der Fluorophor-konjugierten Rezeptorkonstrukte wurden die Plasmide G γ 2-CFP und G γ 2-YFP benutzt, die freundlicherweise von Dr. Moritz Bünemann vom Institut für Pharmakologie zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt es sich um pcDNA3-Vektoren (Invitrogen, Abb. 10), bei denen zwischen die HindIII- und XbaI-Schnittstellen der Multiple Cloning Site die Sequenz für das kleine G-Protein G γ 2 eingefügt wurde. C-terminal daran befindet sich zwischen den XbaI- und XhoI-Schnittstellen die Sequenz für das Cyan- oder das Yellow Fluorescent Protein.

Zur Herstellung der Rezeptorkonstrukte wurde als erstes $G\gamma 2$ -CFP mit HindIII und XbaI geschnitten und das größere Fragment mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt. Die gewünschte Rezeptor-DNA wurde per PCR amplifiziert und mit korrespondierenden Schnittstellen versehen, anschließend verdaut und aufgereinigt und in den geschnittenen Vektor ligiert.

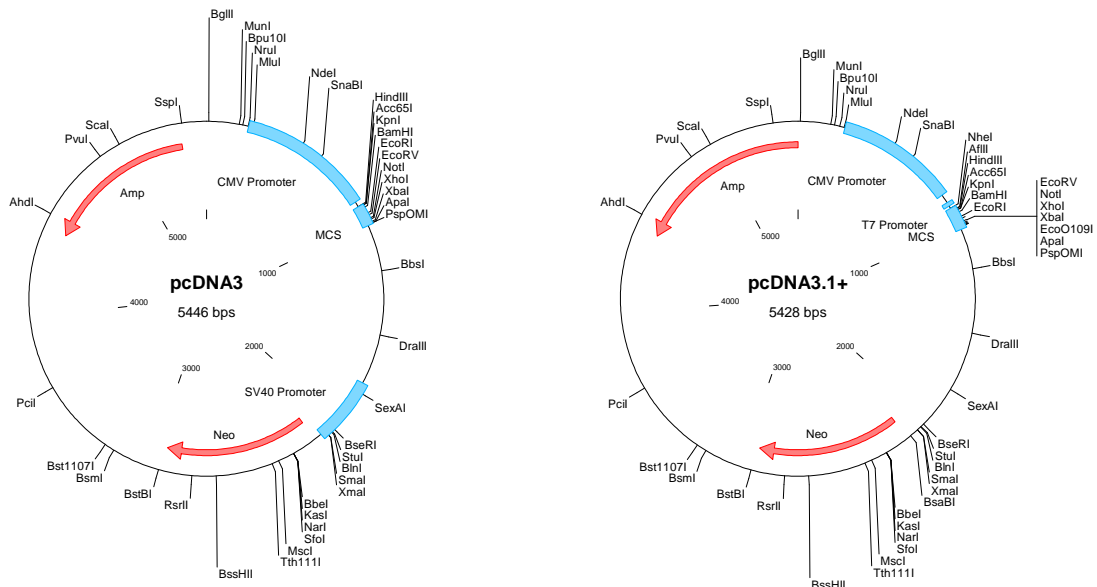


Abb. 10: Vektorkarten der Vektoren pcDNA3 und pcDNA3.1+ (Invitrogen). Diese Vektoren wurden als Ausgangsvektoren der Klonierungen verwendet.

Zur Herstellung der YFP-konjugierten Konstrukte wurde $G\gamma 2$ -YFP mit XbaI und XhoI verdaut und das kleinere Fragment aufgereinigt. Gleichzeitig wurde das CFP-konjugierte Rezeptorkonstrukt mit den gleichen Enzymen verdaut und das größere Fragment aufgereinigt. Anschließend wurden beide Fragmente ligiert.

2.2.5 Oligonukleotide

Zur Herstellung der Inserts für die Fluorophor-konjugierten Rezeptorkonstrukte wurden folgende PCR-Primer verwendet:

hBRIA-HindIII-s: 5'-aga gaa aag ctt gaa atg gct cag cta tac att tac atc-3'

hBRIA-TM-XbaI-a: 5'-aga gaa tct aga tct gct tga gat gct ctt gca ata atg-3'

hBRIA-FL-XbaI-a: 5'-aga gaa tct aga gat ttt tac atc ttg gga ttc aac-3'

mARIIB-HindIII-s: 5'-aga gaa aag ctt gaa atg gcg gcg ccc tgg gcg gc-3'

mARIIB-TM-XbaI-a: 5'-aga gaa tct aga gaa cac atg gcc gta ggg agg ttt ccg-3'

mARIIB-FL-XbaI-a: 5'-aga gaa tct aga gat gct gga ctc ttt agg g-3'

hBRII-HindIII-s: 5'-aga gaa aag ctt gaa atg gct tcc tcg ctg cag cgg c-3'

hBR11-TM-Avr11-a: 5'-aga gaa cct agg ttg ttt agc gtc tcc tgt caa c-3'

hBR11-FL-Avr11-a: 5'-aga gaa cct agg cag aca gtt cat tcc tat atc-3'

hALK4-HindIII-s: 5'-aga gaa aag ctt gaa atg gcg gag tcg gcc gga g-3'

hALK4-FL-XbaI-a: 5'-aga gaa tct aga gat ctt cac gtc ttc ctg c-3'

Für die Konstruktion der Konstrukte mit PECAM1-Transmembrandomäne wurden die Bestandteile mit folgenden Primern hergestellt und anschließend rekombiniert:

(1)-BR1Aecd-PECAM1-a: 5'-gat aac cac tgc aat aag tcc tcg aat gct gcc atc aaa aaa cg-3'

(2)-BR1Aicd-PECAM1-s: 5'-gct ctc ttg atc att gcg gcc aaa cat tat tgc aag agc atc tc-3'

(3)-BR1Aecd-PECAM1-a: 5'-gca atg atc act ccg atg ata acc act gca ata agt cc-3'

(4)-BR1Aicd-PECAM1-s: 5'-cat cgg agt gat cat tgc tct ctt gat cat tgc g-3'

2.2.6 Wachstumsfaktoren

coreBMP-2 wt:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel
coreBMP-2 wt/L51P Hetero:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel
coreBMP-2 wt/A34D Hetero:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel
coreBMP-2 L100P Homo:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel
coreBMP-2 wt/L100P Hetero:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel
hTGF-β2:	E. coli; rekombinant	Kai Heinecke
hGDF-5 wt:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel
hGDF-5R57A Homo:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel
hGDF-5Y106KQ108D:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel
hGDF-5R57AY106KQ108D:	E. coli; rekombinant	Dr. Joachim Nickel

Bei den coreBMP-2-Varianten wurden die N-terminalen Heparinbindungsstellen des wildtypischen BMP-2 entfernt, um unspezifische Interaktionen der Wachstumsfaktoren mit der extrazellulären Matrix auf Zelloberflächen zu verringern (Ruppert et al., 1996; Rider, 2006). Die core-Varianten zeigten in vorhergehenden Biosensoranalysen die gleichen Bindungskonstanten zu den einzelnen Rezeptorsubtypen wie wildtypisches BMP-2 bzw. hetero- oder homodimere Bindeepitopmutanten, die über Heparinbindungsstellen verfügen.

2.2.7 Zelllinien

HEK-tsA201	Human, Embryonic Kidney (Margolskee et al., 1993)
C2C12	Mouse, Myoblast, ATCC CRL-1772
ATDC5	Mouse, Embryo, Riken RCB0565
COS7	African green monkey, Kidney, ATCC CRL-1651

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Pfu-Puffer (10x): 200 mM Tris-HCl pH 8,8
 100 mM KCl
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 1 % Triton X-100
 1 mg/ml BSA

Standardmäßig wurde für die PCR folgender Probenansatz verwendet:

10-20 ng Template-DNA
5 µl Pfu-Puffer (10x)
5 µl dNTPs (2,5 mM / Nukleotid)
2 µl Primer 1 (5 µM)
2 µl Primer 2 (5 µM)
1 µl Pfu-Polymerase
ad 50 µl ddH₂O

Die Spezifität der Reaktion konnte in einigen Fällen durch die Zugabe von 5 µl Formamid, 5 µl DMSO oder 10 µl Betain (5 M) erhöht werden.

Die Proben wurden im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal) mit folgendem Programm amplifiziert:

1) 95° C	5 min	
2) 95° C	30 sec	
3) 55° C	30 sec	
4) 72° C	3 min	Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt.
5) 72° C	7 min	
6) 4° C	∞ min	

Die Annealing-Temperatur wurde entsprechend der angegebenen Primer-Schmelztemperatur angepasst.

2.3.2 Rekombinante PCR

Pfu-Puffer (10x): 200 mM Tris-HCl pH 8,8
 100 mM KCl
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 1 % Triton X-100
 1 mg/ml BSA

Für die Rekombination von zwei PCR-Produkten wurden diese mit einer Standard-PCR hergestellt, wobei die Primer so gewählt wurden, dass beide Produkte zueinander kompatible überlappende Enden aufwiesen. Anschließend wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µl PCR-Produkt 1
1 µl PCR-Produkt 2
5 µl Pfu-Puffer (10x)
5 µl dNTPs (2,5 mM / Nukleotid)
1 µl Pfu-Polymerase
ad 45 µl ddH₂O

Dieser Ansatz wurde dann für 5 min auf 95° C erhitzt und langsam durch Ausschalten des Thermocyclers auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden je 2 µl der endständigen Primer sowie 1 µl Pfu-Polymerase zugegeben und eine Standard-PCR zur Amplifikation des rekombinierten Produktes durchgeführt.

2.3.3 Zyklische Mutagenese

Pfu-Puffer (10x): 200 mM Tris-HCl pH 8,8
 100 mM KCl
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 1 % Triton X-100
 1 mg/ml BSA

Für die zyklische Mutagenese wurde folgender Ansatz verwendet:

10-20 ng Template-DNA
5 µl Pfu-Puffer (10x)
5 µl dNTPs (2,5 mM / Nukleotid)
2 µl Primer 1 (5 µM)
2 µl Primer 2 (5 µM)
1 µl Pfu-Polymerase
ad 50 µl ddH₂O

Dazu wurden komplementäre Primer konstruiert, in deren Mitte die zu mutierende(n) Base(n) plaziert wurden. Mit diesen wurde folgende PCR durchgeführt:

1) 95° C	5 min	
2) 95° C	30 sec	
3) 55° C	30 sec	
4) 72° C	10 min	Die Schritte 2-4 wurden 20x wiederholt.
5) 72° C	10 min	
6) 4° C	∞ min	

Die Annealing-Temperatur wurde entsprechend der angegebenen Primer-Schmelztemperatur angepasst. Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde 1 µl des Restriktionsenzym DpnI zu jedem Ansatz gegeben und dieser für 30 min bei 37° C inkubiert. DpnI erkennt und spaltet nur methylierte DNA an der Sequenz GATC. Da nur die als Template eingesetzte Plasmid DNA methyliert ist, führt diese Spaltung zur Reduzierung wildtypischer Klone. Vor der Transfektion von Bakterien wurde das Enzym für 15 min bei 65° C inaktiviert.

2.3.4 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau von DNA wurde folgender Ansatz benutzt:

DNA (Menge nach Bedarf)
Restriktionspuffer (Konzentration nach Bedarf)
20 u pro Restriktionsenzym
ad 40 µl H₂O

Der Verdau wurde für 2 h bei 37° C durchgeführt. Im Anschluss wurde der komplette Ansatz im Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Fragment mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.5 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde folgender Ansatz verwendet:

DNA-Fragment 1

DNA-Fragment 2

2 µl T4 DNA Ligase Puffer (10x, NEB)

1 µl T4 DNA Ligase (NEB)

ad 20 µl H₂O

Die DNA-Fragmente wurden dabei in einem molaren Verhältnis von ca. 1:1 eingesetzt. Die Ligation fand über Nacht bei Raumtemperatur statt.

2.3.6 Transformation

Für die Transformation von DNA in Bakterien wurden transformationskompetente E. coli JM109 (hergestellt von Birgit Midloch) verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, die gewünschte Menge DNA hinzugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 sec auf 42° C erhitzt und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden zu dem Ansatz 800 µl LB-Medium gegeben und die Bakterien für 30 min auf 37° C gestellt. Im Anschluß wurden 100-200 µl des Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit dem jeweils benötigten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.3.7 Plasmid-DNA-Aufreinigung

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurden Übernachtskulturen in LB-Medium einzelner Kolonien bei 37° C angesetzt. Am nächsten Tag wurde dann die Plasmid-DNA mit Hilfe des Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) nach den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Zur Gewinnung größerer Mengen wurden 100 ml LB-Medium mit 50-100 µl der Übernachtskultur angeimpft und erneut über Nacht kultiviert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Maxi Kit nach Anleitung des Herstellers Qiagen aufgereinigt.

2.3.8 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Richtigkeit der klonierten Konstrukte wurde deren Basenabfolge auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät vom Typ Beckman-Coulter CEQ8000 oder CEQ8800 überprüft. Dazu wurde zuerst 1 µl Plasmid-DNA (Miniprep) mit 6 µl H₂O vermischt und 2 min auf 95° C erhitzt. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt. Zu der Probe wurden dann 1 µl des jeweiligen Sequenzierprimers (5 µM) und 2 µl der DTCS QuickStart-Sequenzierlösung gegeben und folgendes PCR-Programm ausgeführt:

- | | | |
|----------|--------|---|
| 1) 98° C | 40 sec | |
| 2) 96° C | 20 sec | |
| 3) 55° C | 20 sec | |
| 4) 65° C | 4 min | Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt. |
| 5) 4° C | ∞ | |

Nach der Reaktion wurden die Proben gefällt, indem zu jeder Probe 2 µl 100 mM EDTA, 2 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 sowie 1 µl Glycogen (im QuickStart-Kit enthalten) gegeben wurden. Nach dem Vermischen wurde die DNA durch Zugabe von 60 µl eiskaltem Ethanol gefällt und 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 80 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands und Trocknen des Pellets für 3-5 min wurde das Pellet in 35 µl Sample Loading Solution (im QuickStart-Kit enthalten) gelöst und die Sequenzierung gestartet.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

HEK-tsA201-Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ in folgendem Wachstumsmedium kultiviert:

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)

+ 10% Fetales Kälberserum (FCS)

+ 2 mM L-Glutamin

+ 1 mM Natriumpyruvat

+ 1/100 Penicillin/Streptomycin

Die Zellen wurden bei 80-100% Konfluenz im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in neue Zellkulturflaschen gesplittet.

2.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblaulösung zur Anfärbung toter Zellen gemischt und in einer Neubaur-Kammer ausgezählt. Hierbei wurden mindestens drei große Quadrate des Rasters ausgewertet. Anschließend konnte die Zellzahl nach folgender Formel berechnet werden:

$$\sum (\text{Zellen}) / n_{\text{Zählungen}} \times 2 = Z \times 10^4 \text{ Zellen / ml}$$

2.4.3 Transfektion

Für die Transfektion von HEK-tsA201-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Polyfect von der Firma Qiagen benutzt. Die Anwendung entsprach den Empfehlungen des Herstellers für die entsprechenden Kulturgrößen.

2.4.4 Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren zum Nachweis der SMAD- und MAPK-Phosphorylierung

Die Zellen wurden am ersten Tag in der gewünschten Dichte in Zellkulturgefäße (7x10⁵ Zellen/100 mm-Schale) ausgesät und über Nacht bei den dem Zelltyp entsprechenden Bedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch Hungermedium mit reduziertem FCS-Gehalt (2 %) ersetzt. Die Zellen wurden erneut über

Nacht inkubiert. Am dritten Tag wurden die Wachstumsfaktoren in einer Verdünnung von 1:1000 zu den Zellen gegeben und die Zellen erneut für die gewünschten Zeiten inkubiert.

2.4.5 Herstellung von Zellextrakten

TNE-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,4
150 mM NaCl
1 % (v/v) TRITON X-100
1 mM EDTA
50 mM NaF
10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
1 mM Na_3VO_4
1 Tablette Complete Protease Inhibitors (Roche) / 15 ml Puffer

PBS: 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na_2HPO_4
1,4 mM KH_2PO_4
pH 7,4

Alle Arbeiten wurden bei 4° C durchgeführt. Zur Herstellung von Zellextrakten für Western-Blot-Experimente wurde zuerst das Wachstumsmedium von den Zellen entfernt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit möglichst wenig kaltem PBS bedeckt, mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß abgeschabt und in ein gekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden für eine Minute bei 16000x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das entstandene Pellet wurde in einer geeigneten Menge gekühltem TNE-Puffer resuspendiert und bei -80° C eingefroren, um eine möglichst vollständige Lyse zu erhalten. Nach dem erneuten Auftauen wurden die Proben drei Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

2.4.6 Proteinmengenbestimmung nach Redinbaugh (BCA-Assay)

Lösung A: 1,35 % (w/v) NaHCO_3
0,58 % (w/v) NaOH
1,00 % (w/v) Bicinchinonsäure (BCA)
0,57 % (w/v) KNa-Tartrat

Lösung B: 2,30 % (w/v) CuSO₄

Um die Proteinmenge in den gewonnenen Zelllysaten zu bestimmen, wurde in einer 96-well-Platte pro well 1 µl jedes Lysats mit 19 µl H₂O verdünnt und mit 200 µl einer Mischung von Lösung A und Lösung B (49:1) versetzt. Zusätzlich wurden 20 µl verschiedener Standardlösungen mit bekannter Proteinkonzentration mit jeweils 200 µl Reagenzlösung versetzt. Die Proben wurden dann 45-60 min bei 55° C inkubiert, bis eine Violettfärbung auftrat. Anschließend wurde die Absorption bei 550 nm mit einem ELISA-Reader bestimmt und aus dem Verhältnis zu den ermittelten Standardwerten die Proteinkonzentration errechnet.

2.4.7 Luciferase-Assay

Für die Analyse der SMAD-abhängigen Induktion der Luciferaseexpression wurden als erstes 5×10^4 HEK-tsA201-Zellen pro well in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Polyfect (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers transfiziert. Pro well wurden dabei 0,15 µg DNA des jeweiligen Rezeptorkonstrukts, 0,2 µg eines Vektors, welcher das Gen für β-Galaktosidase exprimiert sowie 0,1 µg des jeweiligen Luciferase-exprimierenden Reporterplasmids benutzt. Da in jedem Experiment 0,6 µg Gesamt-DNA transfiziert werden sollten, wurde die fehlende DNA-Menge mit leerem Vektor ergänzt. Als Luciferase-Konstrukte wurden die Vektoren BRE-Luc (Luciferase unter der Kontrolle eines SMAD-1/5/8-spezifischen Promotors Logeart-Avramoglou et al., 2006) und CAGA-Luc (Luciferase unter der Kontrolle eines SMAD-2/3-spezifischen Promotors Dennler et al., 1998) verwendet. Die Expression der β-Galaktosidase diente zur Normierung der Daten bei unterschiedlichen Zelldichten in den einzelnen wells.

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 h mit Hungermedium (2 % FCS) inkubiert und anschließend mit Ligandenlösung in der gewünschten Konzentration stimuliert. Nach Inkubation für 12 h bei 37° C/5% CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Reporter Lysis Buffer (Promega) bedeckt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei -80° C eingefroren. Vor der Messung wurden die Zellen bei 37° C aufgetaut. Anschließend wurden 20 µl des Lysats in eine schwarze 96-well-Platte gegeben. Weitere 50 µl wurden in eine normale 96-well-Platte pipettiert, mit der gleichen Menge 2x β-Galaktosidase-Reagenz (Promega) versetzt und bei 37° C inkubiert, bis eine Gelbfärbung zu sehen war. Die Absorption bei 420 nm wurde mit einem ELISA-Reader bestimmt.

Zur Auswertung der Luciferase-Induktion wurden mit einem Berthold MicroLumat LB 96 P Luminometer in jedes well der schwarzen Platte 50 μ l Luciferase Assay Reagent (Promega) injiziert und die entstehende Lichtreaktion nach 10 sec Inkubation erfasst. Diese Werte wurden anschließend mit den Werten aus dem β -Galaktosidase-Assay normiert.

2.4.8 Radioligandenassays

Waschpuffer: DMEM (- Carbonat)
25 mM HEPES, pH 7,4
0,1 % BSA

Bindepuffer: DMEM (- Carbonat)
25 mM HEPES, pH 7,4

Lysispuffer: 20 mM HEPES, pH 7,4
1 % Triton-X100
10 % Glycerol
0,01 % BSA

Zur Untersuchung der Ligandenbindung an ganzen Zellen wurden COS-7-Zellen in 145 mm-Zellkulturplatten ausgesät (3×10^6 Zellen/Schale) und über Nacht bei 37° C/10% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach dem Standardprotokoll transfiziert und erneut über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät (8×10^4 Zellen/well). Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst einmal mit Bindepuffer und einmal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden im Kühlraum in jedes well 300 μ l vorgekühlter Bindepuffer vorgelegt und die vorbereiteten radioaktiven Ligandenlösungen hinzugegeben. Die Zellen wurden dann 3 h unter leichtem Schütteln bei 4° C inkubiert und 3 x 2 min mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml Lysispuffer über Nacht lysiert. Aliquots von jeweils 500 μ l wurden mit einem γ -Zähler vermessen.

2.4.9 Alkalische-Phosphatase-Assays

ALP1-Lösung: 0,1 M Glycine pH 9,6
1% NP40
1 mM MgCl₂
1 mM ZnCl₂

ALP2-Lösung: 0,1 M Glycine pH 9,6
 1 mM MgCl₂
 1 mM ZnCl₂
 20 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (pNPP)

Für die quantitative Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (ALP) wurden $1,5 \times 10^4$ C2C12-Zellen pro Well in einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht bei 37° C/10% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Medium mit 0,5% FCS für 5 Stunden gehungert und anschließend mit 250 nM BMP-2 stimuliert. Zu jeweils zwei wells wurde nach 0, 1, 3, 6, 24 und 48 Stunden Dorsomorphin (als Inhibitor der SMAD-Phosphorylierung Yu et al., 2008) oder SB203580 (CalBioChem, als Inhibitor der MAPK-Phosphorylierung Cuenda et al., 1995) hinzugegeben. Die Zellen wurden nach 72 Stunden mit PBS gewaschen und 1 Stunde unter leichtem Schütteln in 100 µl ALP1-Lösung lysiert. Die enzymatische Nachweisreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl ALP2-Lösung gestartet und in einem ELISA-Reader bei 405 nm gemessen.

2.5 Mikroskopische Methoden

2.5.1 Beschichtung von Deckgläschen

Benötigte Lösungen:

- 70% Ethanol
- Steriles H₂O dest.
- 50% (v/v) Poly-L-Lysine (Sigma P2636) in sterilem H₂O dest.
- PBS (steril) (s. 2.4.5)

Für die FRET- und FRAP-Mikroskopie müssen die zu untersuchenden Zellen auf runden Mikroskopdeckgläschen mit 24 mm Durchmesser wachsen. Um die Adhäsion an die Plättchen zu erhöhen, wurden die Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtet. Dazu wurden die Plättchen unter sterilen Bedingungen durch Eintauchen in Ethanol und anschließend in steriles Wasser sterilisiert und gewaschen und mindestens 1 Stunde in einer 6-well-Zellkulturplatte in eine 50% (v/v) Poly-L-Lysine-Lösung eingelegt. Im Anschluß wurden die Plättchen in eine neue 6-well-Platte überführt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Plättchen 3x mit jeweils 2 ml sterilem PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden entweder sofort benutzt oder bei 4° C gelagert.

2.5.2 Zellkulturverfahren für die Mikroskopie

Zur Durchführung der fluoreszenzmikroskopischen Experimente wurden HEK-tsA201-Zellen zunächst nach den Angaben der Firma Qiagen für das Polyfect-Transfektionsreagenz in 60 mm-Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit den gewünschten Rezeptorkonstrukten transfiziert. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht wurden die transfizierten Zellen mit 2 ml Zellkulturmedium von der Schale gelöst und 150-200 µl der entstandenen Suspension in ein well einer 6-well-Zellkulturplatte mit beschichtetem Deckgläschen überführt. Am nächsten Tag konnten die auf den Deckgläschen gewachsenen Zellen für Experimente verwendet werden.

2.5.3.1 Grundlagen: Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Im Jahr 1948 beschrieb der deutsche Physiker Theodor Förster erstmals den nach ihm benannten Förster Resonance Energy Transfer, einen physikalischen Prozess, bei dem Energie von einem angeregten Farbstoff strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein benachbartes Akzeptormolekül übertragen wird (Förster, 1948). Handelt es sich bei Donor und Akzeptor um Fluoreszenzfarbstoffe, spricht man von Fluorescence Resonance Energy

Transfer, wobei häufig beide Begriffe synonym unter der Abkürzung FRET verwendet werden (Wang et al., 2008). Eine weitere Anwendung besteht darin, als Donor eine Biolumineszenzquelle zu benutzen. Diese Technik ist als Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) bekannt (Xu et al., 2002; Xu et al., 1999). Eine Voraussetzung für die genannten Techniken war die Entdeckung und Charakterisierung des Green Fluorescent Protein (GFP), wofür die Forscher Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien im Jahr 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurden (Shimomura et al., 1962; Chalfie et al., 1994; Tsien, 1998).

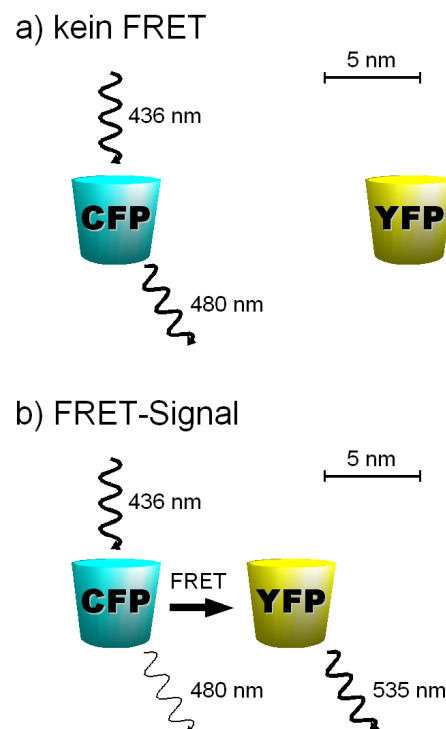


Abb. 11: Das Prinzip der Energieübertragung bei FRET. (a) Bei größerem Abstand der Fluorophore zueinander wird bei Anregung des Donor-Fluorophores CFP keine Energie auf das Akzeptor-Fluorophor YFP übertragen; CFP emittiert daher Licht der Wellenlänge 480 nm. (b) Bei geringerem Abstand wird bei Anregung von CFP Energie quantenmechanisch auf YFP übertragen; die Emission von CFP verringert sich zugunsten der Emission von YFP.

Die Effizienz der Energieübertragung bei FRET hängt vom Abstand von Donor und Akzeptor ab, wobei der mögliche Distanzbereich auch von den verwendeten Fluorophoren bestimmt wird und in den meisten Fällen bei 5-10 nm liegt. Die Effizienz des Energietransfers lässt sich dabei nach folgender Formel berechnen:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Dabei beschreibt R_0 den Förster-Radius der Fluorophore, bei dem die Energieübertragung mit 50 % Effizienz erfolgt, und r den Abstand der Fluorophore zueinander. Aus der Formel geht

auch hervor, dass der Abstand der Fluorophore mit der 6. Potenz in die Rechnung eingeht. Aus diesem Grund können bereits kleine Änderungen des Abstands eine deutliche Änderung des FRET-Signals bewirken. FRET hat sich daher als optisches Nanometermaß in biologischen Experimenten etabliert (Miyawaki, 2003).

Damit eine Energieübertragung zwischen den Fluorophoren stattfinden kann, müssen Moleküle verwendet werden, bei denen das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Beliebte Fluorophor-Paare sind zum Beispiel Cyan Fluorescent Protein – Yellow Fluorescent Protein (CFP – YFP) oder FAsH – CFP. Ebenso ist es möglich, in Proteinen vorkommende Aminosäuren mit schwacher Eigenfluoreszenz wie Tyrosin und Tryptophan als FRET-Fluorophore benutzen. Je größer die überlappende Fläche der Spektren ist, desto besser ist die maximale FRET-Effizienz.

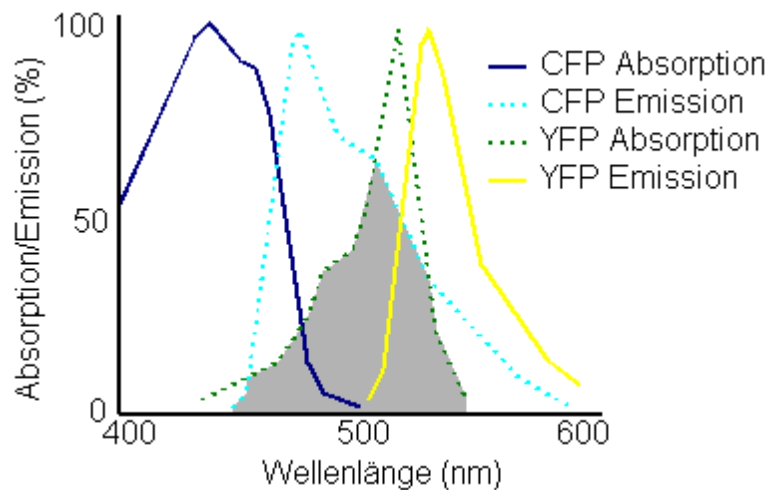


Abb. 12: Darstellung der Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorophore CFP und YFP. Grau: Überlappende Bereich der Emissions- und Absorptionsspektren.

Eine weitere Voraussetzung für FRET ist, dass Donor und Akzeptor parallele elektronische Schwingungsebenen aufweisen. In Lösungen ist dies normalerweise gegeben und spielt keine weitere Rolle. Sind die Fluorophore jedoch fixiert, zum Beispiel innerhalb desselben Proteins, kann eine Änderung des FRET-Signals intramolekulare Strukturveränderungen sichtbar machen, wenn sich die Lage der Fluorophore zueinander ändert.

FRET-Signale werden gemessen, indem mit einem Fluoreszenzmikroskop die Fluoreszenzintensitäten der Fluorophore gemessen werden. FRET zeichnet sich dadurch aus, dass bei einer erfolgreichen Energieübertragung bei Anregung des Donor-Fluorophors die Emissionsintensität des Donors F_{Donor} zurückgeht und sich gleichzeitig die Emissionsintensität des Akzeptorfluorophors F_{Akzeptor} erhöht. Die grafische Darstellung erfolgt als Verhältnis $F_{\text{Akzeptor}}/F_{\text{Donor}}$.

2.5.3.2 FRET-Mikroskopie

FRET-Puffer: 140 mM NaCl

5,4 mM KCl

10 mM HEPES

1 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂

pH 7,3

Für FRET-Experimente wurden transfizierte Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Die Messungen wurden am Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg an einem inversen Fluoreszenzmikroskop vom Typ Zeiss Axiovert 200 mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv und einem Dual-emission Photometric System von TILL Photonics durchgeführt. Die Anregung der Proben erfolgte mit einer Fluoreszenzlampe Polychrome IV (TILL Photonics). Um das Ausbleichen der Fluorophore so gering wie möglich zu halten, wurde die Anregungszeit auf 50 ms mit einer Frequenz von 1 Hz gesetzt. FRET-Verhältnisse wurden als Quotient der YFP- und CFP-Emission, F_{YFP}/F_{CFP} , gemessen, wobei F_{YFP} und F_{CFP} die korrigierten Emissionsintensitäten bei 535 ± 15 nm und 480 ± 20 nm (Beam Splitter DCLP 505 nm) bei einer Anregung von 436 ± 10 nm (Beam Splitter DCLP 460 nm) sind. Die YFP-Emission bei einer Anregung von 480 nm wurde zu Beginn jedes Experiments aufgezeichnet, um die Direktanregung des YFP abziehen zu können. Technisch bedingtes Durchstrahlen von CFP in den 535 nm-Kanal wurde ebenfalls abgezogen, um ein korrektes FRET-Ratio F_{YFP}/F_{CFP} zu erhalten. Das Durchstrahlen von YFP in den 480 nm-Kanal war so gering, dass es ignoriert werden konnte.

Für die Perfusion der Zellen mit Ligandenlösung wurde ein ALA-VM4 Perfusionssystem (ALA Scientific) bei einer Flussrate von ca. 100 μ l/min verwendet. Die Spitze des Perfusionssystems war dabei auf die Zelle im Fokus ausgerichtet. Die Datenerfassung erfolgte mit der Software Clampex (Axon).

2.5.3.3 Analyse von FRET-Daten

Die aufgezeichneten Rohdaten wurden in die Kalkulationssoftware Microcal Origin importiert und weitere Berechnungen durchgeführt. Als erstes wurde das Durchbluten des CFP-Kanals in den YFP-Kanal korrigiert.

$$YFP_{korr1} = YFP_{Roh} - P_1 \times CFP_{Roh}$$

Der dafür notwendige Parameter P_1 ist abhängig vom verwendeten Filter und wurde in früheren Messungen ermittelt. Danach wurde die in jedem Experiment ermittelte YFP-Direktanregung bei 490 nm mit einem weiteren Parameter P_2 multipliziert, welcher das Verhältnis von unspezifisch zu spezifisch angeregtem YFP angibt (F_{436}/F_{490}), und vom vorher korrigierten YFP-Wert abgezogen.

$$YFP_{korr2} = YFP_{korr1} - P_2 \times YFP_{Direkt}$$

Diese Korrektur ist nötig, um die unspezifische Anregung des YFP durch Licht der Wellenlänge 436 nm zu eliminieren. Im letzten Schritt wurde der Quotient aus dem korrigierten YFP- und dem CFP-Wert gebildet, welcher das FRET-Ratio darstellt.

$$Ratio_{FRET} = \frac{YFP_{korr2}}{CFP_{Roh}}$$

Die erhaltenen Werte wurden in einem Koordinatensystem gegen die Zeit aufgetragen. Zur Ermittlung der Geschwindigkeit der Komplexbildung wurde der Teil des linearen Kurvenanstiegs auf Grundlage einer Geradengleichung gefittet. Die ermittelte Steigung dient als Maß für die Geschwindigkeit der Komplexbildung.

2.5.4.1 Grundlagen: Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) wurde zuerst im Jahr 1976 beschrieben und ist die Bezeichnung einer Methode, mit der die zweidimensionale laterale Diffusion von Fluorophor-markierten Molekülen in einer Membran gemessen werden kann (Axelrod et al., 1976; Edidin et al., 1976). Dazu werden Zellen, die die markierten Proteine exprimieren, mit einem Konfokalmikroskop bei geringer Anregungsenergie betrachtet. Anschließend wird das Anregungslicht auf eine kleine Stelle der Zelle fokussiert und die Fluorophore in dieser Region mit hoher Anregungsenergie irreversibel gebleicht. Im Rahmen der Brownschen Molekularbewegung diffundieren nicht gebleichte Moleküle lateral in diese Region ein und ersetzen die nicht-fluoreszierenden Moleküle in der gebleichten Region. Die dafür benötigte Zeit ist ein Maß für die Mobilität der untersuchten Proteine. Dabei ist häufig zu beobachten, dass keine vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Fluoreszenz eintritt. In solchen Fällen ist ein bestimmter Teil der markierten Proteine immobil und somit nicht austauschbar (Lippincott-Schwartz et al., 2003).

Da die verwendete Lichtquelle auch bei geringer Energie im Laufe der Zeit für ein Ausbleichen der Fluorophore sorgt, müssen die aufgenommenen Kurven normiert werden, um dieses so genannte Acquisition Bleaching auszugleichen. Beim Bleichen sollte außerdem die

Fluoreszenz in der geblichenen Region um mindestens 50 % abnehmen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Die Auswertung der Kurven erfolgt mit Hilfe eines zugrunde gelegten mathematischen Modells. In der Literatur sind diverse Modelle beschrieben, die sich vor allem in der Gewichtung der angenommenen Interaktion der Fluorophor-markierten Proteine mit anderen Zellbestandteilen unterscheiden (Yguerabide et al., 1982; Reits and Neefjes, 2001; Sprague et al., 2004; Sprague and McNally, 2005). Die einfachste Annahme ist dabei, dass keine Interaktionen stattfinden und die Bewegung der Moleküle ausschließlich auf lateraler Diffusion beruht. Dies ist jedoch bei der Betrachtung von Zellen so gut wie nie der Fall. Hier ist häufig zu beobachten, dass die untersuchten Proteine eine deutlich langsamere Bewegung zeigen als für eine freie Diffusion anzunehmen wäre (Cherry et al., 1998). Eine Erklärung dafür ist, dass die untersuchten Proteine in der Zelle mit anderen Zellbestandteilen interagieren und ihre Mobilität auf diese Weise eingeschränkt wird (Saxton, 2001; Sprague and McNally, 2005). Vergleiche der theoretischen Modelle mit praktischen Experimenten haben allerdings gezeigt, dass die Interaktion der betrachteten Proteine mit anderen Zellkomponenten nur eine untergeordnete Rolle spielt und in den meisten Fällen bei der Berechnung der Mobilität vernachlässigt werden kann (Saxton, 2001). Bei der Auswertung der Daten sollte auch bedacht werden, dass durch die eingesetzte Lichtquelle nicht nur der Bereich im Fokus geblichen wird, sondern auch die Bereiche der Zelle über und unter der Fokusebene. Messungen, bei denen Bereiche auf der Ober- oder Unterseite der Zelle geblichen wurden, können sich deshalb von Messungen, bei denen die Zellmembran an der Seite der Zelle geblichen wurde, unterscheiden.

Frühere Experimente haben gezeigt, dass sich das Molekulargewicht der untersuchten Proteine nur in relativ geringem Maß auf die Mobilität auswirkt. Der Grund dafür ist, dass bei Transmembranproteinen die Membran selbst den größten Widerstand für die Diffusion darstellt und der Einfluss des Molekulargewichts der untersuchten Proteine vernachlässigbar gering ausfällt (Reits and Neefjes, 2001). Eine größere Auswirkung hat daher auch die Umgebungstemperatur, da sich niedrige Temperaturen negativ auf die Fluidität der Zellmembran auswirken und somit die Mobilität der integrierten Proteine beeinträchtigen.

Die aufgenommenen Werte der Experimente zeigen, dass die Fluoreszenzwiederherstellung und damit die Einwanderung der untersuchten Rezeptoren biphasisch abläuft, mit einem schnellen Anteil zu Beginn und einem langsamen Anteil im weiteren Verlauf des Experiments. Ein solcher Verlauf ist in der Literatur häufig beschrieben, kann jedoch bis heute nicht eindeutig erklärt werden (Saxton, 2001; Sprague and McNally, 2005). Eine

Theorie besagt, dass unterschiedlich zusammengesetzte Rezeptorpopulationen auf der Zelloberfläche für die unterschiedlichen Mobilitäten verantwortlich sind (Lippincott-Schwartz et al., 2003). Da der Verlauf der Fluoreszenzwiederherstellung in den vorliegenden Experimenten biphasisch abläuft, wurde für die Auswertung der Kurven eine doppelt exponentielle Funktion gewählt, um die unterschiedlichen Phasen des Verlaufs erfassen zu können. Dieses Vorgehen wurde aufgrund der bereits beschriebenen Erkenntnisse aus dem Vergleich von theoretischen und praktischen Experimenten bereits erfolgreich in anderen Studien angewandt (Dorsch et al., 2009). Die in den Fits erhaltenen Parameter geben den Anteil mobiler Fluorophore am Gesamtbestand (mobile Fraktion, y_0) sowie die Anteile (A_1 und A_2) und die Zeiten zum Erreichen der halbmaximalen Wiederherstellung (t_1 und t_2) der schnellen und langsamen Bestandteile der Kurve wieder.

Der schnelle Anteil der Kurven in den ersten Sekunden nach dem Bleichen wurde dabei als unspezifisch betrachtet, da dieser wie bereits beschrieben nicht eindeutig erklärt werden kann. Es handelt sich hierbei nicht um eine spontane Reaktivierung von gebleichten Fluorophoren, da dieser schnelle Anstieg bei fixierten Zellen nicht zu sehen ist (Dr. Moritz Bünemann, persönliche Kommunikation). Eventuell handelt es sich hierbei um ein technisches Artefakt, der durch die Art des Bleichens zustande kommt. Da in den hier gezeigten Experimenten Bereiche an der Seite der Zelle gebleicht wurden, kann man nicht von einer punktförmigen Bleichregion ausgehen, sondern muss eine elliptische Form annehmen. Möglicherweise kommt es durch die damit ungleichmäßig um die Bleichregion verteilten Fluorophore (oberhalb und unterhalb weniger, rechts und links mehr) zu den beobachteten Effekten.

2.5.4.2 FRAP-Mikroskopie

FRAP-Experimente (Fluorescence Recovery After Photobleaching) wurden am Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg an einem Konfokalmikroskop vom Typ Leica SP2 durchgeführt. Für die Bleaching-Experimente wurden YFP-konjugierte Rezeptorkonstrukte verwendet, da hiermit das Ausbleichen der Fluorophore effektiver ist als bei CFP. Zur Anregung und zum Bleichen wurde ein Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 514 nm verwendet. Die Zellen waren während der Experimente mit FRET-Puffer bedeckt. Zuerst wurden bei niedriger Laserintensität geeignete Zellen gesucht und ein Bereich aus der Zellmitte fokussiert. Anschließend wurde mit der Steuerungssoftware eine „Region of Interest“ (ROI) im Bereich der Zellmembran festgelegt, die dann mit hoher Laserintensität gebleicht wurde. Vor und nach dem Bleichen wurde die Fluoreszenz der Zelle in unterschiedlichen Zeitintervallen erfasst. Diese Intervalle sind in Abb. 13 wiedergegeben. Die

erhaltenen Bilderserien wurden anschließend mit der Software ImageJ (Girish and Vijayalakshmi, 2004) ausgewertet (siehe 2.7.3).

Serie	Anzahl frames	Dauer pro frame [s]
Pre-Bleach	5	5
Bleach	4	0,5
Post-Bleach 1	5	2
Post-Bleach 2	5	6
Post-Bleach 3	5	10

Abb. 13: Übersicht über die Anzahl und Dauer der Aufnahmen während der Bleichexperimente.

2.5.4.3 Analyse von FRAP-Daten

Die in den FRAP-Experimenten aufgenommenen Bilder wurden ausgewertet, indem zunächst die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in der Bleichregion und die der ganzen Zelle mit der ImageJ-Funktion „Multi Measure“ bestimmt wurde. Um das durch die Anregung bei den Aufnahmen verursachte Bleichen zu kompensieren, wurden alle Werte aus der gebleichten Region mit den Werten der ganzen Zelle normiert. Anschließend wurden die Kurven auf Werte zwischen 100 % (Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen) und 0 % (Intensität der gebleichten Region direkt nach dem Bleichen) normalisiert.

Für die weitere Auswertung der Kurven wurde die Software Microcal Origin benutzt. Hier wurden die Datenpunkte aller Messungen als Kurven dargestellt, wobei diejenigen Messpunkte, die um mehr als 20 % vom Mittelwert des vorigen und nachfolgenden Messpunktes abwichen, nicht berücksichtigt wurden. Dadurch wurde sichergestellt, dass Messreihen mit starken Schwankungen das Gesamtergebnis nicht verfälschen. Die Kurven wurden als Grundlage für einen Fit auf Basis einer doppelt exponentiellen Funktion verwendet. Die erhaltenen Fit-Parameter wurden für die Interpretation der Mobilität der Rezeptoren benutzt.

Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die Mittelwerte der Messpunkte \pm Standardfehler aufgetragen und der Fit der Kurven in das Diagramm eingefügt.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Herstellung von rekombinantem TGF- β 2

Zur Herstellung von rekombinantem humanem TGF- β 2 wurde ein vorliegendes Konstrukt benutzt, das die Sequenz des reifen Proteins in dem Vektor pN25RBSII enthält. Dieses Konstrukt wurde in den E. coli-Stamm JM109 transformiert. Acht Kulturflaschen mit jeweils 800 ml TB-Medium wurden angesetzt und bei einer optischen Dichte von $OD_{550} \sim 0,5$ mit 1 mM IPTG bei 37° C induziert. Nach 3 h konnten 33g Bakterien (Feuchtwicht) geerntet werden.

Da das Protein in unlöslicher Form in den Bakterien in Einschlusskörperchen (Inclusion bodies) abgelagert wird, mussten diese im nächsten Schritt isoliert werden. Dazu wurden die Bakterien in Puffer resuspendiert und für 5 min bei 300 W ultrabeschallt. Nach Zentrifugation und erneuter Resuspension des Pellets wurde dieses erneut für 3 min bei 300 W beschallt. Im Anschluss konnten 6,4 g Einschlusskörperchen durch Zentrifugation isoliert werden. Das Protein wurde dann über Nacht durch Zugabe von 6 M Guanidiniumhydrochlorid extrahiert.

Am nächsten Tag wurden die extrahierten Proteine mit einer Sephacryl S-300 HR-Säule (Pharmacia) per Gelfiltration aufgereinigt. Von den gesammelten Fraktionen enthielten die Fraktionen 5-15 die gewünschten Proteine. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch Druckfiltration auf ca. 40 ml mit einer optischen Dichte von $OD_{280}=20/\text{ml}$ konzentriert.

Zur Renaturierung der ungefalteten Proteine wurden 200 OD der Lösung langsam in 1l der folgenden, auf 4° C vorgekühlten Renaturierungslösung gegeben:

- 2 M LiCl
- 25 mM CHAPS
- 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0
- 5 mM EDTA
- 2 mM Glutathion red.
- 0,2 mM Glutathion ox.

Der Ansatz wurde für mindestens zehn Tage bei 4° C im Dunkeln inkubiert.

Zur Aufreinigung per FPLC wurde der Ansatz auf pH 3,0 eingestellt, durch Druckfiltration aufkonzentriert und zentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf eine Ionenaustauschersäule vom Typ Fractogel EMD SO_3^- 650S geladen und mit einem Gradienten von 0-2 M NaCl eluiert. Die Dimer-enhaltenden Fraktionen wurden vereint, auf 2 OD_{280}/ml konzentriert, aliquotiert und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug ca. 5 mg Protein pro Liter Kulturmedium.

Die korrekte Masse des Proteins wurde im Anschluss von Herrn Dr. Werner Schmitz massenspektrometrisch überprüft.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

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

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

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

SDS-Probenpuffer: 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8
2% SDS
20% Glycerin (86%)
2% Bromphenolblau in H₂O
(für reduzierende Bedingungen: 2% 2-Mercaptoethanol)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird mit dem „Perfect Blue™ Vertical Electrophoresis System“ der Firma PEQLAB durchgeführt. Zuerst wird das Trenngel bis 2 cm 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.

Nachdem die Proben mit SDS-Probenpuffer vermischt, 5 Minuten gekocht und in die Geltaschen eingebracht wurden, erfolgt die elektrophoretische Auftrennung bei einer Stromstärke von 35 mA pro Gel.

	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)
Upper Tris:	1,25 ml	-
Lower Tris:	-	2,5 ml
AA/BAA:	0,5 ml	4 ml
H ₂ O dest.:	3,2 ml	1,5 ml
Glycerin:	-	2 ml
APS 40% (w/v):	12 µl	14 µl
TEMED:	12 µl	14 µl

2.6.3 Western Blot

Blotpuffer:	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
TBS:	20 mM Tris/HCl pH 7,6 150 mM NaCl
Blockpuffer 1:	1x TBS 0,1 % Tween-20 5 % (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA)
Blockpuffer 2:	1x TBS 0,2 % Tween-20 5 % (w/v) Magermilchpulver

Um die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurde eine Semi-Dry-Blotapparatur des Herstellers PEQLAB verwendet. Die Proben wurden 38 min bei 250 mA/cm² je Blot auf die Membran übertragen, 4x 10 min bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert und anschließend über Nacht mit dem jeweiligen Erstantikörper bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Blots 4x 10 min mit Blockpuffer gewaschen, für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert und erneut 4x 10 min mit Blockpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Blots entwickelt.

2.6.4 Entwicklung von Western Blots (Chemolumineszenz)

Lösung 1: 0,1 M Tris/HCl pH 8,5
+ 3 µl 30 % (w/v) H₂O₂

Lösung 2: 2,5 mM Luminol
1 % (v/v) DMSO
0,1 M Tris/HCl pH 8,5
+ 12 µl Enhancer

Enhancer: 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma C9008)
10 ml DMSO

Zum Entwickeln der Blots wurden pro Blot 5 ml Lösung 1 mit 5 ml Lösung 2 vermischt und in der Dunkelkammer auf die Blots gegeben. Die Blots wurden unter leichtem Schütteln 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Blots mit zwei übereinander liegenden Röntgenfilmen in eine Filmkassette gelegt. Nach 5 min Belichtungszeit wurden die Filme entwickelt.

2.6.5 Analyse von Western Blots

Um die entwickelten Western Blots quantitativ auswerten zu können, wurden die Filme mit einem Flachbettscanner eingescannt und mit der Software ImageJ (Girish and Vijayalakshmi, 2004) analysiert. Dazu wurde eine zusammengehörige Blot-Reihe ausgewählt und mit der Funktion Plot Lanes die Intensität der Banden ermittelt. Um verschiedene Blots miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Werte mit den auf gleiche Weise ermittelten Werten der Kontrollblots (α -Actin) normiert und anschließend auf Werte zwischen 0 und 100 % normalisiert, wobei die stärkste Bande jedes Blots als 100 % gewertet wurde.

2.6.6 Iodierung von Liganden

Für Bindungsassays an ganzen Zellen wurden die Liganden mit ¹²⁵I radioaktiv markiert. Hierfür stellte sich die von Frolik *et al.* beschriebene Methode (Frolik et al., 1984) als am besten geeignet heraus. 100 pMol des jeweiligen Liganden in 20 µl einer 1 mM HCl-Lösung wurden mit 20 µl 1 M Na₂HPO₄ (pH 7,5) gemischt. Anschließend wurden 4 µl (400 µCi, 2Ci/mmol) Na¹²⁵I zugegeben. Die Iodierung erfolgte durch Zugabe von 3 x 2 µl Chloramin T (250 µg/ml) für 2 min, 1,5 min und 1 min. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe

von 10 µl 10 mM Acetyltyrosin und 20 µl 100mM Kaliumiodid gestoppt. Für den nächsten Schritt wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen einer Harnstoff-/Eisessig-Lösung versetzt (1,2 g Harnstoff in 1 ml 1 M Eisessig).

Die Aufreinigung erfolgte per Gelfiltration mit einer Sephadex G50-Säule mit 2 ml Bettvolumen. Als Laufpuffer wurde 4 mM HCl/75 mM NaCl/0,1% BSA benutzt, die Fraktionen mit dem markierten Protein wurden durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Mit dieser Methode wurden ca. 50% des ^{125}I inkorporiert. Die Iodierung erfolgte dementsprechend in einem 1:1 molaren Verhältnis. Statistisch wird demnach die Majorität der Proteinmoleküle an einem Tyrosinrest jodiert.

3. Ergebnisse

3.1 Austausch von Rezeptordomänen und Änderung des Signalweges

3.1.1 Herstellung von chimären Rezeptoren

Wie einleitend beschrieben, kann die Signalvermittlung in der TGF- β -Superfamilie über präformierte oder ligandeninduzierte Rezeptorkomplexe erfolgen. Daraus ergeben sich mehrere Fragen: Im Fall der präformierten Komplexe ist bisher nicht bekannt, durch welche Mechanismen die ligandenunabhängige Rezeptor-Rezeptor-Erkennung gesteuert wird. Für die Bildung eines präformierten Komplexes aus BMPR-IA und BMPR-II beziehungsweise BMPR-IB und BMPR-II konnte gezeigt werden, dass der größte Teil der intrazellulären Domäne des Typ-II-Rezeptors benötigt wird, da sonst keine Komplexbildung in Abwesenheit des Liganden beobachtet wird (Nohe et al., 2002). Im Gegensatz dazu werden für die BMP-7- oder Activin-A-induzierte Rekrutierung der Typ-I-Rezeptorketten ActR-I bzw. ActR-IB die intrazellulären Domänen beider Rezeptorsubtypen nicht benötigt (Greenwald et al., 2003). Da in BIAcore-Experimenten keine oder nur sehr schwache Bindungen von Activin-A oder BMP-7 an die extrazellulären Domänen der Typ-I-Rezeptoren gemessen werden konnten (Heinecke et al., 2009), stellt sich die Frage, wie in diesen Fällen Spezifität in der Typ-I-Rezeptor Erkennung erzeugt wird.

Im ersten Schritt der Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Domänen in Typ-I-Rezeptorketten für deren spezifische Rekrutierung in signalaktive Komplexe essentiell sind. Dazu wurden einzelne Domänen verschiedener Rezeptorketten ausgetauscht ("Domain-swapping") und die Auswirkung auf die ligandeninduzierte Signalvermittlung untersucht. In diesen einführenden Experimenten wurde nur eine kleine Auswahl an möglichen Rezeptorchimären analysiert. Bei allen Chimären wurde die extrazelluläre Domäne von TGF- β -RI (ALK5) verwendet und mit den Transmembran- und/oder Kinasedomänen von ActR-IA (ALK2) oder ActR-IB (ALK4) fusioniert. Die Wahl dieses experimentellen Designs wird u. a. dadurch begründet, dass von allen dieser Familie zugehörigen Rezeptoren die TGF- β -Rezeptoren die höchste Ligandenspezifität aufweisen, indem nur die drei TGF- β -Isoformen TGF- β 1, - β 2 und - β 3 durch diese Rezeptoren zelluläre Signale erzeugen können. Die Fusionierung der TGF- β -RI Ektodomäne mit den Transmembran- und/oder intrazellulären Domänen von ActR-I bzw. ActR-IB sollte Antworten auf folgende Fragen liefern: 1. Können beide SMAD Signalwege mit solchen chimären Konstrukten aktiviert werden? Die Signalvermittlung durch ActR-I erfolgt über die Phosphorylierung von SMAD-1, SMAD-5

und SMAD-8, während ActR-IB in Analogie zum wildtypischen TGF- β -RI (ALK5) SMAD-2 und SMAD-3 aktiviert. 2. Welche Rolle spielt die Transmembrandomäne? Ist für die spezifische Rekrutierung des Typ-I-Rezeptors diese Domäne entscheidend, sollte dies in qualitativ oder quantitativ unterscheidbaren Signalen resultieren, die durch Reporteranalysen auf einfache Weise erfasst werden können. Neben dem als Referenz dienenden wildtypischen TGF- β -RI wurden vier verschiedene Rezeptorchimäre analysiert. Die Transmembrandomäne entsprach entweder dem Ursprung der extrazellulären oder der intrazellulären Domäne. Eine Übersicht über die Rezeptorkonstrukte und die verwendete Nomenklatur zeigt Abbildung 14.

Bezeichnung	Extrazellulär	Transmembran	Intrazellulär
5e2ti	ALK5	ALK2	ALK2
5et2i	ALK5	ALK5	ALK2
5e4ti	ALK5	ALK4	ALK4
5et4i	ALK5	ALK5	ALK4

Abb. 14: Nomenklatur und Bestandteile der verwendeten Rezeptorkonstrukte.

3.1.2 Untersuchung der SMAD-abhängigen Luciferaseaktivität

Die Signalaktivität der Rezeptorchimäre wurde indirekt durch die SMAD-abhängige Induktion eines Reporterkonstruktes bestimmt. Es wurden in zwei verschiedenen Versuchsansätzen Reporterengenkonstrukte verwendet, bei denen das Luciferase kodierende Gen entweder unter der Kontrolle eines SMAD-1/5/8- oder eines SMAD-2/3-sensitiven Promoters steht. Die Aktivität der Luciferase kann dabei quantitativ bestimmt werden und dient als Maß für die ligandeninduzierte Rezeptoraktivierung.

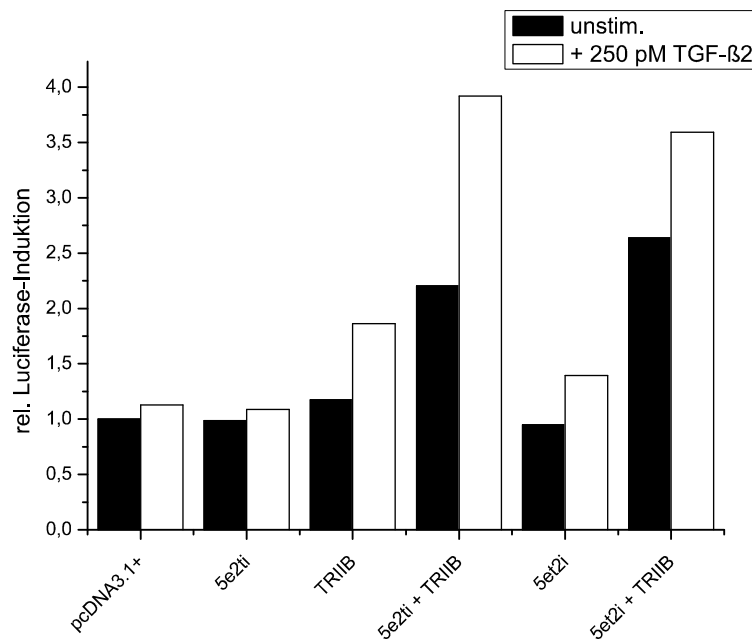


Abb. 15: Luciferase-Induktion in HEK-Zellen durch SMAD-1/5/8. HEK-tA201-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptorkonstrukten sowie mit einem SMAD-1/5/8-sensitiven Luciferase-Reporterplasmid transfiziert und entweder nicht oder mit 250 pM TGF-β2 für 1 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Induktion der Luciferase bestimmt. Die Luciferaseinduktion wurde auf den Wert der unstimulierten, mock-transfizierten Zellen normiert.

Abbildung 15 zeigt die Luciferaseaktivität unter der Kontrolle des SMAD-1/5/8-sensitiven Promoters in HEK-tA201-Zellen. Die Zellen wurden zusätzlich transient mit den angegebenen Rezeptorkonstrukten oder als Kontrolle mit einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+) transfiziert. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte entweder unstimuliert oder nach einstündiger Stimulation mit 250 pM TGF-β2. Die Balken zeigen die Luciferaseaktivität relativ zur Aktivität in mock-transfizierten unstimulierten Zellen.

Die Chimären, welche die Transmembran- und/oder die intrazelluläre Domäne von ALK2 enthalten, zeigen bei gleichzeitiger Transfektion von TGF-βR-IIB sowohl basal als auch stimuliert eine deutlich höhere Aktivität als in untransfizierten Zellen. Bei alleiniger

Transfektion ohne zusätzlichen Typ-II-Rezeptor sind die Chimäre allerdings nicht oder nur in sehr geringem Maße in der Lage, ein Signal über SMAD-1/5/8 zu generieren. Die Cotransfektion des Typ-II-Rezeptors TGF- β -RII ist also nötig, da dieser offenbar endogen nicht, oder zu geringen Mengen vorliegt, um eine effiziente Transphosphorylierung zu gewährleisten. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass bereits in Zellen, welche nur mit dem Typ-II-Rezeptor transfiziert wurden, durch Ligandenstimulation eine Erhöhung des Luciferasesignals sichtbar ist. Die Herkunft der Transmembrandomäne des Typ-I-Rezeptors spielt bei der Signalvermittlung keine Rolle, da sowohl das Chimär mit der Transmembrandomäne von ALK2 als auch das Chimär mit der Transmembrandomäne von ALK5 das gleiche Verhalten zeigen. Ebenfalls wird die Signalweiterleitung nicht durch den Austausch der Kinasedomäne behindert, da ALK2 nicht den TGF- β üblichen SMAD-2/-3, sondern den SMAD-1/-5/-8 Signalweg aktiviert. Für die TGF- β 2 vermittelte Signaltransduktion scheint daher nur die Präsenz die Ektodomäne des TGF- β R-I (ALK5) erforderlich zu sein.

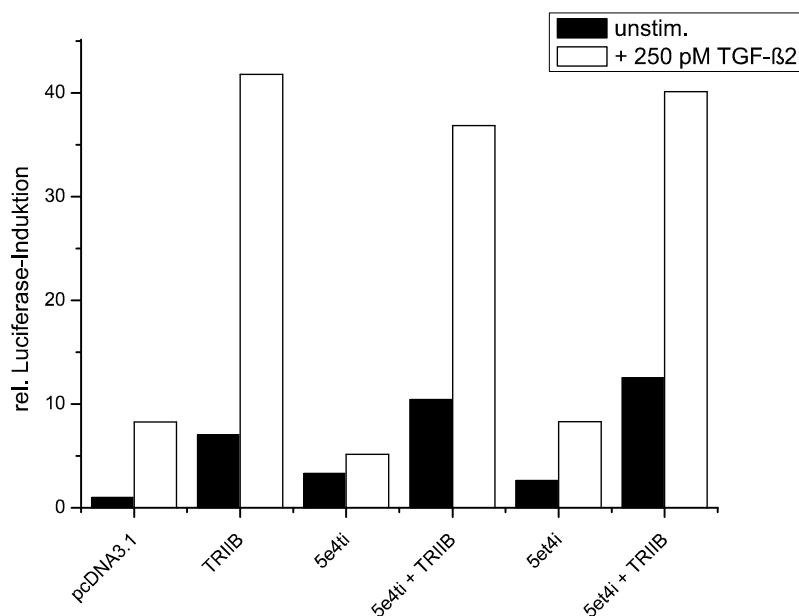


Abb. 16: Luciferase-Induktion in HEK-Zellen durch SMAD-2/3. HEK-tsA201-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptorkonstrukten sowie mit einem SMAD-2/3-sensitiven Luciferase-Reporterplasmid transfiziert und entweder nicht oder mit 250 pM TGF- β 2 für 1 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Induktion der Luciferase bestimmt. Die Luciferaseinduktion wurde auf den Wert der unstimulierten, mock-transfizierten Zellen normiert.

Zur Kontrolle wurden ähnliche Experimente mit Rezeptorchimären durchgeführt, bei denen die Transmembran- und/oder Kinasedomäne des ActR-IB (ALK4) an die Ektodomäne des

TGF- β R-I Rezeptors (ALK5) fusioniert wurde. Beide Rezeptoren aktivieren den SMAD-2/-3 Signalweg. In Abbildung 16 ist die Induktion der Luciferase unter der Kontrolle des SMAD-2/3-sensitiven Promoters in HEK-tsA201-Zellen, die zusätzlich transient mit den angegebenen Rezeptorkonstrukten transfiziert wurden, ohne oder mit einstündiger Stimulation durch 250 pM TGF- β 2. Auch hier zeigt sich deutlich, dass TGF- β R-IIB in den Zellen der limitierende Faktor ist, da durch die Transfektion dieses Rezeptors nach der Stimulation mit TGF- β 2 ein sehr hohes Signal erhalten wird. Die Transfektion der chimären Konstrukte zeigt auch in diesem Versuch nur dann einen Effekt, wenn TGF- β R-IIB cotransfiziert wird. Allerdings ist kein höheres Signal als bei der Transfektion von TGF- β R-IIB alleine zu erzielen. Dieser Effekt kann durch die endogene Expression des TGF- β R-I Rezeptors erklärt werden, wenn dessen Präsenz eine maximale Aktivierung der zur Verfügung stehenden SMAD-Moleküle bedingt. Die Menge mindestens eines der an der Signalkaskade beteiligten Moleküle scheint daher die Signalaktivität zu limitieren. Andererseits, wären die transfizierten chimären Konstrukte nicht funktional, würde man einen inhibitorischen, wenn nicht sogar dominant-negativen Effekt erwarten, da die extrazellulären Domänen der Chimären mit denen des endogen exprimierten Rezeptors um die Bindung mit dem Liganden konkurrieren würden. In diesem Fall würde eine Abnahme des Luciferasesignals erwartet, was aber nicht der Fall ist. Ein weiteres Indiz für die Funktionalität der Chimären ist, dass bereits in unstimulierten Zellen durch die Transfektion dieser Konstrukte in Verbindung mit dem Typ-II-Rezeptor ein höheres basales Luciferasesignal zu sehen ist. Dies wird vermutlich durch eine ligandenunabhängige Interaktion der Rezeptoren miteinander verursacht.

Die gezeigten Experimente belegen, dass die Rezeptorrekrutierung in den Signalkomplex durch den Austausch von der Transmembran- und/oder der intrazellulären Domäne nicht beeinflusst wird. Außerdem ist es möglich, durch Kombination verschiedener Rezeptorelemente die verwendeten Signalwege zu beeinflussen. Der benötigte Ligand sowie der zu rekrutierende Typ-II-Rezeptor werden dabei durch die extrazelluläre Domäne definiert, wohingegen die Art des verwendeten Signalweges von der intrazellulären Kinasedomäne des Typ-I-Rezeptorkonstrukts abhängt. Die Herkunft der Transmembrandomäne scheint dabei wiederum keine Rolle zu spielen, da es keinen Einfluss hatte, ob die zum extra- oder intrazellulären Rezeptorteil gehörende Transmembrandomäne verwendet wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für die Messungen der Rezeptorrekrutierung mit Hilfe der FRET-Technologie von großer Bedeutung, da hier u.a. Rezeptorkonstrukte, bei denen die Kinasedomäne durch verschiedene Fluorophore (CFP und YFP) substituiert ist, verwendet wurden.

3.2 Untersuchung der Ligandenbindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche

Die Tatsache, dass in den dimeren Liganden der TGF- β -Superfamilie vier Rezeptor-Bindeepitope vorhanden sind, führt dazu, dass auf der Zelloberfläche eine Vielzahl von möglichen individuellen Rezeptor-Liganden-Interaktionen vorstellbar ist. Außerdem können die Liganden noch mit anderen zellulären Komponenten wie zum Beispiel Corezeptoren oder der extrazellulären Matrix interagieren. Daher sollte untersucht werden, ob sich die in Oberflächen-Plasmonresonanz Messungen (SPR, BIAcore) ermittelten Bindeaffinitäten von Liganden und Rezeptoren von denen unterscheiden, die durch radioaktiv markierte Liganden an ganzen Zellen bestimmt werden. In BIAcore-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Bindeaffinität durch die gleichzeitige Interaktion des Liganden sowohl mit zwei Typ-I- als auch mit zwei Typ-II-Rezeptoren (1:2-Interaktion) durch Aviditätseffekte deutlich erhöht. Über die Zusammensetzung von Rezeptorkomplexen auf Zellen ist bisher wenig bekannt. Präformierte Komplexe wurden zwar nachgewiesen, nicht aber deren exakte Stöchiometrie. Ebenso wenig existieren Daten über die Verteilung von monomeren und präassemblierten dimeren Rezeptoren eines Subtyps. Es sollte daher durch Bindung radioaktiv markierter Liganden an ganzen Zellen untersucht werden, ob Interaktionen mit monomeren und dimeren Rezeptoren differenziert erfasst werden können, da sich aufgrund der BIAcoredaten deren Bindeaffinitäten deutlich unterscheiden. Um den Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Bindung des Liganden zu minimieren, wurden in den folgenden Experimenten BMP-2-Varianten benutzt, bei denen die N-terminalen Heparinbindungsstellen entfernt wurden.

3.2.1 Verwendete Rezeptorkonstrukte

Zur Untersuchung der Ligandenbindung an ganzen Zellen wurden COS7-Zellen mit BMPR-IA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit radioaktiv markiertem BMP-2 inkubiert und die nach mehrmaligem Waschen zurückbleibende Aktivität gemessen.

Zusätzlich zur Transfektion mit wildtypischem BMPR-IA wurde ein System des Herstellers ARIAD verwendet, bei dem die intrazelluläre Domäne des BMPR-IA durch eine FKBP-Domäne substituiert wird (ARIAD Homodimerization Kit). Durch Inkubation mit einem synthetischen Dimerizer-Molekül kann dann die Bildung von homodimeren Rezeptoren induziert werden, da der Dimerizer gleichzeitig zwei FKBP-Domänen bindet. Diese Technologie sollte genutzt werden, um die Bildung homodimerer Typ-I-Rezeptorkomplexe zu erzwingen, was in einer Erhöhung der Anzahl hochaffiner Ligandenbindungsstellen

resultieren sollte. Zur Kontrolle wurde ein zusätzliches BMPR-IA-FKBP-Konstrukt hergestellt, bei dem die Transmembrandomäne durch die eines nicht verwandten membranständigen Proteins ersetzt wurde. Diese Variante sollte Aufschluß auf mögliche Einflüsse der Transmembrandomänen auf die Rezeptordimerisierung liefern. Bei der verwendeten Transmembrandomäne handelt es sich um die des Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1). Diese wurde gewählt, da in der Literatur Experimente beschrieben sind, in denen mit dem ARIAD-System in Verbindung mit PECAM-1 eine nahezu einhundertprozentige Dimerisierung nach Zugabe des Dimerizers erreicht werden konnte (Zhao and Newman, 2001).

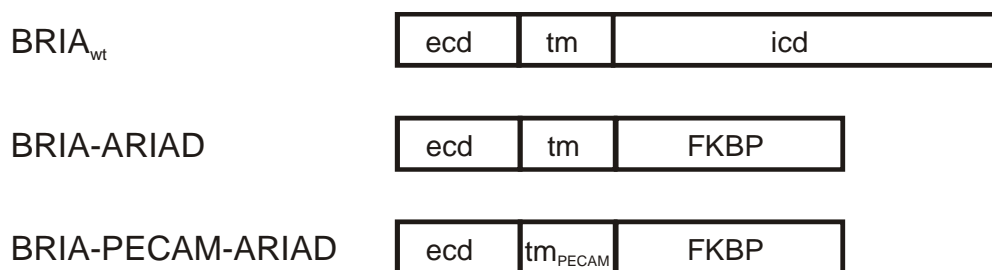


Abb. 17: Übersicht der in den Radioligandenassays verwendeten Rezeptorkonstrukte.

3.2.2 Ligandenbindung an wildtypische Rezeptoren

Abbildung 18 zeigt die Bindekurven von N-terminal trunziertem BMP-2 (coreBMP-2(wt)) an COS7-Zellen, die mit wildtypischem BMPR-IA transfiziert wurden. Die Transfektionsbedingungen waren dabei in allen Experimenten identisch.

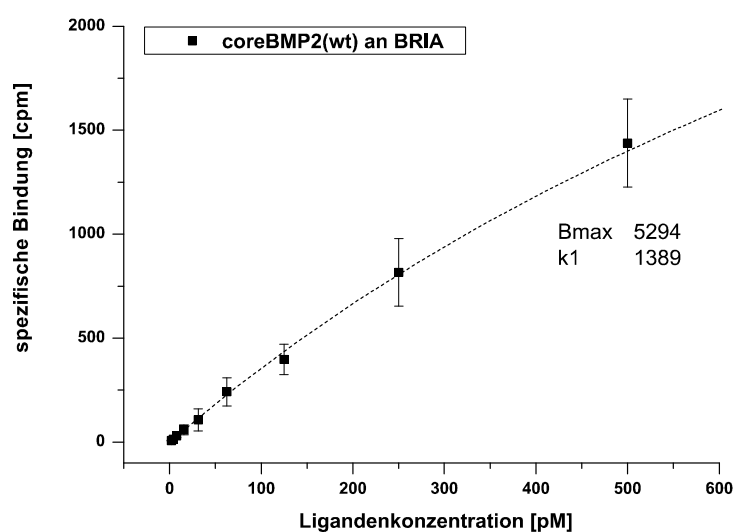


Abb. 18: Bindungskurve von wildtypischem BMP-2 an BMPR-IA-transfizierte COS7-Zellen. Die ermittelte Affinität ($k_1 = 1,4$ nM) entspricht der Affinität der 1:2-Interaktion von Ligand und Rezeptor.

Fittet man die sich ergebenden Bindungskurven nach einem One-Site-Binding-Model, erhält man Werte für die maximal gebundene Aktivität (B_{max} [cpm]) sowie die Affinität des Liganden zu der jeweiligen Bindestelle (k_1 [pM]). Für einen Konzentrationsbereich des Liganden von 0-500 pM, welcher in Analogie zu bereits früher durchgeführten Experimenten gewählt wurde (Paralkar et al., 1991), erhält man mit dieser Methode eine Affinität des Liganden zum Rezeptor von 1,4 nM, was der in Biosensor-Experimenten ermittelten Affinität der 1:2-Interaktion von BMP-2 zu BMPR-IA entspricht.

Um die 1:1-Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor zu messen, wurde das gleiche Experiment mit einer radioaktiv markierten Mutante (coreBMP-2_wt/L51P) durchgeführt (Abbildung 19). Die Aminosäure Leucin an Position 51 stellt einen Hot-Spot für die Bindung an die Typ-I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB dar. Der Austausch gegen Prolin führt dazu, dass die Wasserstoffbrücke zwischen Leu51 in BMP-2 und Gln86 in BMPR-IA nicht mehr ausgebildet wird (Keller et al., 2004). Die Bindung des Typ-I-Rezeptors wird durch die Mutation nahezu vollständig inhibiert. Bei der heterodimeren Mutante ist nur ein Bindeepitop für BMPR-IA zerstört, so dass nur 1:1-Interaktionen mit dem Typ-I-Rezeptor erfasst werden.

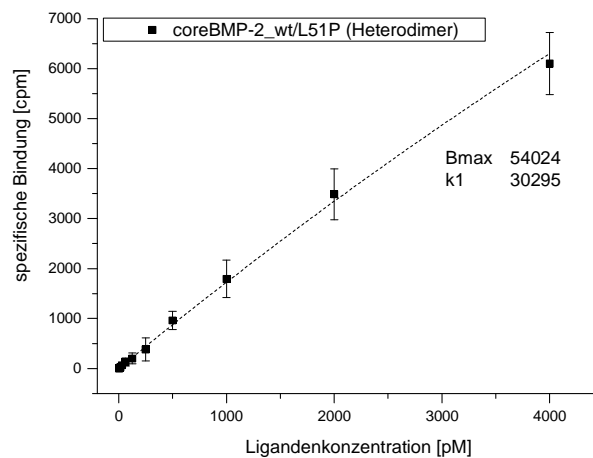


Abb. 19: Bindungskurven von coreBMP-2_wt/L51P an BMPR-IA-transfizierte COS7-Zellen. Die ermittelte Affinität ($k_1 = 30$ nM) entspricht der 1:1-Interaktion von Ligand und Rezeptor.

Da die Bindungskurve im Konzentrationsbereich von 0-500 pM die Plateauphase nicht erreicht und somit nicht ausgewertet werden kann, wurden diese Experimente mit Ligandenkonzentrationen bis 4000 pM durchgeführt. Der Fit der Bindungskurve ergibt eine K_D von etwa 30 nM, was der ermittelten Affinität 1:1-Interaktion von BMP-2:BMPR-IA *in vitro* entspricht. Interessanterweise ergibt der Fit im Vergleich mit Experimenten mit coreBMP-2(wt) eine etwa 10-fach höhere Anzahl an Bindungsstellen (B_{max}). Mögliche unspezifische Bindungen bei höheren Ligandenkonzentrationen konnten durch den direkten Nachweis von BMPR-IA mit einem radioaktiv markierten Fab-Fragment allerdings

ausgeschlossen werden (Heinecke et al., 2009). Die Ergebnisse ließen vermuten, dass bei Messungen mit höheren Konzentrationen von coreBMP-2(wt) eine ähnlich hohe Bmax bestimmt würde. Daraufhin wurden die Bindungsstudien mit höheren coreBMP-2(wt) Konzentrationen wiederholt (Abbildung 20).

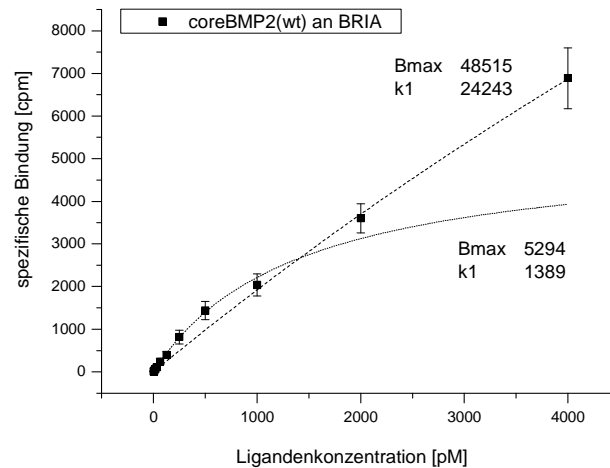


Abb. 20: Bindung von wildtypischem BMP-2 an BMPR-IA-transfizierte COS7-Zellen. Die untere Kurve zeigt den Fit der erhaltenen Werte im Bereich der Ligandenkonzentration von 0-500 pM, die obere Kurve stellt den Fit im Bereich von 1000-4000 pM dar. Die ermittelten Affinitäten (k1) entsprechen den Werten der 1:2- bzw. 1:1-Interaktion von Ligand und Rezeptor. Etwa 90% der Bindungsstellen (Bmax) interagieren in einer 1:1-Interaktion mit dem Liganden, die restlichen 10% zeigen eine hochaffine 1:2-Interaktion.

Bei den entsprechenden Experimenten fiel allerdings auf, dass die Bindungskurve einen biphasischen Verlauf aufweist. Die Kurve wurde daher in zwei unterschiedlichen Bereichen (von 0-500 pM und von 1000-4000 pM) nach einem „One site binding“-Modell gefittet. Die Verwendung von Ligandenkonzentrationen bis 500 pM ergibt dabei wie bereits gesehen eine Affinität von 1,4 nM, die der in Biosensor-Experimenten ermittelten Affinität der 1:2-Interaktion von BMP-2:BMPR-IA entspricht. In den höheren Konzentrationsbereichen erhält man eine Affinität von 25 nM, die der in Biosensor-Experimenten und in Bindeversuchen mit der heterodimeren Mutante BMP-2L51P ermittelten Affinität der 1:1-Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor entspricht. Auffällig ist die Verteilung in hoch- und niedrig-affine Bindungsstellen, wobei 90% der Stellen niederaffin sind. 10 % der Bindestellen sind hochaffin und stellen mit großer Wahrscheinlichkeit präformierte Rezeptordimere oder möglicherweise auch höher geordnete Strukturen dar, die eine simultane 1:2-Interaktion mit dem Liganden ermöglichen. Erwähnenswert ist die erfasste Anzahl der Bindestellen (Bmax), deren Summe mit den durch die heterodimere coreBMP-2_wt/L51P Variante ermittelten Bindestellen übereinstimmt.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Messungen nicht um Artefakte handelt, die durch eine Überexpression der transfizierten Rezeptorkonstrukte hervorgerufen werden, wurden die gleichen Versuche mit untransfizierten C2C12-Zellen wiederholt. Die oben gezeigten Ergebnisse konnten mit diesem Ansatz bestätigt werden (Heinecke et al., 2009).

3.2.3 Induktion hochaffiner Bindestellen durch Rezeptordimerisierung

Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei den hochaffinen Bindungsstellen wirklich um Rezeptordimere handelt, wurde das oben beschriebene ARIAD-System benutzt, um Rezeptoren artifiziell durch Zugabe eines künstlichen Dimerizers zu dimerisieren und somit die Anzahl hochaffiner Bindungsstellen zu erhöhen. Obwohl die Einwirkzeit des Dimerizers deutlich länger als vom Hersteller angegeben gewählt wurde, konnte keine Erhöhung der hochaffinen Bindestellen festgestellt werden, sondern ausschließlich eine Interaktion, die im Bereich der niederaffinen 1:1-Interaktion liegt (Abbildung 21). Die Anzahl der Bindungsstellen liegt ebenfalls im Bereich der mit der heterodimeren coreBMP-2_wt/L51P-Mutante ermittelten Werte.

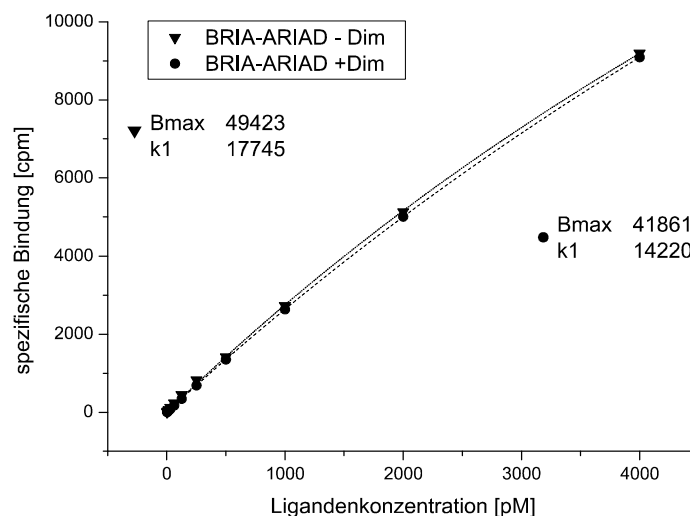


Abb. 21: Bindungskurven von wildtypischem BMP-2 an BMPR-IA-ARIAD-transfizierte COS7-Zellen ohne (- Dim) und mit (+ Dim) Einwirkung des synthetischen Dimerizers. Durch Einsatz des Dimerizers ist es nicht möglich, hochaffine Bindungsstellen zu induzieren.

Überraschenderweise wurde bei diesen Experimenten kein biphasischer Kurvenverlauf beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass für die Bildung präformierter Rezeptordimere die intrazelluläre Domäne essentiell ist. Auch nach Zugabe des Dimerizers wurden keine hochaffinen Bindestellen etabliert. Es werden nur niederaffine Bindestellen detektiert, wobei die Anzahl der Bindestellen den Erwartungen entspricht. Auch mit der Rezeptorvariante, bei der die Transmembrandomäne des BMPR-IA gegen die eines als mobil bekannten Proteins

(PECAM-1) ausgetauscht wurde, konnten keine hochaffinen Bindestellen durch Zugabe des Dimerizers erzeugt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Erklärung dieser Beobachtung gibt es mehrere Möglichkeiten. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die mangelnde Dimerisierbarkeit auf sterische Gründe zurückzuführen ist. So könnte eventuell die Ausrichtung der Rezeptoren in der Membran verhindern, dass der Dimerizer zwei Rezeptoren gleichzeitig erreichen kann. Eine andere Erklärung besteht darin, dass der Dimerizer zwar zwei Rezeptormoleküle dimerisieren kann, die Geometrie dieses artifiziell induzierten Komplexes aber lediglich die Bindung des Liganden an einen Rezeptor erlaubt. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Mobilität der Rezeptoren in der Membran in einem Maße eingeschränkt ist, so dass eine Dimerisierung einer großen Zahl von Rezeptoren nicht möglich ist. Sollte diese letzte Theorie zutreffen, hätte dies zur Folge, dass das bisher angenommene Gesamtbild der ligandeninduzierten Rezeptoraktivierung zumindest fraglich erscheint, da für eine Rekrutierung von Rezeptoren in den Signalkomplex zumindest eine gewisse Mobilität angenommen werden muss. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Rezeptoren mobil in der Membran vorliegen.

3.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

3.3.1 Herstellung von Rezeptorkonstrukten

Die ligandeninduzierte Signalvermittlung der Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie erfordert entweder die Bindung des Liganden an einen präformierten Rezeptorkomplex oder die Bildung eines neuen Komplexes aus mehreren Rezeptoren. Um die Rekrutierung der Rezeptoren in den Signalkomplex gewährleisten zu können, muss mindestens einer der membranständigen Rezeptorsubtypen ein gewisses Maß an Mobilität aufweisen. In den nachfolgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob sich die Mobilitäten verschiedener Rezeptoren voneinander unterscheiden und ob die unterschiedlichen Rezeptordomänen diese Mobilität beeinflussen. Des Weiteren sollte die ligandeninduzierte Komplexbildung verschiedener Rezeptorpaare betrachtet werden, wobei hier ein Schwerpunkt auf dem Einfluss der intrazellulären Kinasedomäne auf diesen Vorgang lag. Für diese Experimente wurden fluoreszenzmikroskopische Verfahren gewählt. Zur Untersuchung der Rezeptormobilität mittels Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) und der ligandeninduzierten Komplexbildung mittels Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) wurden wildtypische Typ I- und Typ II-Rezeptoren c-terminal mit Cyan Fluorescent Protein (CFP; hellblau) oder Yellow Fluorescent Protein (YFP; gelb) fusioniert. In Analogie wurden auch Rezeptorvarianten verwendet, bei denen die Kinasedomäne entfernt und durch CFP oder YFP ersetzt wurde. Die trunkierten Rezeptoren enden dabei nach den ersten zehn Aminosäuren der intrazellulären Domäne, so dass nur die extrazelluläre und die Transmembrandomäne vollständig vorhanden sind. Das wildtypische Signalpeptid ist bei allen Konstrukten vorhanden, um die richtige Lokalisation in der Zellmembran zu gewährleisten. Eine Übersicht über die erzeugten Konstrukte zeigt Abb. 22.

Die Konstrukte wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Die Signalaktivität der "full-length" Konstrukte wurde außerdem in SMAD-Phosphorylierungsassays getestet. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Fluorophor-fusionierten Rezeptoren in ihrer Aktivität nicht von wildtypischen Rezeptoren unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu den wildtypischen und trunkierten Fusionsrezeptoren wurden außerdem trunkierte BMPR-IA-Konstrukte hergestellt, bei denen die wildtypische Transmembrandomäne durch eine fremde, nicht mit BMP-Rezeptoren verwandte Transmembrandomäne ersetzt wurde. Diese Transmembrandomäne stammt auch hier vom Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1). Auf diese Weise sollte untersucht

werden, ob hierdurch eine höhere Mobilität der Rezeptorkonstrukte in der Membran erzielt wird. Ebenfalls kann so in FRET-Experimenten überprüft werden, ob die native Transmembrandomäne für die Komplexierung von Rezeptoren verschiedener Subtypen zwingend erforderlich ist.

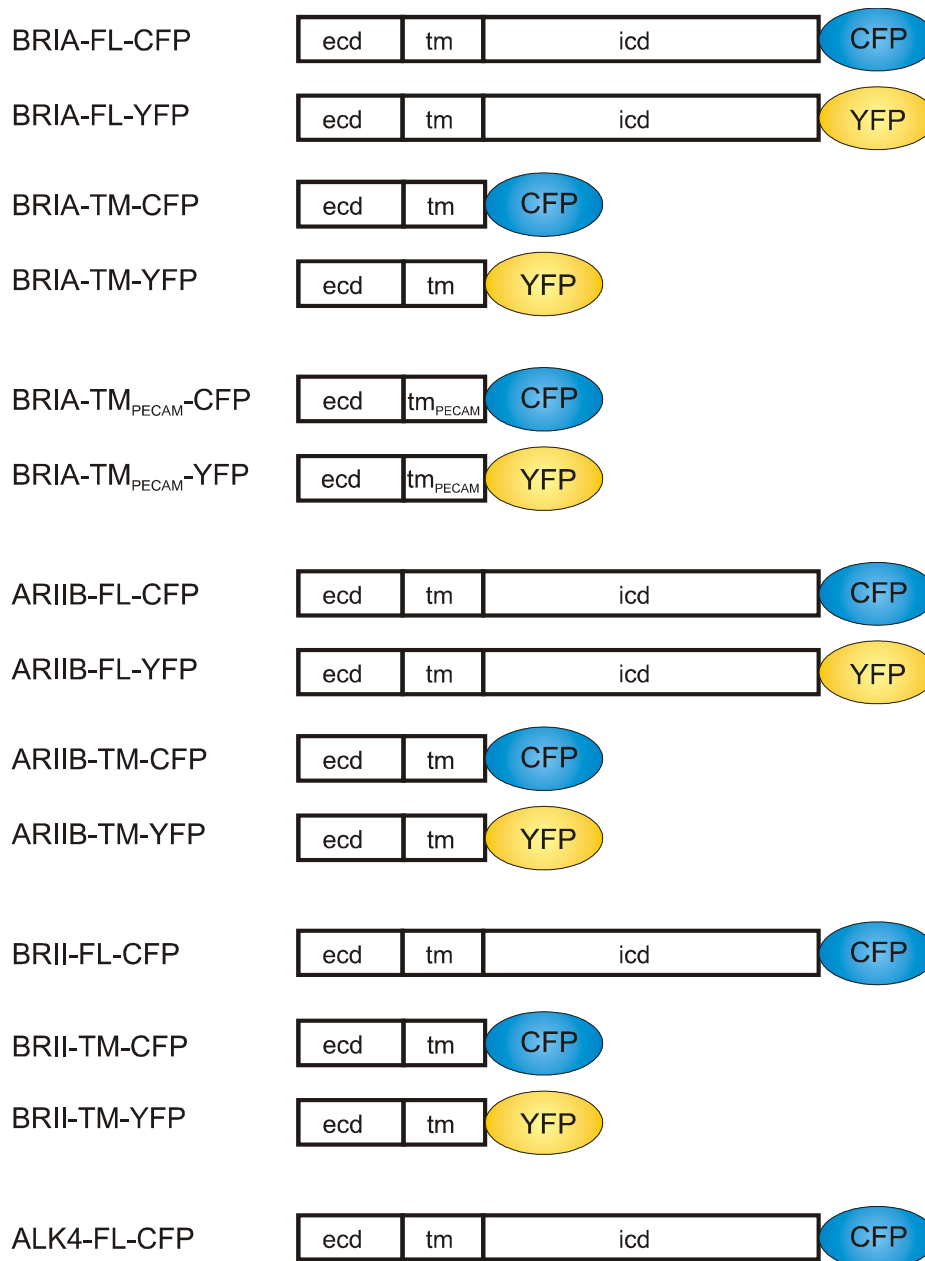


Abb. 22: Übersicht der hergestellten CFP- und YFP-fusionierten Rezeptorkonstrukte.

3.3.2 Rezeptorexpression in HEK-tsA201-Zellen

Um Unterschiede in der Expression von endogenen Rezeptoren in nicht-transfizierten Zellen und von Rezeptor-Fluorophor-Fusionsproteinen in transfizierten Zellen zu untersuchen, wurde

mRNA von wildtypischen und transfizierten Zellen gewonnen und die Expression von BMPR-IA und ActR-IIB mittels RT-PCR analysiert. Als Kontrolle wurde die mRNA des HPRT-Gens amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 gezeigt.

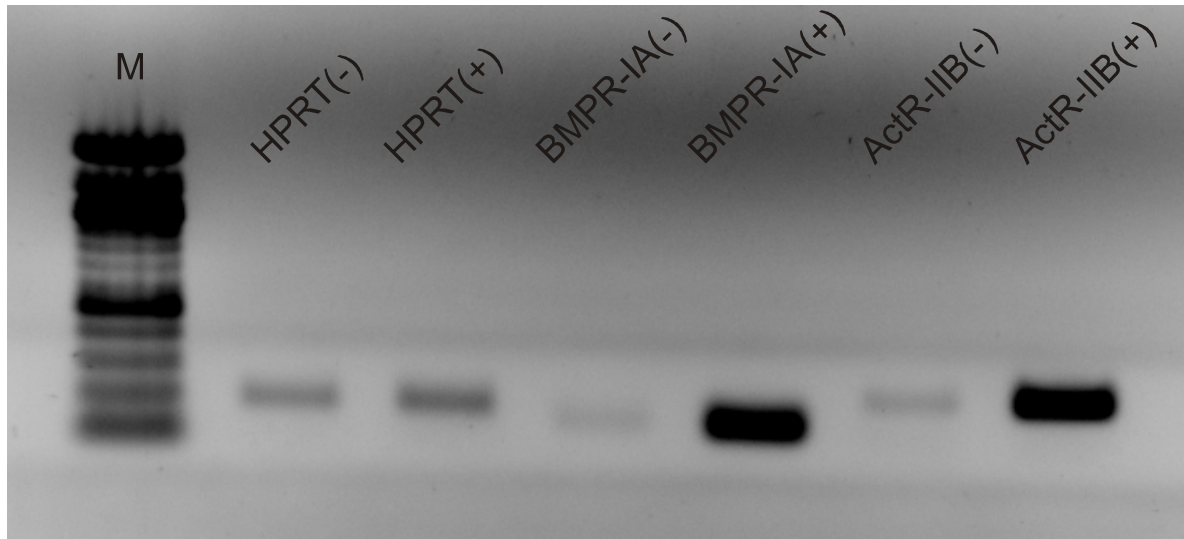


Abb. 23: Agarosegel der RT-PCR von wildtypischen und transfizierten HEK-tsA201-Zellen. Für die Transfektionen wurde in allen Zellen die gleiche DNA-Menge (1 µg des Rezeptor-kodierenden Plasmids) verwendet. (M) NEB 100 bp Marker; (-): untransfizierte Zellen; (+): transfizierte Zellen. HPRT wurde als Kontrolle aus untransfizierten und BMPR-IA-transfizierten Zellen amplifiziert.

Es ist klar zu erkennen, dass in wildtypischen Zellen eine geringe Menge an BMPR-IA und ActR-IIB endogen exprimiert wird. Dies wurde von Frau Dr. Susanne Gebhardt in ihrer Dissertation auch für andere Rezeptoren (TGF-βR-I, TGF-βR-II, BMPR-IB, BMPR-II) durch Real-Time-PCR-Experimente bestätigt und konnte für TGF-βR-I und TGF-βR-II auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Reporteranalysen gezeigt werden. In transfizierten Zellen ist die Expression der Rezeptoren auf RNA-Ebene um einen Faktor von 100-1000 erhöht. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die mit diesen Zellen gewonnenen Ergebnisse durch die endogen vorhandenen Rezeptoren nur in geringem Maße beeinflusst werden, solange nur die fluoreszenzmarkierten Konstrukte untersucht werden, wie es z.B. in FRET- und FRAP-Experimenten der Fall ist. Bei der Untersuchung der Signaltransduktion in die Zelle können endogen vorhandene Rezeptoren allerdings die Ergebnisse beeinflussen. Dies bestätigen auch die in den Luciferase-Experimenten gemachten Beobachtungen, wo offenbar der endogen vorhandene Typ-I-Rezeptor TGF-βR-I mit den transfizierten Rezeptorchimären um die Bindung des Liganden und die Aktivierung des SMAD-2/3-Signalwegs konkurriert. Bei der Transfektion mit den Fluorophor-fusionierten Rezeptoren fiel außerdem auf, dass die Expressionsraten der einzelnen Rezeptortypen trotz gleichen Ausgangsvektors unterschiedlich ausfallen. Als Maßstab hierfür wurde die von den Photodioden des FRET-Mikroskops

detektierte Leuchtintensität für die beiden Fluorophore CFP und YFP herangezogen. Generell konnte festgestellt werden, dass die trunkierten Rezeptorkonstrukte weniger transfizierte DNA erfordern, um die gewünschte Helligkeit zu erreichen, als die Konstrukte in voller Länge. Außerdem ist die Expression von ActR-IIB deutlich stärker als bei allen anderen Rezeptoren, so dass hier eine fünffach geringere DNA-Menge als bei den anderen Rezeptortypen zur Transfektion ausreicht, um die für die Experimente benötigte Expression zu erreichen.

3.3.3 Lokalisation der fusionierten Rezeptoren

Um sicherzustellen, dass die Fluorophor-fusionierten Rezeptorkonstrukte richtig in die Zellmembran integrieren, wurde die Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Dazu wurden HEK-tsA201-Zellen mit BRIA-FL-CFP transfiziert und mit einem Konfokalmikroskop analysiert. Zur Markierung der Zellmembran wurden die Zellen zusätzlich mit mYFP, einem YFP-Protein mit fusionierter Palmitoylierungssequenz, transfiziert. Die Zellkerne wurden durch eine Färbung mit Hoechst 33342 sichtbar gemacht (Abbildung 24).

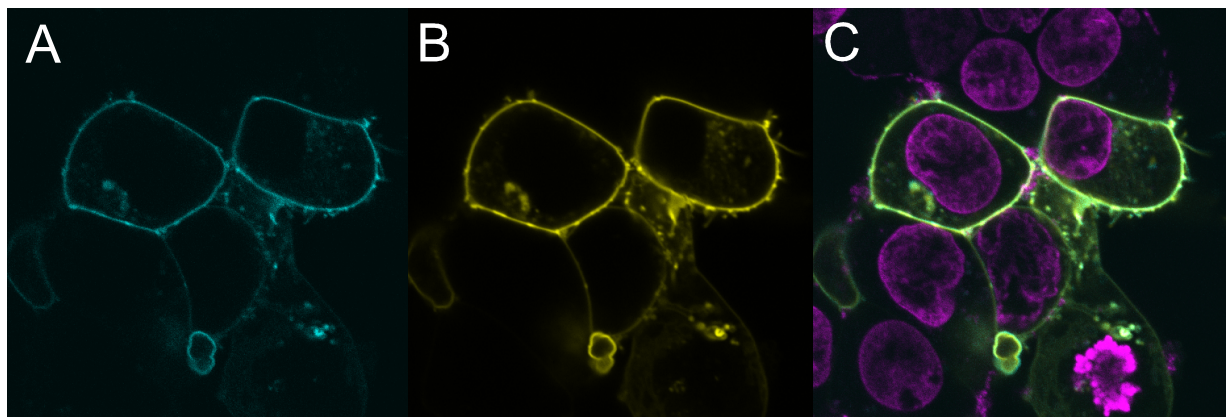


Abb. 24: Konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter HEK-tsA201-Zellen. (A) BRIA-FL-CFP; (B) mYFP; (C) Überlagerung von (A) + (B) und Färbung der Zellkerne (violett)

Auf den Bildern ist klar zu erkennen, dass die Rezeptorkonstrukte wie erwartet in die Zellmembran eingebaut werden. Im endoplasmatischen Retikulum ist außerdem eine leichte Färbung zu erkennen, die auf die Überexpression der fluoreszenzmarkierten Proteine zurückzuführen ist.

Die korrekte Lokalisation der übrigen Rezeptorkonstrukte wurde während der FRET- und FRAP-Experimente überprüft (Daten nicht gezeigt).

3.3.4 Mobilität der Rezeptoren in der Zellmembran

Um die Mobilität der Rezeptoren in der Zellmembran zu untersuchen, wurden HEK-tsA201-Zellen mit verschiedenen YFP-fusionierten Rezeptorkonstrukten einzeln oder in Kombination transfiziert. Anschließend wurden Fluorescence Recovery After Photobleaching- (FRAP-) Experimente durchgeführt. Hierbei werden die Zellen bei geringer Anregungsenergie im Konfokalmikroskop betrachtet. Nachdem eine Ebene in der Mitte der Zelle fokussiert wurde, wurden die Fluorophore in einem kleinen Teil der Zellmembran mit hoher Laserenergie gebleicht. In bestimmten Zeitabständen wurden Bilder der Zelle aufgenommen und das Einwandern leuchtender Fluorophore aus der Umgebung der gebleichten Region gemessen. Ein Beispielerperiment ist in Abbildung 25 dargestellt.

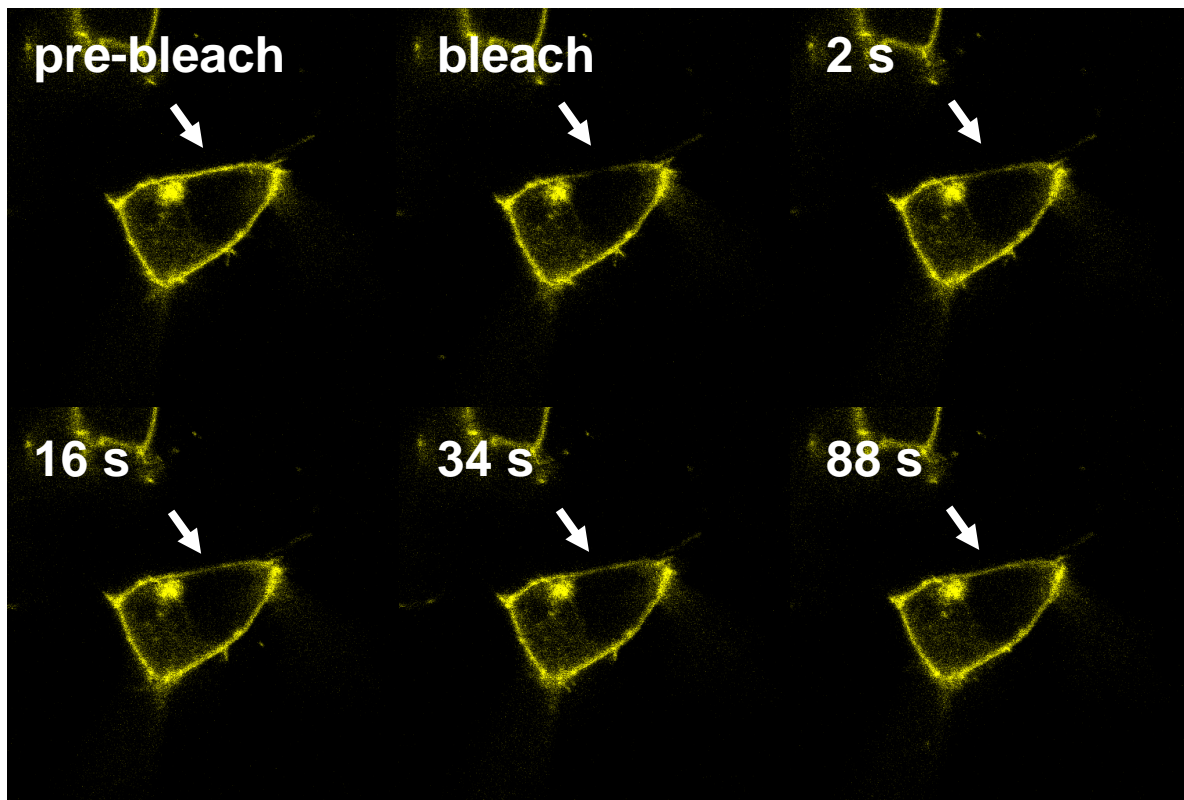


Abb. 25: Einzelaufnahmen aus dem Verlauf eines FRAP-Experiments. Gezeigt ist die Wiederherstellung der Fluoreszenz im gebleichten Bereich (Pfeil) in Abhängigkeit von der Zeit.

Aus diesen Daten ließen sich dann der Anteil der mobilen und immobilen Fraktionen am Gesamt Rezeptorbestand der Zelle, sowie die Zeiten für die halbmaximale Wiederherstellung der Fluoreszenz bestimmen, was einen direkten Hinweis auf die Mobilität der untersuchten Konstrukte liefert. Bei diesen Experimenten wurden ausschließlich YFP-fusionierte Rezeptoren betrachtet, da diese eine höhere Leuchtkraft als die CFP-Konstrukte zeigten und sich auch effektiver bleichen ließen.

3.3.4.1 Mobilität der Einzelrezeptoren

Durch die unter 3.2 beschriebenen Experimente stellte sich die Frage, ob die Rezeptoren überhaupt ausreichend mobil sind, da es mit Hilfe des ARIAD-Systems nicht möglich war, eine Dimerisierung von Rezeptoren eines Subtyps zu induzieren. Darum wurde als erstes die Mobilität einzelner, nativer bzw. c-terminal trunkierter Rezeptoren untersucht.

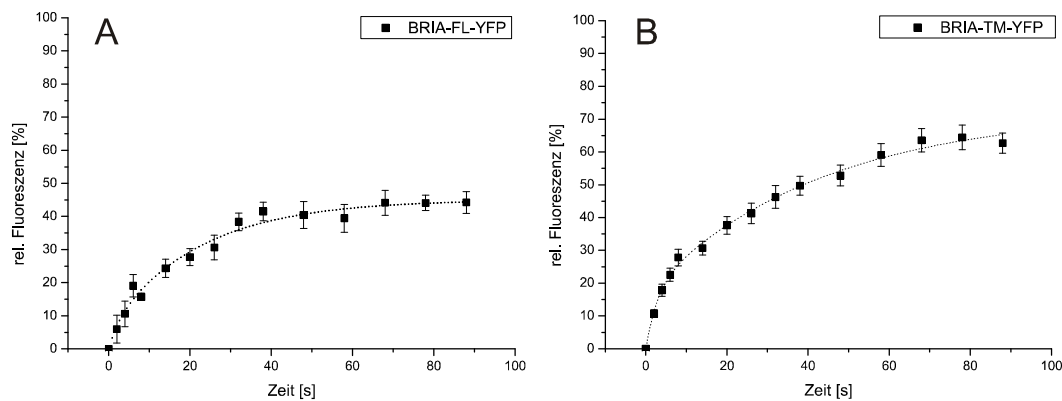


Abb. 26: Ergebnisse der Bleichexperimente des Typ-I-Rezeptors BMPR-IA in full-length- (A) und trunkierter (B) Form

Die in den Abbildungen 26, 27 und 28 dargestellten Kurven zeigen die Ergebnisse der FRAP-Experimente für die Rezeptoren BMPR-IA, ActR-IIB (jeweils in trunkierter (TM) und full-length- (FL) Form) und BMPR-II (in trunkierter Form).

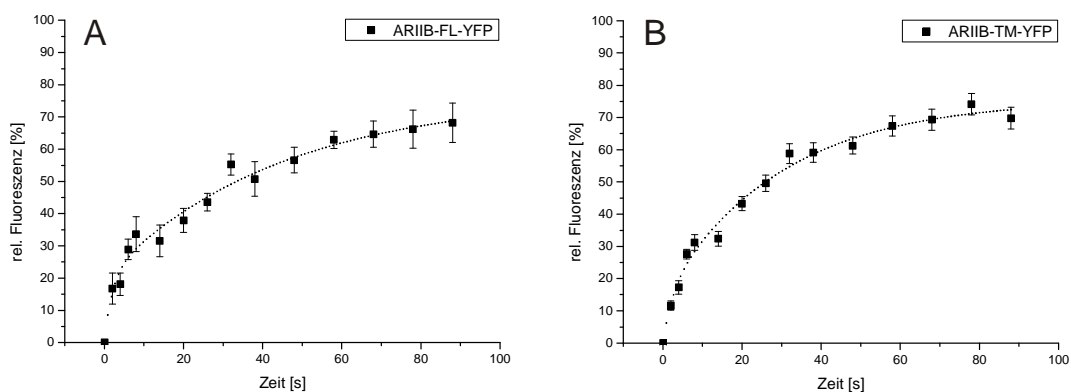


Abb. 27: Ergebnisse der Bleichexperimente des Typ-II-Rezeptors ActR-IIB in full-length- (A) und trunkierter (B) Form

Auffällig bei allen Messungen ist ein mehr oder weniger ausgeprägter biphasischer Verlauf. Wie im Methodenteil beschrieben, wird ein solcher Kurvenverlauf oft beobachtet, konnte aber bisher nicht eindeutig erklärt werden. Eine mögliche Ursache könnten Interaktionen der Rezeptortypen mit anderen Komponenten der Zelloberfläche darstellen. Ebenso sind verschiedene Rezeptorpopulationen mit unterschiedlicher Mobilität denkbar. Interessant ist,

dass im Vergleich der full-length- mit der trunkierten Form sich der Typ-I-Rezeptor BMPR-IA konträr zum Typ-II-Rezeptor ActR-IIB verhält. BMPR-IA zeigt in trunkierter Form eine deutlichere Biphasizität, während der steile Kurvenanteil bei der Untersuchung des nativen Rezeptors kaum ausgeprägt ist. Bei ActR-IIB tritt der biphasische Kurvenverlauf dagegen mit dem full-length-Rezeptorkonstrukt auf, während bei Verwendung des trunkierten Rezeptors der steile Kurvenanteil deutlich geringer ausfällt. Die trunkierte Form des Typ-II-Rezeptors BMPR-II zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die trunkierte Form von ActR-IIB. Der jeweilige Kurvenverlauf scheint also für die Rezeptorsubtypen spezifisch zu sein.

Für die quantitative Auswertung wurde nur der flachere Anteil der Kurven verwendet. Die Fit-Parameter dieses Kurvenbereichs unterscheiden sich nur wenig, womit die Mobilität der Einzelrezeptoren insgesamt ähnlich ist. Lediglich im Fall des Typ-I-Rezeptors BMPR-IA scheint die intrazelluläre Domäne einen Einfluss auf die Mobilität zu haben, da hier eine deutliche Reduktion des Anteils an mobilen Rezeptoren zu sehen ist.

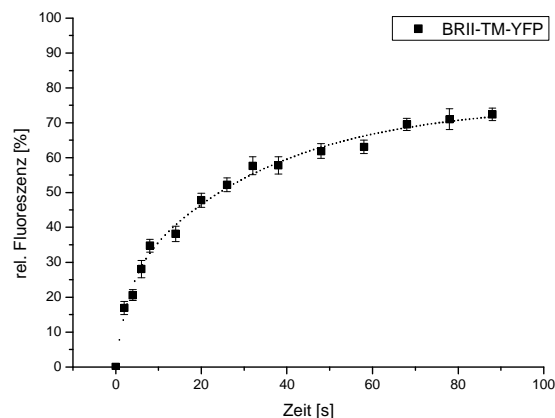


Abb. 28: Ergebnisse der Bleichexperimente des Typ-II-Rezeptors BMPR-II in trunkierter Form.

Rezeptor	Mobile Fraktion [%]	t1/2 [s]
BRIA-FL-YFP	45,1 ± 2,3	22,1 ± 5,4
BRIA-TM-YFP	72,5 ± 4,0	43,1 ± 8,6
ARIIB-FL-YFP	76,4 ± 8,3	44,2 ± 15,2
ARIIB-TM-YFP	75,6 ± 2,9	29,6 ± 4,4
BRII-TM-YFP	75,5 ± 2,8	33,4 ± 5,3

Abb. 29: Zusammenfassung der ermittelten Fit-Parameter des langsamen Kurvenanteils. Die mobile Fraktion beschreibt den Anteil gebleicher Fluorophore, der durch Einwanderung ungebleicher Fluorophore ersetzt werden kann. t1/2 gibt die Zeit bis zur halbmaximalen Wiederherstellung der ursprünglichen Fluoreszenz an.

Die geringere Mobilität des nativen BMPR-IA könnte ein Hinweis darauf sein, dass die intrazelluläre Domäne durch Interaktion mit anderen zellulären Bestandteilen eine

Immobilisierung des Liganden auf der Zelloberfläche unterstützt, indem die Mobilität des Rezeptors insgesamt herabgesetzt wird. Eine andere Erklärung wäre, dass BMPR-IA in nativer Form als Homodimer auf der Zelle vorliegt und durch den größeren Komplex eine geringere Mobilität zeigt. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass BMPR-IA eine Tendenz zu einer höheren Geschwindigkeit, ausgedrückt durch eine niedrigere halbmaximale Wiederherstellungszeit, als die anderen Konstrukte aufzeigt. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass das Molekulargewicht der untersuchten Proteine kaum Einfluss auf deren Mobilität hat (Reits and Neefjes, 2001). Die höhere Geschwindigkeit könnte dazu dienen, den geringeren Anteil an mobilen Rezeptoren bei diesem Rezeptortyp zu kompensieren.

3.3.4.2 Veränderung der Mobilität durch Austausch der Transmembrandomäne

Um festzustellen, welchen Einfluss die Transmembrandomäne auf die Mobilität der Rezeptoren hat, wurden FRAP-Experimente mit einem trunkierten BMPR-IA-Konstrukt durchgeführt, bei dem die native Transmembrandomäne durch die Transmembrandomäne des Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecules (PECAM-1) ersetzt wurde (Abbildung 30). Da die quantitative Dimerisierbarkeit dieses Proteins eine hohe Mobilität vermuten lässt (Zhao and Newman, 2001), wurde erwartet, dass durch den Austausch auch eine erhöhte Mobilität des Typ-I-Rezeptors erreicht werden kann.

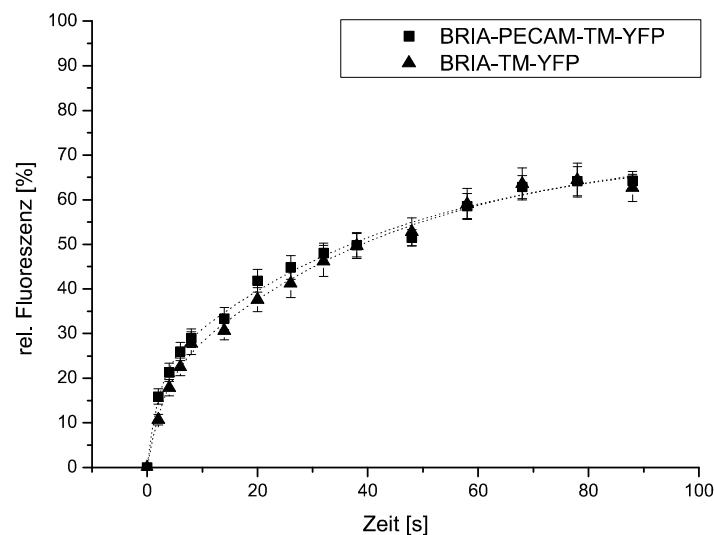


Abb. 30: Vergleich der Ergebnisse der Bleichexperimente von BMPR-IA und BMPR-IA-PECAM, jeweils in trunkierter Form.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Mobilität durch den Ersatz der Transmembrandomäne nicht verändert wird.

Rezeptor	Mobile Fraktion [%]	t1/2 [s]
BRIA-TM-YFP	72,5 ± 4,0	43,1 ± 8,6
BRIA-PECAM-TM-YFP	71,6 ± 3,7	43,0 ± 8,2

Abb. 31: Zusammenfassung der ermittelten Mobilitäts-Parameter.

Dies lässt vermuten, dass der Grund für die eingeschränkte Mobilität von BMPR-IA im Zusammenhang mit der extrazellulären Domäne stehen muss. So könnte es hier Interaktionen mit anderen Strukturen auf der Zelloberfläche oder mit der extrazellulären Matrix geben, die die Mobilität des Rezeptors herabsetzen.

3.3.4.3 Veränderung der Mobilität durch Anwesenheit beider Rezeptortypen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit beider Rezeptortypen die Mobilität der individuellen Rezeptorsubtypen verändert. Dies könnte zum Beispiel durch eine Komplexbildung der beiden Rezeptortypen auch ohne das Vorhandensein des Liganden verursacht werden (präformierte Komplexe). Für die Experimente wurden deshalb HEK-tsA201-Zellen mit BMPR-IA und ActR-IIB cotransfiziert, wobei sich das zu bleichende YFP-Molekül jeweils nur an einem der beiden Rezeptortypen befand. Der jeweils andere Rezeptortyp war zur Kontrolle der Expression an CFP fusioniert, wobei für die Messungen Zellen ausgesucht wurden, die beide Rezeptortypen in etwa gleich stark exprimieren. Für diese Experimente wurden trunkierte Rezeptorvarianten benutzt, da diese von den Zellen besser exprimiert werden und damit eine höhere Leuchtkraft aufweisen.

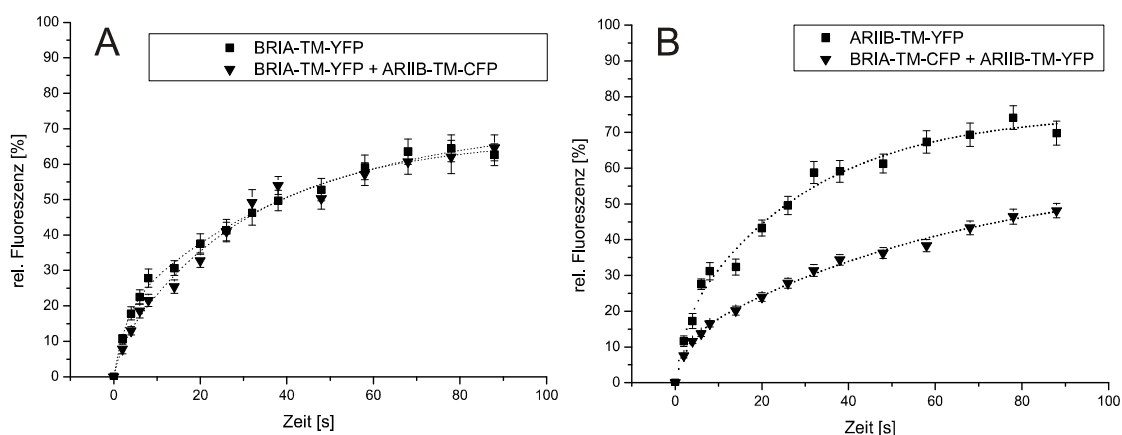


Abb. 32: Vergleich der Ergebnisse von Messungen mit Einzelrezeptoren und Messungen in Anwesenheit des Partnerrezeptors. (A) Analyse von BMPR-IA, (B) Analyse von ActR-IIB.

Wie in Abbildung 32A gezeigt, ändert sich die Mobilität von BMPR-IA durch die Anwesenheit von ActR-IIB nur unwesentlich. Auffällig ist hier lediglich die Abnahme des

biphasischen Charakters der Kurve. Über die Ursache hierfür läßt sich, wie bereits erwähnt, lediglich spekulieren. Sehr wahrscheinlich wird durch die Interaktion von ActR-IIB mit einer Subpopulation von BMPR-IA Rezeptoren, z.B. mit monomeren oder präformierten BMPR-IA Rezeptordimeren, aufgrund der Zunahme der Molekülgröße deren Mobilität herabgesetzt.

Analysiert man jedoch die Mobilität des fluoreszenzmarkierten Typ-II-Rezeptors ActR-IIB, stellt man fest, dass diese durch die Präsenz von BMPR-IA signifikant beeinflusst wird (Abbildung 32B).

Rezeptor	Mobile Fraktion [%]	t1/2 [s]
BRIA-TM-YFP	72,5 ± 4,0	43,1 ± 8,6
BRIA-TM-YFP + ARIIB-TM-CFP	72,8 ± 7,7	55,4 ± 16,0
ARIIB-TM-YFP	75,6 ± 2,9	29,6 ± 4,4
BRIA-TM-CFP + ARIIB-TM-YFP	60,4 ± 5,8	64,3 ± 14,2

Abb. 33: Änderung der Fit-Parameter durch Anwesenheit beider Rezeptortypen.

Der Anteil der mobilen Fraktion von ActR-IIB ist in geringem Maße, jedoch signifikant reduziert. Wesentlich deutlicher ist die Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit, die sich durch die Präsenz von BMPR-IA mehr als halbiert (siehe Werte für t_{1/2}). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich auch in Abwesenheit des Liganden beide Rezeptorsubtypen zu Komplexen formieren. Die Mobilität des BMPR-IA scheint hier limitierend zu sein, so dass die Mobilität des gebildeten Komplexes vorrangig durch den Typ-I-Rezeptor BMPR-IA bestimmt wird.

3.3.4.4 Veränderung der Mobilität durch Anwesenheit des Liganden

Um den Einfluss der Liganden auf die Mobilität der Rezeptoren zu untersuchen, wurden Zellen zuerst mit einem einzelnen, YFP-fusionierten Rezeptortyp transfiziert und vor dem Bleichexperiment für fünf Minuten mit 30 nM coreBMP-2 inkubiert (Abbildung 34).

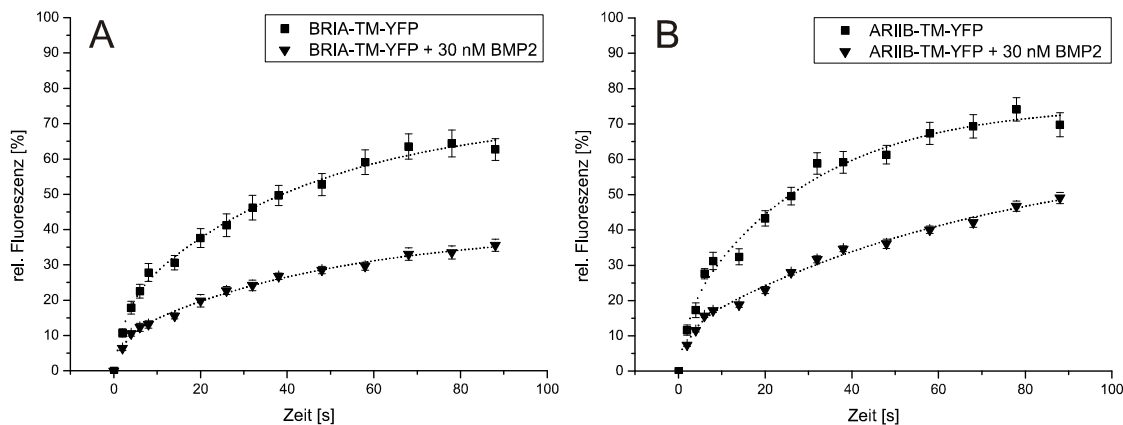


Abb. 34: Mobilität der Einzelrezeptoren BMPR-IA (A) und ActR-IIB (B) in Abwesenheit und Gegenwart von 30 nM coreBMP-2.

Die Zugabe von BMP-2 bewirkt eine signifikante Verlangsamung beider Rezeptortypen. In beiden Fällen ist eine Abnahme der mobilen Fraktion und somit eine zunehmende Immobilisierung zu beobachten, die allerdings für den Typ-I-Rezeptor deutlich ausgeprägter ausfällt. Dafür ändert sich bei diesem Rezeptor die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Fluoreszenzintensität nicht, wohingegen beim Typ-II-Rezeptor eine deutliche Verlangsamung der Fluoreszenzwiederherstellung zu sehen ist. Die Herabsetzung der Rezeptormobilität zeigt, dass beide Rezeptortypen mit dem Liganden auf der Zelloberfläche interagieren können. Der Typ-I-Rezeptor übernimmt als hochaffiner Rezeptor offenbar eine Verankerungsfunktion, die durch die starke Reduktion der mobilen Fraktion in Anwesenheit des Liganden sichtbar wird. Die Abnahme der mobilen Fraktion kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass sich durch Bindung des Liganden die Größe der entstehenden Rezeptorkomplexe erhöht. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass der Ligand zusätzlich mit anderen Strukturen auf der Zelloberfläche interagiert und dadurch die Mobilität des Ligand-Rezeptorkomplexes herabgesetzt wird. Für die Interaktion von BMP-2 mit Typ-II-Rezeptoren wurden in BIAcore-Experimenten wesentlich schnellere Bindekinetiken als für die mit BMPR-IA oder -IB bestimmt. Insbesondere die kinetischen Dissoziationskonstanten (k_{off}) sind für die BMP-2:Typ-II-Rezeptorinteraktion ca. 100-fach größer als die für die Typ-I-Rezeptor Interaktion. Die daraus resultierenden Halbwertszeiten ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{off}}$) liegen für den individuellen BMP-

2:BMPR-IA-Komplex im Bereich von 30 Minuten, für einen BMP-2:Typ-II-Rezeptorkomplex jedoch im Sekundenbereich. Die schnelle Bindekinetik, insbesondere die kurze Halbwertszeit der BMP-2:ActR-IIB-Interaktion erklärt hinreichend, warum eine Verlangsamung dieses Rezeptors nach Ligandenbindung, nicht aber eine Abnahme der mobilen Fraktion beobachtet wird.

Rezeptor	Mobile Fraktion [%]	t1/2 [s]
BRIA-TM-YFP	72,5 ± 4,0	43,1 ± 8,6
BRIA-TM-YFP + 30 nM coreBMP-2	40,2 ± 3,5	48,8 ± 12,9
ARIIB-TM-YFP	75,6 ± 2,9	29,6 ± 4,4
ARIIB-TM-YFP + 30 nM coreBMP-2	63,8 ± 5,4	71,4 ± 13,4

Abb. 35: Änderung der Fit-Parameter durch Anwesenheit des Liganden.

Um zu untersuchen, wie sich die zusätzliche Anwesenheit des jeweils anderen Rezeptortyps auf die Mobilität auswirkt, wurden wie in 3.3.4.2 Zellen mit beiden Rezeptortypen cotransfiziert und vor dem Experiment für fünf Minuten mit 30 nM coreBMP-2 inkubiert. Auch hier war der zu bleichende Rezeptortyp mit YFP fusioniert, der Partnerrezeptor dagegen mit CFP (Abbildung 36).

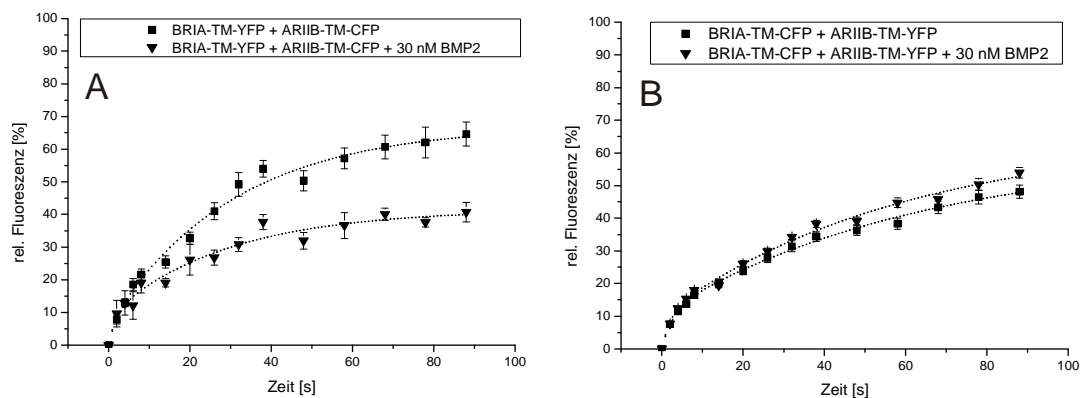


Abb. 36: Einfluss von 30 nM coreBMP-2 auf die Mobilität der Rezeptoren in Anwesenheit des Partnerrezeptors. (A) Auswirkungen auf BMPR-IA, (B) Auswirkungen auf ActR-IIB.

Die Daten zeigen, dass sich für BMPR-IA auch hier eine starke Immobilisierung zeigt, die sich durch eine deutliche Verringerung der mobilen Fraktion ausdrückt. Die Mobilität des Typ-II-Rezeptors ActR-IIB wird durch die Anwesenheit des Liganden dagegen nicht weiter beeinflusst. Die ermittelten Parameter für die ActR-IIB Mobilität entsprechen in etwa denjenigen, die für diesen Rezeptor in Präsenz von BMPR-IA (Abbildung 33) erfasst wurden. Es kann daher vermutet werden, dass durch die schnellen Bindekinetiken der BMP-2:ActR-IIB-Interaktion kein weiterer Beitrag für die Komplexstabilität erbracht werden kann.

Rezeptor	Mobile Fraktion [%]	t1/2 [s]
BRIA-TM-YFP + ARIIB-TM-CFP	72,8 ± 7,7	55,4 ± 16,0
BRIA-TM-YFP + ARIIB-TM-CFP + 30 nM coreBMP-2	41,6 ± 3,1	29,2 ± 8,9
BRIA-TM-CFP + ARIIB-TM-YFP	60,4 ± 5,8	64,3 ± 14,2
BRIA-TM-CFP + ARIIB-TM-YFP + 30 nM coreBMP-2	65,4 ± 3,9	59,7 ± 8,2

Abb. 37: Ermittelte Fit-Parameter in Anwesenheit des Partnerrezeptors und des Liganden.

Diese Daten sind ein deutlicher Hinweis dafür, dass BMPR-IA durch die Bindung des Liganden auf der Zelloberfläche verankert wird. Deshalb zeigt dieser Rezeptor eine starke Reduktion der Mobilität in Anwesenheit des Liganden. Basierend auf den gezeigten Ergebnissen scheint zumindest ein Teil des niederaffinen Typ-II-Rezeptors ActR-IIB bereits in Abwesenheit des Liganden in Assoziation mit dem Typ I Rezeptor vorzuliegen (präformierte Komplexe). Eine durch den Liganden induzierte Rekrutierung kann mit diesen Experimenten nicht erfasst werden. Für die Generierung von signalaktiven Rezeptorkomplexen scheinen daher weitere Prozesse, wie z.B. eine ligandeninduzierte Konformationsänderungen eines oder beider Rezeptoren notwendig zu sein.

3.3.5 Ligandeninduzierte Rezeptorkomplexbildung

Um die initialen Rekrutierungsschritte der Rezeptoren in den Signalkomplex auf ganzen Zellen untersuchen zu können, wurde ein System entwickelt, bei dem die Annäherung der beiden Rezeptortypen nach dem FRET-Prinzip (Fluorescence Resonance Energy Transfer) sichtbar gemacht werden kann. Dieses Prinzip basiert darauf, dass es zwischen zwei Fluorophoren mit überlappenden Anregungs- und Emissionsspektren bei geringem Abstand zu einer messbaren Energieübertragung kommt.

Mit den bereits vorgestellten, CFP- und YFP-fusionierten Rezeptorkonstrukten kann somit eine Annäherung beider Rezeptortypen durch eine Erhöhung des FRET-Signals detektiert werden, was der Bildung eines Komplexes aus den fusionierten Rezeptoren entspricht. Bei dieser Art von Messungen ist zu beachten, dass es sich wie auch bei den FRAP-Messungen um Messungen an einzelnen Zellen handelt. Zur Standardisierung der Ergebnisse wurden deshalb Zellen für die Messungen herangezogen, die sich in den Ausgangsparametern (Signalintensität des Blau- und Gelbkanals) möglichst wenig unterschieden. Außerdem wurden pro Bedingung mehrere Zellen untersucht. Deutliche Unterschiede gab es in der maximalen Höhe des erhaltenen FRET-Signals. Diese Unterschiede können auf unterschiedliche Zellgrößen und damit unterschiedliche Anzahlen an Gesamtrezeptoren zurückzuführen sein. Ein weiterer Faktor kann außerdem die Lage der Zelle (einzeln oder im Verbund mit anderen Zellen) sein, da eine freiliegende Zelle einen größeren Teil ihrer Oberfläche dem umgebenden Medium präsentiert als eine Zelle in einem Zellverbund.

Um trotzdem Messungen verschiedener Zellen vergleichen zu können, wurden alle erhaltenen Kurven normiert. Anschließend wurden die Ligandenkonzentration, bei der es zu einer Annäherung der Fluorophore kommt, sowie die Geschwindigkeit dieser Annäherung ermittelt. Als Maß für die Geschwindigkeit wurde die Steigung des linearen Anstiegs der Kurve nach Perfusion mit dem Liganden benutzt. Die gezeigten Kurven zeigen jeweils Einzelmessungen und sind beispielhaft für die zugehörigen Experimente.

3.3.5.1 Unterschiede zwischen nativen und trunkierten Rezeptorkonstrukten

In ersten Versuchen wurde untersucht, ob sich Experimente mit trunkierten Rezeptoren von solchen mit full-length-Rezeptoren unterscheiden (Abbildung 38). Dazu wurden Zellen mit Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren transfiziert, wobei die Typ-I-Rezeptoren grundsätzlich mit CFP und die Typ-II-Rezeptoren mit YFP fusioniert waren.

Aus technischen Gründen wurde im ersten Schritt die Kombination aus BMPR-IA und ActR-IIB analysiert. Obwohl BMP-2 mit dieser Rezeptorkombination nur geringe Signaleigenschaften aufweist, konnten erfolgreich ternäre Komplexe bestehend aus dem Liganden und den Ektodomänen beider Rezeptoren *in vitro* hergestellt und zur Aufklärung der Struktur benutzt werden (Weber et al., 2007). Aufgrund der experimentell ermittelten Bindeaffinitäten des Liganden sowohl an BMPR-IA als auch an ActR-IIB schien diese Auswahl am sinnvollsten (Heinecke et al., 2009).

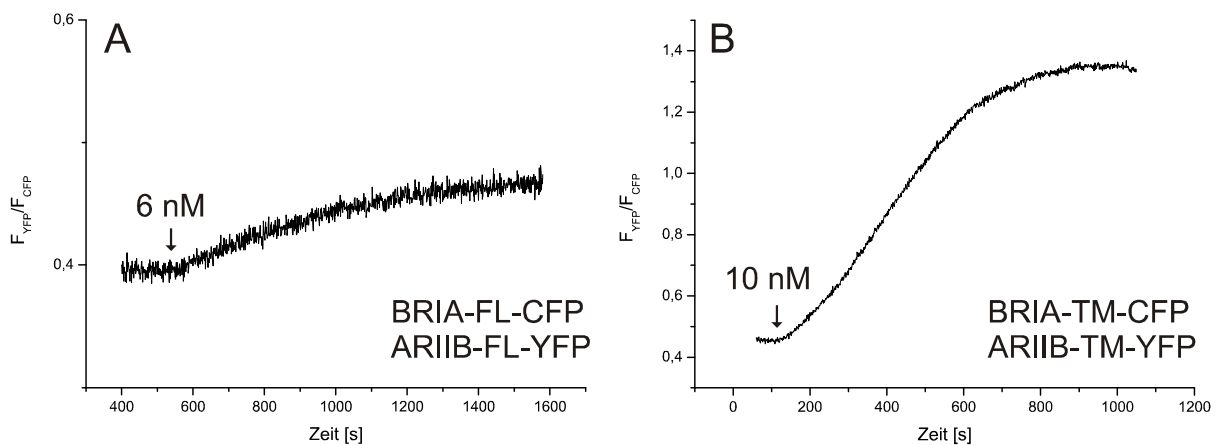


Abb. 38: Typische Kurven der FRET-Experimente. (A) Full-length-Rezeptoren, (B) trunkeerte Rezeptoren. Pfeil: Start der Perfusion mit coreBMP-2-Ligandenlösung in der angegebenen Konzentration. Messreihen mit trunkeerten Rezeptoren ergaben generell deutlich höhere Signalamplituden als Messreihen mit Full-length-Rezeptoren. Die niedrigere Signalamplitude der Full-length-Rezeptoren führt auch zu einem größeren Rauschen des Signals.

Erstaunlicherweise zeigte sich sowohl bei der Kombination von Full-length- als auch von trunkeerten Rezeptoren ein reproduzierbarer Anstieg des FRET-Signals ab einer Ligandenkonzentration zwischen 6 und 10 nM. Es ist dabei zu beachten, dass die Zunahme des FRET-Signals auf zweierlei Arten interpretiert werden kann: Entweder ist dieses Signal das Resultat einer Rekrutierung beider Rezeptortypen zu einem Komplex oder aber die Folge einer ligandeninduzierten Konformationsänderung, welche die beiden Fluorophore auf der zytosolischen Seite näher zusammen bringt. Auffällig ist, dass Messreihen mit trunkeerten Rezeptoren generell deutlich höhere Signalamplituden zeigen als solche mit full-length Rezeptorkonstrukten. Die Tatsache, dass vom Start der Perfusion mit dem Ligand bis zum Erreichen des Plateaus mehrere Minuten vergehen, spricht aber eher für eine Neubildung von Rezeptorkomplexen, da Konformationsänderungen in der Regel deutlich schneller ablaufen sollten. Die niedrigere Signalamplitude der Full-length-Rezeptoren führt auch zu einem größeren Rauschen des Signals. Die Unterschiede in der Signalamplitude werden vermutlich dadurch verursacht, dass die Fluorophore bei den trunkeerten Rezeptoren durch die fehlende

intrazelluläre Domäne einen geringeren Abstand zueinander haben und dadurch eine effektivere Energieübertragung stattfinden kann.

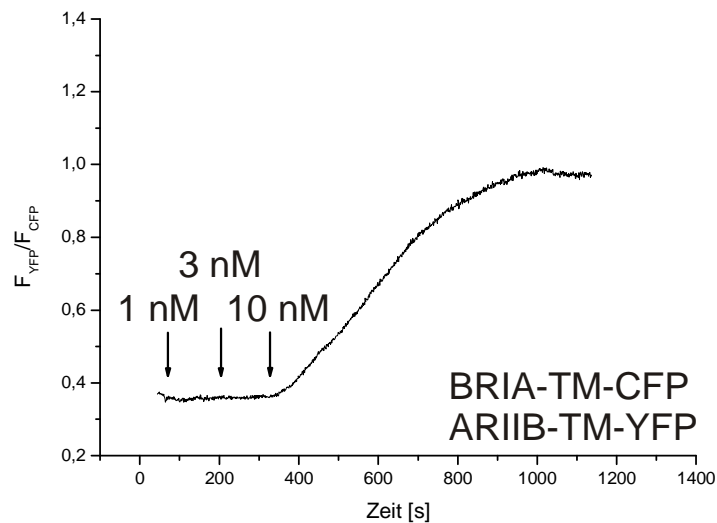


Abb. 39: FRET-Experiment zur Ermittlung des Schwellenwertes der für die Komplexbildung benötigten Ligandenkonzentration. Dazu wurde die Zelle nacheinander mit steigenden Ligandenkonzentrationen perfundiert. Eine Komplexbildung ist ab einer Konzentration von 10 nM coreBMP-2 zu erkennen.

Die Geschwindigkeit der Komplexbildung (Steigung der Kurve im linearen Bereich) ist ebenfalls sowohl bei Full-length- als auch bei trunkierten Rezeptoren identisch und ändert sich über einen breiten Konzentrationsbereich nicht. Erst bei hohen Konzentrationen ab 100 nM ist eine Steigerung der Geschwindigkeit zu verzeichnen. Es lässt sich schlussfolgern, dass die intrazelluläre Kinasedomäne der Rezeptoren für die ligandeninduzierte Komplexbildung nicht benötigt wird. Ein Einfluss der Mobilität der Rezeptoren ist eher unwahrscheinlich, da sich die Mobilität der Full-length-Konstrukte in FRAP-Experimenten nicht wesentlich von der Mobilität der trunkierten Konstrukte unterschied.

Besonders auffällig ist auch die maximale FRET-Induktion, die bereits ab einer definierten Schwellenkonzentration erreicht wird. Eine weitere Erhöhung durch anschließende Perfusion mit höher konzentrierter Lösung ist nicht oder nur in sehr geringem Maße möglich, so dass hier bereits bei der Stimulation mit der für die Komplexbildung mindestens benötigten Ligandenkonzentration der größte Teil der vorhandenen Rezeptoren zur Bildung von Signalkomplexen herangezogen wird (Abbildung 40).

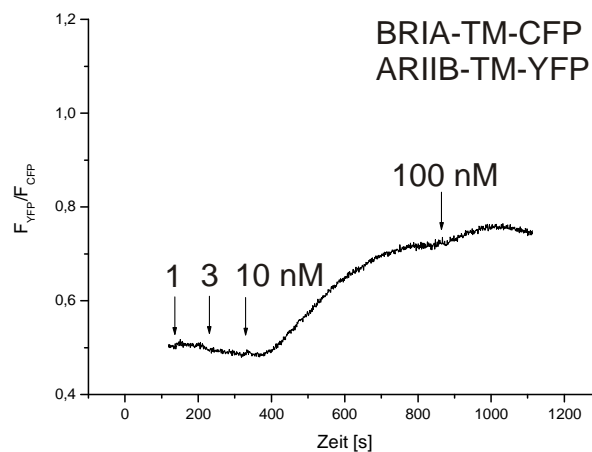


Abb. 40: Induzierung der Komplexbildung zwischen BPR-IA und ActR-IIB in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration. Die Komplexbildung beginnt bei Stimulation mit 10 nM coreBMP-2. Nach Erreichen des Plateaus ist durch Perfusion mit höheren Konzentrationen nur noch eine sehr geringe Steigerung des Signals möglich.

Eine weitere unerwartete Beobachtung bei den Experimenten ist, dass bei keiner Rezeptorkombination durch anschließende Perfusion mit Puffer eine Abnahme des FRET-Signals beobachtet werden konnte. Durch Langzeitaufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Abnahme des FRET-Signals über die Zeit durch das Ausbleichen der Fluorophore während der Aufnahme entsteht. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass nach der ligandeninduzierten Komplexbildung keine Dissoziation dieser Komplexe erfolgt. Über den Verbleib des Liganden nach Pufferperfusion kann keine Aussage getroffen werden, da dieser bedingt durch den experimentellen Ansatz nicht erfasst werden kann.

Aufgrund des besseren Signal-Rausch-Verhältnisses und der größeren Signalamplitude der trunkierten Rezeptoren wurden die weiteren Experimente bevorzugt mit diesen Varianten durchgeführt, da diese auch bei weniger transfizierter DNA-Menge besser exprimiert wurden und somit eine höhere Leuchtkraft aufwiesen.

3.3.5.2 Neubildung von Rezeptorkomplexen

Obwohl die lange Zeitdauer von mehreren Minuten vom Start der Perfusion mit Ligand bis zum Erreichen des Plateaus in den Messungen bereits einen Hinweis darauf gibt, dass hier die Entstehung und nicht die Umlagerungen bereits bestehender Komplexe beobachtet wird, sollte zur Absicherung ein weiterer Nachweis erbracht werden. Dazu wurden FRAP- und FRET-Messungen durchgeführt, bei denen die Fluidität der Zellmembran durch Behandlung mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin herabgesetzt wurde. Durch diese Substanz werden Teile des Cholesterols aus der Membran entfernt. Auf diese Weise sollte die Mobilität der Rezeptoren

herabgesetzt werden, was sich bei einer Komplexbildung auf die Geschwindigkeit auswirken sollte.

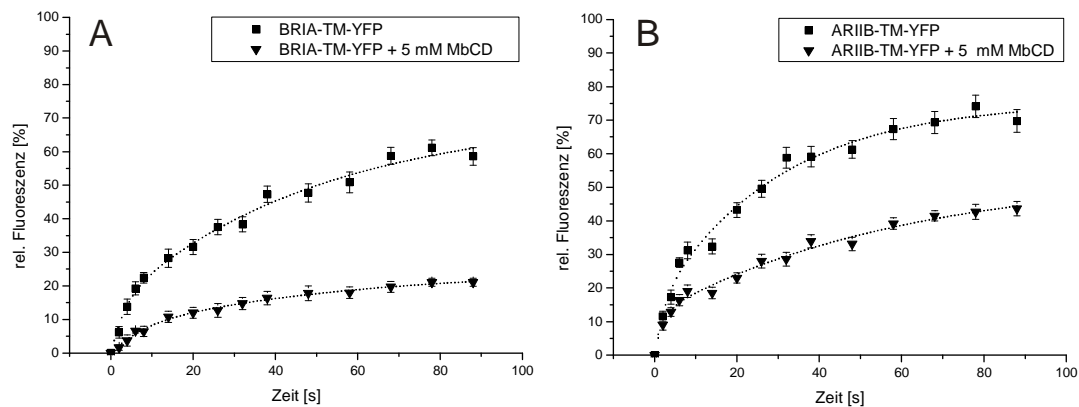


Abb. 41: FRAP-Experimente vor und nach Behandlung der Zellen mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin (MbCD). (A) BMPR-IA, (B) ActR-IIB.

Durch den Entzug des Cholesterols aus der Membran wurde die Mobilität sowohl des Typ-I- als auch des Typ-II-Rezeptors herabgesetzt, wobei die Auswirkungen auf BMPR-IA stärker sind (Abbildung 41 und 42).

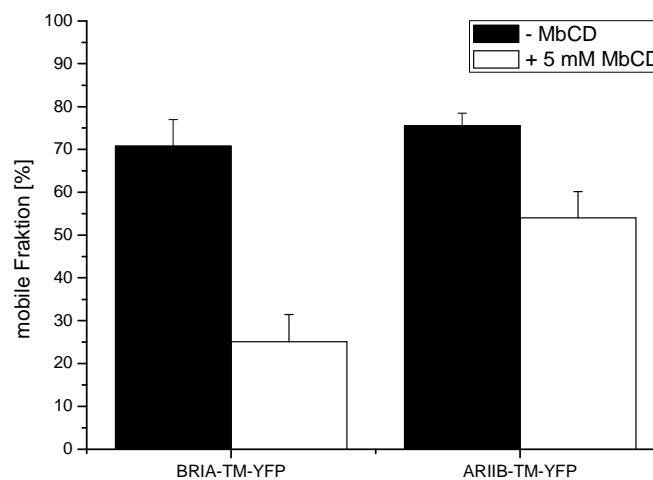


Abb. 42: Änderung der mobilen Fraktion der jeweiligen Rezeptoren durch Zugabe von 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin (MbCD).

Nachdem auf diesem Weg nachgewiesen werden konnte, dass Methyl- β -Cyclodextrin die Mobilität der Rezeptoren beeinflusst, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Zugabe von Methyl- β -Cyclodextrin auch Einfluss auf FRET-Experimente hat (Abbildung 43). Sollte dies der Fall sein, wäre dies ein weiterer Hinweis auf die Bildung von Komplexen, da im Fall von Konformationsänderungen die Mobilität der Proteine in der Membran kaum eine Rolle spielen sollte.

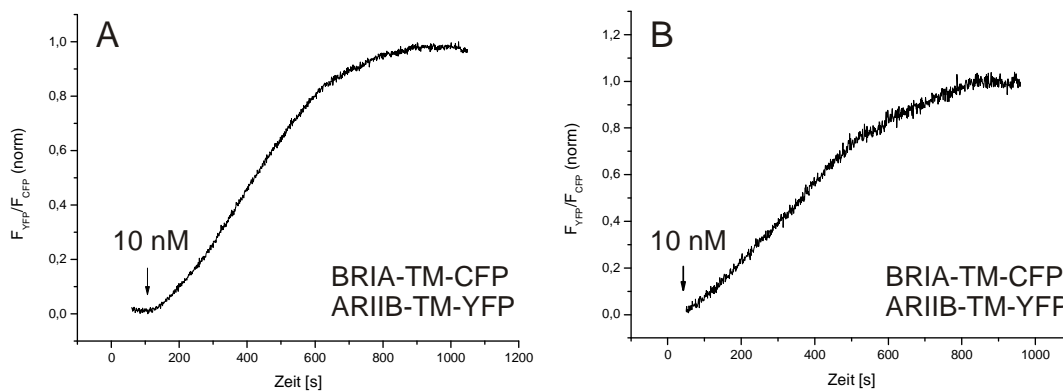


Abb. 43: FRET-Experimente vor (A) und nach (B) Behandlung mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin. Die Zellen wurden mit coreBMP-2 in der angegebenen Konzentration perfundiert.

Aus den Ergebnissen dieser Versuche geht hervor, dass die Geschwindigkeit der Komplexbildung in Anwesenheit von Methyl- β -Cyclodextrin signifikant abnimmt (Abbildung 44).

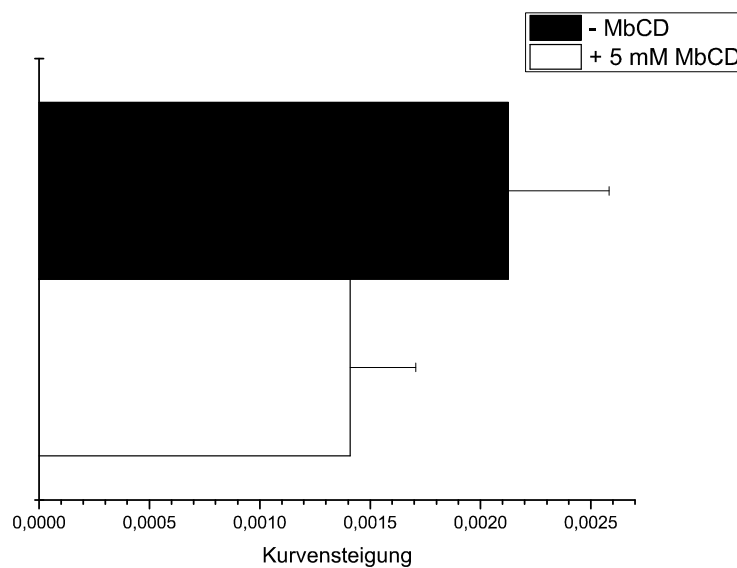


Abb. 44: Vergleich der Steigungen des linearen Anstiegs der FRET-Kurven von BRIA-TM-CFP + ARIIB-TM-YFP nach Perfusion mit 30 nM coreBMP-2 als Maß der Geschwindigkeit der Komplexbildung. Nach Behandlung mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin ist die Steigung geringer und die Komplexbildung somit langsamer.

Die quantitative Auswertung zeigt eine Reduktion der Geschwindigkeit um etwa 30 %, was gut mit der Abnahme der mobilen Fraktion im Fall von ActR-IIB korreliert werden kann. Die durch Methyl- β -Cyclodextrin verursachte stärkere Immobilisierung von BMPR-IA scheint dagegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorherigen FRAP-Experimente, in denen BMPR-IA bereits durch die Bindung von BMP-2 eine deutliche Immobilisierung zeigte. Die Beeinflussung des FRET-Signals durch Methyl- β -Cyclodextrin sowie die Tatsache, dass der Zeitverlauf eines typischen

FRET-Experiments bis zum Erreichen des Plateaus mehrere Minuten in Anspruch nimmt, sind Anzeichen dafür, dass in diesen Versuchen die Rekrutierung von Rezeptoren in Komplexe beobachtet wird.

3.3.5.3 Spezifität der Rezeptorkomplexbildung

Um zu überprüfen, ob die Signalkomplexbildung aus BMPR-IA und ActR-IIB ligandenspezifisch erfolgt, wurden HEK-tsA201-Zellen mit beiden Rezeptortypen transfiziert und mit verschiedenen konzentrierten TGF- β 2-Lösungen perfundiert (Abbildung 45). Dabei konnte auch mit höheren Konzentrationen (bis 30 nM) keine Komplexbildung induziert werden. Die Rekrutierung dieser Rezeptoren in den Signalkomplex wird daher spezifisch durch die Bindung von BMP-2 ausgelöst.

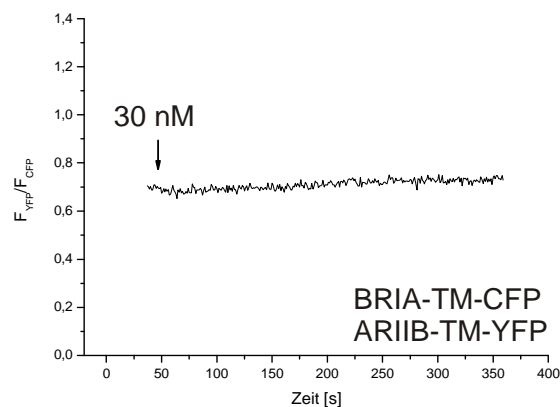


Abb. 45: FRET-Experiment zur Kontrolle der Ligandenspezifität. Die Zelle wurde mit 30 nM TGF- β 2 perfundiert.

Durch die Überexpression der Rezeptoren in den transfizierten Zellen ist es denkbar, dass es allein durch die räumliche Nähe zwischen den Rezeptoren zu zufälligen Interaktionen kommt, die das FRET-Signal verfälschen können. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass unspezifische Interaktionen durch die Perfusion mit dem Ligand ausgelöst werden können. Um diese Verfälschungen ausschließen zu können, wurden HEK-tsA201-Zellen mit trunkiertem BMPR-IA (CFP) zusammen mit mYFP transfiziert und FRET-Experimente durchgeführt (Abbildung 46). Bei mYFP handelt es sich um ein YFP-Protein mit fusionierter Palmylierungssequenz. Durch diese Anordnung wird das Fluorophor knapp unterhalb der Zellmembran im Zytoplasma lokalisiert. Eine extrazelluläre Domäne weist dieses Konstrukt nicht auf, was eine Interaktion mit dem Liganden ausschließt. Eine zufällige, unspezifische Interaktion wird durch die FRET-Amplitude repräsentiert, die zu Beginn des Experiments vor Zugabe des Liganden vorliegt. Diese unterscheidet sich bei diesen Versuchen nicht von der Anfangsamplitude, die in Experimenten mit zwei Rezeptorsubtypen zu sehen ist. Daraus lässt

sich schließen, dass das basale FRET-Signal allein durch die räumliche Nähe der beiden Fluorophore erzeugt wird. Außerdem lässt sich schlussfolgern, dass es auch zwischen BMPR-IA und ActR-IIB nur eine geringe spezifische Interaktion vor der Zugabe des Liganden gibt, da sich die Anfangsamplituden in diesen Experimenten nicht von der hier gemessenen unspezifischen Anfangsamplitude unterscheiden.

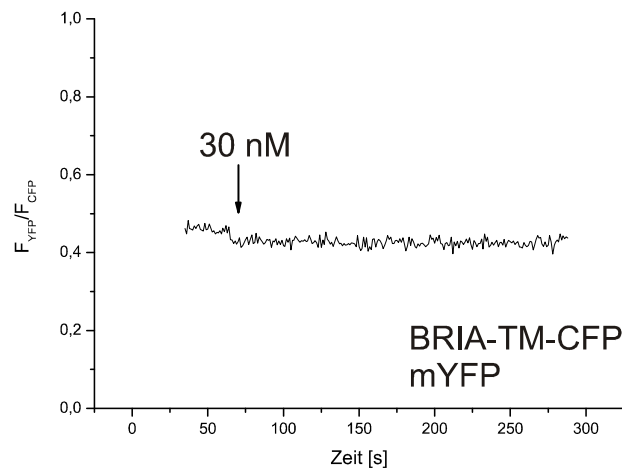


Abb. 46: Messung zur Kontrolle der Rezeptorspezifität. Die Zellen wurden mit 30 nM coreBMP-2 perfundiert.

Durch Perfusion mit 30 nM coreBMP-2 konnte zwischen BMPR-IA und mYFP keine Komplexbildung induziert werden. Für die Bildung eines ligandeninduzierten Signalkomplexes sind also die extrazellulären Domänen beider Rezeptoren erforderlich.

3.3.5.4 Unterschiede bei Verwendung von verschiedenen Typ-II-Rezeptoren

BMP-2 kann neben den Activin-Typ-II-Rezeptoren ebenfalls mit BMPR-II interagieren. Die Signalkomplexe zeigen allerdings je nach vorhandenem Typ-II-Rezeptor eine andere Funktionalität (Kawabata et al., 1998; ten Dijke et al., 2003). In BIAcore Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindeaffinitäten der BMP-2:BMPR-II Interaktion signifikant kleiner als die der Bindung von BMP-2 an ActR-IIB sind (Sebald et al., 2004; Heinecke et al., 2009). In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob sich die in den BIAcoreanalysen ermittelten Unterschiede auch in FRET-Experimenten widerspiegeln. Dazu wurden HEK-tsA201-Zellen mit BMPR-IA (CFP) und ActR-IIB (YFP) oder BMPR-IA (CFP) und BMPR-II (YFP), jeweils in trunkierter Form, transfiziert und die FRET-Signale analysiert. Die Zellen wurden mit verschiedenen konzentrierten Liganden-Lösungen perfundiert und die Änderungen der CFP- und YFP-Signale aufgezeichnet (Abbildung 47).

Rezeptoren	Ligand	1 nM	3 nM	6 nM	10 nM	30 nM	100 nM
BRIA-TM + ARIIB-TM	coreBMP-2	-	-	-	++	++	++
BRIA-FL + ARIIB-FL	coreBMP-2	-	-	-	++	++	++
BRIA-TM + BRII-TM	coreBMP-2	-	-	-	-	++	++

Abb. 47: Für die Komplexbildung verschiedener Rezeptorkombinationen benötigte Schwellenwertkonzentrationen von coreBMP-2.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Schwellenkonzentration, ab der es zu einem FRET-Signal kommt, vom verwendeten Typ-II-Rezeptor abhängig ist. So kommt es bei Verwendung von ActR-IIB ab einer Konzentration von 6-10 nM zu einer Komplexbildung der Rezeptoren, bei Transfektion von BMPR-II als Typ-II-Rezeptor benötigt man jedoch mindestens eine Ligandenkonzentration von 30 nM. Die Signalamplitude blieb in allen Experimenten annähernd gleich. Durch Perfusion mit Pufferlösung konnte in keinem Fall eine Trennung der Rezeptoren erreicht werden, so dass bei allen verwendeten Rezeptorkombinationen ein stabiler Rezeptorkomplex vorzuliegen scheint.

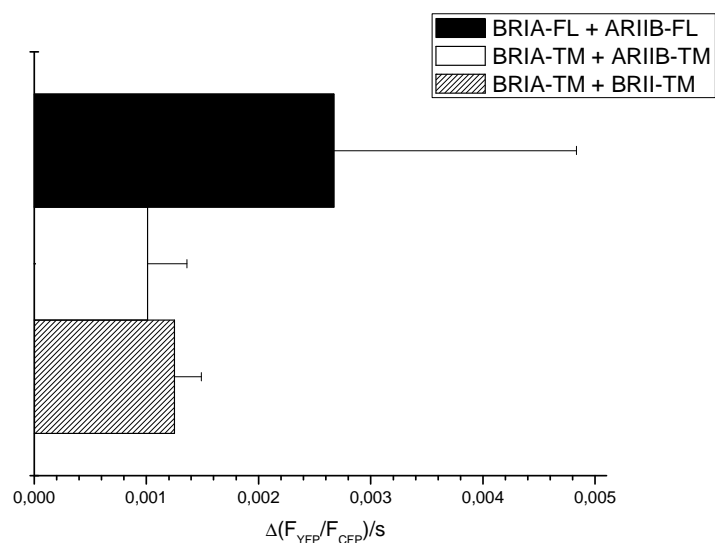


Abb. 48: Vergleich der Steigungen des linearen Anstiegs der FRET-Kurven als Maß für die Geschwindigkeit der Komplexbildung.

Die Geschwindigkeit der Komplexbildung war bei allen Rezeptorkombinationen etwa gleich schnell (Abbildung 48). Die ermittelten Werte für die Schwellenkonzentration unterscheiden sich aber um den Faktor 3 und entsprechen den in BIAcore-Experimenten ermittelten K_D -Werte der 1:2-Interaktion zwischen BMP-2 und ActR-IIB beziehungsweise BMP-2 und BMPR-II. Diese Versuche zeigen damit, dass sich unterschiedliche Affinitäten des Liganden zu den verschiedenen Rezeptoren auf die Induktion der Rezeptorkomplexbildung auswirken.

Die Affinität der Ligand:Typ-II-Rezeptorinteraktion scheint dabei der ausschlaggebende Faktor zu sein.

Erwähnenswert erscheint an dieser Stelle, dass auch der K_D -Wert der 1:1-Interaktion zwischen BMP-2 und BMPR-IA in einem ähnlichen Konzentrationsbereich (~50 nM) liegt. Inwieweit monomere Rezeptoren oder aber präformierte Rezeptordimere eines Subtyps zur Erzeugung der FRET-Signale beitragen, sollten Versuche mit heterodimeren BMP-2 Mutanten zeigen.

3.3.5.5 Analyse von BMP-2-Mutanten mit verringerter Affinität

Durch die dimere Struktur der Liganden der TGF- β -Superfamilie können in einem Signalkomplex jeweils bis zu zwei Typ-I- und zwei Typ-II-Rezeptoren vorhanden sein. Aus früheren Versuchen ist bereits bekannt, dass auch Komplexe, die nicht den vollen Rezeptorbesatz beinhalten, aktiv sein können (Knaus and Sebald, 2001). Um herauszufinden, ob ein oder zwei Exemplare des jeweiligen Rezeptorsubtyps in den Signalkomplex rekrutiert werden, wurden FRET-Versuche mit BMP-2-Mutanten durchgeführt, bei denen die in Biosensoranalysen ermittelte Affinität zu einem oder beiden Rezeptortypen durch Punktmutationen in den jeweiligen Bindeepitopen verringert wurde (Keller et al., 2004; Zhang et al., 2007). Außerdem wurde eine Mutante benutzt, bei der alle vier Epitope mutiert sind. Für die Experimente wurden HEK-tsA201-Zellen verwendet, die transient mit BMPR-IA und ActR-IIB transfiziert wurden.

Überraschenderweise zeigen sich in allen Versuchen mit heterodimeren Mutanten, bei denen ein Epitop für die Bindung des Typ-I-Rezeptors (BMP-2L51P) oder des Typ-II-Rezeptors (BMP-2A34D bzw. BMP-2L100P) verändert wurde, genau die gleichen Ergebnisse wie in den vorherigen Versuchen mit wildtypischen Liganden (Abbildung 49). Leichte Verschiebungen in der Schwellenwertkonzentration sowie eine teilweise geringere Geschwindigkeit der Komplexbildung mögen dabei auf Ungenauigkeiten bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung der verwendeten Proteine bzw. deren biologischer Aktivität zurückgeführt werden. Mutationen in einzelnen Bindeepitopen von BMP-2, die zum Teil einen dramatischen Verlust an Bindeaffinität zu den jeweiligen Rezeptoren zur Folge haben, zeigen demnach keinerlei Auswirkung auf die Bildung von Rezeptorkomplexen. Auch in diesen Versuchen waren die Komplexe nach der Bildung stabil und zeigten keine Abnahme des FRET-Signals nach Perfusion mit Puffer.

Rezeptoren	Ligand	1 nM	3 nM	6 nM	10 nM	30 nM	100 nM
BRIA-TM + ARIIB-TM	coreBMP-2	-	-	-	++	++	++
	coreBMP-2L51P Hetero	-	-	+	++	++	++
	coreBMP-2A34D Hetero	-	-	+	+	++	++
	coreBMP-2L100P Hetero	-	-	-	+	++	++
	coreBMP-2L51P Homo	-	-	-	++	++	++
	coreBMP-2A34D Homo	-	-	-	++	++	++

Abb. 49: Übersicht über die Schwellenkonzentrationen der hetero- und homodimeren coreBMP-2-Mutanten.

Auch homodimere Mutanten, bei denen beide Epitope für einen Rezeptortyp mutiert sind, waren in der Lage, wie wildtypische Liganden eine Komplexbildung zu induzieren. Die Schwellenkonzentration, die Signalamplitude sowie die Geschwindigkeit des Vorgangs unterschieden sich ebenfalls nicht von Experimenten mit wildtypischen Liganden. Dabei war es gleichgültig, ob die Bindeepitope für den Typ-I- oder Typ-II-Rezeptor mutiert sind. Für die Rekrutierung des Partnerrezeptors in den Signalkomplex scheint es also ausreichend zu sein, wenn der Ligand an einen Rezeptorsubtyp – gleichgültig, ob Typ-I oder Typ-II – binden kann. Für die Generierung eines Signals reicht dies allerdings nicht aus, wie bereits in Arbeiten in Knaus und Sebald gezeigt werden konnte (Knaus and Sebald, 2001). Die Bildung eines Signalkomplexes ist daher der erste notwendige, aber nicht hinreichende Schritt für eine erfolgreiche Signalübertragung in die Zelle. Es ist daher anzunehmen, dass durch die Bindung des Liganden an beide Rezeptorsubtypen sterische Veränderungen im Bereich der intrazellulären Domänen der Rezeptoren erfolgen, die für eine Aktivierung der Rezeptorkinasen erforderlich sind.

Ein anderes Bild zeigt die Mutante, bei der alle Bindeepitope mutiert sind (BMP-2L51PA34D). Auch diese Variante war in der Lage, eine Komplexbildung hervorzurufen. Im Gegensatz zu allen anderen BMP-2-Mutanten sowie wildtypischem BMP-2 konnte aber hier durch Perfusion mit Puffer eine deutliche Reduktion des FRET-Signals erreicht werden, was als Dissoziation der Rezeptoren interpretiert werden kann (Abbildung 50). Auch die erreichte Signalamplitude fiel deutlich niedriger aus.

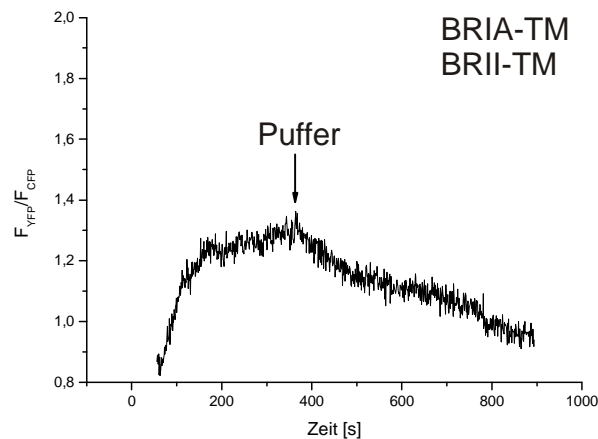


Abb. 50: Bei Komplexen, die durch Stimulation mit 30 nM coreBMP-2L51PA34D (Homo) induziert wurden, kann durch anschließende Perfusion mit Puffer eine Dissoziation der Rezeptoren erreicht werden.

Diese Ergebnisse lassen keine Rückschlüsse auf die Stöchiometrie der induzierten Komplexe zu, da sich die mit den Mutanten erzielten Ergebnisse nicht untereinander und auch nicht von Ergebnissen mit wildtypischen Liganden unterscheiden. Für einen stabilen Signalkomplex scheint lediglich die unveränderte Bindung an einen einzelnen Rezeptorsubtyp – entweder Typ I oder Typ II – erforderlich zu sein, da in allen Versuchen sowohl mit heterodimeren als auch mit homodimeren Mutanten, die für einen Rezeptortyp bindedefizient sind, das gleiche Komplexierungsverhalten beobachtet wurde.

3.3.5.6 Analyse von BMP-2-Mutanten mit höherer Typ-II-Rezeptoraffinität

Im Folgenden wurde untersucht, ob eventuell eine Erhöhung der Bindeaffinitäten zu einem der beiden Rezeptortypen die Komplexbildung beeinflusst (Abbildung 51). Dabei wurde auf BMP-2 Mutanten zurückgegriffen, bei denen einzelne Aminosäuren im Typ-II-Rezeptor-Bindeepitop (knuckle Epitop) gegen die in gleicher Position befindlichen Aminosäuren in Activin-A ausgetauscht wurde (Weber et al., 2007). Die Mutante BMP-2N100KL102D (coreBMP-2KD) zeigt eine 20-fach erhöhte Affinität zu ActR-IIB, während BMP-2R85P (coreBMP-2RP) eine etwa 10-fach höhere Affinität zu BMPR-II aufweist.

Rezeptoren	Ligand	1 nM	3 nM	6 nM	10 nM	30 nM	100 nM
BRIA-TM + ARIIB-TM	coreBMP-2	-	-	-	++	++	++
	coreBMP-2KD Homo	-	-	-	++	++	++
BRIA-TM + BRII-TM	coreBMP-2	-	-	-	-	++	++
	coreBMP-2RP Homo	-	-	-	-	++	++

Abb. 51: Übersicht über die Schwellenkonzentrationen der coreBMP-2-Mutanten mit erhöhter Typ-II-Rezeptor Affinität.

Erstaunlicherweise konnte auch durch die Erhöhung der Affinität zu den Typ-II-Rezeptoren in keinem Fall eine Veränderung der Komplexbildung erreicht werden, da sowohl der benötigte Schwellenwert der Ligandenkonzentration als auch die Geschwindigkeit der Komplexbildung gleich blieben. Die Erhöhung der Affinität zu den Typ-II-Rezeptoren hat also für BMP-2 ebenfalls keine Auswirkungen auf die Rekrutierung der Rezeptoren.

Zusammenfassend deuten alle Ergebnisse daraufhin, dass die BMP-2-induzierte Rekrutierung beider Rezeptortypen zu Komplexen völlig unabhängig von den Bindeaffinitäten des Liganden zu den einzelnen Rezeptoren ist. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Bildung der Komplexe durch andere, bisher unerforschte Mechanismen gesteuert wird. Die Interaktion des Liganden mit den Rezeptoren scheint somit den Prozess der Rezeptorrekrutierung lediglich in Gang zu setzen. Eine weitere Funktion des Liganden mag darin bestehen, diesen Komplex zu stabilisieren und/oder Konformationsänderungen zu erzeugen, die für die Aktivierung der Kinasedomänen der Rezeptoren notwendig sind.

3.3.5.7 Untersuchung der Eigenschaften von GDF-5

Um zu überprüfen, ob es sich bei den gezeigten Ergebnissen um spezifische Eigenschaften des Liganden BMP-2 handelt, wurden die Experimente mit einem verwandten Faktor, dem Growth and Differentiation Factor 5 (GDF-5), wiederholt. GDF-5 bindet mit ähnlichen Affinitäten an dieselben Rezeptoren wie BMP-2. Lediglich die Bindung an den Typ-I-Rezeptor BMPR-IA ist durch 10- bis 15-fach höhere K_D -Werte, d.h. niedrigere Affinität, gekennzeichnet. Da in FRET-Experimenten mit BMP-2-Mutanten gezeigt wurde, dass die individuellen Bindeaffinitäten zu den verschiedenen Rezeptortypen die Komplexbildung nicht beeinflusst, wurden mit GDF-5 ähnliche Ergebnisse erwartet. Mit wildtypischem GDF-5 konnte jedoch erst eine Komplexbildung ab einer Ligandenkonzentration von 100 nM beobachtet werden (Abbildung 52). Der Schwellenwert ist somit etwa 10-mal höher als derjenige, der mit allen BMP-2 Varianten und gleicher Rezeptorkombination nachgewiesen wurde. Der Unterschied korreliert mit der 10-15-fach niedrigeren Bindeaffinität zu BMPR-IA, was im Falle von GDF-5 doch auf eine Abhängigkeit der Bindeaffinitäten auf die Komplexbildung hindeutet. Um dies zu überprüfen, wurden Experimente mit homodimeren GDF-5-Mutanten durchgeführt, bei denen die Affinität für jeweils einen Rezeptortyp durch Punktmutationen erhöht wurde (Abbildung 52). So ist bei der Mutante GDF-5R57A die Affinität zu BMPR-IA etwa 10-fach erhöht, bei der Mutante GDF-5Y106KA108D (GDF-5KD) die zu ActR-IIB um den Faktor 10. Die Mutante GDF-5R57AY106KA108D (GDF-5AKD) kombiniert diese Mutationen.

Rezeptoren	Ligand	1 nM	3 nM	6 nM	10 nM	30 nM	100 nM
BRIA-TM + ARIIB-TM	GDF-5	-	-	-	-	-	++
	GDF-5R57A	-	+	++	++	++	++
	GDF-5Y106KA108D	-	-	-	++	++	++
	GDF-5R57AY106KA108D	++	++	++	++	++	++

Abb. 52: Übersicht über die in Experimenten mit wildtypischem und mutiertem GDF-5 ermittelten Schwellenkonzentrationen zur Induktion der Komplexbildung.

Im Gegensatz zu BMP-2 wird im Falle von GDF-5 ein deutlicher Einfluss der erhöhten Affinität auf die Komplexbildung festgestellt. Die benötigte Schwellenkonzentration war bei beiden Mutanten um den Faktor 10-15 erniedrigt, so dass ähnliche Werte wie für BMP-2 ermittelt werden konnten. Die Erniedrigung der Schwellenkonzentration korreliert auch hier exzellent mit dem durch die Mutationen bedingten Affinitätsgewinn zu den jeweiligen Rezeptortypen. Bestätigt wurde dies auch durch die homodimere Doppelmutante, die affinitätserhöhende Mutationen in den Typ-I- als auch Typ-II-Rezeptor-Bindeepitopen enthält, da ein weiteres Absinken der Schwellenkonzentration für die Komplexbildung auf ca. 1 nM beobachtet werden konnte.

Die Geschwindigkeit der Komplexbildung wurde durch die Erhöhung der Affinitäten nur gering beeinflusst (Abbildung 53). Der deutlichste Geschwindigkeitszuwachs konnte bei der GDF-5Y106KA108D-Mutante beobachtet werden. Für die GDF-5-vermittelte Rezeptorrekrutierung scheint daher die Affinität des Liganden zum Typ-II-Rezeptor geschwindigkeitsbestimmend zu sein. Die durch GDF-5 induzierten Komplexe sind, wie auch die BMP-2-induzierten Komplexe, stabil und dissoziieren nicht durch Perfusion mit Puffer. Da derselbe Zelltyp und dieselben Rezeptoren wie bei den Experimenten mit BMP-2 verwendet wurden, kann aus diesen Experimenten geschlossen werden, dass für BMP-2 und GDF-5 unterschiedliche Mechanismen der Rezeptorrekrutierung existieren.

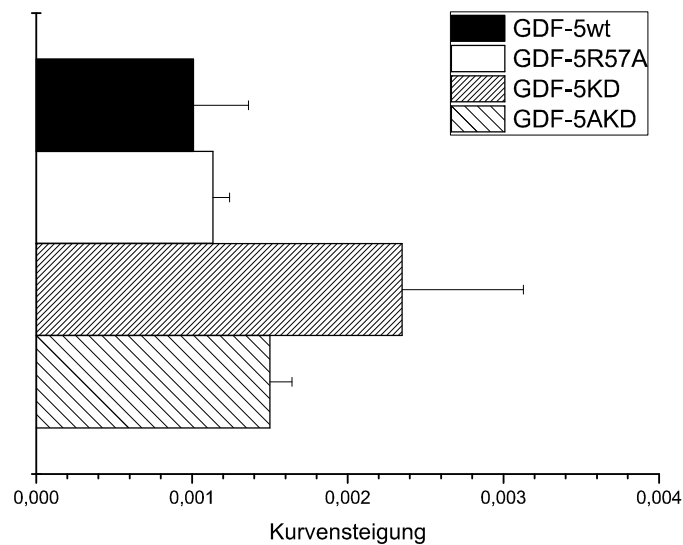


Abb. 53: Vergleich der Geschwindigkeiten des FRET-Signalanstiegs durch verschiedene GDF-5-Varianten. GDF-5R57A zeigt eine 10-fach erhöhte Affinität zu BMPR-IA, GDF-5KD zeigt eine 10-fach erhöhte Affinität zu ActR-IIB. Die Mutante GDF-5AKD kombiniert alle Mutationen.

3.3.5.8 Untersuchung der Eigenschaften von Activin-A

Aufgrund der interessanten Ergebnisse, die sich bezüglich der Rezeptorrekrutierung aus dem Vergleich von BMP-2 und GDF-5 ergaben, wurde ein weiterer Ligand aus der TGF- β -Superfamilie untersucht. Activin-A wurde ausgewählt, da dieser Ligand im Gegensatz zu BMP-2 und GDF-5 hochaffin an die Typ-II-Rezeptoren Act-RII und -IIB bindet. Außerdem zeigt der für die Signalweiterleitung benötigte Typ-I-Rezeptor ActR-IB keine messbare Interaktion mit diesem Liganden (Heinecke et al., 2009). Für die FRET-Experimente wurden ebenfalls HEK-tsA201-Zellen verwendet, die mit ActR-IB (CFP) und ActR-IIB (YFP), jeweils in nativer Form, transfiziert und mit verschiedenen konzentrierten Lösungen von humanem Activin-A perfundiert wurden. Zusätzlich wurden die gleichen Experimente mit ActR-IB (CFP) und BMPR-II (YFP) durchgeführt (Abbildung 54).

Rezeptoren	Ligand	1 nM	3 nM	6 nM	10 nM	30 nM	100 nM
ALK4-FL + ARIIB-FL	Activin-A	-	-	-	-	-	-
ALK4-FL + BRII-TM	Activin-A	-	-	-	-	++	++

Abb. 54: Übersicht über die ermittelten Schwellenkonzentrationen von Activin-A.

In mit ActR-IB und ActR-IIB transfizierten Zellen konnte – im Gegensatz zu den Experimenten mit BMP-2- und GDF-5-Varianten – durch Perfusion mit Ligandenkonzentrationen bis 100 nM Activin-A kein Ansteigen des FRET-Signals erreicht

werden. Auffällig war jedoch, dass diese Rezeptorkombination ein deutlich höheres basales FRET-Signal als die Kombination BMPR-IA und ActR-IIB, bzw. BMPR-IA und BMPR-II in vorherigen Experimenten zeigte (Abbildung 55). Es kann daher vermutet werden, dass die Rezeptoren ActR-IB und ActR-IIB nahezu quantitativ präformierte Komplexe bilden.

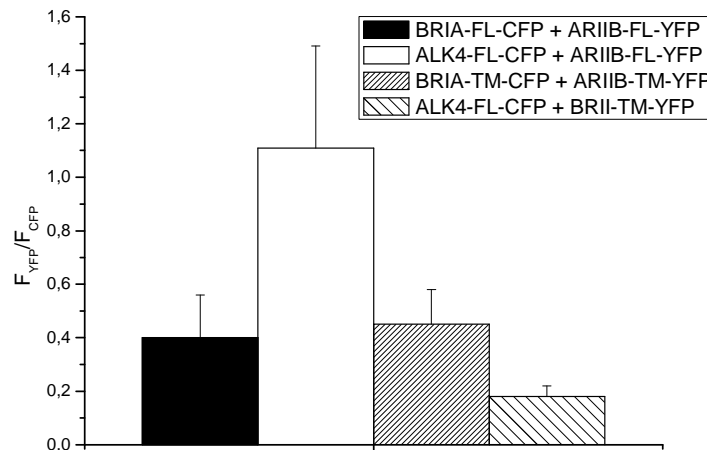


Abb. 55: Vergleich des durchschnittlichen basalen FRET-Signals von verschiedenen Rezeptorkombinationen vor der Stimulation mit Ligandenlösung.

Erstaunlicherweise konnte mit der Kombination aus ActR-IB und BMPR-II ab einer Konzentration von 30 nM Activin-A eine Komplexbildung induziert werden. Für diese Rezeptorkombination wurde kein erhöhtes, sondern ein eher niedriges basales FRET-Signal auf dem Niveau der Kombination BMPR-IA:ActR-IIB beobachtet.

An diesem Beispiel wird deutlich, dass verschiedene Rezeptorkombinationen, die mit demselben Liganden interagieren können, unterschiedliche Mechanismen der Komplexbildung und damit auch der Signalweiterleitung in die Zelle zeigen können. In Verbindung mit der Erkenntnis, dass präformierte und ligandeninduzierte Rezeptorkomplexe unterschiedliche Signale in der Zelle auslösen können (Nohe et al., 2002), ergibt sich somit für den Organismus die Möglichkeit, mit einem Liganden verschiedene Reaktionen zu erreichen.

Um zu überprüfen, ob beide Rezeptorkombinationen signalaktiv sind, wurden HEK-tsA201-Zellen mit den genannten Rezeptoren transfiziert, mit Activin-A stimuliert und anschließend die Phosphorylierung von SMAD-2, welches von dem Typ-I-Rezeptor ActR-IB phosphoryliert werden kann, per Western Blot überprüft (Abbildung 56).

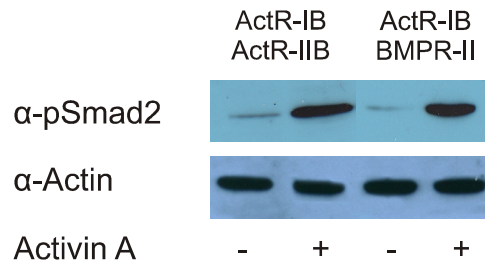


Abb. 56: Phosphorylierung von SMAD-2. HEK-tsA201-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptoren transfiziert. Unstimulierte und für 1h mit 10 nM Activin-A stimulierte Zellen wurden lysiert und die Phosphorylierung von SMAD-2 im Western Blot überprüft. Actin diente als Ladekontrolle.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass beide Rezeptorkombinationen in der Lage sind, SMAD-2 bei Stimulation mit Activin-A zu phosphorylieren. Damit ist sowohl die Kombination ActR-IB:ActR-IIB als auch die Kombination ActR-IB:BMPR-II in der Lage, ein Signal in die Zelle weiterzuleiten.

3.4 Untersuchung der ligandeninduzierten SMAD-Phosphorylierung

Durch die in den FRET-Experimenten gezeigten Unterschiede bei der Stimulation von Zellen mit BMP-2 und GDF-5 stellte sich die Frage, ob diese Liganden sich auch in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden. Frühere Experimente von Dr. Joachim Nickel haben gezeigt, dass C2C12- und ATDC5-Zellen trotz gleichen bekannten Rezeptorbesatzes in Alkalische-Phosphatase-Assays unterschiedlich auf die Stimulation mit diesen Liganden reagieren. So zeigen beide Zelllinien bei Stimulation mit BMP-2 eine Induktion der Expression des alkalischen Phosphatasegens. Die Mutante GDF-5R57A, die zu allen typischen Rezeptoren ähnlich Bindeaffinitäten wie BMP-2 aufweist, induziert wie BMP-2 alkalische Phosphatase in ATDC5-, jedoch nicht bzw. nur sehr schwach in C2C12-Zellen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass in ATDC5-Zellen entweder zusätzliche Komponenten vorhanden sind, die eine Signalübertragung nach Bindung des Liganden ermöglichen und die in C2C12-Zellen fehlen, oder dass in C2C12-Zellen Komponenten vorhanden sind, die die Signalübertragung nach der Bindung des Liganden inhibieren. Es wurde daher untersucht, ob nach Stimulation durch die Liganden in allen Fällen signalaktive Komplexe gebildet werden, die die nachgeschalteten SMAD-Proteine durch Phosphorylierung aktivieren. Beide Zelllinien wurden dafür mit unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden stimuliert und nach unterschiedlichen Zeiten die SMAD-Aktivierung mit einem Phospho-SMAD-1/5-Antikörper in Western Blots analysiert.

3.4.1 BMP-2-induzierte Phosphorylierung von SMAD-1/5

Die Western Blots der BMP-2-stimulierten C2C12-Zellen zeigen, dass bereits bei Ligandenkonzentrationen unter 10 nM eine Phosphorylierung von SMAD-1/5 zu sehen ist.

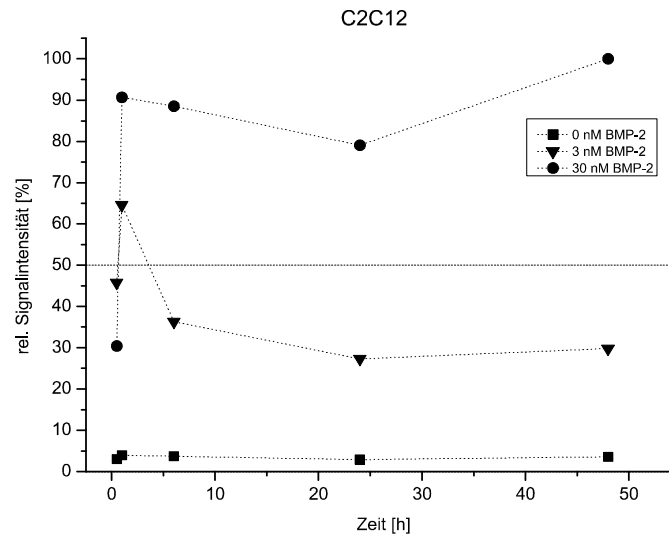


Abb. 57: Quantitative Auswertung von Western Blots gegen Phospho-SMAD 1/5. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung in C2C12-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen.

Diese Phosphorylierung wird allerdings nur kurzfristig aufrecht erhalten und geht bereits nach sechs Stunden deutlich zurück. Erst bei Stimulation mit Ligandenkonzentrationen ab 10 nM ist eine durchgängig hohe (über 50 % des Maximalwertes) SMAD-1/5-Phosphorylierung über den gesamten Verlauf des Experiments zu beobachten.

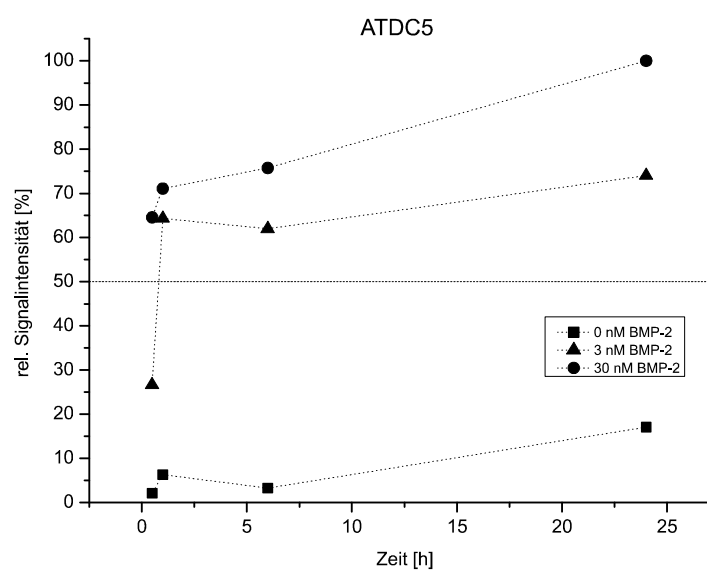


Abb. 58: Quantitative Auswertung von Western Blots gegen Phospho-SMAD-1/5. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung in ATDC5-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen.

ATDC5-Zellen zeigen bereits bei einer Stimulation mit 3 nM BMP-2 eine permanente SMAD-1/5-Phosphorylierung (Abbildung 58). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass für die Induktion der Alkalischen Phosphatase, die über einen Zeitraum von mehreren Tagen stattfindet, eine permanente Aktivierung des SMAD-Signalweges nötig ist. Zwar ist auch bei der Stimulation mit niedrigeren BMP-2-Konzentrationen eine Phosphorylierung von SMAD-1/5 zu beobachten, diese ist allerdings nur von kurzer Dauer und geht bereits nach wenigen Stunden wieder zurück. Diese temporäre SMAD-Aktivierung ist anscheinend für die Induktion der Alkalischen Phosphatase nicht ausreichend, da nach Stimulation mit 3 nM BMP-2 keine signifikante Induktion des ALP-Gens beobachtet wird (Knaus and Sebald, 2001).

3.4.2 GDF-5R57A-induzierte Phosphorylierung von SMAD-1/5

Auch nach Stimulation mit GDF-5R57A wird in beiden Zelltypen eine Phosphorylierung von SMAD-1/5 festgestellt. Allerdings zeigen C2C12-Zellen hier einen anderen Verlauf der SMAD-Phosphorylierung als bei der Stimulation mit BMP-2.

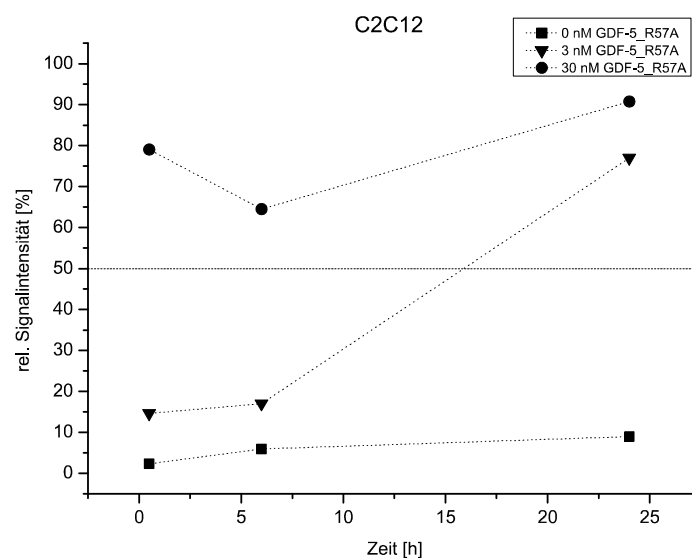


Abb. 59: Quantitative Auswertung von Western Blots gegen Phospho-SMAD-1/5. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung in C2C12-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen.

Bei niedrigen GDF-5R57A-Konzentrationen gibt es keine starke anfängliche Phosphorylierung, die dann wieder zurückgeht, sondern es zeigt sich eine im gesamten Verlauf ansteigende Phosphorylierung von SMAD-1/5. Interessanterweise ist bei Stimulation mit 30 nM GDF-5R57A eine durchgängig hohe SMAD-1/5-Phosphorylierung zu sehen. Wie bereits beschrieben, ist das Alkalische Phosphatasegen in C2C12-Zellen durch GDF-5R57A nur sehr schlecht induzierbar. Es kann daher vermutet werden, dass hierfür ein zusätzlicher,

für die GDF-5 Liganden spezifischer Mechanismus vorhanden sein muss, der aber in C2C12 Zellen offensichtlich fehlt.

ATDC5-Zellen verhalten sich bei Stimulation mit GDF-5R57A anders. Diese Zellen zeigen bereits bei niedrigen Ligandenkonzentrationen eine permanente Phosphorylierung von SMAD-1/5.

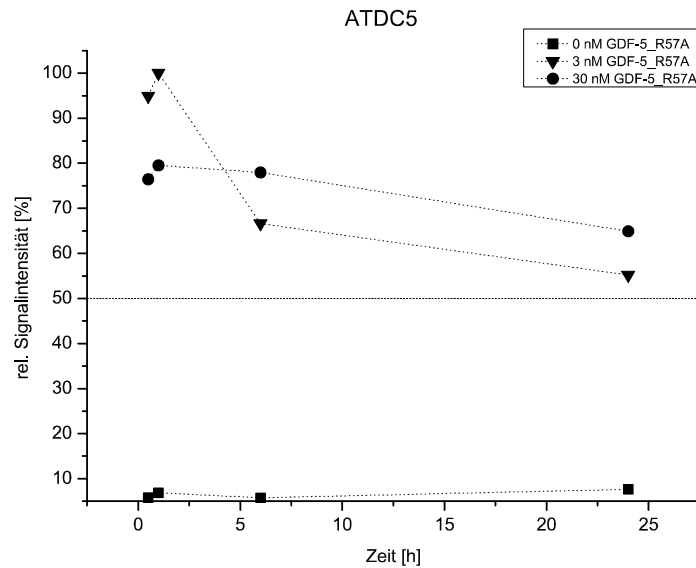


Abb. 60: Quantitative Auswertung von Western Blots gegen Phospho-SMAD-1/5. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung in ATDC5-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen.

Aus den Ergebnissen mit beiden Zelltypen lässt sich folgern, dass ab einer bestimmten Ligandenkonzentration eine über die Zeit stabile Aktivierung des SMAD-Signalweges erfolgt. Experimente mit dem spezifischen Inhibitor Dorsomorphin, der die Phosphorylierung von SMAD-1/5/8 durch den aktivierten Typ-I-Rezeptor verhindert, zeigen eindeutig, dass diese permanente Aktivierung für die Induktion des ALP Genes essentiell ist. Für GDF-5 Varianten ist dies in C2C12-Zellen jedoch nicht ausreichend.

4. Diskussion

4.1 Abhängigkeit des aktivierten Signalweges von den Rezeptordomänen

In der Vergangenheit wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen Experimente durchgeführt, um aufzuklären, welche Rezeptordomänen für die Spezifität des ausgelösten SMAD-Signalweges verantwortlich sind. Dabei wurde festgestellt, dass die Rezeptoren TGF- β R-I und TGF- β R-II auch dann noch signalaktiv sind, wenn die extrazellulären Domänen gegen die artfremden extrazellulären Domänen des Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) α - oder β -Rezeptors ausgetauscht werden (Anders and Leof, 1996). Diese Rezeptoren ermöglichen eine hochaffine Bindung von GM-CSF, wenn ein Dimer aus den ligandenbindenden α - und β -Rezeptoruntereinheiten vorliegt. Auf diese Weise können ein heterodimerer Komplex aus je einem chimären Typ-I- und Typ-II-Rezeptor oder homodimere Komplexe aus zwei chimären Typ-I- oder zwei chimären Typ-II-Rezeptoren gebildet werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Komplex, der die intrazellulären Domänen von TGF- β R-I und TGF- β R-II enthält, die gleiche Aktivität wie ein Komplex aus wildtypischen Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren zeigt, wohingegen Komplexe, die jeweils nur die Domänen von TGF- β R-I oder TGF- β R-II enthalten, bei Stimulation mit GM-CSF kein Signal auslösen können.

In weiteren Experimenten konnten Persson *et al.* zeigen, dass durch den Austausch der intrazellulären Kinasedomäne von TGF- β R-I gegen die intrazelluläre Domäne von BMPR-IB eine TGF- β -abhängige Aktivierung von SMAD-1 erreicht werden kann (Persson et al., 1997). Durch Austausch der Kinasedomäne ist es also möglich, die Art des verwendeten Signalweges umzuschalten. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass eine Rezeptorchimäre, die aus der extrazellulären Domäne von TGF- β R-II und der Kinasedomäne von ActR-IIB besteht, weiterhin in der Lage ist, in Verbindung mit TGF- β R-I ein Signal über SMAD-2 zu generieren. Die Spezifität des Signals ist also allein vom Typ der Kinasedomäne des Typ-I-Rezeptors abhängig. Dies konnte in weiteren Untersuchungen auch für andere Rezeptorchimären bestätigt werden. Experimente mit Chimären aus der extrazellulären Domäne von BMPR-IA oder BMPR-IB zusammen mit der intrazellulären Domäne von ActR-IB haben gezeigt, dass die Stimulation dieser Chimären mit BMP-2 zu einer Aktivierung von SMAD-2 führt (Kotzsch et al., 2008).

Im Jahr 1999 untersuchten Lux *et al.* die Signalaktivität weiterer chimärer Rezeptoren (Lux et al., 1999). In dieser Arbeit wurden Konstrukte verwendet, die aus Bestandteilen von TGF- β R-I, BMPR-IA, ActR-IB und ALK-1 zusammengesetzt waren. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf Rezeptoren, bei denen der Austausch im Bereich der GS-Region der intrazellulären

Domäne vorgenommen wurde. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle Rezeptorkonstrukte bei Stimulation mit dem zur extrazellulären Domäne passenden Liganden in der Lage waren, ein SMAD-Signal auszulösen, obwohl die GS-Box Teile beider verwendeten Rezeptortypen enthielt. Dies zeigt, dass lediglich eine GS-reiche Struktur vorhanden sein muss, die vom Typ-II-Rezeptor phosphoryliert werden kann, um eine Signalweiterleitung in die Zelle zu gewährleisten.

Ein weiterer Beweis für die voneinander unabhängigen Funktionen der einzelnen Rezeptordomänen stammt von Greenwald *et al.* In einer Arbeit von 2003 wurde in Quervernetzungsexperimenten gezeigt, dass ActR-I und ActR-IB auch dann noch einen ligandeninduzierten Komplex mit ActR-II bilden können, wenn sowohl Typ-I- als auch Typ-II-Rezeptor nach der Transmembrandomäne trunziert sind, die intrazelluläre Domäne also fehlt (Greenwald *et al.*, 2003). Die intrazelluläre Domäne der Rezeptoren ist daher für die Rekrutierung des Typ-II-Rezeptors in den Signalkomplex aus Ligand und Typ-I-Rezeptor nicht erforderlich.

In den erwähnten Untersuchungen wurde eine mögliche Rolle der Transmembrandomäne für die Rezeptorrekrutierung nicht berücksichtigt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob ein Austausch von Transmembrandomänen in Typ-I-Rezeptoren die Komplexierung beider Rezeptortypen inhibiert und/oder die Spezifität der transduzierten Signale beeinflusst. Dazu wurden verschiedene Rezeptorchimären hergestellt, bei denen die extrazelluläre Domäne von TGF- β -RI mit den intrazellulären Domänen von ActR-I und ActR-IB kombiniert wurde. Da sich diese beiden Typ-I-Rezeptoren in dem verwendeten SMAD-Signalweg unterscheiden, konnte mit Hilfe spezifisch responsiver Luciferase-Konstrukte der aktivierte Signalweg festgestellt werden. Die Transmembrandomäne stammte entweder von TGF- β -RI oder den Activin-Typ-I-Rezeptoren, so dass ein eventueller Einfluss auf den Signalweg in den Luciferase-Assays hätte festgestellt werden können.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es auch mit diesen Chimären (in Verbindung mit dem Typ-II-Rezeptor TGF- β -RIIB) möglich ist, durch Stimulation mit TGF- β 2 ein SMAD-Signal auszulösen. Interessanterweise konnte wenig Einfluss der unterschiedlichen Transmembrandomänen auf die Aktivierung der nachgeschalteten SMAD-Proteine festgestellt werden. Der verwendete Signalweg wurde ausschließlich durch die Kinasedomäne festgelegt. Im Zusammenhang mit den bereits bekannten Ergebnissen kann daher geschlossen werden, dass der verwendete SMAD-Signalweg nur von der Art der vorliegenden Kinasedomäne abhängt, wohingegen die Ligandenspezifität nur von der extrazellulären Domäne festgelegt wird. Die Herkunft der Transmembrandomäne spielt für die Generierung des Signals offenbar

keine Rolle und sorgt lediglich für die korrekte Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran.

Erstaunlicherweise zeigen einige Liganden der TGF- β -Superfamilie wie zum Beispiel TGF- β 2 oder Activin-A keine, bzw. nur sehr geringe Affinitäten zu den jeweiligen Typ-I-Rezeptoren (de Crescenzo et al., 2001; Heinecke et al., 2009). Es stellt sich daher die Frage, wie es trotzdem gelingt, die entsprechenden Rezeptoren in einen Signalkomplex zu rekrutieren. Kristallographische Untersuchungen haben ergeben, dass Activin-A durch die hochaffine Bindung an den Typ-II-Rezeptor eine Strukturänderung erfährt, die eine Erhöhung der Affinität zum Typ-I-Rezeptor zur Folge hat (Greenwald et al., 2004). TGF- β 2 erfordert für die Bindung an den Typ-II-Rezeptor die Anwesenheit des Typ-I-Rezeptors oder des Corezeptors Betaglycan (del Re et al., 2004).

4.2 Ligandenbindung an hoch- und niederaffine Bindungsstellen in Zellkultur

In der Literatur sind mehrfach Experimente beschrieben, in denen Affinitäten von Liganden zu ihren Rezeptoren mit Hilfe von radioaktiven Bindungsassays semi-quantitativ untersucht wurden (Paralkar et al., 1991; Heldin et al., 1981; Cuatrecasas, 1971; Carpenter et al., 1975). Dabei fällt auf, dass im Falle von BMP-2 relativ niedrige Ligandenkonzentrationen (< 500 pM) verwendet wurden. In den ersten der in dieser Arbeit vorgestellten Bindeversuche konnten unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Versuchsparameter ähnliche Dissoziationskonstanten für die Interaktionen von BMP-2 mit BMPR-IA ermittelt werden. Die K_D -Werte lagen im Bereich von ~ 1 nM, was exzellent mit den durch BIAcore-Analysen ermittelten Affinitäten der 1:2 Interaktion von BMP-2 mit BMPR-IA übereinstimmt. Wurden höhere Konzentrationen des radioaktiv markierten BMP-2s verwendet, fiel ein typisch biphasischer Kurvenverlauf auf. Eine getrennte Analyse der Bindungskurve im hohen Konzentrationsbereich ergab deutlich höhere K_D -Werte (~ 25 nM). Diese wiederum stimmen gut mit den entsprechenden Biosensor-Daten der 1:1-Interaktion von BMP-2 mit BMPR-IA überein. K_D -Werte im Bereich von 25 nM wurden auch für die Interaktion der heterodimeren Mutante BMP-2L51P, bei der ein Typ-I-Rezeptor-Bindeepitop zerstört ist, mit BMPR-IA ermittelt. Die Bindungskurven zeigten hier aber keinen biphasischen Verlauf; d.h. hochaffine Bindestellen im Bereich von 1 nM wurden nicht beobachtet. Aus diesen Daten kann man schließen, dass auf den Oberflächen der transfizierten Zellen Bindestellen generiert werden, bei denen es sich aufgrund ihrer Affinität zum Liganden höchstwahrscheinlich um monomere (niederaffine) bzw. dimere (hochaffine)

Rezeptorkomplexe handelt. Die ermittelte Anzahl der Bindungsstellen zeigt, dass etwa 10 % der Bindungsstellen hochaffin sind, wohingegen die restlichen 90 % den niederaffinen Anteil stellen. Mit anderen Worten: 90 % der Rezeptoren liegen monomer und 10 % in Form präformierter dimerer Rezeptorkomplexe vor. Um zu überprüfen, ob insbesondere die niederaffinen Bindestellen monomeren Rezeptoren entsprechen, wurden Bindeversuche mit einem monovalenten Fab-Fragment durchgeführt, welches spezifisch mit der Ektodomäne des BMPR-IA interagiert. Die Analyse der Bindekurven ergab einen ebenfalls mit BIAcoreanalysen übereinstimmenden K_D -Wert von ~ 13 nM und wichtiger, die erwarteten Werte für B_{max} , die auch für die niederaffinen Bindestellen der BMP-2 Liganden ermittelt wurden. Erstaunlicherweise wurde auch eine ähnliche Verteilung von hoch- und niederaffinen Bindestellen (1:10) in nicht transfizierten, BMP-2 responsiven C2C12-Zellen beobachtet. Es scheint sich also nicht um ein durch Überexpression des Rezeptors hervorgerufenen Artefakt zu handeln.

Ob der Anteil hochaffiner Bindestellen erhöht werden kann, sollte durch eine Rezeptorchimäre überprüft werden, bei der die Kinasedomäne durch eine FKBP-Dimerisierungsdomäne ersetzt wurde. Dieses System ermöglicht durch die Zugabe eines synthetischen Dimerizers, der zwei FKBD-Domänen miteinander verbindet, die Induktion von homodimeren Molekülen. Auf diese Weise sollten homodimere BMPR-IA-Rezeptorkomplexe erzeugt werden, die eine 1:2-Interaktion mit wildtypischem BMP-2 ermöglichen.

Überraschenderweise war es auf diese Weise nicht möglich, die Anzahl an hochaffinen Bindungsstellen zu erhöhen. Im Gegenteil konnten selbst mit wildtypischem BMP-2 lediglich niederaffine Interaktionen festgestellt werden. Auch durch eine beträchtlich längere (24 h) als die vom Hersteller ARIAD angegebene (1 h) Einwirkzeit des Dimerizers konnte keine Dimerisierung erzielt werden. Dies lässt vermuten, dass entweder die Mobilität der Rezeptoren in der Zellmembran zu stark eingeschränkt ist, um eine umfassende Komplexbildung zu ermöglichen, oder die Ektodomänen der Rezeptorchimäre nach erfolgter Dimerisierung eine Konformation einnehmen, die eine simultane Bindung des Liganden verhindert. Da unabhängig von der Präsenz des Dimerizers lediglich niederaffine Bindestellen etabliert werden, kann außerdem auf eine essentielle Bedeutung der Kinasedomäne für die Rezeptordimerisierung geschlossen werden.

Da die Mobilität individueller Rezeptoren möglicherweise durch deren Transmembrandomänen beeinflusst wird, wurde ein weiteres Konstrukt erstellt, bei dem die Transmembrandomäne von BMPR-IA gegen die des Platelet Cell Adhesion Molecule 1

(PECAM-1) ersetzt wurde. Vom diesem Protein ist aus der Literatur bekannt, dass es mit dem ARIAD Homodimerization Kit zu nahezu 100 % dimerisiert werden kann (Zhao and Newman, 2001), was eine hohe Mobilität in der Zellmembran voraussetzt. Allerdings war es auch mit diesem Konstrukt nicht möglich, hochaffine Bindungsstellen zu induzieren.

Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass durch die Dimerisierung der FKBP-Domänen die Orientierung der extrazellulären Rezeptordomänen zueinander eine 1:2-Interaktion mit dem Liganden verhindert. Es ist aber ebenfalls nicht auszuschließen, dass die Mobilität der Rezeptoren nicht (nur) von der Transmembrandomäne abhängt, sondern auch durch Interaktionen der extrazellulären oder intrazellulären Domäne mit anderen Zellbestandteilen wie der extrazellulären Matrix oder dem Zytoskelett beeinflusst wird.

Interessanterweise lassen sich bei der Bindung von BMP-2 an Zellen, die mit dem Typ-II-Rezeptor ActR-IIB transfiziert wurden, ausschließlich hochaffine Bindungsstellen nachweisen (Heinecke et al., 2009). Die ermittelte Affinität entspricht dabei der aus BIAcore-Experimenten bekannten Affinität der 1:2-Interaktion von BMP-2 und ActR-IIB. Die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen entspricht dabei der Anzahl hochaffiner Bindungsstellen von BMPR-IA-transfizierten Zellen. Da eine ähnliche Expression beider Rezeptortypen nachgewiesen wurde, lässt sich folgern, dass die übrigen ActR-IIB-Rezeptoren als Monomere vorliegen und aufgrund zu niedriger Affinität keine signifikante Bindung von BMP-2 erzielen können (Heinecke et al., 2009).

4.3 Mobilität der Rezeptoren in der Zellmembran

Aus früheren Einzelmolekülstudien von Frau Dr. Anke Hartung war bereits bekannt, dass sich einzelne Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren in ihrer Mobilität unterscheiden (unveröffentlichte Ergebnisse). Für diese Versuche wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, um die Rezeptoren zu detektieren. Daraus ergibt sich allerdings das Problem, dass durch den bivalenten Antikörper zwei Rezeptoren gleichzeitig gebunden werden können. Zusammen mit der nicht unerheblichen Größe des Antikörpers selbst kann es so zu Messartefakten kommen, da die Mobilität der Moleküle auch von ihrer Größe abhängig ist. Aus diesem Grund wurde für die hier durchgeführten Experimente die Methode des Fluorescent Recovery After Photobleaching (FRAP) ausgewählt. Dabei handelt es sich um eine mikroskopische Technik, bei der das Einwandern Fluorophor-konjugierter Proteine in einen geblichenen Bereich in der Zellmembran gemessen und daraus die Mobilität der untersuchten Proteine bestimmt wird. Mit dieser Methode ist es allerdings nicht möglich, die Mobilität einzelner Moleküle zu erfassen. Ebenso kann die Mobilität einzelner Proteinsubpopulationen, die beispielsweise in

verschiedenen Kompartimenten der Membran vorliegen, mit dieser Methode nicht unterschieden werden.

Da es sich hier um Messungen an Einzelzellen handelt, konnten trotz gleicher experimenteller Voraussetzungen oft deutliche Unterschiede beim Vergleichen einzelner Messungen beobachtet werden. Ein weiteres Problem bestand darin, dass sich einige Zellen während der Messung bewegten und sich dadurch aus dem Messbereich entfernten. Aus diesen Gründen wurden für jede Rezeptorvariante und –kombination mindestens 25 Einzelzellen gemessen.

Die Mobilität der Rezeptoren ergibt sich zum einen aus dem mobilen Anteil, d.h. dem Anteil der Rezeptoren am Gesamtrezeptorbestand, der überhaupt beweglich ist, und der benötigten Zeit, die bis zur Wiederherstellung der halbmaximalen Fluoreszenz in der gebleichten Region vergeht. Letztere dient als indirektes Maß für die Geschwindigkeit der Rezeptorbewegung in der Membran.

Die Mobilität des Typ-I-Rezeptor BMPR-IA unterscheidet sich signifikant von allen anderen untersuchten Rezeptoren. Bei der nicht-trunkierten Variante BMPR-IA-FL-YFP ist die mobile Fraktion signifikant kleiner als bei den anderen Konstrukten, während die Fluoreszenzwiederherstellung etwa die gleiche Geschwindigkeit zeigt. Bei diesem Rezeptorkonstrukt scheint also die intrazelluläre Domäne einen Beitrag zur Verankerung des Rezeptors in der Membran zu leisten. Die trunkierte Variante BMPR-IA-TM-YFP zeigt dagegen eine ähnliche mobile Fraktion wie die anderen Rezeptorkonstrukte, allerdings scheint dieser Rezeptor etwas langsamer zu sein als die anderen trunkierten Konstrukte, da die halbmaximale Wiederherstellungszeit länger ist. Die Parameter für die Mobilität aller anderen Rezeptorkonstrukte waren vergleichbar. Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl die untersuchten Typ-I- als auch die Typ-II-Rezeptoren zum größten Teil mobil in der Zellmembran vorliegen. Die in den Radioligandenassays aufgestellte Hypothese, dass die Typ-I-Rezeptoren zur induzierten Komplexbildung eine zu geringe Mobilität aufweisen, um eine Dimerisierung zu erreichen, konnte mit diesen Experimenten nicht bestätigt werden.

Da in Radioligandenassays der Austausch der Transmembrandomäne des BMPR-IA Rezeptors durch die eines nachweislich hochmobilen Proteins (Zhao and Newman, 2001) keinen Einfluss auf dessen Homodimerisierung hatte, sollte in den FRAP-Experimenten überprüft werden, ob durch diesen Austausch überhaupt eine Erhöhung der Beweglichkeit erzielt werden kann. Der Vergleich der Kurven des chimären Proteins BRIA-PECAM-YFP mit der trunkierten wildtypischen Variante BRIA-TM-YFP lässt keine Unterschiede zwischen beiden Proteinen erkennen. Da in BRIA-PECAM-YFP nur die extrazelluläre Domäne des Typ-I-Rezeptor BMPR-IA vorhanden ist, liegt die Vermutung nahe, dass eine Interaktion

zwischen der extrazellulären Domäne mit anderen membranständigen Proteinen oder der extrazellulären Matrix stattfindet. Eine andere Möglichkeit bestünde in der Interaktion des fusionierten YFP-Moleküls mit Bestandteilen des Zytosols. Allerdings konnte Dr. Bünemann in früheren Experimenten zeigen, dass ein YFP-Molekül, an das die Palmylierungssequenz der Lyn-Kinase N-terminal fusioniert wurde, eine nahezu komplette Wiederherstellung der Fluoreszenz im gebleichten Areal zeigt (persönliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, dass mögliche Wechselwirkungen zwischen YFP und zytosolischen Bestandteilen zu gering sind, um die deutlich geringere Mobilität der fusionierten Rezeptoren zu erklären.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich die Mobilität von BMPR-IA oder ActR-IIB durch die Anwesenheit des jeweils anderen Rezeptorsubtyps ändert. Dazu wurden Zellen mit beiden Rezeptortypen transfiziert, wobei nur ein Rezeptortyp an YFP fusioniert war und somit bei den Bleichexperimenten detektiert wurde. Der andere Rezeptortyp war ein CFP-Fusionsprotein, wobei die blaue Fluoreszenz der Transfektionskontrolle diente.

Diese Experimente zeigen eindeutig, dass die Mobilität von BMPR-IA durch die Anwesenheit des ActR-IIB Rezeptors nur geringfügig verändert wird. Der Anteil der mobilen Fraktion bleibt gleich, die halbmaximale Wiederherstellungszeit verlängert sich marginal. Betrachtet man dagegen den Typ-II-Rezeptor ActR-IIB, stellt man fest, dass dieser Rezeptor in Gegenwart von BMPR-IA eine deutlich veränderte Mobilität zeigt. Der Anteil der mobilen Fraktion ist signifikant erniedrigt und die halbmaximale Wiederherstellungszeit der Fluoreszenz deutlich größer. Eine Erklärung für diese Verlangsamung ist, dass die Rezeptoren mit BMPR-IA zumindest temporär interagieren. Interessanterweise ist diese Interaktion bei der Betrachtung des BMPR-IA nicht erkennbar. Dies deutet stark daraufhin, dass die Mobilität des BMPR-IA auch die Mobilität der entstandenen Rezeptorkomplexe bestimmt und somit limitierend wirkt. Die Ergebnisse zeigen auch eindeutig, dass Rezeptoren verschiedener Subtypen in Komplexe rekrutiert werden, und zwar unabhängig von der Präsenz des Liganden und der Kinasedomäne beider Rezeptortypen. Diese präformierten Komplexe sind aber offensichtlich nicht signalaktiv. In einem solchen System scheint der Ligand lediglich für die Aktivierung der Rezeptoren, wahrscheinlich durch induzierte Konformationsänderungen, verantwortlich zu sein. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit des Liganden weitere Auswirkungen auf die Mobilität der Rezeptoren hat. Dazu wurde ein Teil der bereits beschriebenen Experimente nach einer fünfminütigen Inkubation mit 30 nM coreBMP-2 wiederholt. Um Internalisierungseffekte, die bei einer Temperatur von 37° C eine Halbwertszeit von etwa 15 min zeigen (Hartung et al.,

2006), zu minimieren, wurden die Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt und nach maximal 30 min ein neuer Messansatz verwendet.

Zunächst wurde der Einfluss des Liganden auf die einzeln transfizierten Rezeptoren BMPR-IA und ActR-IIB betrachtet. Hier stellte sich heraus, dass beide Rezeptortypen in Anwesenheit des Liganden eine deutliche Veränderung der Mobilität erfahren. Beim Typ-I-Rezeptor BMPR-IA ist eine deutliche Verringerung der mobilen Fraktion zu sehen, während die halbmaximale Wiederherstellungszeit nahezu gleich bleibt. Beim Typ-II-Rezeptor ActR-IIB verringert sich die mobile Fraktion nur in geringerem Maße, wohingegen eine deutliche Verlangsamung der halbmaximalen Wiederherstellungszeit auftritt. Diese Ergebnisse zeigen, dass BMPR-IA durch die Bindung des Liganden deutlich immobilisiert wird. Dies kann ursächlich allein durch die Größe des entstandenen Ligand-Rezeptorkomplex bedingt sein, welche sich negativ auf die laterale Diffusion des Komplexes in der Membran auswirkt. Es ist aber ebenso denkbar, dass der Ligand zusätzlich mit Komponenten der extrazellulären Matrix interagiert und dadurch den Komplex an ein limitiertes Areal der Zelloberfläche fixiert. Für den Typ-II-Rezeptor ActR-IIB konnte in Gegenwart des Liganden lediglich eine Verlangsamung, aber keine Immobilisierung wie im Falle von BMPR-IA festgestellt werden. Dies zeigt, dass ActR-IIB auch ohne den Typ-I-Rezeptor in der Lage ist, mit dem Liganden zu interagieren. Allerdings scheint diese Interaktion eher temporär zu sein, was in einer deutlichen Verlangsamung des Rezeptors resultiert. Die Beobachtungen können sehr gut mit BIAcore-Messungen korreliert werden, in denen eine wesentlich schnellere Bindekinetik für die BMP-2:ActR-IIB-Interaktion als für BMP-2 mit BMPR-IA beobachtet wurde (Heinecke, 2009). Insbesondere die im Vergleich zur BMP-2:BMPR-IA-Interaktion ~100-fach größere kinetische Dissoziationskonstante (k_{off}) der Interaktion von BMP-2 mit ActR-IIB verweist auf eine um den gleichen Faktor niedrigere Halbwertszeit individueller Komplexe ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{off}}$). Betrachtet man die Mobilität ternärer Komplexe, die aus Ligand, Typ-I- und Typ-II-Rezeptor bestehen, ergeben sich wiederum Unterschiede zwischen den beiden Rezeptorsubtypen. Der Typ-I-Rezeptor BMPR-IA verhält sich wie in Experimenten, in denen lediglich dieser Rezeptor sowie der Ligand anwesend waren, das heißt, es tritt eine deutliche Immobilisierung auf. Geringfügige Änderungen der halbmaximalen Wiederherstellungszeiten sowie des prozentualen Anteils der immobilen Fraktion sind beobachtbar, jedoch nicht signifikant. Der Typ-II-Rezeptor ActR-IIB verhält sich wie in den Experimenten, in denen nur der Typ-I-Rezeptor, aber kein Ligand anwesend war. Der Ligand scheint also keinen weiteren Einfluss auf die Mobilität dieses Rezeptors zu haben.

Der Typ-I-Rezeptor BMPR-IA wird ganz klar durch die Bindung des Liganden in der Membran verankert, während die kurzzeitigen Interaktionen des ActR-IIB mit BMPR-IA die Rekrutierung des Typ-II-Rezeptors in den Komplex erleichtern. Die Ergebnisse lassen ebenfalls vermuten, dass die ternären Komplexe nicht permanent existieren, da ansonsten durch die Immobilisierung des Typ-I-Rezeptors BMPR-IA auch eine deutliche Herabsetzung der Mobilität des Typ-II-Rezeptors ActR-IIB zu sehen sein müsste.

4.4 Untersuchung der ligandeninduzierten Komplexbildung

In Radioliganden- oder Quervernetzungsexperimenten mit ganzen Zellen konnte in der Vergangenheit lediglich die Existenz von Rezeptorkomplexen untersucht werden, nicht jedoch der Prozess der Komplexbildung. Es wurden in dieser Arbeit FRET-Experimente durchgeführt, mit denen der Prozess der Bildung von ligandeninduzierten Rezeptorkomplexen auf ganzen Zellen in Echtzeit verfolgt werden kann. Wie bei den FRAP-Messungen handelt es sich auch hier um Messungen an Einzelzellen. Wie bereits erwähnt ergeben sich durch dieses Verfahren Schwierigkeiten beim Vergleichen von Einzelmessungen, da sich diese von Zelle zu Zelle zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Um die Ergebnisse unterschiedlicher Messungen dennoch miteinander vergleichen zu können, wurden die erhaltenen Kurven auf Werte zwischen Null (vor Zugabe des Liganden) und Eins (maximale Amplitude) normalisiert. Um sicherstellen zu können, dass diese Ergebnisse überhaupt vergleichbar sind, wurde darauf geachtet, Zellen für die Messungen auszuwählen, die möglichst ähnliche Messparameter (Zellgröße, Fluoreszenzintensität der Fluorophore) aufwiesen. Um zu gewährleisten, dass für jeden CFP-fusionierten Rezeptor ein YFP-fusionierter Partner vorhanden ist, wurden Zellen vermessen, bei denen die Intensität des YFP etwa 1,2 – 3-fach höher war als die CFP-Intensität. Geht man davon aus, dass beide Fluorophore bei gleicher Intensität gleich häufig in den Zellen vertreten sind, lag also ein Überschuss an YFP-fusionierten Rezeptoren vor.

Zur Applikation des Liganden wurde eine Perfusionsapparatur verwendet, die die Zelle im Fokus mit Medium oder Puffer, in dem die verschiedenen Liganden in einer definierten Konzentration gelöst vorlagen, überspült. Bei einer Flussrate von 50-100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einem Kapillardurchmesser von 100 μm konnte davon ausgegangen werden, dass der Lösungsaustausch in der unmittelbaren Umgebung der Zelle nahezu ohne Verzögerung stattfindet und keine Diffusionseffekte auftreten. Um weiterhin zu verhindern, dass die Konzentration des Liganden in der Lösung durch Interaktionen des Liganden mit dem Schlauchmaterial des Perfusionssystems signifikant herabgesetzt wird, wurde eine Variante

des BMP-2 verwendet, bei der die N-terminalen basischen Heparin-Bindungsstellen entfernt wurden. Die Praktikabilität des Versuchsansatzes wurde in ersten Versuchen getestet, bei denen Zellen mit fluorophor-markierten, full-length oder trunkierten BMPR-IA- und ActR-IIB-Versionen kotransfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen an BMP-2 perfundiert wurden. Diese Rezeptor-Liganden-Kombination wurde gewählt, da sie zu den am besten charakterisierten Kombinationen innerhalb der TGF- β -Superfamilie gehört.

Es stellte sich heraus, dass eine ligandeninduzierte Komplexbildung sowohl mit full-length- als auch mit trunkierten Rezeptorvarianten erfolgt. Die Anwesenheit der intrazellulären Kinasedomäne hat also keine Auswirkungen auf die Rekrutierbarkeit der Rezeptoren und bestätigt die aus FRAP-Experimenten gewonnenen Daten. Die maximale Signalamplitude fällt jedoch bei den full-length Konstrukten deutlich niedriger aus als bei den trunkierten Rezeptorkonstrukten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei den trunkierten Konstrukten die Fluorophore dicht unter der Zellmembran lokalisiert sind, während sie bei den nativen Konstrukten am C-Terminus der intrazellulären Domäne angebracht sind. Da es bisher keine Strukturdaten für die intrazellulären Domänen dieser Rezeptoren gibt, kann auch keine sichere Aussage darüber getroffen werden, wie hier die Fluorophore zueinander positioniert sind. Es ist also durchaus wahrscheinlich, dass der Abstand der Fluorophore in diesem System deutlich größer ist als der bei den trunkierten Rezeptor-Varianten, was in einem niedrigeren FRET-Signal resultiert. Um diese Theorie zu überprüfen, sollten Konstrukte von BMPR-IA und ActR-IIB erstellt werden, bei denen das Fluorophor zwischen Transmembran- und intrazellulärer Domäne angebracht ist. Aufgrund von technischen Problemen waren diese Klonierungen jedoch nicht erfolgreich, so dass die entsprechenden Experimente nicht durchgeführt werden konnten.

Die trunkierten Rezeptorkonstrukte wiesen neben einer besseren Expression eine höhere Signalamplitude und damit ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis auf. Die weiteren Experimente wurden daher bevorzugt mit trunkierten Rezeptorvarianten durchgeführt. Als Kontrolle wurden zusätzlich Messungen durchgeführt, bei denen die Zellen mit einem Rezeptortyp in nativer und einem Rezeptortyp in trunkierter Form transfiziert wurden. Mit diesen Rezeptoren konnte ebenfalls eine Komplexbildung beobachtet werden, unabhängig davon, ob der Typ-I- oder der Typ-II-Rezeptor trunkiert war. Bei diesen Experimenten lag die maximale Signalamplitude in einem ähnlichen Bereich wie bei den full-length Konstrukten. Dies ist leicht dadurch zu erklären, dass durch das Vorhandensein einer Kinasedomäne der Abstand der Fluorophore zueinander deutlich größer ist, als wenn beide Rezeptoren trunkiert sind. Dies ist auch ein Hinweis darauf, dass die niedrige Signalamplitude der nativen

Rezeptoren ebenfalls mit einem größeren räumlichen Abstand der Fluorophore zusammenhängt.

Eine weitere Auffälligkeit ist, dass durch eine Perfusion der formierten Komplexe mit Pufferlösung keine Dissoziation (erkennbar durch eine Abnahme des FRET-Signals) erreicht werden konnte. Die Rezeptoren scheinen also stabil im Komplex zu verbleiben, was einen Widerspruch zu den oben diskutierten FRAP-Ergebnissen darstellt. Dort wiesen einige Ergebnisse daraufhin, dass der Typ-II-Rezeptor auch in Anwesenheit des Liganden nur temporär mit dem Typ-I-Rezeptor interagiert. Eine Erklärung für diesen Widerspruch könnte sein, dass durch den Überschuss des transfizierten Typ-II-Rezeptors nur ein Teil in Komplexe integriert wird, während der andere Teil weiterhin einzeln oder als Homodimer auf der Zelle vorliegt. Der integrierte Teil sorgt in den FRAP-Experimenten für die zu messende Erniedrigung der Mobilität. Es ist also wahrscheinlich, dass in gleichen Experimenten, bei denen die Rezeptorexpression so eingestellt ist, dass nur ein geringer Überschuss vorliegt, eine deutlichere Immobilisierung des Typ-II-Rezeptors zu verzeichnen ist, da weniger freie Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind. In den vorliegenden FRET-Experimenten spielt dieser Überschuss dagegen nur eine untergeordnete Rolle, da hier nur die direkte Interaktion zwischen zwei Fluorophoren in einem limitierten räumlichen Bereich erfasst wird. Zur quantitativen Abschätzung der Geschwindigkeit der Komplexbildung wurde die Steigung des linearen Anstiegs der normalisierten Kurven verwendet. Es stellte sich heraus, dass die Komplexbildung unabhängig von der eingesetzten Ligandenkonzentration immer im gleichen Geschwindigkeitsbereich lag.

Nachdem die Funktionalität des Messsystems mithilfe dieser Rezeptorkombination sichergestellt werden konnte, wurden weitere Experimente mit der Rezeptorkombination BMPR-IA:BMPR-II durchgeführt. Auch mit dieser Kombination unterschied sich die Geschwindigkeit der Komplexbildung nicht von den vorherigen Experimenten.

Interessanterweise stellte sich heraus, dass eine dosisunabhängige Komplexbildung ab einer definierten Schwellenkonzentration des BMP-2-Liganden beobachtet werden konnte. Die notwendige minimale Schwellenkonzentration ist dabei von den verwendeten Rezeptoren abhängig. Eine dosisabhängige Signalamplitude wird aber erwartet, da der Grad der Expression ligandeninduzierbarer Gene wie z.B. der des alkalischen Phosphatasegens (ALP) mit der verabreichten Ligandenkonzentration in Zellkultur korreliert. Stattdessen scheint die Komplexbildung einem Alles-oder-nichts-Mechanismus zu folgen, was bedeutet, dass unter der Schwellenkonzentration keine Komplexbildung stattfindet, ab der Schwellenkonzentration dagegen ein Maximum an rekrutierten Komplexen erzeugt wird. Eine weitere Steigerung des

FRET-Signals durch höhere Ligandenkonzentrationen ist nur in sehr geringem Umfang möglich. Erstaunlicherweise liegt diese Schwellenkonzentration in einem Bereich, in dem in Alkalischen Phosphatase-Assays eine halbmaximale Aktivierung der Expression dieses Enzyms zu sehen ist. Außerdem spiegelt die benötigte Schwellenkonzentration die Affinitätsunterschiede von ActR-IIB und BMPR-II zu den Liganden wieder (Heinecke et al., 2009), da für die mit BMPR-IA und BMPR-II transfizierten Zellen eine dreifach höhere Ligandenkonzentration nötig ist, um eine Komplexbildung zu induzieren. Dieses Verhalten spricht dafür, dass die Aktivierung der Alkalischen Phosphatase nicht ausschließlich über induzierte Komplexe erfolgt. Möglicherweise erfolgt die Aktivierung dieses Gens in niedrigen Konzentrationsbereichen, also unterhalb der in FRET-Experimenten beobachteten Schwellenkonzentration, durch präformierten Rezeptorkomplexe (Nohe et al., 2004). Diese sind in den FRET-Experimenten allerdings nicht erfassbar. Ein Grund für die Etablierung eines solchen Schalters könnte sein, dass es der Zelle auf diese Weise ermöglicht wird, auf unterschiedliche Ligandenkonzentrationen zwei verschiedene Reaktionen zu zeigen. Wenn dies der Fall ist, wäre dieser Mechanismus ein Beispiel dafür, dass ein solches System bei gleicher Stimulation mehrfach reagieren kann: einmal dosisabhängig auf graduelle Weise wie bei der Aktivierung der Alkalischen Phosphatase, und andererseits als Schalter, der lediglich zwischen unter- und überschwelliger Ligandenkonzentration unterscheidet. Hierbei spielt natürlich auch der zeitliche Verlauf der Stimulation eine Rolle. In den hier durchgeführten FRET-Experimenten wird der unmittelbare Effekt des Liganden auf die Rezeptoren innerhalb weniger Minuten untersucht, wohingegen die Induktion der Alkalischen Phosphatase über mehrere Stunden bzw. Tage betrachtet wird. Die Untersuchung der zeitabhängigen SMAD-Phosphorylierung hat gezeigt, dass sich auch hier bei längerer Untersuchungsdauer eine Dosisabhängigkeit dahingehend einstellt, dass die SMAD-Phosphorylierung über längere Zeiträume nur bei Stimulation mit höheren Ligandenkonzentrationen aufrecht erhalten werden kann.

Ein bisher wenig untersuchter Aspekt der Signalvermittlung in der TGF- β -Superfamilie ist die Zusammensetzung der signalaktiven Rezeptorkomplexe auf der Zelloberfläche. Bisher ist durch Versuche mit bindeepitop-defizienten Ligandenmutanten lediglich bekannt, dass für die Aktivierung des SMAD-Signalwegs die Bindung eines Typ-I-Rezeptors ausreichend ist, während für die Aktivierung des MAPK-Signalwegs die Bindung von zwei Typ-I-Rezeptoren benötigt wird (Knaus and Sebald, 2001). Die Bindung nur eines Typ-I-Rezeptors führt zu einer starken Reduzierung der MAPK-abhängigen Induktion der Alkalischen Phosphatase, wohingegen keine signifikante Veränderung des SMAD-Signals zu erkennen ist. Für beide

Signalwege ist allerdings ein Ligand mit zwei intakten Typ-II-Rezeptor-Bindeepitopen notwendig, da bereits eine Mutation in einem dieser Bindeepitope zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung sowohl des SMAD- als auch des MAPK-Signalweges führt (Knaus and Sebald, 2001). Die Bindung an zwei Typ-II-Rezeptoren scheint also notwendig für die Generierung eines Signals zu sein, was auch dafür spricht, dass zwei Typ-II-Rezeptoren sowohl in präformierten als auch in ligandeninduzierten Komplexen vorhanden sein müssen.

Da weder in FRAP- noch in FRET-Experimenten zwischen Rezeptormonomeren und -dimeren unterschieden werden konnte, sollte mit Hilfe verschiedener BMP-2 Mutanten untersucht werden, wie sich die induzierten Rezeptorkomplexe aus BMPR-IA und ActR-IIB bzw. BMPR-IA und BMPR-II stöchiometrisch zusammensetzen. Es wurden sowohl hetero- als auch homodimere BMP-2-Varianten verwendet, bei denen durch Mutation eines einzelnen oder mehrerer Bindeepitope eine verringerte Bindungsfähigkeit zu den entsprechenden Rezeptoren erzeugt wird. Für alle Varianten wurde eine Verringerung des FRET-Signals und/oder eine Erhöhung der zur Komplexbildung erforderlichen Schwellenkonzentration des Liganden erwartet. Stattdessen zeigen die Ergebnisse, dass bei der Verwendung der mutierten Liganden für beide Rezeptorkombinationen keine Unterschiede im Vergleich zu Messungen mit wildtypischem BMP-2 zu sehen sind. Erstaunlicherweise ist selbst mit Liganden, bei denen durch die Mutation aller vier Bindeepitope deutlich reduzierte Bindeaffinitäten zu den verwendeten Rezeptoren vorliegen und die in Alkalischen Phosphatase-Assays keinerlei Aktivität mehr zeigen, trotzdem eine Rezeptorkomplexbildung mit den gleichen Parametern (Geschwindigkeit, Signalamplitude) wie bei wildtypischen Liganden zu erkennen.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass für die Rekrutierung der Rezeptoren in den Komplex bereits ein kurzer Kontakt mit dem Liganden ausreicht. Diese Bindung kann möglicherweise durch Wechselwirkungen mit weiteren Komponenten der Zelloberfläche stabilisiert werden, die in Interaktionsanalysen *in vitro* nicht erfasst werden. Für die Aktivierung des Ligand-Rezeptorkomplexes wäre dann ein längerer Kontakt und/oder ligandeninduzierte Konformationsänderungen der Rezeptoren eines oder beider Subtypen erforderlich. Um diese Theorie zu überprüfen, wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob der Ligand nach der Komplexbildung an die Rezeptoren gebunden bleibt oder nicht. Dies könnte zum Beispiel ebenfalls mit einer FRET-basierten Methode geschehen, bei der der Energietransfer zwischen einem Fluorophor-konjugierten Liganden und einem Fluorophor-konjugierten Rezeptor gemessen wird. Hierbei sollte aber bedacht werden, dass durch die Größe der konjugierten Fluorophore die Bindeeigenschaften von Ligand und Rezeptor beeinflusst werden können.

Eine Alternative stellen hier eventuell synthetische Farbstoffe wie FLAsH und ReAsH dar, die deutlich kleiner sind (Griffin et al., 1998; Griffin et al., 2000; Adams et al., 2002). Diese binden allerdings an Cystein-reiche Sequenzen, die in die Proteine eingefügt werden müssen und die die korrekte Faltung des Liganden verhindern könnten.

Mit den hier durchgeführten Experimenten konnte also höchstens eine indirekte Aussage darüber getroffen werden, wie die induzierten Rezeptorkomplexe zusammengesetzt sind. Es kann festgestellt werden, dass sich die Zusammensetzung nicht durch die Veränderung der Bindeepitope des Liganden verändert, da die erhaltenen FRET-Signale sich ebenfalls nicht verändern. Eventuell bestehen Unterschiede in der Stöchiometrie von präformierten und induzierten Komplexen. Dies wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Da sich durch das Ausschalten einzelner oder mehrerer Bindeepitope keine Veränderung im Ablauf der Komplexbildung ergab, stellte sich nun die Frage, ob es möglich ist, durch eine Erhöhung der Bindeaffinität des Liganden für die Typ-II-Rezeptoren ActR-IIB und BMPR-II die Bildung von Rezeptorkomplexen zu beeinflussen. Hier wäre denkbar, dass durch die höhere Affinität des Liganden entweder eine Absenkung des Schwellenwertes der Ligandenkonzentration, eine Erhöhung der Bildungsgeschwindigkeit des Komplexes oder eine Kombination dieser Effekte auftreten kann. Die Ergebnisse zeigen aber, dass auch hierdurch keine Veränderung in Hinsicht auf die Komplexbildung hervorgerufen wird. Die Rekrutierung von ActR-IIB oder BMPR-II in einen durch BMP-2 induzierten Komplex ist dementsprechend von den Bindeaffinitäten des Liganden zu den einzelnen Rezeptoren komplett unabhängig.

Es stellt sich die Frage, ob es sich hier um ein ligandenspezifisches Phänomen handelt oder dieses Verhalten für mehrere bzw. alle Liganden der TGF- β -Superfamilie typisch ist. Daher wurden Experimente mit einem weiteren Liganden (GDF-5) durchgeführt, von dem ebenfalls eine Kollektion mutierter Varianten vorlag. GDF-5 bindet wie BMP-2 ebenfalls an die Rezeptoren BMPR-IA und ActR-IIB, allerdings ist die Affinität zu BMPR-IA etwa um den Faktor 10-15 niedriger als bei BMP-2 (Nickel et al., 2005; Heinecke et al., 2009). Interessanterweise konnte in FRET-Experimenten mit wildtypischem GDF-5 eine Komplexbildung erst ab einer Ligandenkonzentration von 100 nM erreicht werden. Dies ist das Zehnfache der Schwellenkonzentration der BMP-2-induzierten Komplexbildung und kann gut mit der niedrigeren Bindeaffinität von GDF-5 zu BMPR-IA korreliert werden. Um zu überprüfen, ob Veränderungen der Rezeptor-Bindeaffinitäten dieses Liganden die Komplexbildung ebenfalls nicht beeinflussen, wurden zunächst Messungen mit der Mutante GDF-5R57A durchgeführt. Durch diese Mutation wird die Diskriminierung der Typ-I-

Rezeptorerkennung aufgehoben, so dass diese Variante, in Analogie zu BMP-2, an BMPR-IA und BMPR-IB mit gleich hoher Affinität bindet (Nickel et al., 2005). Eine ähnliche "gain of function" Mutation von GDF-5 (GDF5R57L) ist auch *in vivo* bekannt und korreliert mit dem Phänotyp der Brachydaktylie beim Menschen (Seemann et al., 2005).

Mit dieser Mutante lag auch die beobachtete Schwellenkonzentration zur Induktion der Komplexbildung, wie bei BMP-2, im Bereich von 6-10 nM. Eine durch die Mutation Y106KQ108D in GDF-5 bedingte Erhöhung der Affinität zu den Typ-II-Rezeptoren verursachte ebenfalls eine mit der Affinitätssteigerung korrelierende Herabsetzung der benötigten Schwellenkonzentration. Die Kombination beider Mutationen resultiert in einer weiteren Herabsetzung der benötigten Schwellenkonzentration um den von den Affinitätsunterschieden erwarteten Faktor. Die Geschwindigkeit der Komplexbildung veränderte sich jedoch in allen Experimenten nur geringfügig. Diese Ergebnisse zeigen klar, dass im Gegensatz zu BMP-2 die Bindeaffinitäten von GDF-5 sowohl zum Typ-I- als auch zum Typ-II-Rezeptor für die Komplexbildung eine große Rolle spielen. Für die Signalamplitude sind sie jedoch, wie im Falle von BMP-2, irrelevant.

Im letzten Schritt sollte ein Ligand der TGF- β -Superfamilie untersucht werden, dessen hochaffiner Bindungspartner der Typ-II-Rezeptor ist. Die Wahl fiel dabei auf Activin-A, da dieser Ligand neben dem Typ-I-Rezeptor ActR-IB ebenfalls ActR-IIB zur Signalvermittlung benutzt. In dieser Interaktion stellt der Typ-II-Rezeptor ActR-IIB den hochaffinen Bindungspartner dar, während in BIAcore-Messungen keine Interaktion von Activin-A mit dem Typ-I-Rezeptor ActR-IB festgestellt werden konnte. Es wurden ebenfalls Messungen mit BMPR-II als Typ-II-Rezeptor durchgeführt, da Activin-A diesen Rezeptor ebenfalls – allerdings mit deutlich geringerer Affinität als ActR-IIB – binden kann (Heinecke et al., 2009). Interessanterweise wurde, auch mit hohen Activin-A-Konzentrationen von bis zu 100 nM, keine Komplexbildung mit der Rezeptorkombination ActR-IB und ActR-IIB beobachtet. Wurde jedoch die Kombination ActR-IB und BMPR-II verwendet, konnten ab einer Schwellenkonzentration von 30 nM deutliche FRET-Signale detektiert werden.

Beachtenswert war, dass in Zellen, die mit ActR-IB und ActR-IIB kotransfiziert wurden, ein etwa deutlich höheres (3-fach) ligandenunabhängiges basales FRET-Signal beobachtet werden konnte, während Zellen, die mit ActR-IB und BMPR-II transfiziert waren, ein normales basales FRET-Signal zeigten. Dies lässt vermuten, dass die beiden Activin-Rezeptoren ActR-IB und ActR-IIB ligandenunabhängig quantitativ präformierte Komplexe bilden und die Signalvermittlung in diesem System durch ligandeninduzierte Konformationsänderungen der Rezeptoren erfolgt. Mit beiden Rezeptorkombinationen ActR-

IB:ActR-IIB und ActR-IB:BMPRII konnte eine ligandenabhängige Phosphorylierung von SMAD-2/-3 beobachtet werden, was die Funktionalität der signalvermittelnden Komplexe belegt.

4.5 Ligandeninduzierte Phosphorylierung von SMAD-1/5/8

Wie bereits seit längerem bekannt ist, reagieren sensitive Zellen auf die Stimulation mit Liganden der TGF- β -Superfamilie mit der Phosphorylierung von SMAD-Proteinen (Shi and Massague, 2003). Dabei bestimmt der aktivierte Typ-I-Rezeptor, welche SMAD-Proteine phosphoryliert werden. Für BMP-2 und GDF-5 sind dies SMAD-1, SMAD-5 und SMAD-8. Durch die in den FRET-Experimenten gezeigten Unterschiede bezüglich der BMP-2- und GDF-5-induzierten Bildung von Rezeptorkomplexen stellt sich die Frage, ob bzw. in welcher Weise sich diese Unterschiede auf nachgeschaltete Prozesse, wie z.B. die Regulation responsiver Gene auswirken. In zellbasierten Experimenten wurde beobachtet, dass die Expression eines solchen Gens (Alkalische Phosphatase, ALP) in C2C12-Zellen nur durch BMP-2, nicht aber durch GDF-5 induziert wird. Unerwartet wird in diesen Zellen ALP auch nicht bzw. kaum durch die GDF-5 Variante R57A induziert, obwohl diese Mutante mit BMP-2 vergleichbare Rezeptorbindeaffinitäten aufweist. Ein signifikanter Unterschied in der ligandeninduzierten Phosphorylierung von nachgeschalteten SMAD-Proteinen durch BMP-2 und GDF-5R57A konnte jedoch nicht beobachtet werden. Es ist daher zu vermuten, dass die GDF-5-vermittelte Expression von ALP die Aktivierung eines zusätzlichen, für diesen Liganden spezifischen Signalweges erfordert.

5. Schlussfolgerung

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob es bei den Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie Mechanismen gibt, die eine Erhöhung der Affinität zur Rekrutierung der niederaffinen Rezeptorkette in den Signalkomplex bewirken. Ein solcher Mechanismus konnte aus den bekannten Quervernetzungsexperimenten und der Postulierung eines kooperativen (für Mitglieder der BMP-Familie Attisano et al., 1996) bzw. eines seriellen (für Mitglieder der TGF- β -Familie Liu et al., 1995) Bindungsmodus gefolgert werden. Strukturanalysen und Biosensoranalysen von Rezeptoren und Liganden ließen allerdings keine Rückschlüsse auf eine im BMP- und Activin-System vorhandene Kooperativität zu.

Aus den in dieser Arbeit gewonnen Ergebnissen lassen sich mehrere Schlüsse bezüglich der Rekrutierung von Rezeptoren in einen Signalkomplex ziehen. So entscheidet allein die extrazelluläre Domäne des Rezeptors darüber, ob eine Rekrutierung in den Komplex erfolgt oder nicht. Interessanterweise gilt dies auch bei sehr niedriger Affinität des Liganden zum Rezeptor. Die Transmembrandomäne scheint dagegen keine Rolle zu spielen, da sie ohne Folgen für die Rezeptorrekrutierung austauschbar ist. Anders verhält es sich wiederum bei der Kinasedomäne. Zwar wurde gezeigt, dass diese für die Bildung von heterodimeren Komplexen nicht erforderlich ist (Greenwald et al., 2003), was auch nochmal in den durchgeführten FRET-Experimenten belegt wurde. Für die Bildung von homodimeren Komplexen eines Subtyps scheint die Kinasedomäne aber erforderlich zu sein, da es ohne sie nicht möglich war, hochaffine Bindungsstellen in transfizierten Zellen zu generieren.

In den FRAP-Ergebnissen spiegeln sich die aus vorherigen BIAcore-Experimenten bekannten Ergebnisse wieder. So zeigt BMPR-IA durch Interaktion mit dem Liganden nur eine geringe Veränderung in der Geschwindigkeit, dafür aber eine generelle Immobilisierung dieses Rezeptortyps. Der Typ-II-Rezeptor ActR-IIB zeigt dagegen keine Immobilisierung, dafür aber eine Verlangsamung der Bewegung, was für temporäre Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor spricht. Dies korreliert gut mit den aus Biosensoranalysen bekannten schnellen Kinetiken zwischen BMP-2 und ActR-IIB.

Die FRET-Experimente ergaben erstaunlicherweise, dass ähnliche Liganden (BMP-2 und GDF-5) mit den gleichen Rezeptoren ein völlig unterschiedliches Verhalten zeigen. So war für BMP-2 die Komplexbildung unabhängig von den Bindeaffinitäten zu den einzelnen Rezeptoren, sondern wurde lediglich vom Überschreiten eines bestimmten Konzentrationsschwellenwertes bestimmt. GDF-5 zeigte dagegen die erwartete Abhängigkeit von den Ligand-Rezeptor-Affinitäten.

Diese und frühere Beobachtungen zeigen, dass Kooperativität im biochemischen Sinn (Koshland, JR. and Hamadani, 2002) nur im TGF- β - und eventuell im Activin-System existiert. Für die BMP-2-vermittelte Signalkomplexbildung konnten dagegen keine Anzeichen von Kooperativität gefunden werden. Die TGF- β -vermittelte Rezeptorkomplexbildung kann daher im Gegensatz zu früheren Erkenntnissen präziser als sequentiell und kooperativ beschrieben werden, wohingegen die BMP-2-vermittelte Rezeptorkomplexbildung anscheinend ausschließlich sequentiell verläuft.

Aus diesen Erkenntnissen geht hervor, dass eine Vielzahl biologischer Aktivitäten möglicherweise durch Unterschiede in den primären Schritten der Signalvermittlung, wie z.B. der Rezeptorrekrutierung, erzeugt werden kann.

6. Literatur

- Adams, S.R., Campbell, R.E., Gross, L.A., Martin, B.R., Walkup, G.K., Yao, Y., Llopis, J. and Tsien, R.Y. (2002). New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* 124, 6063–6076.
- Allendorph, G.P., Vale, W.W. and Choe, S. (2006). Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7643–7648.
- Anders, R.A. and Leof, E.B. (1996). Chimeric granulocyte/macrophage colony-stimulating factor/transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors define a model system for investigating the role of homomeric and heteromeric receptors in TGF-beta signaling. *J Biol Chem* 271, 21758–21766.
- Attisano, L. and Wrana, J.L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646–1647.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Montalvo, E. and Massague, J. (1996). Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 16, 1066–1073.
- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W.W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 16, 1055–1069.
- Bengtsson, L. (2007). What MAN1 does to the Smads. TGFbeta/BMP signaling and the nuclear envelope. *FEBS J* 274, 1374–1382.
- Caestecker, M. de (2004). The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 1–11.
- Carcamo, J., Weis, F.M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J.L., Attisano, L. and Massague, J. (1994). Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 14, 3810–3821.
- Carpenter, G., Lembach, K.J., Morrison, M.M. and Cohen, S. (1975). Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 250, 4297–4304.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.
- Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., Dijke, P. ten, Iwata, K.K. and Massague, J. (1990). Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 265, 20533–20538.
- Chen, H.B., Shen, J., Ip, Y.T. and Xu, L. (2006). Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Genes Dev* 20, 648–653.
- Chen, Y.G., Wang, Z., Ma, J., Zhang, L. and Lu, Z. (2007). Endofin, a FYVE domain protein, interacts with Smad4 and facilitates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 282, 9688–9695.

- Cherry, R.J., Smith, P.R., Morrison, I.E. and Fernandez, N. (1998). Mobility of cell surface receptors: a re-evaluation. *FEBS Lett* 430, 88–91.
- Constam, D.B. and Robertson, E.J. (1999). Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* 144, 139–149.
- Coucouvannis, E. and Martin, G.R. (1999). BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 126, 535–546.
- Crescenzo, G. de, Grothe, S., Zwaagstra, J., Tsang, M. and O'Connor-McCourt, M.D. (2001). Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *J. Biol. Chem.* 276, 29632–29643.
- Cuatrecasas, P. (1971). Insulin--receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1264–1268.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R. and Lee, J.C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364, 229–233.
- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y. and Davies, D.R. (1992). Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257, 369–373.
- del Re, E., Babitt, J.L., Pirani, A., Schneyer, A.L. and Lin, H.Y. (2004). In the absence of type III receptor, the transforming growth factor (TGF)-beta type II-B receptor requires the type I receptor to bind TGF-beta2. *J. Biol. Chem.* 279, 22765–22772.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., Dijke, P. ten, Huet, S. and Gauthier, J.M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17, 3091–3100.
- Dijke, P. ten, Miyazono, K. and Heldin, C.H. (1996). Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* 8, 139–145.
- Dijke, P. ten, Korchynskyi, O., Valdimarsdottir, G. and Goumans, M.-J. (2003). Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 105–113.
- Dorsch, S., Klotz, K.N., Engelhardt, S., Lohse, M.J. and Bunemann, M. (2009). Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods* 6, 225–230.
- Edidin, M., Zagyansky, Y. and Lardner, T.J. (1976). Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* 191, 466–468.
- Einstein, A. (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* 17, 549–560.
- Finelli, A.L., Bossie, C.A., Xie, T. and Padgett, R.W. (1994). Mutational analysis of the *Drosophila* tolloid gene, a human BMP-1 homolog. *Development* 120, 861–870.

- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55–75.
- Francois, V., Solloway, M., O'Neill, J.W., Emery, J. and Bier, E. (1994). Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. *Genes Dev* 8, 2602–2616.
- Frolik, C.A., Wakefield, L.M., Smith, D.M. and Sporn, M.B. (1984). Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor-beta in normal rat kidney fibroblasts. *J Biol Chem* 259, 10995–11000.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y.I. and Knaus, P. (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* 11, 1023–1035.
- Gilboa, L., Wells, R.G., Lodish, H.F. and Henis, Y.I. (1998). Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol* 140, 767–777.
- Girish, V. and Vijayalakshmi, A. (2004). Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer* 41, 47.
- Gray, P.C., Bilezikjian, L.M. and Vale, W. (2002). Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan. *Mol Cell Endocrinol* 188, 254–260.
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W. and Choe, S. (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* 11, 605–617.
- Greenwald, J., Vega, M.E., Allendorph, G.P., Fischer, W.H., Vale, W. and Choe, S. (2004). A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors. *Mol Cell* 15, 485–489.
- Griffin, B.A., Adams, S.R., Jones, J. and Tsien, R.Y. (2000). Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FLAsH. *Methods Enzymol* 327, 565–578.
- Griffin, B.A., Adams, S.R. and Tsien, R.Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281, 269–272.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Belmonte, J.C. and Choe, S. (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420, 636–642.
- Groppe, J., Hinck, C.S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J.P., Taylor, A.B., Schwarz, P.M., Wrana, J.L. and Hinck, A.P. (2008). Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell* 29, 157–168.
- Halbrooks, P.J., Ding, R., Wozney, J.M. and Bain, G. (2007). Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *J Mol Signal* 2, 4.

- Harrington, A.E., Morris-Triggs, S.A., Ruotolo, B.T., Robinson, C.V., Ohnuma, S. and Hyvonen, M. (2006). Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. *EMBO J* 25, 1035–1045.
- Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M.M., Wenzel, V., Boergermann, J.H., Hassel, S., Henis, Y.I. and Knaus, P. (2006). Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Molecular & Cellular Biology* 26, 7791–7805.
- Heinecke, K., Seher, A., Schmitz, W., Mueller, T.D., Sebald, W. and Nickel, J. (2009). Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC Biol* 7, 59.
- Heldin, C.H., Miyazono, K. and Dijke, P. ten (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.
- Heldin, C.H., Westermark, B. and Wasteson, A. (1981). Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3664–3668.
- Hogan, B.L. (1996). Bmps: multifunctional regulators of mammalian embryonic development. *Harvey Lect* 92, 83–98.
- Hoodless, P.A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M.B., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85, 489–500.
- Jones, W.K., Richmond, E.A., White, K., Sasak, H., Kusmik, W., Smart, J., Oppermann, H., Rueger, D.C. and Tucker, R.F. (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, 215–225.
- Kawabata, M., Imamura, T. and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 49–61.
- Keller, S., Nickel, J., Zhang, J.L., Sebald, W. and Mueller, T.D. (2004). Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat Struct Mol Biol* 11, 481–488.
- Kirsch, T., Nickel, J. and Sebald, W. (2000). BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J* 19, 3314–3324.
- Knaus, P. and Sebald, W. (2001). Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol Chem* 382, 1189–1195.
- Koshland, D.E., JR. and Hamadani, K. (2002). Proteomics and models for enzyme cooperativity. *J Biol Chem* 277, 46841–46844.
- Kotzsch, A., Nickel, J., Seher, A., Heinecke, K., van Geersdaele, L., Herrmann, T., Sebald, W. and Mueller, T.D. (2008). Structure analysis of bone morphogenetic protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome. *J. Biol. Chem.* 283, 5876–5887.

- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P. and Hogan, B.L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13, 424–436.
- Lin, L., Valore, E.V., Nemeth, E., Goodnough, J.B., Gabayan, V. and Ganz, T. (2007). Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 110, 2182–2189.
- Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M. and Guillemin, R. (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321, 779–782.
- Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N. and Patterson, G.H. (2003). Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biol Suppl*, S7-14.
- Liu, F., Ventura, F., Doody, J. and Massague, J. (1995). Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15, 3479–3486.
- Logeart-Avramoglou, D., Bourguignon, M., Oudina, K., Dijke, P. ten and Petite, H. (2006). An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct. *Anal Biochem* 349, 78–86.
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J.L. and Massague, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73, 1435–1444.
- Lux, A., Attisano, L. and Marchuk, D.A. (1999). Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem* 274, 9984–9992.
- Margolskee, R.F., McHendry-Rinde, B. and Horn, R. (1993). Panning transfected cells for electrophysiological studies. *Biotechniques* 15, 906–911.
- Marques, G., Musacchio, M., Shimell, M.J., Wunnenberg-Stapleton, K., Cho, K.W. and O'Connor, M.B. (1997). Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* 91, 417–426.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753–791.
- Massague, J., Blain, S.W. and Lo, R.S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295–309.
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783–2810.
- McDonald, N.Q. and Hendrickson, W.A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73, 421–424.
- Miyawaki, A. (2003). Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. *Dev Cell* 4, 295–305.

- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. and Miyazono, K. (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 7, 1191–1204.
- Moustakas, A. and Heldin, C.H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573–3584.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C.H. (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114, 4359–4369.
- Murphy, C. (2007). Endo-fin-ally a SARA for BMP receptors. *J Cell Sci* 120, 1153–1155.
- Nagaso, H., Suzuki, A., Tada, M. and Ueno, N. (1999). Dual specificity of activin type II receptor ActRIIb in dorso-ventral patterning during zebrafish embryogenesis. *Dev Growth Differ* 41, 119–133.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C.H. and Miyazono, K., et al. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 16, 5353–5362.
- Newfeld, S.J., Wisotzkey, R.G. and Kumar, S. (1999). Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers. *Genetics* 152, 783–795.
- Nickel, J., Kotzsch, A., Sebald, W. and Mueller, T.D. (2005). A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB. *J Mol Biol* 349, 933–947.
- Nickel, J., Sebald, W., Groppe, J.C. and Mueller, T.D. (2009). Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev*.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y.I. and Knaus, P. (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 277, 5330–5338.
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P. and Petersen, N.O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16, 291–299.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. and Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401, 480–485.
- Pallaghy, P.K., Nielsen, K.J., Craik, D.J. and Norton, R.S. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci* 3, 1833–1839.
- Paralkar, V.M., Hammonds, R.G. and Reddi, A.H. (1991). Identification and characterization of cellular binding proteins (receptors) for recombinant human bone morphogenetic protein 2B, an initiator of bone differentiation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3397–3401.
- Parker, L., Stathakis, D.G. and Arora, K. (2004). Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Prog Mol Subcell Biol* 34, 73–101.
- Persson, U., Souchelnytskyi, S., Franzen, P., Miyazono, K., Dijke, P. ten and Heldin, C.H. (1997). Transforming growth factor (TGF-beta)-specific signaling by chimeric TGF-beta type

- II receptor with intracellular domain of activin type IIB receptor. *J Biol Chem* 272, 21187–21194.
- Reddi, A.H. (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16, 247–252.
- Reddi, A.H. (2005). BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 249–250.
- Reits, E.A. and Neefjes, J.J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* 3, E145–7.
- Rider, C.C. (2006). Heparin/heparan sulphate binding in the TGF-beta cytokine superfamily. *Biochem Soc Trans* 34, 458–460.
- Ross, J.J., Shimmi, O., Vilmos, P., Petryk, A., Kim, H., Gaudenz, K., Hermanson, S., Ekker, S.C., O'Connor, M.B. and Marsh, J.L. (2001). Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410, 479–483.
- Ruppert, R., Hoffmann, E. and Sebald, W. (1996). Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* 237, 295–302.
- Samad, T.A., Rebbapragada, A., Bell, E., Zhang, Y., Sidis, Y., Jeong, S.J., Campagna, J.A., Perusini, S., Fabrizio, D.A. and Schneyer, A.L., et al. (2005). DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280, 14122–14129.
- Savage-Dunn, C. (2001). Targets of TGF beta-related signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 305–312.
- Saxton, M.J. (2001). Anomalous subdiffusion in fluorescence photobleaching recovery: a Monte Carlo study. *Biophys J* 81, 2226–2240.
- Saxton, M.J. (2007). A biological interpretation of transient anomalous subdiffusion. I. Qualitative model. *Biophys J* 92, 1178–1191.
- Saxton, M.J. (2008). A biological interpretation of transient anomalous subdiffusion. II. Reaction kinetics. *Biophys J* 94, 760–771.
- Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J.L. and Mueller, T.D. (2004). Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem* 385, 697–710.
- Seemann, P., Schwappacher, R., Kjaer, K.W., Krakow, D., Lehmann, K., Dawson, K., Stricker, S., Pohl, J., Ploger, F. and Staub, E., et al. (2005). Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* 115, 2373–2381.
- Sheetz, M.P., Schindler, M. and Koppel, D.E. (1980). Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes. *Nature* 285, 510–511.
- Shi, W., Chang, C., Nie, S., Xie, S., Wan, M. and Cao, X. (2007). Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci* 120, 1216–1224.

- Shi, Y. and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700.
- Shimmi, O. and O'Connor, M.B. (2003). Physical properties of Tld, Sog, Tsg and Dpp protein interactions are predicted to help create a sharp boundary in Bmp signals during dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Development* 130, 4673–4682.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223–239.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.
- Sprague, B.L. and McNally, J.G. (2005). FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol* 15, 84–91.
- Sprague, B.L., Pego, R.L., Stavreva, D.A. and McNally, J.G. (2004). Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* 86, 3473–3495.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509–544.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779–791.
- Wang, Y., Shyy, J.Y. and Chien, S. (2008). Fluorescence Proteins, Live-Cell Imaging, and Mechanobiology: Seeing Is Believing. *Annu Rev Biomed Eng* 10, 1–38.
- Weber, D., Kotzsch, A., Nickel, J., Harth, S., Seher, A., Mueller, U., Sebald, W. and Mueller, T.D. (2007). A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor. *BMC Struct Biol* 7, 6.
- Wells, R.G., Gilboa, L., Sun, Y., Liu, X., Henis, Y.I. and Lodish, H.F. (1999). Transforming growth factor-beta induces formation of a dithiothreitol-resistant type I/Type II receptor complex in live cells. *J Biol Chem* 274, 5716–5722.
- Wiater, E. and Vale, W. (2003). Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 278, 7934–7941.
- Wotton, D. and Massague, J. (2001). Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 254, 145–164.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massague, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341–347.
- Xia, Y., Yu, P.B., Sidis, Y., Beppu, H., Bloch, K.D., Schneyer, A.L. and Lin, H.Y. (2007). Repulsive guidance molecule RGMA alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4. *J Biol Chem* 282, 18129–18140.
- Xu, Y., Johnson, C.H. and Piston, D. (2002). Bioluminescence resonance energy transfer assays for protein-protein interactions in living cells. *Methods Mol Biol* 183, 121–133.

Xu, Y., Piston, D.W. and Johnson, C.H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 151–156.

Yguerabide, J., Schmidt, J.A. and Yguerabide, E.E. (1982). Lateral mobility in membranes as detected by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* 40, 69–75.

Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A. and Zhao, G.Q. (2000). Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14, 1053–1063.

Ying, Y. and Zhao, G.Q. (2001). Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 232, 484–492.

Yu, P.B., Hong, C.C., Sachidanandan, C., Babitt, J.L., Deng, D.Y., Hoyng, S.A., Lin, H.Y., Bloch, K.D. and Peterson, R.T. (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* 4, 33–41.

Zhang, F., Crise, B., Su, B., Hou, Y., Rose, J.K., Bothwell, A. and Jacobson, K. (1991). Lateral diffusion of membrane-spanning and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins: toward establishing rules governing the lateral mobility of membrane proteins. *J Cell Biol* 115, 75–84.

Zhang, F., Crise, B., Su, B., Hou, Y., Rose, J.K., Bothwell, A. and Jacobson, K. (1992). The lateral mobility of some membrane proteins is determined by their ectodomains. *Biophys J* 62, 92–94.

Zhang, F., Lee, G.M. and Jacobson, K. (1993). Protein lateral mobility as a reflection of membrane microstructure. *Bioessays* 15, 579–588.

Zhang, J.L., Huang, Y., Qiu, L.Y., Nickel, J. and Sebald, W. (2007). von Willebrand factor type C domain-containing proteins regulate bone morphogenetic protein signaling through different recognition mechanisms. *J Biol Chem* 282, 20002–20014.

Zhao, T. and Newman, P.J. (2001). Integrin activation by regulated dimerization and oligomerization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 from within the cell. *J Cell Biol* 152, 65–73.

Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. and Thomsen, G.H. (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400, 687–693.

7.1 Zusammenfassung

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bilden zusammen mit den Activinen, Growth and Differentiation Factors (GDFs) und Transforming Growth Factor β (TGF- β) die Transforming Growth Factor β -Superfamilie von sekretierten Signalproteinen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Erhaltung und Regeneration von Geweben und Organen. Die Signalvermittlung dieser Proteine erfolgt durch die Bindung von zwei verschiedenen Typen von Serin-/Threonin-Kinaserezeptoren, die als Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren bezeichnet werden. Im ersten Schritt erfolgt die Bindung an den hochaffinen Rezeptor (im Fall von BMP-2 der Typ-I-Rezeptor), im nächsten Schritt wird der niederaffine Rezeptor in den Komplex rekrutiert. Bis heute sind lediglich sieben Typ-I- und fünf Typ-II-Rezeptoren bekannt, was auf eine Promiskuität in der Liganden-Rezeptor-Interaktion schließen lässt. Die Architektur beider Rezeptorsubtypen ist dabei relativ ähnlich. Beide bestehen aus einer ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Kinasedomäne. Eine nacheinander ablaufende Transphosphorylierung der intrazellulären Domänen führt zu einer Phosphorylierung von SMAD-Proteinen, die dann als nachgeschaltete Vermittler fungieren und die Transkription regulierter Gene auslösen.

Im Hauptteil dieser Arbeit wurden die initialen Schritte der Rezeptorkomplexformierung sowie die Mobilität der Rezeptoren mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Methoden untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass für die Bildung eines Signalkomplexes eine bestimmte Schwellenkonzentration des Liganden nötig ist und dass der Mechanismus nach einem Alles-oder-Nichts-Prinzip wie ein Schalter funktioniert. Außerdem konnten Unterschiede in der Nutzung der gleichen Rezeptoren durch verschiedene Liganden festgestellt werden.

Die anderen Teile der Arbeit befassen sich mit der Funktionalität der verschiedenen Rezeptordomänen in der Signalübermittlung, der Analyse von hoch- und niederaffinen Ligandenbindestellen auf ganzen Zellen sowie dem Einfluss des SMAD- und des MAPK-Signalwegs auf die Induktion der Alkalischen Phosphatase. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Art der SMAD-Phosphorylierung allein vom Typ der Kinasedomäne abhängig ist, dass auf einer Zelle verschiedene Rezeptorpopulationen existieren, welche von unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen angesprochen werden, und dass die Induktion der Alkalischen Phosphatase stark vom zeitlichen Verlauf der SMAD- und MAPK-Aktivierung abhängig ist.

7.2 Abstract

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), together with Activins, Growth and Differentiation Factors (GDFs) and Transforming Growth Factor β (TGF β), are secreted signalling proteins that belong to the Transforming Growth Factor β superfamily. They play an important role in regulating the development, maintenance and regeneration of tissues and organs. Signalling of TGF β superfamily members occurs by binding to two types of serine-/threonine kinase receptors termed type I and type II. First, the high affinity receptor (in case of BMP2 the type I receptor) is bound, and then the low affinity receptor is recruited into the signalling complex. The fact that there are only seven type-I and five type-II receptors are known implies a limited promiscuity in ligand-receptor interaction. The architecture of both receptor subtypes is quite similar, with a small extracellular ligand-binding domain, a single transmembrane domain and an intracellular kinase domain. Subsequent transphosphorylation of the intracellular receptor domains leads to phosphorylation of SMAD proteins, which then act as downstream mediators and activate gene transcription.

The main part of this work was to analyze the initial steps in receptor complex formation and the mobility of TGF β -superfamily receptors with fluorescence microscopy techniques. It could be shown that complex formation requires a certain ligand threshold concentration and shows an all-or-nothing switch-like behaviour. Furthermore, differences between different ligands using the same receptors could be visualized.

The other parts of this work deal with the functionality of the different receptor domains in signal transduction, the analysis of high- and low-affinity binding sites on whole cells and the influence of the SMAD- and MAPK-pathways on alkaline phosphatase induction. It could be shown that the type of SMAD phosphorylation is solely dependent on the type of the kinase domain, that there exist different receptor populations on a cell that are addressed by different ligand concentrations and that alkaline phosphatase induction is highly dependent on the time course of SMAD- and MAPK-pathway activation.

Anhang

Danksagung

Computerlogbuch, Sternzeit 27042010. Dies sind die persönlichen Aufzeichnungen von Fähnrich Kai Heinecke. Nachdem das große Ziel, ein Offizierspatent zu erhalten, nun fast erreicht ist, möchte ich die Gelegenheit für einen kurzen Rückblick auf meine bisherige Zeit im Dienst der Sternenflotte nutzen.

Die Menschheit schrieb die Sternzeit 01022004, als ich als frischgebackener Fähnrich und Absolvent der Sternenflottenakademie auf die Sternenflottenbasis 487 abkommandiert wurde, um mich als Offiziersanwärter im Wissenschaftsdienst zu beweisen. Nicht ahnend, was mich erwartet, betrat ich den Raum, der meinem zukünftigen kommandierenden Offizier als Büro zugeteilt war. Und dort saß er, in einem drehbaren Lehnstuhl, wie man es von anderen Sternenflottenoffizieren kennt: Commander Joachim „Tiberius“ Nickel, Erster Offizier und rechte Hand von Captain Walter Sebald, dem Leiter der Forschungsstation PCII. Erst etwas misstrauisch, weil er vermutete, ich wäre ein Student der medizinischen Abteilung, taute er sofort auf, als ich erklärte, dass ich richtige Wissenschaft machen möchte. Kurz darauf wurde ich den anderen Mitgliedern der Station vorgestellt. Zuerst natürlich Captain Sebald, der mir einen guten Start und viel Erfolg wünschte, danach den anderen Offizieren und den Mitgliedern des technischen Personals, die nicht nur von der Erde stammten, sondern auch aus anderen Quadranten kamen. Interessanterweise gab es auf der Station auch ein kleines Borg-Kollektiv, das sich zwar weitgehend friedlich verhielt, dessen wahre Absichten aber nicht immer klar waren. Natürlich war ich nicht der einzige Fähnrich. Einige Offiziersanwärter waren schon länger dabei, andere hatten auch erst vor kurzem angefangen, und im Laufe der Zeit gab es immer mal wieder Wechsel im Personal. Zu unserer Station gehörte außerdem ein Außenposten unter der Leitung von Commander Thomas Müller. Dort wurden Kristalle gezüchtet und im Anschluss mit allerlei Strahlen beschossen. Vermutlich handelte es sich um die Entwicklung neuartiger Waffensysteme. Commander Müller wurde zwischenzeitlich zum Captain befördert und hat ein eigenes Kommando auf dem Außenposten Botany Bay.

Die Details meiner Arbeit sind in den Akten der Sternenflotte zu finden, deshalb werde ich hier nicht weiter darauf eingehen. Die Arbeit selbst war interessant und abwechslungsreich und hat mir sehr viel Spaß gemacht. Da die für einige Experimente benötigte technische Ausrüstung bei uns nicht vorhanden war, bot mir Commander Moritz Bünemann von der Forschungsstation im Sektor Versbach eine Kooperation an, die ich gerne annahm. Die

dortigen Kollegen waren sehr nett und hilfsbereit, so dass ich die vielen Lichtjahre, die ich in meinem Shuttle zurücklegte, um dorthin zu gelangen, gerne auf mich nahm. Auch Commander Bünemann wurde inzwischen befördert und hat ein eigenes Kommando in einem anderen Quadranten übernommen.

Natürlich gab es während meiner Zeit auf PCII auch nicht so schöne Momente. Ein prägendes Erlebnis war der Brand in unseren Laborräumen, der aber zum Glück nur Geräte, nicht aber das Forschungsmaterial vernichtet hat. Der Planer unserer Station muss ein Ferengi gewesen sein, anders lässt sich das Einsparen von Brandmeldern und Löschanlagen nicht erklären.

Zurückblickend kann ich sagen, dass die Zeit auf PCII eine sehr schöne Zeit war, an die ich immer gerne zurückdenken werde. Ich habe dort viel gelernt und viel Spaß gehabt. Ich möchte mich daher bei allen Mitarbeitern bedanken, insbesondere bei Captain Sebald, der mir die Arbeit erst ermöglicht hat. Es freut mich, dass Sie weiterhin die Möglichkeit haben, Ihrer Forschung nachzugehen!

Mein Dank gilt außerdem unserer technischen Assistentin Birgit Midloch, die mir immer hilfreich zur Seite stand und eingesprungen ist, wenn es bei mir mal eng wurde. Liebe Birgit, ich hoffe, Dir geht es gut und Deine jetzige Arbeit macht Dir Spaß!

Ich möchte auch allen anderen Mitarbeitern und natürlich den anderen Offiziersanwärtern danken. Ich denke, wir hatten eine schöne Zeit zusammen!

Wie bereits erwähnt, habe ich viel Zeit in der Arbeitsgruppe von Captain Moritz Bünemann verbracht. Ihm und seinen Kollegen gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung und die viele Zeit, die ich am Mikroskop verbringen durfte. Lieber Moritz, ich wünsche Dir alles Gute in Marburg!

Danken möchte ich außerdem Captain Jörg Schultz von der bioinformatischen Forschungseinheit für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit. Jörg, vielen Dank dafür und für die hilfreichen Diskussionen!

Captain Thomas Müller und seiner Crew auf Botany Bay möchte ich für die vielen netten wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche danken. Thomas, beim nächsten Bowlen möchte ich wieder mitmachen!

Mein Dank gilt natürlich auch meiner Familie und ganz besonders meiner Freundin (und Verlobten) Judith, die mich immer unterstützt hat und nachsichtig war, wenn ich mal wieder am Wochenende in die Station musste. Vielen Dank Euch allen!

Zu guter Letzt möchte ich einem Menschen ganz besonders danken. Joachim, ich hoffe, Du merkst, dass dieser Text doch etwas unter Deinem Einfluss entstanden ist... Du warst mir in

den vergangenen Jahren eine große Hilfe und ein toller Freund. Durch Dich habe ich sehr viel gelernt (sowohl wissenschaftliches als auch nichtwissenschaftliches) und nicht zuletzt mein Faible für Magnum entdeckt... Ich wünsche Dir für die Zukunft alles Gute und hoffe, dass wir uns öfter mal wiedersehen!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Kai Henrik Heinecke

geb. am 22.11.1977 in Celle

Familienstand: verlobt

Berufstätigkeit

- | | |
|-------------------|--|
| 04/2009 – heute | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg |
| 03/2009 | Freier Mitarbeiter bei PMF Public Marketing Ferkinghoff, Würzburg |
| 10/2008 – 02/2009 | Leiter des molekulargenetischen Diagnostiklabors der Praxis für Humangenetik und Prävention, Dr. med. Robert Hering, Stuttgart |
| 01/2004 – 06/2008 | Doktorand am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg |

Studienbegleitende Tätigkeiten

- | | |
|-------------------|---|
| 02/2003 – 09/2008 | Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik |
| 12/2000 – 12/2002 | Studentische Hilfskraft am Rechenzentrum der Universität Würzburg |
| 06/1999 – 06/2000 | Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik |

Ausbildung

- | | |
|-------------------|--|
| 01/2004 – 06/2008 | Promotionsstudium bei Prof. W. Sebald am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Thema der Dissertation: „ <i>Die Dynamik der primären Erkennungsschritte von BMP-Rezeptoren</i> “ |
| 01/2003 – 10/2003 | Diplomarbeit bei Prof. C. R. Müller-Reible am Institut für Humangenetik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Thema der Diplomarbeit: „ <i>Chromosomale DNA- Marker in der medizinischen Diagnostik</i> “ |
| 10/1998 – 01/2003 | Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Prüfungsfächer: Biotechnologie, Humangenetik, Mikrobiologie |
| 08/1990 – 06/1997 | Hölty-Gymnasium Celle |

Wehrdienst

- | | |
|-------------------|--|
| 09/1997 – 06/1998 | Grundwehrdienst bei 5./PzLBtl 334 „Celle“ in Celle/Scheuen |
|-------------------|--|

Schriftenverzeichnis

Kotzsch A., Nickel J., Seher A., Heinecke K., van Geersdaele L., Herrmann T., Sebald W., Mueller T.D.: *Structure analysis of bone morphogenetic protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome.* J Biol Chem. 2008 Feb 29; 283(9): 5876-87

Heinecke K., Seher A., Schmitz W., Mueller T.D., Sebald W., Nickel J.: *Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins.* BMC Biol 2009 Sep 7; 7: 59

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre weiterhin, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, im April 2010

Kai Heinecke