

Integrierung und biochemische Charakterisierung ektoper BMP Rezeptoren in Zellmembranen

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

VORGELEGT VON

Jannes Ulbrich

AUS DITZINGEN-HEIMERDINGEN



WÜRZBURG 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter:

Prof. Dr. W. Sebald

2. Gutachter:

Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Frau

&

Meiner Familie

1	Einleitung.....	7
1.1	BMPs.....	7
1.2	BMP Rezeptoren.....	10
1.2.1	Rezeptor Ligand Interaktionen	13
1.2.2	Kooperativität der Rezeptor-Ligand Interaktion.....	15
1.3	BMP Signalwege	19
1.3.1	Der Smad Signalweg.....	20
1.3.2	Regulation der BMP Signaltransduktion	23
1.3.2.1	Extrazelluläre Modulatoren:	23
1.3.2.2	Membrangebundene Modulatoren:.....	24
1.3.2.3	Intrazelluläre Modulatoren:.....	24
1.4	Plasmamembran.....	25
1.4.1	Integration von Proteinen in Plasmamembranen.....	27
1.4.1.1	Zellmembranintegration von GPI-Proteinen:.....	28
1.4.1.2	Modifikation der zu integrierenden Moleküle mit einer hydrophoben Gruppe 30	
1.4.1.3	Integration/Generierung membranständiger Moleküle mit reaktiver extrazellulärer Gruppe	33
2	Zielsetzung der Arbeit.....	37
3	Material und Methoden	38
3.1	Abkürzungen.....	38
3.2	Materialien	42
3.2.1	Chemikalien und Enzyme:.....	42
3.2.2	Bakterienstämme:	42

3.2.3	Vektoren:.....	43
3.2.3.1	Prokaryotische Vektoren:	43
3.2.3.2	Eukaryotische Vektoren:.....	43
3.2.4	Rekombinante Proteine:.....	43
3.2.5	Proteingrößenstandards:	44
3.2.6	Medien und Lösungen für die prokaryotische und eukaryotische Zellkultur ..	45
3.3	Zellbiologische Methoden.....	49
3.3.1	Steriles Arbeiten:.....	49
3.3.2	Insektenzellkultur.....	49
3.3.2.1	Monolayer-Kultur.....	49
3.3.2.2	Suspensions-Kultur	49
3.3.3	Säugerzellkultur:.....	50
3.3.4	Zellassays:.....	50
3.3.5	Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität.....	51
3.4	Indirekte Immunfluoreszenz	51
3.5	Bestimmen des Zelldurchmessers am Coulter-Counter	52
3.6	Molekularbiologische Methoden.....	54
3.7	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. Coli</i>	54
3.8	Expression rekombinanter Proteine in <i>SF9</i>-Zellen	56
3.8.1	Plaque Assay	56
3.8.2	Ampflifikation rekombinanter Baculoviren	57
3.8.3	Expression in <i>SF9</i> Zellen.....	57
3.9	Chromatographische Verfahren	58
3.9.1	Metallaffinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Sepharose.....	58

3.9.2	Metallaffinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Sepharose (<i>Batch</i> Verfahren).....	60
3.9.3	Gelfiltrationschromatographien.....	61
3.9.3.1	Gelfiltration an einer HiLoad 16/60TM Superdex 200® Säule.....	61
3.9.3.2	Gelfiltration an einer Bio-Gel P6 Säule.....	63
3.9.4	Anionenaustausch-Chromatographie.....	63
3.9.5	BMP-2 Affinitätschromatographie:.....	65
3.9.6	Reverse Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	66
3.10	Proteinbiochemische Methoden	69
3.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	69
3.10.2	Proteinfärbung.....	71
3.10.2.1	Coomassie-Blau Färbung	71
3.10.2.2	Silberfärbung:.....	71
3.10.3	Western Blot.....	73
3.10.4	BCA-Assay:	75
3.10.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	76
3.10.6	Thrombinspaltung:.....	77
3.10.7	Lysin spezifische Proteinlipidierung mit Hilfe von BAM Molekülen.....	78
3.10.8	Lysin spezifische OregonGreen® Markierung	79
3.10.9	¹²⁵ Iod-Markierung von Proteinen.....	80
3.11	Lipidbiochemische Methoden.....	82
3.11.1	Liposomenherstellung:.....	82
3.11.2	Fusion von Liposomen mit Zellmembranen.....	83
3.11.3	Kopplung von His ₆ -getagten Proteinen an Zellmembran-integrierte Chelatlipide.....	84

4	Ergebnisse	85
4.1	Expression rekombinanter BMP Rezeptor Ektodomänen.....	85
4.1.1	Expression rekombinanter BMP Rezeptor Ektodomänen in <i>E. Coli</i>	85
4.1.1.1	Expression und Aufreinigung der Ektodomäne des humanen BMPR-1A.....	85
4.1.1.2	Expression und Aufreinigung der Ektodomäne des murinen ActR-2B	89
4.1.1.3	Expression und Aufreinigung der Ektodomäne des ActR-2B_MxeGyrA Fusionsproteins.....	94
4.1.2	Expression rekombinanter BMP Rezeptor Ektodomänen in <i>SF9</i> Zellen	98
4.2	Integration von BMP Rezeptorektodomänen in Plasmamembranen	102
4.2.1	BMP-Rezeptor Lipidierung durch eine „ <i>Expressed Protein Ligation</i> “	102
4.2.2	Membran-Integration lipidierter BMP Rezeptorektodomänen	106
4.2.2.1	Bamylierung von BMP-Rezeptoren:	113
4.2.2.2	Aufreinigung der monobamylierten Rezeptoren	115
4.2.2.3	Visualisierung der BMPR-1A_BAM8000 Membranintegration.....	116
4.2.3	Integration von BMP Rezeptoren mit Hilfe von Chelatlipiden	118
4.2.3.1	Fusion der Liposomen mit Plasmamembranen	120
4.2.3.2	Kopplung von His6-Proteinen an die integrierten Chelatlipide.....	128
4.2.3.3	Retentionszeit der verankerten BMP Rezeptoren.....	133
4.2.3.4	Inhibierung der Smad 1,5 Phosphorylierung durch membranintegrierte BMP Rezeptorektodomänen.....	135
4.2.3.4.1	Charakterisierung des Smad Signalwegs in ATDC5 und MPC11 Zellen.....	135
4.2.3.4.2	Einfluss der Liposomenfusion auf die Smad-Phosphorylierung.....	138
4.2.3.4.3	Inhibierung der Smad-Phosphorylierung durch lösliche BMP-Rezeptorektodomänen.....	141

4.2.3.4.4	Inhibierung der Smad Phosphorylierung durch Chelatlipid-gekoppelte Rezeptoren.....	142
5	Zusammenfassung	146
6	Diskussion	150
6.1	Intein vermittelte BMP Rezeptor Lipidierung.....	151
6.2	Lysin-spezifische Lipidierung von BMP Rezeptortodomänen	152
6.3	Integration von Ektodomänen mit Hilfe von Chelatlipiden.....	156
7	Literaturverzeichnis	166
	Lebenslauf.....	180
	Publikationen.....	182
	Erklärung.....	183
	Danksagung.....	184

1 Einleitung

1.1 BMPs

BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) bilden zusammen mit den GDFs (*Growth And Differentiation Factors*), Activinen/Inhibinen, den TGF- β s (*Transforming Growth Factor*), der MIS (*Muellerian duct-inhibiting substance*) und GDNF (*Glial-Derived Neurotrophic Growth Factor*) die TGF- β Superfamilie. Die BMPs stellen mit ca. 20 Vertretern die größte Untergruppe dieser strukturell eng verwandten Proteine dar. Erste fundierte Hinweise auf osteoinduktive Substanzen wurden im Jahre 1965 von Dr. Marshall Urist beschrieben (URIST 1965), nachdem Lacroix bereits 1945 das prinzipielle Vorhandensein eines „Osteogenins“ postulierte (LACROIX, 1945). Nach der Implantation demineralisierter Knochenmatrix in das Muskelgewebe von Ratten formierte sich an der Stelle des Eingriffes ektopter Knochen. Mit Hilfe eines *in vivo* Assay, der in den frühen Achtzigern von Sampath und Reddi entwickelt wurde, dem sog. „rat subcutaneous assay“ (SAMPATH and REDDI 1981) und durch Weiterentwicklungen in den Bereichen der Molekulargenetik und Proteinbiochemie gelang in den folgenden Jahren die Identifizierung und Klassifizierung der ersten BMP Gene, sowie die Aufreinigung funktioneller BMPs (WOZNEY *et al.* 1988).

BMPs wurden in einer Vielzahl verschiedener, phylogenetisch weit entfernter Organismen identifiziert, wie beispielsweise *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio* und dem Menschen, wobei die Anzahl verschiedener BMPs mit der Komplexität des Organismus korreliert zu sein scheint (MIYAZAWA *et al.* 2002; PARKER *et al.* 2004; SAVAGE-DUNN 2001).

Die namensgebende osteoinduktive Aktivität der meisten dieser sezernierten Proteine ist auf regulatorische Funktionen während des gesamten Ablaufs hin zum ausdifferenzierten Knochengewebe zurückzuführen: Chemotaxis von Vorläuferzellen, Mitose, Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten und Osteoblasten (REDDI 1994).

Das Spektrum der physiologischen Funktionen der BMPs beschränkt sich nicht auf die Knochen- und Knorpelbildung. Während der frühen Embryonalentwicklung fungieren BMPs

als zentrale Morphogen etwa bei der Mesoderminduktion oder der Neurogenese (DALE *et al.* 1992; DALE and JONES 1999; JONES *et al.* 1992; KOSTER *et al.* 1991).

Darüber hinaus regulieren diese pleiotropen Proteine im adulten Organismus essentielle Funktionen bei der Gewebeheilung, Homöostase und Wachstumskontrolle in einer Vielzahl diverser Organe und Gewebetypen, wie beispielsweise dem Herzen, der Niere, den Zähnen und der Haut (CAIN *et al.* 2008; CUNNINGHAM *et al.* 1992; EBENDAL *et al.* 1998; HOGAN 1996; REDDI 2000). Die differenziellen, zelltypspezifischen Funktionen der BMPs konnten dabei durch *in vitro* Versuche (BALEMANS and VAN HUL 2002; VUKICEVIC *et al.* 1989) und diverse Mausmodelle geklärt werden (Botchkarev 2003).

BMPs werden als Vorläuferproteine translatiert, die etwa das dreifache Molekulargewicht besitzen, verglichen mit dem vollständig prozessierten Protein. Die Vorläuferproteine setzen sich aus einem N-terminalen Signalpeptid, welches das Protein für den sekretorischen Signalweg markiert, einer Prodomäne und einer C-terminalen reifen Domäne zusammen. Funktionelle BMPs sind ausnahmslos Dimere, wobei sowohl Homo-als auch Heterodimere beschrieben sind (LAVERY *et al.* 2008). Nach der initialen Abspaltung des Signalpeptids erfolgt die Zusammenlagerung zweier Monomere durch die Ausbildung einer Schwefelbrücke zwischen zwei konservierten Cysteinen an Position 78. In einem letzten Schritt spalten furinähnliche Proteasen das Vorläuferprotein an einem konservierten Motiv R-X-X-R (CONSTAM and ROBERTSON 1999; JONES *et al.* 1994).

Von besonderer struktureller und funktioneller Bedeutung sind der so genannte Cysteinknoten (MURRAY-RUST *et al.* 1993; SUN and DAVIES 1995) und ein N-terminales Segment, das dem Cysteinknotenmotiv vorgelagert ist. Der Cysteinknoten wird durch 6 Cysteine gebildet, wobei 2 Disulfide mit benachbarten Resten eine ringartige Struktur generieren und die dritte Schwefelbrücke orthogonal durch die Ringebene aufgebaut wird. Zum einen verleiht dieses Motiv den Mitgliedern der TGF- β Superfamilie eine außergewöhnlich hohe Stabilität, zum anderen ist diese Domäne von besonderer funktioneller Bedeutung, da es Teile der Bindeepitope für die Typ I und Typ II Rezeptoren beinhaltet.

Innerhalb der BMP Proteinfamilie lassen sich die einzelnen Vertreter nach strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten weiter einteilen (KAWABATA *et al.* 1998). BMP-2 und BMP-4 bilden dabei eine Untergruppe, BMP-5, BMP-6 und BMP-7, sowie BMP-8 eine andere.

Bemerkenswert ist hierbei, dass die Mitglieder der TGF- β Superfamilie über alle Untergruppen hinweg eine einheitliche, zweifach symmetrische Faltung aufweisen (GRIFFITH *et al.* 1996; MITTL *et al.* 1996; SCHEUFLER *et al.* 1999). So zeigen BMP-2 und TGF- β 2 gerade 30% Übereinstimmung in der Primärsequenz, die Polypeptidkette beider Proteine dagegen kann bis auf einige Loop/Schleifen Regionen deckungsgleich übereinandergelegt werden (SEBALD *et al.* 2004).

Die Tertiärstruktur eines BMP Monomers wird häufig durch das Modell einer linken Hand beschrieben: die zwei β -Faltblätter, die in 9 β -Strängen organisiert sind, stellen die beiden Finger dar. Der N-Terminus repräsentiert den Daumen und die α -Helix das Handgelenk (s. Abb. 1.1A). In BMP Dimeren wurden 2 Typen Rezeptor-Bindeepitope identifiziert: Das „Wrist“ Epitop, das die hochaffine Bindestelle für die Typ I Rezeptoren darstellt und das „Knuckle“ Epitop für die niederaffine Interaktion mit den Typ II Rezeptoren. Während das Knuckle Epitop, das auf der konvexen Seite der Finger beider Monomere lokalisiert ist, ein intramolekulares Epitop darstellt, wird das Wrist Epitop aus Resten beider Monomere generiert (s. Abb. 1.1B). (KIRSCH *et al.* 2000b; KNAUS and SEBALD 2001; NICKEL *et al.* 2001). Aufgrund der zweifachen Symmetrie der dimeren Proteine weisen diese je 2 Knuckle und zwei Wrist Epitope auf.

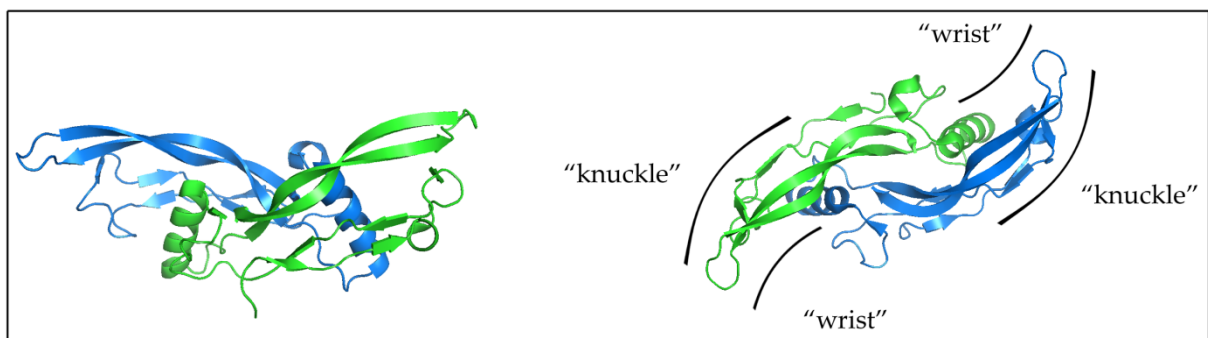


Abbildung 1.1: Strukturmodell des BMP-2 Dimers.

A: Seitenansicht des dimeren BMP-2. Die Monomere sind in grün und blau dargestellt. Die Monomere sind aus einer α -Helix („wrist“) und zwei aus β -Faltblättern („fingers“) gebildet. **B:** Aufsicht eines BMP-2 Dimers. Die Bindeepitope der BMP Rezeptoren sind schematisch angegeben. Aus (WEBER *et al.* 2007). Die Abbildung wurde mit Pymol V1.1 erstellt.

1.2 BMP Rezeptoren

BMPs entfalten ihre biologischen Funktionen entsprechend den übrigen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie nach Bindung an spezifische membranständige Rezeptor Serin/Threonin Kinasen (CAIN *et al.* 2008; NOHE *et al.* 2004; SEBALD *et al.* 2004). Während für die gesamte TGF- β Superfamilie 12 Rezeptoren beschrieben sind (7 Typ I und 5 Typ II), konnten bis heute 6 Rezeptoren als Bindungspartner für BMPs identifiziert werden (s. Abb 1.2). Den ca. 20 Mitgliedern der BMP Familie stehen demnach nur 6 Rezeptoren zur Verfügung. Bemerkenswerter Weise kann ein Rezeptor mit verschiedenen Liganden- und die BMPs wiederum mit mehreren Rezeptoren interagieren (NICKEL *et al.* 2005; WEBER *et al.* 2007). In Anbetracht der funktionellen Diversität, welche die Vertreter die BMP Familie aufweisen, und der limitierten Anzahl signalvermittelnder Rezeptoren, stellt sich natürlich die Frage, welche Mechanismen die Spezifität einzelner BMP vermittelter Signale bestimmen.

Die BMP Rezeptoren konnten anhand spezifischer struktureller Merkmale klassifiziert werden: Die glykosilierte extrazelluläre Ektodomäne der Rezeptoren weist eine so genannte „Drei-Finger-Toxin“ Faltung auf, welche ursprünglich für bestimmte, nicht verwandte Neurotoxine beschrieben wurde. Ein weiteres gemeinsames Merkmal der extrazellulären Domänen ist der hohe Anteil an Cysteinen, bzw. Disulfidbrücken, wodurch die extrazellulären Bereiche der Rezeptoren stabilisiert werden (GREENWALD *et al.* 1999; GREENWALD *et al.* 1998; KIRSCH *et al.* 2000b).

Die Verankerung in die Plasmamembran erfolgt über eine einzelne Transmembrandomäne, die Signaltransduktion durch eine cytoplasmatische Serin/Threonin spezifische Kinasedomäne (DE CAESTECKER 2004). Die TGF- β Rezeptoren unterscheiden sich durch bestimmte konservierte Bereiche innerhalb ihrer Kinasedomänen, wodurch sie in die Typ I und die Typ II Rezeptorklassen eingeteilt werden können (CARCAMO *et al.* 1994; MASSAGUE *et al.* 2000; TEN DIJKE *et al.* 1996). Ein charakteristisches Merkmal der Typ I Rezeptoren ist die so genannte „GS-Box“, eine 30 Aminosäuren umfassende Glycin und Serin reiche Region, welche der Kinase-Domäne unmittelbar vorgelagert ist (MANNING *et al.* 2002; MASSAGUE *et al.* 1992). Funktionell ist dieser Bereich entscheidend für die Spezifikation der ausgelösten Signalkaskade. Die Typ II Rezeptoren, deren Kinasedomäne im Gegensatz zu den Typ I Rezeptoren konstitutiv aktiv ist, beinhalten eine Serin und Threonin-reiche Region distal der

Kinase-Domäne. Erwähnenswert hierbei ist eine strukturelle Besonderheit des BMP Rezeptors Typ II (BMPR-2). Dieser existiert in zwei unterschiedlichen Splice-Varianten, einer Long-Form (LF) und einer Short-Form (SF). Die LF zeichnet sich durch eine cytoplasmatische, C-terminale Verlängerung auf, deren Funktion bis dato unbekannt ist. Die bisher für die BMPs beschriebenen Typ I und Typ II Rezeptoren sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Rezeptorklasse	Name	Alternativname
Typ I Rezeptoren	ActR-1	ALK-2
	BMPR-1A	ALK-3
	BMPR-1B	ALK-6
Typ II Rezeptoren	ActR-2	/
	ActR-2B	/
	BMPR-2	/

Tabelle 1.1: BMP Typ I- und Typ II Rezeptoren

Die ersten TGF- β Rezeptoren, die identifiziert werden konnten, waren der humane TGF- β Rezeptor Typ II und der Activin Rezeptor Typ II der Maus (LIN *et al.* 1992; MATHEWS and VALE 1991). Die Rezeptoren ALK-1, ALK-2 und ALK-3 wurden ursprünglich aufgrund Sequenz-Übereinstimmungen „*Activin Like Kinases*“ benannt, wodurch eine nicht einheitliche Nomenklatur entstand (TEN DIJKE *et al.* 1993).

Die differentielle Expression der einzelnen BMP Rezeptoren konnte durch Expressionsstudien an Mausmodellen nach gewebespezifischen und zeitlichen Gesichtspunkten aufgeklärt werden (BEPPU *et al.* 2000; GU *et al.* 1999; MANOVA *et al.* 1995; MATZUK *et al.* 1995; VERSCHUEREN *et al.* 1995).

Weitere Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Rezeptoren konnten durch diverse Maus-Nullmutanten gezogen werden; Übersicht in (GOUMANS *et al.* 2003). Die Deletion der

Rezeptoren ActR-I, BMPR-1A und BMPR-2 führt zum Tod während der frühen Embryonalentwicklung durch Defekte während der Mesoderm Formation. Nullmutanten des BMPR-1B sind lebensfähig, zeigen aber schwerwiegende Defekte der Gliedmaßen, wie beispielsweise die Brachydaktylie Typ 2A (LEHMANN *et al.* 2003; YOON *et al.* 2005). Die Typ II Rezeptoren ActR-2 und ActR-2B können sich funktionell kompensieren, wohingegen eine Nullmutante, die keinen der beiden Rezeptoren exprimiert, wiederum in einem frühen Embryonalstadium abstirbt. Diese Befunde belegen eindrucksvoll die Bedeutung der BMPs als Morphogene während früher Entwicklungsstadien.

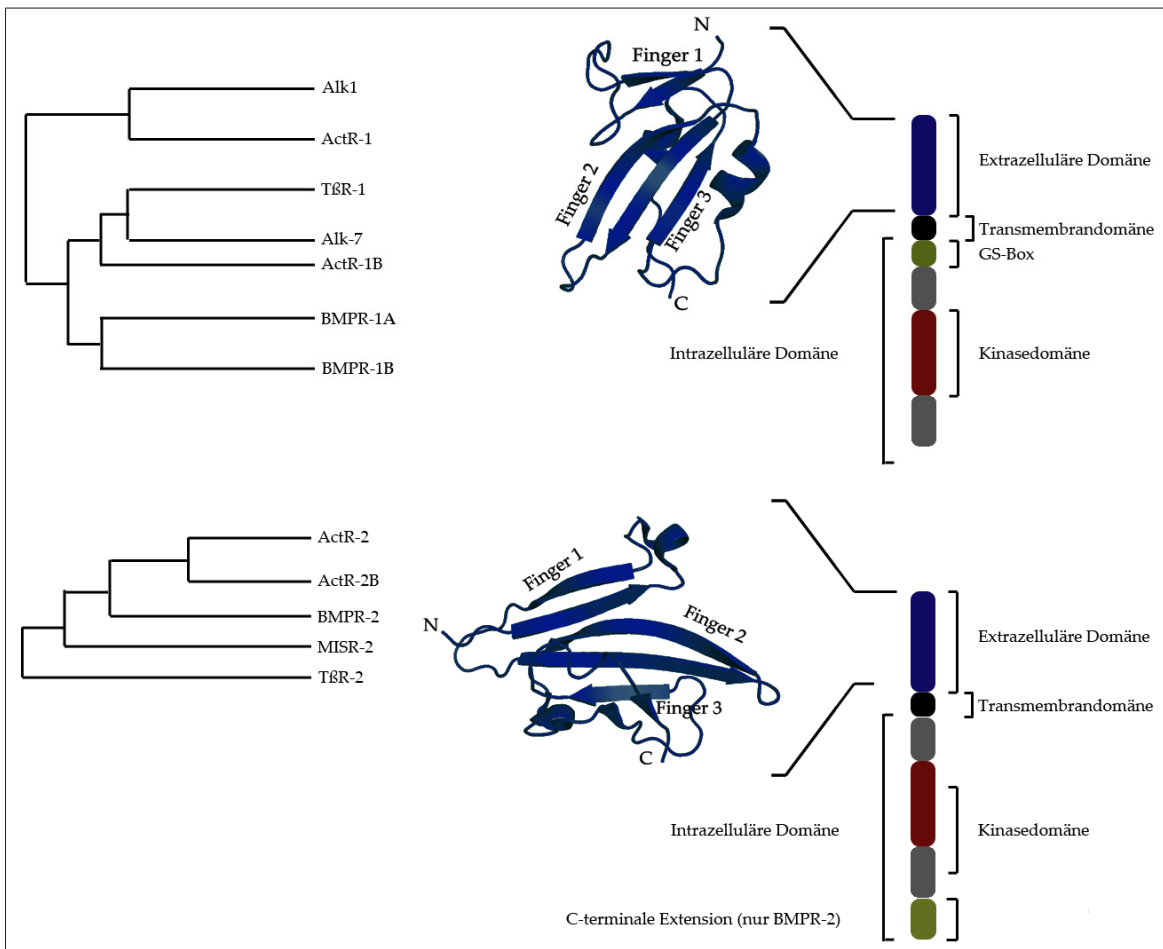


Abbildung 1.2: Einteilung und Organisation von TGF- β Rezeptoren.

A: Sequenzhomologie-abhängige Gruppierung der Typ I Rezeptoren. **B:** Schematische Darstellung der Typ I Rezeptoren mit Bänderdarstellung der extrazellulären Domäne (WEBER *et al.* 2007). **C:** Sequenzhomologie-abhängige Gruppierung der Typ II Rezeptoren **D:** Schematische Darstellung der Typ II Rezeptoren mit Bänderdarstellung der extrazellulären Domänen (YIN *et al.* 2008).

1.2.1 Rezeptor Ligand Interaktionen

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie vermitteln ihre zellulären Effekte durch Bindung an zwei Typen Rezeptor Serin/Threonin Kinasen. Die konstitutiv aktive Kinasedomäne des Typ II Rezeptors hat dabei immer die Funktion, den Typ I Rezeptor durch Phosphorylierung zu aktivieren. Der aktivierte Typ I Rezeptor leitet im nächsten Schritt das extrazelluläre Signal durch gewisse Effektorproteine weiter. Die Rezeptor-Ligand Interaktionen der Vertreter der TGF- β Superfamilie scheinen oberflächlich betrachtet einfach aufgebaut, da es aufgrund der geringen Anzahl an Rezeptoren augenscheinlich nur eine begrenzte Anzahl signalvermittelnder Komplexe geben kann.

Hierbei sind jedoch eine Reihe von Faktoren zu erwähnen, welche es ermöglichen, eine Vielzahl verschiedener, signalvermittelnder Rezeptor-Ligand Komplexe zu generieren. Die Komplexität des Systems ergibt sich zum einen aus der dimeren Natur der Liganden. Jeder Ligand beinhaltet zwei Typ I und zwei Typ II Interaktionsflächen (s. Abb 1.1).

Auf diese Weise können verschiedene Rezeptorkombinationen spezifisch eine Vielzahl zellulärer Effekte herbeiführen. Die Zahl funktionsfähiger Komplexe wird durch die promiskuitive Natur der Liganden und der Rezeptoren zudem vervielfacht, was besonders eindrucksvoll durch die Activin Typ II Rezeptoren veranschaulicht wird, die sowohl als hochaffine Rezeptoren für Smad 2/3 Signalwege, als auch als niederaffine Rezeptoren für Smad 1/5/8 Signalwege fungieren können (NAGASO *et al.* 1999).

Zudem kann ein Ligand jeweils einen Typ I Rezeptor rekrutieren, welcher spezifisch die Smad 2/3 oder die Smad 1/5/8 Signalkaskade aktiviert (GOUMANS and MUMMERY 2000). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Organisation der Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Rezeptoren können sowohl als monomere Rezeptoren, oder als präformierte Komplexe existieren. Der Bindungsmodus kann dabei über die ausgelöste Signalkaskade entscheiden. In den vergangenen Jahren ist es gelungen, durch die Kombination verschiedener experimenteller Ansätze weitreichende Informationen zur Rezeptor-Ligand Interaktion zu gewinnen. Übersicht in: (NICKEL *et al.* 2009; SEBALD *et al.* 2010; SIEBER *et al.* 2009).

Mit Hilfe von „*crosslinking*“ Experimenten konnten prinzipiell zwei Modi der Rezeptor-Bindung identifiziert werden (MASSAGUE 1998). Activine und TGF- β s sind Vertreter des ersten Bindungsmodus, der als „*sequentieller Bindungsmodus*“ definiert wurde. Hier fungiert

der Typ II Rezeptor als hochaffiner Interaktionspartner für die Liganden (VENTURA *et al.* 1994). Der resultierende Proteinkomplex rekrutiert in einem zweiten Schritt den niederaffinen Typ I Rezeptor, der durch die konstitutiv aktive Kinasedomäne des Typ II Rezeptors aktiviert wird. Bindung von Typ I Rezeptoren bedingt in diesem System die vorangegangene Interaktion zwischen dem Liganden und dem Typ II Rezeptor (ATTISANO *et al.* 1993; EBNER *et al.* 1993; FRANZEN *et al.* 1993). In Zellversuchen konnte zudem belegt werden, dass die Affinität zum Typ I Rezeptor durch das Vorhandensein des Typ II Rezeptors erhöht wird, so dass von einem sequentiellen, kooperativen Mechanismus ausgegangen werden kann (LIU *et al.* 1995).

BMPs, so wurde Ende der neunziger Jahre postuliert, folgen einem zweiten, „*kooperativen Bindungsmechanismus*“ in welchem die Typ I Rezeptoren die hochaffinen Bindungspartner darstellen. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass innerhalb der BMP-Unterfamilie beide Rezeptortypen von unterschiedlichen BMPs hochaffin gebunden werden können. Eine klare mechanistische Abgrenzung der BMPs von den anderen Mitgliedern der TGF β -Superfamilie ist demnach wiederlegt.

So zeigen beispielsweise BMP-3, BMP-5, BMP-7 und BMP-8 eine höhere Bindungsaffinität zu den jeweiligen Typ II Rezeptoren (ALLENDORPH *et al.* 2007; GREENWALD *et al.* 2003), entsprechen also in ihrer Rezeptorinteraktion der so genannten „*sequentiellen Bindung*“. Die bedeutendsten Vertreter innerhalb der BMP-Familie, welche den zweiten Bindungsmodus repräsentieren, sind BMP-2 und BMP-4 (LAVERY *et al.* 2008). Diese BMPs binden mit höherer Affinität an die entsprechenden Typ I Rezeptoren (BMPR-1A/B, ActR-1) als an die Typ II Rezeptoren (BMPR-2, ActR-2A/B). Das Modell einer kooperativen Bindung resultierte aus Beobachtungen von Zellexperimenten, dass diese BMPs mit geringer Affinität an die Typ I und die Typ II Rezeptoren alleine binden, die Typ-I Rezeptoren allerdings um den Faktor 50-100 bevorzugt werden (KIRSCH *et al.* 2000a). Die Rezeptor-Ligand Affinität steigt dagegen im heteromeren Komplex deutlich an (LIU *et al.* 1995; NOHNO *et al.* 1995; ROSENZWEIG *et al.* 1995; TEN DIJKE *et al.* 1994).

Die BMP Rezeptoren wurden in Zellmembranen als einzelne Rezeptorketten („*BMP induced signaling complex*“, BISCs), oder als Präformierte Komplexe („*preformed receptor complex*“, PFC) nachgewiesen, wobei sowohl homo- als auch heteromere Komplexe identifiziert werden konnten (GILBOA *et al.* 2000; HASSEL *et al.* 2003; NOHE *et al.* 2002). Die PFCs stellen

hochaffine Bindungspartner für die BMPs dar. Zudem kann auch die Rekrutierung des niederaffinen Typ II Rezeptors nach Bindung des BMPs an den entsprechenden Typ I Rezeptor erfolgen (BISCs „*BMP induced signaling complexes*“).

Durch Mutation des Typ II Rezeptors BMPR-2, durch welche die Ausbildung von PFCs inhibiert werden konnte und der Entwicklung von BMP Mutanten, die ein oder zwei nicht funktionelle Knuckle- oder Wrist Epitope aufweisen, konnte zum einen nachgewiesen werden, dass die Rezeptor-Ligand Interaktion im BMP System keinem einheitlichen Schema folgt und zudem der Bindungsmodus die ausgelöste Signalkaskade determiniert (KNAUS and SEBALD 2001; NOHE *et al.* 2002).

1.2.2 Kooperativität der Rezeptor-Ligand Interaktion

BMPs vermitteln ihre zellulären Effekte nach Bindung an zwei Typen von Serin/Threonin Kinasen mit einer Transmembrandomäne. Der Interaktion des dimeren Liganden und der plasmamembranverankerten Rezeptoren liegt dabei scheinbar eine kooperative Bindung zu Grunde, wie beispielsweise Crosslinking-Experimente zeigten (MASSAGUE 1998; STROUD and WELLS 2004). Die molekularen Mechanismen, die diese Kooperation der BMP Rezeptor-Ligand Interaktion auf Zelloberflächen vermitteln, sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Interessanterweise zeigten BMPs in Interaktionsstudien mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz, in der Bindung an die entsprechenden Rezeptortodomänen in der 1:2 Interaktion und im ternären Komplex keine Kooperativität. Da in diesen Versuchen lediglich die ligandenbindenden Domänen der Rezeptoren verwendet werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Transmembransegmente und/oder die cytosolischen Bereiche der Rezeptoren die Kooperativität vermitteln.

Da die Zusammenlagerung funktioneller BMP Rezeptor-Ligand Komplexe nach der initialen Bindung an die entsprechenden Typ I Rezeptoren ein schrittweiser Prozess ist (ausgenommen PFCs) und der Ligand im Falle einer 1:1 Interaktion eine wesentlich geringere Affinität aufweist als in zellulären Systemen, die beide Rezeptortypen beinhalten, liegt die Annahme eines allosteren Bindungsmechanismus nahe, zumal da in ähnlichen Systemen eine Konformationsänderungen nach der Ligandenbindung beobachtet werden

konnte.

Der „*Epidermal Growth Factor*“ (EGF) bindet an spezifische Rezeptor-Tyrosinkinasen. Nach der Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung innerhalb der Rezeptorkette, die zu einer Rezeptor-Dimerisierung durch direkte Rezeptor-Rezeptor Kontakte führt (SCHLESSINGER 2002). Innerhalb der TGF- β Superfamilie konnten ebenfalls durch hochauflösende Kristallstrukturen allosterische Mechanismen nach Ligandenbindung identifiziert werden. So zeigt beispielsweise TGF- β 3 bzw. TGF- β 1 profunde Konformationsänderungen nach Bindung an die Ektodomäne des T β R-3 (HART *et al.* 2002; HINCK *et al.* 1996; MITTL *et al.* 1996). Ein Beweis, ob diese Konformation auch *in vivo* existiert, oder ein Artefakt der Kristallisation war, steht noch aus.

Ein weiteres Beispiel für allosterische Mechanismen innerhalb der TGF- β Superfamilie stellt die Interaktion von ActA mit dem Typ II Rezeptor ActR-2B dar (GREENWALD *et al.* 2004; THOMPSON *et al.* 2003). Aufgrund der geringen räumlichen Distanz der Bindeepitope für den hochaffinen Typ II Rezeptor und des putativen Epitops des niederaffinen Typ I Rezeptors nach Ligandenbindung sind Rezeptor-Rezeptor Interaktionen in diesem Fall wahrscheinlich, jedoch noch nicht nachgewiesen.

Ein Vergleich der Kristallstruktur von ungebundenem BMP-2 mit dem binären Rezeptor-Ligand Komplex BMP-2-BMPR-1A zeigte dagegen, dass nach Bindung des hochaffinen Typ I Rezeptors keine Konformationsänderung im Komplex zu beobachten ist (KIRSCH *et al.* 2000b; SCHEUFLER *et al.* 1999). Dies konnte durch die Strukturaufklärung des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-1A und ActR-2B bestätigt werden (WEBER *et al.* 2007).

BMP induzierte Konformationsänderungen der entsprechenden Rezeptoren konnten dagegen für einen weiteren Vertreter dieser Proteinfamilie beschrieben werden. Im Falle der Interaktion zwischen BMP-7 und dem Typ II Rezeptor ActR-2B induziert die Ligandenbindung eine Konformationsänderung des BMP-Dimers in den Bereichen der Knuckle und Wrist (GREENWALD *et al.* 2003; GRIFFITH *et al.* 1996). Oberflächen-Plasmon-Resonanz Untersuchungen zeigten, dass die Affinität von BMP-7 zum Typ I Rezeptor ActR-1 nach der Bindung von BMP-7 an die Ektodomäne des ActR-2 um das ca. Fünffache gesteigert wird.

Da die Konformationsänderungen innerhalb beider Bindeepitope lokalisiert sind, ist es wahrscheinlich, dass dieser Effekt auf allosterische Mechanismen zurückzuführen ist (SEBALD and MUELLER 2003).

Allerdings kann diese relativ geringe Änderung der Affinität den kooperativen Mechanismus nicht vollständig erklären.

Aus den bisher erhaltenen Strukturdaten kann Allosterie als alleiniger, der Kooperativität zu Grunde liegender Mechanismus bei der BMP-Rezeptor Interaktion ausgeschlossen werden.

Des Weiteren erscheint aufgrund der Strukturdaten der BMP Rezeptorkomplexe weitestgehend gesichert, dass die Transmembransegmente der Rezeptoren keine direkte Interaktionen miteinander eingehen (WEBER *et al.* 2007).

Eine Wechselwirkung der cytoplasmatischen Domänen beider BMP Rezeptortypen wäre eine weitere Möglichkeit, die Rezeptoraffinität zum Liganden zu modellieren. Allerdings ergaben Crosslinking-Experimente, dass die kooperative Bindung von BMP-7 an den niederaffinen Rezeptor auch mit trankierten Rezeptoren, also ohne cytoplasmatischen Teil zu beobachten war (GREENWALD *et al.* 2003). Letztendlich belegen die erhaltenen Daten, dass innerhalb des BMP-Systems allosterische Mechanismen weitestgehend ausgeschlossen werden können. An diesem Punkt stellt sich natürlich die Frage, welche Mechanismen die in Zellkulturexperimenten gewonnenen Daten der Kooperativität erklären können.

Die Organisation der BMP Rezeptoren in der Plasmamembran hat für Protein-Protein Interaktionen mit den Liganden weit reichende Konsequenzen (GARCIA-SAEZ and SCHWILLE 2010; GREENWALD *et al.* 2004; HOLLMANN *et al.* 2010; OLIVER and BERLIN 1982; SEBALD and MUELLER 2003; WEGHUBER *et al.* 2010).

Durch die Verankerung von Membranproteinen werden diese in einem zweidimensionalen Raum angeordnet, wodurch sich die örtliche Konzentration der Proteine erheblich erhöht. Aufgrund der lokalen Anreicherung der Rezeptoren wird eine 1:2 Interaktion mit dem entsprechenden Liganden begünstigt. Das vollständige Auflösen dieses Komplexes ist wesentlich unwahrscheinlicher als in einer 1:1 Interaktion, sodass die effektive Affinität der Rezeptoren gesteigert wird.

Die 1:2 Interaktion kann dabei durch eine sehr schnelle sequentielle Bindung von zwei Typ I Rezeptoren generiert werden oder die hohe Konzentration entsprechender Rezeptoren führt

auch ohne Liganden zu Protein-Protein Interaktionen zwischen den einzelnen Rezeptorketten (GILBOA *et al.* 2000).

Des Weiteren führen Lipid-Protein Interaktionen zu lokalen Aggregationen von Proteinen in der Membran, was hochaffine Rezeptor-Ligand Interaktionen begünstigt. Hierbei sind zwei Mechanismen zu erwähnen. Die Acylgruppen der Membranlipide stellen hochflexible Molekülbereiche dar, die eine Vielzahl verschiedener Konformationen innerhalb der Plasmamembran annehmen können. In der Kontaktfläche zu den vergleichsweise starren Transmembrandomänen integraler Proteine werden dagegen auch energetisch ungünstige Konformationen erzwungen. Um diesen Effekt zu minimieren, lagern sich Membranproteine zu Clustern zusammen, wodurch die Lipid - Protein Kontaktfläche minimiert wird (GRASBERGER *et al.* 1986). Die zweite Triebkraft, die zu Protein Protein Interaktionen innerhalb der Membranen führt, ist das so genannte „*hydrophobic mismatch*“ (KILLIAN 1998). Differenzen in der Breite der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran und der hydrophoben Transmembrandomäne eines Proteins führt zu Stauchungen, bzw. gestreckten Lipidkonformationen in der Nähe des Proteins. Diese ebenfalls ungünstige Lipidanordnung führt wiederum zur Oligomerisierung bestimmter Proteine (MARSH 2008).

Darüber hinaus spielt die Kompartimentierung der Plasmamembran in so genannte Mikrodomänen eine wichtige Rolle in der Organisation und Funktion von Membranproteinen untereinander, beziehungsweise von Membranproteinen und cytosolischen oder extrazellulären Proteinen (HANCOCK 2006; KUSUMI *et al.* 2004; LAJOIE *et al.* 2009a).

Galektine bilden eine Untergruppe der Lectine und bilden Quervernetzungen zwischen Gal-GlcNAc Gruppen von N-Glykanen verschiedener Glykoproteine. Auf diese Weise bilden sich vernetzte Akkumulate verschiedener Membranproteine, wie beispielsweise Rezeptoren aus, was zum einen die Diffusion der vernetzten Proteine reguliert (GOETZ *et al.* 2008; LAJOIE *et al.* 2009b), zum anderen kann so auch die Interaktion der vernetzten Proteine modifiziert werden, wie für die EGF-abhängige *Focal adhesion kinase* (FAK) Dephosphorylierung und Aktivierung der Tyrosin-Phosphatase Shp2 beschrieben (GUO *et al.* 2007).

Des Weiteren stellen so genannte *Lipid rafts*, dynamisch regulierte Membranbereiche mit einem hohen Anteil an Cholesterin und Sphingolipiden mit einem Durchmesser von etwa 50nm, eine wichtige Komponente in Plasmamembranen dar, durch welche Protein-Protein

Interaktionen beeinflusst werden (FAN *et al.* 2010; HANCOCK 2006; LINGWOOD and SIMONS 2010).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Organisation von BMP Rezeptoren in *lipid rafts* für die Funktionalität von BMP Rezeptoren bedeutsam ist (RAMOS *et al.* 2006). Für die Signaltransduktion von BMP Rezeptoren spielen zwei weitere Membrankomponenten eine entscheidende Rolle, die *caveolae* und die *clathrin coated pits* (CCPs), welche wichtige Funktionen im Lipidtransport, Signaltransduktionen und Endozytosevorgängen spielen (HARTUNG *et al.* 2006; NOHE *et al.* 2005; RAMOS *et al.* 2006).

Eine weitere wichtige Konsequenz der Anordnung von Proteinen in Zellmembranen ist die Verringerung der möglichen Freiheitsgrade. Proteine können innerhalb der Membran transversale Bewegungen ausführen, oder entlang der eigenen Längsachse rotieren. Durch die Bindung des Liganden verliert dieser ebenfalls einen Freiheitsgrad, wodurch die Interaktion des Knuckle Epitops mit den Typ II Rezeptoren begünstigt wird. Mit Hilfe eines vereinfachten, theoretischen Modells konnten die verschiedenen Parameter der Protein Protein Interaktion in Biomembranen analysiert und die daraus resultierenden Veränderungen der Proteinkomplex-Assoziation berechnet werden (GRASBERGER *et al.* 1986). Die Berechnungen ergaben, dass die verschiedenen aufgeführten Faktoren zu einer Interaktionsverstärkung um den Faktor 1×10^6 in einem dimeren System, bzw. 1×10^{12} in einem trimeren System führen.

1.3 BMP Signalwege

BMPs vermitteln ihre biologischen Funktionen durch spezifische cytoplasmatische Faktoren, wie die Smad Proteine 1, 5 und 8, durch „Mitogen-activated protein kinases“ (MAPKs), z.B. p38, „Extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) und der „C-Jun N-terminal kinase“ (JNK).

1.3.1 Der Smad Signalweg

Smad Proteine

Der am besten charakterisierte BMP-Signalweg ist der Smad Signalweg (HELDIN *et al.* 1997). In Wirbeltieren sind acht Smad Proteine identifiziert worden, die in drei funktionelle Gruppen eingeteilt werden können (MOUSTAKAS *et al.* 2001).

Die Smad Proteine 1, 2, 3, 5 und 8 bilden die Gruppe der Rezeptor Smads, oder R-Smads. Die R-Smads 1, 5 und 8 sind Haupt-Effektorproteine im BMP System, Smad-2 und 3 leiten vor allem die Signale der TGF- β s und Activine weiter.

Dies R-Smads 1, 5 und 8 werden durch die Typ I Rezeptoren nach der Aktivierung der Kinasedomäne phosphoryliert und so aktiviert (HARTSOUGH and MULDER 1997). Smad4 ist einziger Vertreter der zweiten Gruppe, der so genannten Co-Smads. Diese werden von aktivierten Rezeptor-Smads rekrutiert und bilden einen Komplex, der im Zellkern die Expression diverser Zielgene steuert (JENSEN *et al.* 2010) (s. Abb. 1.3).

Die dritte Gruppe bilden die inhibitorischen Smads (I-Smads) 6 und 7. R-Smads und Co-Smad folgen einem einheitlichen Aufbau: Eine hochkonservierte N-terminale MH1 Domäne wird durch einen Linker variabler Länge mit einer C-terminalen MH2 Domäne verbunden. Die MH1 Domäne beinhaltet zwei Funktionen. Zum einen inhibiert sie die die MH2 Domäne durch direkte intramolekulare Kontakte (BAKER and HARLAND 1996; LIU *et al.* 1996), zum anderen kann die MH1 Domäne nach der Typ I Rezeptor vermittelten Aktivierung sequenzspezifisch an DANN binden (KIM *et al.* 1997; LIU *et al.* 1997), wobei Smad-2 eine Ausnahme bildet.

Die C-terminale MH2 Domäne weist zum einen das Phosphorylierungsmotiv SSXS auf, das durch die entsprechenden Typ I Rezeptoren phosphoryliert und damit das Smad Protein in den aktiven Zustand überführt wird. Des Weiteren interagieren Smad Protein mit Hilfe der MH2 Domäne mit einer Vielzahl von Proteinen, den TGF- β Rezeptoren, anderen Smad-Proteinen und sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren (HATA *et al.* 1997; MACIAS-SILVA *et al.* 1996).

Smad Signaltransduktion

Nach der Formation eines funktionellen BMP Rezeptor-Ligand Komplexes phosphoryliert der Typ II Rezeptor durch die konstitutiv aktive Kinasedomäne die GS-Box des Typ I Rezeptors, wodurch die Typ I Kinase aktiviert wird (WRANA *et al.* 1992; WRANA *et al.* 1994). Im nächsten Schritt werden im BMP-System die R-Smads 1, 5 und 8 rekrutiert und phosphoryliert, wodurch die intramolekulare Inhibition der MH2 Domäne durch die MH1 Domäne aufgehoben wird (MASSAGUE 1998).

Die Übertragung der Phosphatgruppen auf die GS-Box ist von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der Interaktion zwischen dem Typ I Rezeptor und dem R-Smad (CHEN and MASSAGUE 1999; KIM *et al.* 1997).

Die Bindung des L45-Loops, einer neun Aminosäuren umfassenden Sequenz innerhalb der Kinase Domäne des Typ I Rezeptors an das L3-Loop der R-Smads determiniert dagegen die Spezifität der Interaktion (CHEN *et al.* 1998).

Die aktivierten R-Smads unterliegen durch die Phosphorylierung einer Konformationsänderung, wodurch sie sich vom Rezeptor lösen und im nächsten Schritt Smad-4 rekrutieren, wobei wiederum das L3-Loop von Smad-4 entscheidend für die Interaktion ist.

Die Konformationsänderung der R-Smads, die aus der Phosphorylierung resultieren, exponieren zudem eine „nuclear localization sequence“ (NLS), wodurch β -Integrin an den Komplex aus RSmad und CoSmad binden kann und dieser in den Zellkern transferiert wird (KURISAKI *et al.* 2001; XIAO *et al.* 2001).

Vor der Aktivierung zeigen die R-Smads eine beinahe vollständige Lokalisation im Zytoplasma, während Smad-4 ständig zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma wechselt. Dieses Verhalten ist durch ein konstitutiv aktives NLS innerhalb der MH1 Domäne und einem „nuclear export signal“ (NES) in der Linkerregion zu erklären (WATANABE *et al.* 2000).

Im Nukleus interagieren die Smad-Komplexe mit weiteren Co- und Transkriptions-Faktoren, wodurch die DNA Bindung und die transkriptionelle Aktivität reguliert wird; Übersicht in (DERYNCK and ZHANG 2003). Im Zellkern unterliegen die R-Smads einer kontinuierlichen

Dephosphorylierung, wodurch der Smad Komplex dissoziiert und die inaktiven R-Smads in das Zytoplasma überführt werden (INMAN and HILL 2002).

Die inhibitorischen Effekte der Smads 6 und 7 sind auf 2 Mechanismen zurückzuführen. Zum einen können die I-Smads an die Rezeptoren der TGF- β Superfamilie binden und so die Interaktion der Kinasedomänen mit den R-Smads inhibieren (IMAMURA *et al.* 1997), zum anderen konnte gezeigt werden, dass Smad-6 in niedrigen Konzentrationen selektiv BMP Signalwege blockiert, indem es kompetitiv an aktivierte BMP R-Smads bindet und so die Interaktion mit Smad-4 inhibiert wird (HATA *et al.* 1998).

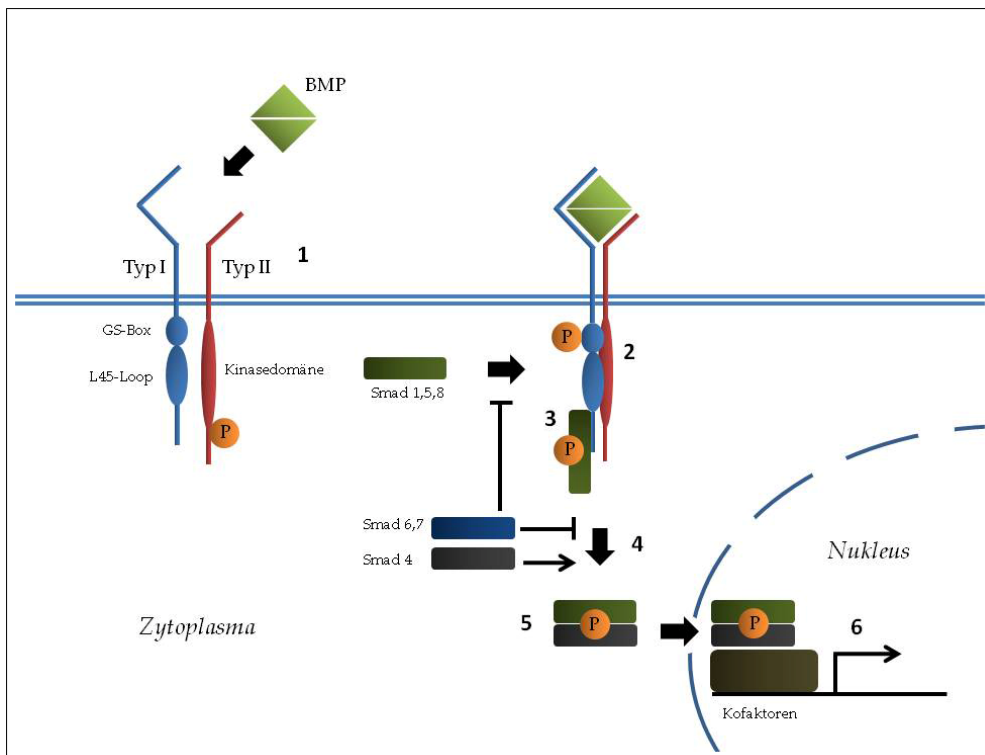


Abbildung 1.3: Schema des Smad Signalwegs.

1. Ein BMP-Dimer bindet an einen präformierten Komplex, oder an einen hochaffinen Typ I Rezeptor, wobei der Rezeptor-Ligand Komplex anschließend den niederaffinen Rezeptor rekrutiert. 2. Durch die Bindung phosphoryliert die intrinsisch aktive Kinasedomäne des Typ II Rezeptors den Typ I Rezeptor an der GS-Box, wodurch die Typ I Kinasedomäne aktiv wird. 3. Ein Rezeptorsmad, das im Grundzustand durch die MH1 Domäne intramolekular inhibiert wird, bindet durch das L3 loop an die L45 Schleife der Kinasedomäne des Typ I Rezeptors und wird phosphoryliert. Diese Interaktion unterliegt einer Konkurrenz durch inhibitorische Smads. 4. Durch die Phosphatgruppen ändert sich die Konformation des R-Smads und es löst sich vom Rezeptor. Im Zytoplasma bindet es Smad-4, oder ein inhibitorisches Smad (Smad-6/7). 5. Der Komplex aus R-Smad und Co-Smad (Smad-4) wird in den Nucleus transferiert. 6. Im Zellkern bildet sich zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren ein aktiver Komplex, der die Expression diverser Zielgene reguliert.

1.3.2 Regulation der BMP Signaltransduktion

Eine genaue zeitliche und räumliche Koordination der BMP Signale ist in allen Schritten, von den frühen Entwicklungsabläufen bis zur Homöostase und Gewebeheilung des adulten Gewebes, notwendig. Um die zellulären Effekte der BMPs steuern zu können, haben sich eine Vielzahl von Regulationsmechanismen entwickelt, die an verschiedenen Stellen der BMP Signaltransduktion eingreifen. Die Modulatoren lassen sich grob in drei Gruppen einteilen: Extrazelluläre, membrangebundene und intrazelluläre Modulatoren.

1.3.2.1 Extrazelluläre Modulatoren:

Im extrazellulären Raum wurden eine Reihe von antagonistischen Faktoren identifiziert, welche die BMP Rezeptor Interaktion inhibieren. Die Faktoren können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

1. Die DAN-Familie: Zu dieser Familie gehören die Antagonisten Gremlin, das wichtige Funktionen während der Nieren- und Gliedmaßenentwicklung inne hat (HSU *et al.* 1998), das „*Uterine sensitization-associated gene-1*“ (USAG-1, Sclerostin) (SIMMONS and KENNEDY 2002), Cerberus (PICCOLO *et al.* 1999) und Coco (BELL *et al.* 2003).

2. Die Chordin Familie: Zu dieser Familie werden Chordin (PICCOLO *et al.* 1996) und Crim1 (WILKINSON *et al.* 2003) gezählt. Weitere wichtige Antagonisten sind „*Twisted Gastrulation*“ (TSG) (ROSS *et al.* 2001) und Noggin (GROPPE *et al.* 2002). Mit Hilfe dieser Modulatoren ist es möglich, sehr genau abgestufte BMP Gradienten zu generieren. Aufgrund der Interaktion einiger dieser Modulatoren untereinander ergeben sich eine Vielzahl weiterer Kontrollmöglichkeiten.

So ist beispielsweise bekannt, dass Sclerostin Noggin binden kann und so die inhibierende Wirkung beider Proteine aufgehoben wird (WINKLER *et al.* 2004). Im Falle von TSG hat die Wechselwirkung mit anderen BMP-Modulatoren noch drastischere Auswirkungen. TSG kann alleine an BMP-2 und BMP-4 binden und mit höherer Affinität als binärer Komplex mit Chordin. Auf der anderen Seite beschleunigt TSG die metalloprotease-katalysierte Spaltung (BMP-1) von Chordin, wodurch es als BMP Agonist fungiert (LITTLE and MULLINS 2004).

Zudem wurden sezernierte BMP Agonsiten beschrieben. Hierbei sind das „*Kielin/chordin-like protein*“ (KCP) und Crossveinless 2 (IKEYA *et al.* 2006) zu erwähnen. Crossveinless 2 wurden ebenfalls eine antagonistische Wirkung zugeschrieben (BINNERTS *et al.* 2004), sodass dieser Faktor BMP Signalwege vielseitig beeinflussen kann.

1.3.2.2 Membrangebundene Modulatoren:

Neben den sezernierten BMP Modulatoren wurden zudem membrangebundene BMP Antagonisten und Agonisten identifiziert.

Das Membranprotein „*BMP and Activin membrane-bound inhibitor*“ (BAMBI) bzw. das homologe Protein in Säugern „*Nma*“ gleichen in ihrem molekularen Aufbau den Typ I Rezeptoren, besitzen jedoch keine Kinasedomäne.

BAMBI interagiert mit den entsprechenden Typ II Rezeptoren und verhindert so die Bildung funktioneller BMP Rezeptor-Ligand Komplexe (ONICHTCHOUK *et al.* 1999).

Neben BAMBI wurde eine Reihe weiterer membranständiger Modulatoren der BMP Signalaktivität beschrieben, welche allerdings mit den BMP Typ I Rezeptoren interagieren und so die Ligandenbindung begünstigen. Diese GPI verankerten Proteine wie das „*repulsive guidance molecule*“ (RGMA), DRAGON (RGMB) und „*hemojuvelin*“ werden aufgrund ihrer Funktion als Agonisten oder Co-Rezeptoren beschrieben (BABITT *et al.* 2006; SAMAD *et al.* 2005), wobei neuere Untersuchungen zeigten, dass DRAGON *in vitro* BMP induzierte Signalwege ebenso inhibieren kann (KANOMATA *et al.* 2009). Eine Übersicht über die extrazellulären Regulationsmechanismen ist zu finden in (BALEMANS and VAN HUL 2002; BIER 2008).

1.3.2.3 Intrazelluläre Modulatoren:

Im Cytoplasma existieren neben den bereits erwähnten Mechanismen weitere Möglichkeiten, BMP Signalwege zu regulieren. Die wichtigsten intrazellulären Modulatoren sind die inhibitorischen Smad Proteine Smad-6 und Smad-7.

Smad-7 bindet an aktivierte Typ I Rezeptoren und hemmt so die Interaktion von R-Smads mit den Kinase Domänen der Rezeptoren kompetitiv. Smad-6 kann bereits in geringer Konzentration an Smad-1 binden und so die Interaktion des R-Smads mit Smad-4 blocken. In höherer Konzentration gehen beide inhibitorischer Smads dieselben biochemischen Interaktionen ein. Die Expression beider inhibitorischer Smads wird durch die BMP Stimulation geregelt, so dass die BMP induzierten zellulären Effekte einem negativen Feedback unterliegen.

Eine weitere Möglichkeit der Modulation BMP induzierter Signalwege stellt die E3 Ubiquitin Ligase Smurf-1 dar. Diese markiert die Rezeptor Smads 1 und 5 für die Degradation durch Proteasomen (ZHU *et al.* 1999), wird im Gegensatz zu den inhibitorischen Smads jedoch nicht durch BMP Signalewege reguliert, so dass hier eher davon ausgegangen werden kann, dass Smurf-1 das Basislevel an Smad-1/5 Proteinen reguliert. Eine detaillierte Beschreibung der intrazellulären Regulationsmechanismen ist zu finden bei (VON BUBNOFF and CHO 2001).

1.4 Plasmamembran

Die Plasmamembran stellt eine hochflexible und dennoch stabile Barriere dar, die das Zellinnere vom umgebenden Medium trennt. Bereits zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts konnte anhand isolierter Membranen nachgewiesen werden, dass diese zum Großteil aus amphiphilen Lipiden, Cholesterol und Proteinen aufgebaut ist. Bis zur Veröffentlichung des „Flüssig-Mosaik-Modells von Singer und Nicolson schrieb man der Membran anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen einen dreiteiligen Aufbau zu, wie im „Davson-Danielli-Modell“ postuliert (DAVSON and DANIELLI 1936; SINGER and NICOLSON 1972).

Das von Singer und Nicolson vorgeschlagene Modell beschreibt die Plasmamembran als eine Lipid-Doppelschicht mit integralen Proteinen, wobei sich die molekularen Komponenten der Membran ungehindert transversal und um die eigene Längsachse rotierend bewegen können. Des Weiteren, so wurde angenommen, liegen die einzelnen Bestandteile der Zelloberfläche zufällig verteilt vor.

Inzwischen ist das Bild der Plasmamembran als nichtregulierte Barriere, deren Bestandteile frei innerhalb der Membranebene diffundieren können, überholt. Statt dessen zeigten verschiedene experimentelle Ansätze, dass die Plasmamembran dynamisch reguliert wird und weitreichende Funktionen inne hat in Bezug auf eine Vielzahl zellulärer Abläufe wie diverser Aktivierungen, Ligand-Rezeptor Erkennungen, Antigen-Präsentationen und intrazelluläre Interaktionen (MOUREK *et al.* 2009; SENGUPTA *et al.* 2007; SMYTH and SHAW 2008; VEREB *et al.* 2003).

Während der Entwicklung hin zum adulten Gewebe durchlaufen Zellen komplexe Differenzierungsmechanismen, die sich unter anderem auch auf die Zusammensetzung der Plasmamembran auswirken. Beispielsweise bewirkt die Kopplung einer Fucose-Gruppe an Notch eine veränderte Rezeptor-Ligand Interaktion, wodurch während bestimmter Entwicklungsschritte die Zellmorphologie abgeändert wird (MOLONEY *et al.* 2000).

Durch die Kompartimentierung der Zelloberfläche mit Hilfe einer Reihe von Membrandomänen wie *Lipid Rafts*, *Synapsen*, „*Clathrin-Coated Pits*“ (CCPs), „*Caveolae*“, *Fokalen Adhäsionspunkten* und *Zell-Zell Verbindungen* können zelluläre Abläufe räumlich getrennt voneinander kontrolliert werden (LAUDE and PRIOR 2004; LOMMERSE *et al.* 2004). Eine weitere wichtige Funktion der Gliederung von Plasmamembranen in strukturell und funktionell distinkte Bereiche liegt in der Konzentrationserhöhung von Reaktionspartnern in den einzelnen Bereichen, wodurch bestimmte zelluläre Mechanismen effektiver ablaufen (HARTUNG *et al.* 2006; LAJOIE *et al.* 2009a).

So spezifizieren Membrandomänen wie „*Clathrin-Coated Pits*“ (CCPs) und „*Caveolae*“, die eine zentrale Rolle bei der Endozytose inne haben, durch selektive Aggregation von Proteinkomplex-Komponenten intrazelluläre Signale (MCPHERSON *et al.* 2001).

Lipid Rafts, die sich durch einen hohen Anteil an Sphingomyelin und Cholesterol auszeichnen, aggregieren ebenfalls bestimmte Proteine. Des weiteren determiniert die Endozytose von aktivierten Proteinkomplexen auf der Zelloberfläche die ausgelösten Signalkaskaden im Zellinneren (RAZANI *et al.* 2002). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass nach der Depletion bestimmter Endozytosemechanismen durch die Überexpression einer dominant-negativen Dynamin Mutante die „*Nerve Growth Factor*“ (NGF) induzierte Zelldifferenzierung geblockt wurde, während NGF Signale, die der Apoptose vorbeugen, verstärkt wurden. In diesem Fall führt das Signal, das durch Rezeptor-Ligand Interaktionen

auf der Zelloberfläche initiiert wird durch die Endozytose zu unterschiedlichen zellulären Effekten (ZHANG *et al.* 2000).

BMP Signalwege werden ebenfalls durch die Endozytose aktivierter Rezeptor-Ligand Komplexe beeinflusst. Zum einen werden Rezeptoren durch Endozytose von der Zelloberfläche entfernt und können auf diesem Weg inaktiviert werden, zum anderen scheint die Expressionsregulation von BMP responsiven Genen durch phosphorylierte Smad Proteine die Endozytose aktivierter Signalkomplexe zu benötigen (HARTUNG *et al.* 2006). Neben diesen Funktionen haben Plasmamembranen weitere Funktionen in Bezug auf die Zelladhäsion, Differenzierung sowie Kommunikation mit der Extrazellulären Matrix, um nur einige zu nennen.

1.4.1 Integration von Proteinen in Plasmamembranen

Plasmamembranen eukaryotischer Lebewesen sind hochkomplexe Zellstrukturen, welche aus Lipiden, Proteinen und Kohlehydraten aufgebaut sind. All diese Bestandteile interagieren, um die vielseitigen Funktionen, wie die Kommunikation von Zellen untereinander- oder mit der extrazellulären Matrix, der Ausbildung von Zell-Zell Kontakten oder dem selektiven Aufnehmen von Botenstoffen ausüben zu können (FUTERMAN *et al.* 1998).

Die Manipulation der Zelloberfläche kann zum einen wichtige Erkenntnisse darüber liefern, wie die Vielzahl biochemischer Abläufe an der Plasmamembran kontrolliert werden, also grundlegende funktionelle Informationen bereitstellen. Zum anderen ist sie auch in Gebieten der angewandten Biologie von Interesse, wie dem Einbringen bestimmter Wirkstoffe in das Zellinnere oder dem „*tissue engineering*“. Beispielsweise konnten Lee *et al.* durch die Integration von Zuckern, die eine Keto-Gruppe beinhalteten, bestimmte Adenovirusrezeptoren in Zellmembranen verankern und so genetisches Material viral in Zellen schleusen, die üblicherweise resistent sind gegen die Passage von Adenoviren (LEE *et al.* 1999).

Martin und Peterson benutzten des Weiteren N-Cholesterylglycin-gekoppelte Rezeptoren, die durch Endocytose Interaktionspartner ins Zellinnere schleusten (MARTIN and PETERSON 2003).

De Bank et al. nützen durch eine Periodat Oxidation entstandene Aldehydgruppen *in vitro* Membran-integrierter Sialinsäure, um Zellen mittels Biotin- und Avidin-Hydrazin Konjugaten zu *crosslinken*. Die so entstandenen dreidimensionalen Zellcluster sollen Ausgangspunkte sein für weitere biotechnologische Untersuchungen mit dem Ziel neuartiger Instrumente im Bereich des „*tissue engineering*“ (DE BANK *et al.* 2003). Eine Übersicht verschiedener Membranmodifikationen wird vorgestellt in (MA *et al.* 2007).

Neben der gerichteten Modifikation der Plasmembran ist es zudem möglich, selbstintegrierende Proteine zu generieren, um die Eigenschaften der jeweiligen Proteine innerhalb der Membran zu untersuchen. Da Zellmembranen räumlich stark begrenzte Interaktionsflächen darstellen, ist es nötig, exogene Moleküle mechanistisch quantifizierbar zu integrieren.

Insbesondere die Spezifität von Protein-Protein Interaktionen wird zum großen Teil durch die Konzentration der Bindungspartner bestimmt. Die Überexpression von Transmembranproteinen durch Gentransfer stellt demnach kein probates Mittel dar, die Proteinzusammensetzung der Zelloberfläche kontrolliert zu verändern. Die bisher entwickelten Methoden lassen sich in 3 Gruppen zusammenfassen:

- Integration extrahierter GPI-verankerter Proteine
- Modifikation der zu integrierenden Moleküle mit einer hydrophoben Gruppe
- Integration/Generierung membranständiger Moleküle mit reaktiver extrazellulärer Gruppe

1.4.1.1 Zellmembranintegration von GPI-Proteinen:

GPI-Anker stellen posttranslationale Modifikationen dar, mit deren Hilfe Proteine in die Plasmamembran integriert werden können. In Einzellern sind ein Großteil aller Membranproteine durch GPI-Anker in die Plasmamembran integriert, weswegen diese

Moleküle als evolutionär ursprüngliche Methode der Verankerung von Membranproteinen angesehen werden (CAPDEVILLE *et al.* 1987).

GPI Anker stellen kovalent verknüpfte, c-terminale Proteinmodifikationen dar, wobei die Kernstruktur hochkonserviert ist: alle GPI Anker bestehen aus einem Ethanolamin-Phosphat, einer Trimannose-Einheit, einer Glukosamin-Gruppe und einem Inositolphospholipid-Anker. Die Mannose-Einheiten 1 und 3 sowie die Inositolgruppe werden darüber hinaus modifiziert, wodurch die GPI Anker funktionell angepasst werden können.

Mit Ausnahme von Erythrozyten besitzen alle Säugerzellen GPI-Ankern mit je einer glycerolkonjugierten Alkyl- bzw. Acyl-Gruppe. In Erythrozyten besitzen die GPI Anker eine zusätzliche Fettsäure als Ankereinheit, wohngegen einige Einzeller, wie *Leishmania donovani* GPI Anker mit nur einer Acyl- oder Alkylgruppe aufweisen (IKEZAWA 2002).

Die Fähigkeit aus Plasmamembranen extrahierter GPI Proteine, sich spontan in Zellmembranen zu integrieren, wurde erstmals von Medof *et al.* anhand des „*decoy accelerating factors*“ (DAF) beschrieben (MEDOF *et al.* 1984).

GPI Anker Proteinen beinhalten C- und N-terminale Signalsequenzen, die sie für die Kopplung eines GPI-Ankers markieren, wobei der Anker kovalent mit dem C-Terminus verknüpft wird. Durch die Identifizierung der Signalsequenz ist es möglich, GPI-modifizierte, rekombinante Proteine *in vitro* in eukaryotischen Expressionssystemen herzustellen, durch Detergenzien zu extrahieren und aufzureinigen (ANEZ-ROJAS *et al.* 2006; BUMGARNER *et al.* 2005; FUTERMAN *et al.* 1998; GUTHER *et al.* 2001; MEDOF *et al.* 1996; ROJAS *et al.* 2008).

Die so gewonnenen Proteine integrieren sich in die Plasmamembranen von Zellen und sind funktionell aktiv. Der Nachteil dieser Methode liegt in den geringen Ausbeuten an GPI-Protein, der sich im ng- μ g Bereich bewegt. Des Weiteren sind *de novo* Synthesen von GPI modifizierten Peptiden beschrieben, die aber eine Festphasensynthese der Peptide voraussetzen (XUE *et al.* 2003).

1.4.1.2 Modifikation der zu integrierenden Moleküle mit einer hydrophoben Gruppe

Die Modifikation von Proteinen bedarf reaktiver Gruppen bestimmter Aminosäuren, wie Thiolgruppen von Cysteinen, Aminogruppen von Lysinen, oder Carboxylaten von einem Glutamat- oder Aspartat-Rest. So konnte die Gruppe von Teruyuki Nagamune mit Hilfe pegylierter Lipide, die eine endständige N-Hydroxysuccinimid-Gruppe aufwiesen, Proteine lysin-spezifisch lipidieren, wobei die Kopplung aufgrund des PEG-Linkers in wässriger Umgebung durchgeführt werden konnte (CHUNG *et al.* 2004; KATO *et al.* 2004).

Die so lipidierten Proteine integrierten sich ähnlich der GPI Proteine spontan in Zellmembranen.

Die spezifische Modifikation natürlicher Aminosäuren wird allerdings durch das multiple Vorkommen der reaktiven Aminosäuren innerhalb des Zielproteins eingeschränkt. Daher wurden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, nicht-natürliche Aminosäuren *in vitro* in Proteine zu integrieren, wie beispielsweise durch die Verwendung von Suppressor tRNAs und mutierten tRNA Synthetasen in zellfreien Expressionssystemen (OHNO *et al.* 2007; SAKAMOTO *et al.* 2002; SCHOFFELEN *et al.* 2008; UMANAH *et al.* 2009; YE *et al.* 2008). Problematisch hierbei ist die Effizienz der Stop-Codon Suppression und die geringen Ausbeuten an Protein. Eine Übersicht über verschiedene Strategien zur spezifischen Proteinmodifikation ist zu finden in (FOLEY and BURKART 2007).

Eine weitere Möglichkeit, Proteine an einer spezifischen Position zu modifizieren, konnte durch die Entdeckung der Inteine entwickelt werden. Inteine stellen Insertionen innerhalb verschiedener Proteine dar, die im Zuge eines autokatalysierten, translationalen Prozesses entfernt werden. Inteine wurden erstmal 1990 von P.M. Kane beschrieben (KANE *et al.* 1990), wobei inzwischen zahlreiche Beispiele in allen drei Domänen bekannt sind (GOGARTEN *et al.* 2002).

Über die Funktion der Inteine kann allerdings bisher nur spekuliert werden. Die Proteinbereiche, die N- und C-terminal vom Intein liegen, werden N-, bzw. C-Extein genannt und während der Spleißreaktion durch eine Peptidbindung verknüpft.

Definitionsgemäß wird die N-terminale Aminosäure des Inteins der Nummer 1 zugewiesen, zum C-Terminus wird der Wert entsprechend der Position angegeben. Die N-terminale,

Aminosäure des C-Exteins wird als +1 definiert, die nächste als +2 usw. Im N-Extein wird die Aminosäure am C-Terminus als -1 definiert, zum N-Terminus hin werden die Aminosäuren entsprechend ihrer Position absteigend nummeriert.

Der Spleiß-Mechanismus kann in vier Schritte gegliedert werden (XU *et al.* 1994), s. Abb. 1.4:

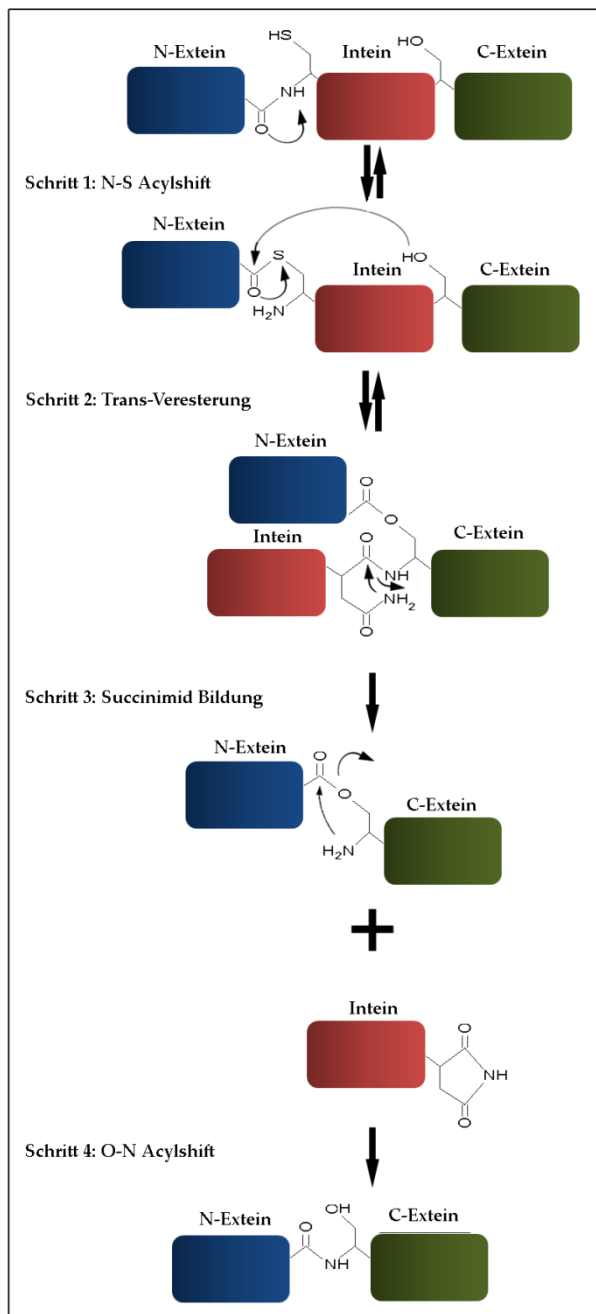


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Protein Spleiß- Mechanismus. Einzelheiten siehe Text.

Im ersten Schritt erfolgt eine spontane N-S, oder N-O Acylumlagerung durch das Cystein, bzw. Serin in Position 1, wodurch ein linearer Thioester generiert wird. Diese Umlagerung ist prinzipiell in jedem Protein möglich, da sie jedoch energetisch hochgradig ungünstig ist, läuft sie praktisch nicht ab.

Durch die Aufklärung der Struktur des MxeGyrA Inteins konnte gezeigt werden, dass die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren an Position -1 und 1 in einer instabilen *cis*-Konformation vorliegt (KLABUNDE *et al.* 1998) bzw. wie im Sce VMA Intein in einer verdrehten *trans*-Konformation (POLAND *et al.* 2000). Diese außergewöhnliche Konformation ermöglicht die Acylumlagerung in der Inteinkette.

Im zweiten Schritt erfolgt eine Umesterung durch einen nukleophilen Angriff der Aminosäure an Position +1 (Ser+1, Cys+1, Thr+1), was zu einem „verzweigten“ Thioester führt.

Die Struktur der Inteine begünstigt wiederum diese Reaktion, da die Peptidbindung zwischen -1 und 1 in direkter Nähe zur Seitenkette an +1 liegt. Im dritten Schritt folgen die Zyklisierung des Asparagins am C-Terminus des Inteins und die langsame Hydrolyse des Aminosuccinimids, wodurch das Intein abgespalten wird.

Im finalen vierten Schritt bildet sich durch eine weitere Acylumlagerung eine Peptidbindung zwischen beiden Exteinen aus. Die grundlegende Funktion des Inteins ist die Beschleunigung der ersten Acylumlagerung und der Asn-Zyklisierung (PERLER 2006).

Die Sequenz und Struktur der Exteine ist für die Spleiß-Reaktion relativ unbedeutend. Lediglich die Aminosäure an Position -1 spielt für die initiale Acylumlagerung eine wichtige Rolle, wobei die Präferenz für bestimmte Reste vom jeweiligen Intein abhängt. So konnte die Spleißreaktion in heterologen Systemen ebenfalls nachgewiesen werden, die Effizienz der Spaltung war dabei lediglich 5-10fach geringer als im homologen System (DAVID *et al.* 2004; NOREN *et al.* 2000; PAULUS 2001).

Durch Mutation des Asparagins am C-Terminus des Inteins sowie der Aminosäure an Position +1 kann die Spleißreaktion nach dem ersten Schritt blockiert werden, wodurch Inteine eine Reihe von Anwendungen ermöglichen, wie der Aufreinigung von Proteinen, Kopplungsreaktionen und Protein-Zyklisierungen (PERLER 2006).

Der lineare Thioester zwischen dem C-Terminus des N-Exteins und dem N-Terminus des Inteins kann anschließend durch ein niedermolekulares Thiolreagens gespalten werden, wodurch ein Thioester mit guter Abgangsgruppe generiert wird.

Abschließend ist es möglich, ein beliebiges Molekül mit einem terminalen Cystein an den C-Terminus des Exteins zu koppeln, wobei sich wiederum eine stabile Peptidbindung ausbildet. Inzwischen sind prokaryotische Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die die Aufreinigung von Intein-Fusionsproteinen und die positionsspezifische Modifikationen eines beliebigen Zielproteins ermöglichen.

So konnte beispielsweise die Arbeitsgruppe von Herbert Waldmann Ras und Rab Proteine am C-Terminus durch die Verwendung von Inteinen Lipidieren (ALEXANDROV *et al.* 2002; GOTTLIEB *et al.* 2006). Eine Übersicht über verschiedene Intein-Anwendungsmöglichkeiten wird beschrieben in (PERLER 2006).

1.4.1.3 Integration/Generierung membranständiger Moleküle mit reaktiver extrazellulärer Gruppe

Neben der direkten Modifikation von Proteinen mit lipophilen Gruppen, welche eine spontane Integration in Plasmamembranen von Zielzellen ermöglichen, ist die Integration, bzw. die Generierung von membranständigen Molekülen, welche eine reaktive, extrazelluläre Gruppe beinhalten, eine weitere Möglichkeit, definierte Mengen Protein an Zellmembranen zu koppeln.

Eine Möglichkeit, Proteine an Zellmembranen zu binden stellt die chemische Modifikation endogen vorliegender, integraler Moleküle dar. Beispielsweise ist es möglich, durch eine Neuramidase-Behandlung die Sialsäure von Oligosacchariden zu entfernen und in einem zweiten Schritt die nun exponierten Galactosamin- oder *N*-Acetylgalactosamin-Gruppen zu oxidieren, um reaktive Aldehydgruppen zu generieren (LEMIEUX and BERTOZZI 1998; LEMIEUX and BERTOZZI 2001).

Eine andere Möglichkeit besteht in der Periodat-vermittelte Oxidation der Sialsäure selbst. Weitere interessante chemische Gruppen, die endogen nicht auf Zelloberflächen zu finden sind, stellen Ketone und Azide dar. Diese reaktiven Gruppen können als Vorläufermoleküle in Form modifizierter Sialsäuren von Zellen aufgenommen und metabolisiert werden, wodurch die integralen Membranbausteine mit den Keton bzw. Azidgruppen entstehen. Diese Moleküle mit den „Ankergruppen“ stehen anschließend für Kopplungsreaktionen ohne weitere chemische Modifikation zur Verfügung (MAHAL *et al.* 1997).

Neben der Modifikation endogen vorliegender Membranbestandteile bietet die Fusion von Liposomen mit zellulären Plasmamembranen eine weitere Möglichkeit, exogene Moleküle in Zellmembranen zu integrieren (HIGASHI *et al.* 1996; STEBELSKA *et al.* 2007; ZHUKOVSKY *et al.* 2006).

Aufgrund der stabilen Interaktion von Metallionen mit Oligohistidinsequenzen beliebiger Proteine stellen Lipide mit dem Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (NTA als polare Kopfgruppe eine interessante Möglichkeit dar, Proteine an Membranen zu koppeln (ALONSO *et al.* 2008; HOCHULI *et al.* 1987; LATA *et al.* 2006b; LATA *et al.* 2005).

Mit Hilfe von Chelatlipiden als Bestandteil künstlicher, planarer Membranen konnte die Bindung von Proteinen an eine Membran *in vitro* untersucht werden (DORN *et al.* 1998).

Durch die Kombination spektroskopischer Verfahren und dem „*Fluorescence resonance energy transfer*“ (FRET) wurde mit Hilfe von Chelatlipiden verschiedene Aspekte der Rezeptor-Ligand Interaktionen in einem zweidimensionalen Membranmodell gemessen (GAVUTIS *et al.* 2006b).

Darüber hinaus zeigte die Gruppe von Joseph Altin, dass Liposomen aus Palmitoyl-Oleyl-Phosphatidylcholin und einem Chelatlipid mit Zellmembranen fusionierten und die integrierten Chelatlipide nach der Komplexierung bivalenter Metallkationen als Membrananker Proteine mit Histidintag auf der Zelloberfläche binden konnten (VAN BROEKHOVEN and ALTIN 2002; VAN BROEKHOVEN *et al.* 2000).

Liposomen bestehen aus dispergierten Lipiden, die in Vesikeln aus einer oder mehrerer Lipiddoppelschichten organisiert sind. Je nach Größe und Anzahl der Lipidschichten werden Liposomen als „*small unilamellar vesicles*“ (SUV) (\emptyset kleiner als 100nm, eine Lipidschicht), als „*large unilamellar vesicles*“ (LUV) (\emptyset 100-100 μ m, eine Lipidschicht) oder als „*large multilamellar vesicles*“ (LMV) (\emptyset 10 μ m und mehr, mehrere Lipidschichten) definiert. Die Integration von Chelatlipiden bedingt die Fusion der Liposomen mit Zellmembranen. Die Mechanismen, die der Fusion zu Grunde liegen, sind trotz zahlreicher Computersimulationen, theoretischer Modelle und experimenteller Daten wenig verstanden. In Abbildung 1.5 ist schematisch die Fusion zweier Membranen nach dem bisherigen Wissensstand abgebildet. Membranfusionen spielen in einer Vielzahl physiologischer Abläufe eine wichtige Rolle, wie beispielsweise bei der Übertragung von Aktionspotentialen an Synapsen, verschiedenen Endozytosewegen oder bei der Vermehrung diverser Viren. Dabei laufen Fusionen *in vivo* nicht spontan ab, sondern werden durch verschiedene Mechanismen voran getrieben, beispielsweise durch Proteine wie Synaptotagmin oder das Glykoprotein von *herpes simplex*. Eine Übersicht über verschiedene Fusionsprozesse ist zu finden bei (WICKNER and SCHEKMAN 2008).

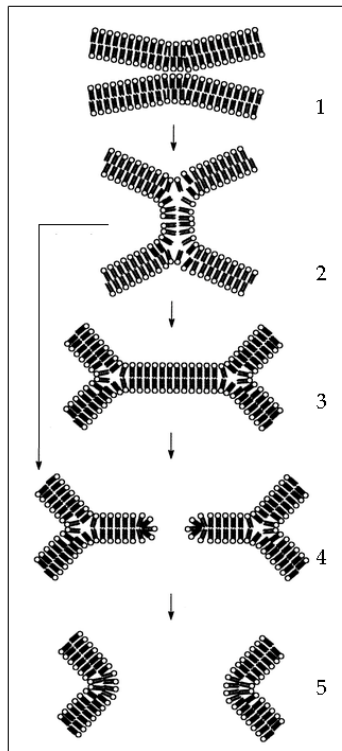


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung eines Membranfusionsprozesses. Durch direkten Kontakt kommt es zu punktuellen Ausbuchtungen. Hemifusion durch Bildung einer Stielartigen Struktur („hemifusion stalk“, HS). Durch die Ausdehnung des HS entlang der Membranebene kommt es zur Bildung des sog. „hemifusion diaphragm“, HD. Bildung der Fusionspore. 2 Mechanismen der Bildung der Fusionspore sind beschrieben: Entweder die Fusionspore wird direkt aus HS gebildet, oder es erfolgt der Zwischenschritt über das HD. Die Fusion ist vollständig abgelaufen. Quelle: Royal Society of Chemistry; <http://www.rsc.org/ej/P2/2001/b101370j/b101370j-f8.gif>

Durch Versuche mit Liposomen, deren Lipidzusammensetzung derer eukaryotischer Zellen gleich, konnte gezeigt werden, dass selbst langzeitige Membrankontakte keine Fusion auslösten (CHERNOMORDIK and KOZLOV 2008).

In den letzten 30 Jahren konnten jedoch eine Vielzahl Verfahrensweisen ermittelt werden, die Membranfusionen *in vitro* voran treiben können. Neben der Zusammensetzung der zu fusionierenden Membranen können bestimmte Proteine, die verschiedene Fusionsprozesse *in vivo* katalysieren, aufgereinigt und in Liposomen integriert werden. Die resultierenden Liposomen „fusogenic liposomes“ (FL) fusionieren spontan mit Plasmamembranen und schleusen das Liposomeninnere in das Cytoplasma. Ein gut beschriebenes Beispiel hierfür ist der Einbau von *Sendai Virus* Partikeln in SUVs (CHERNOMORDIK and KOZLOV 2008; NAKANISHI and MIZUGUCHI 1998; NAKANISHI *et al.* 1999).

Weitere Möglichkeiten bestehen in der Zugabe bivalenter Metallkationen (PAPAHADJOPOULOS *et al.* 1976b), Detergenzien (PAPAHADJOPOULOS *et al.* 1976a) oder von Polyethylenglykol (PEG), das bereits vor ca. 30 Jahren verwendet wurde, um Zell-Zell Fusionen zu initiieren (AHKONG *et al.* 1975). Im Gegensatz zur Zugabe von Metallionen oder

Detergenzien, die zu unerwünschten Nebeneffekten führten, konnte inzwischen gezeigt werden, dass PEGs einzig durch die Verringerung des Volumens zwischen zwei Membranen die Fusion vorantreibt. Zudem zeigten weitere Experimente, dass PEG Zwischenzustände der Fusion (s. Abb. 1.5) stabilisieren kann (LENTZ 2007; MALININ *et al.* 2002).

Aufgrund der geringen Toxizität und der hohen Effizienz von PEGs verschiedener Molekulargewichte Fusionen einzuleiten, stellt dieses Polymer eine weit verbreitete Möglichkeit dar, Fusionsprozesse zu simulieren und zudem Fusionsprozesse methodisch anzuwenden.

2 Zielsetzung der Arbeit

BMPs vermitteln ihre zellulären Effekte nach Bindung an die entsprechenden membranständigen Rezeptoren. Verschiedene Aspekte der Ligand-Rezeptor Interaktion innerhalb dieser Proteinfamilie konnten durch Mutagenesestudien, Strukturaufklärungen verschiedener Liganden, Rezeptoren und Rezeptor-Ligand Komplexe sowie durch die Verwendung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) Spektroskopie geklärt werden.

Ins besondere die SPR-Technologie ermöglicht detaillierte Studien verschiedener Aspekte der Ligand-Rezeptor Interaktion. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die ermittelten Affinitäten in SPR-Experimenten und zellbasierten Assays teilweise erheblich voneinander abwichen.

SPR Messungen können die verschiedenen Phasen der Protein-Protein Interaktion (Bindung, Fließgleichgewicht, Dissoziation) in Echtzeit darstellen, wodurch sich weit reichende Möglichkeiten ergeben.

Die Kombination der SPR Technologie und künstlicher Membranen ermöglicht Interaktionsstudien in einem dynamischen zweidimensionalen Raum, jedoch ist es nicht möglich, Zellmembranen derart nachzustellen, dass sie alle biophysikalischen Eigenschaften besitzen, welche Protein-Protein Interaktionen beeinflussen können (s. Einleitung).

Um die Ligand-Rezeptor Interaktion auf Zelloberflächen möglichst wirklichkeitsgetreu nachzustellen, sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene methodische Ansätze entwickelt und evaluiert werden, BMP Rezeptortodomänen quantifizierbar in Zellmembranen zu integrieren. Die Bindungseigenschaften derart generierter künstlicher „Decoy-Rezeptoren“ können anschließend mit Hilfe von Zellassays analysiert werden.

Auf diese Weise sollen in Zukunft wichtige offene Fragen bezüglich der Affinität von BMP Rezeptoren in Plasmamembranen und der Bildung funktioneller Ligand-Rezeptor Komplexe beantwortet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAA	Bis-Acrylamid
BAM	Biocompatible anchor for membranes
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR-1A/B	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A/B
BMPR-2	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CBD	Chitin binding domain
cDNA	kodierende DNA

cpm	Counts per minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHPE	1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphoethanolamine
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
h	human
HBS	Hepes gepufferte Salzlösung
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N''-2- ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs Flüssigkeits Chromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl Transferase
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- α -thiogalaktosid

Kan	Kanamycin
LB	Luria Broth
M	Marker
MOI	Multiplicity of infection
MW	Molekulargewicht
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n.red	nicht reduzierend
NTA	Nitrilotriessigsäure,
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel-elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglykol
pfU	Plaque forming unit/Plaque bildende Einheit
POPC	Palmitoyl-Oleyl-Phosphatidylcholine
P/S	Penicillin/Streptomycin
red.	reduzierend
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSmad	Rezeptor Smad

RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz Einheit „resonance unit“
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf-9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9
SPR	Surface plasmon resonance
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
Tet	Tetracyclin T
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	Transforming Growth Faktor
Tris	Tris-hydroxymethylamino-ethan
Trx	Thioredoxin
ÜNK	Übernachtkultur
ÜTK	Übertagkultur
VA	Virusamplifikation
WB	Western Blot

- MM 294: ATCC 39607 F- supE44 hsdR17 endA1 thi-1 lambda

3.2.3 Vektoren:

3.2.3.1 Prokaryotische Vektoren:

- modifizierter pET32a: (Novagen) Grundgerüst: T7 Promotor; lacI Sequenz; Thioredoxin A (N-terminal); His-6 Tag Modifikation (Kirsch et al. 2000): durch die Deletion der Basenpaare 223 bis 297 aus dem originalen Vektor ist die Position der Thrombinschnittstelle unmittelbar vor das Zielgen verschoben.

- IMPACT pTWIN1: (NEB) Grundgerüst: T7 Promotor; lacI Sequenz; Ssp DnaB Intein (N-terminal); MxeGyrA (C-terminal)

3.2.3.2 Eukaryotische Vektoren:

- modifizierter pBAC3(Novagen) Grundgerüst: f1 ori, polh Promotor, AmpR, gp64 Signalpeptid, His6-Tag, S-Tag. Modifikation (Kraich, Michael): Durch Mutation der Basenpaare 1376-1378 wurde eine BamHI-Schnittstelle unmittelbar hinter der internen Thrombinschnittstelle eingefügt. Eine weitere Mutation (bp 1487) zerstörte eine bereits im Vektor vorhandene BamHI-Schnittstelle.

3.2.4 Rekombinante Proteine:

- BMP-2 *E.coli*; rekombinant; human; Prof. Dr. W. Sebald (Ruppert, R. et al., 1996)

3.2.5 Proteingrößenstandards:

Für die Bestimmung des Molekulargewichts in SDS-PAGEs und Western-Blots wurden verschiedene Größenstandards eingesetzt:

SDS-PAGE		
Protein	Molekulargewicht	Konzentration[$\mu\text{g}/5\mu\text{l}$]
Phosphorylase b	97	0,67
Albumin	66	0,83
Ovalbumin	45	1,47
Carbo-Anhydrase	30	0,83
Trypsin-Inhibitor	20,1	0,8
a-Lactalbumin	14,4	1,16

Tabelle 2.1: SDS-PAGE Größenstandard

Western Blot	
Protein	Molekulargewicht
α 2-Macroglobulin	180
β -Galactosidase	116
Fructose-6-Phosphat Kinase	84
Pyruvatkinase	58
Fumarase	48,5
Lactic Dehydrogenase	36,5
Triosephosphat Isomerase	26,6

Tabelle 2.2: Western-Blot Größenstandard

3.2.6 Medien und Lösungen für die prokaryotische und eukaryotische Zellkultur

Prokaryonten

5×ENB-Medium 40g/l Nutrient broth.

25g/l Bacto-Trypton

7,5 g/l KH₂PO₄

17,5 g Na₂HPO₄

25 g/l NaCl.

ENB-Platten 7,5 g Agar in 400ml dH₂O → autoklavieren

Wenn die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt ist werden auf 100ml

5×ENB zugegeben:

1,25ml 40%ige Glucose-Lösung

250µl Thiamin c(100mg/ml)

Antibiotika

Die Lösung wird in Petrischalen gefüllt und nach dem vollständigen Erstarren bei 4°C gelagert

LB-Medium 10g/l Bacto-Trypton

5g/l Hefe-Extrakt

10g/l NaCl

→ pH: 7.5

Material und Methoden

10x Phosphatpuffer(Pi)	170mM KH_2PO_4 720mM K_2HPO_4
SOC-Medium	20g/l Bacto-Trypton 5g/l Yeast-Extract 0,19g/l KCl → autoklavieren; direkt vor Gebrauch zugeben: 10µl/ml 1M MgSO_4 , 10µl/ml 1 M MgCl_2 und 10ml 40% Glucose
TB-Medium	13,3g/l Bacto-Trypton 26,6 g/l Yeast-Extract 4,4ml/l Glycerin → autoklavieren; direkt vor Gebrauch 1:10 (v/v) Pi-Puffer zugegeben.
TSS	85% LB-Medium 10% PEG (w/v, MW: 8000) 5% DMSO 50mM MgCl_2

Eukaryoten

ALP1 100mM Glycin, pH9,6

1% NP-40

1mM MgCl₂

1mM ZnCl₂

ALP2 100mM Glycin, pH 9,6

1mM MgCl₂

1mM ZnCl₂

0,2mg pNPP (auf 100µl Gesamtvolumen)

DMEM (Gibco) „Dullbecco´s Modified Eagle Medium“

Präparation nach Anleitung des Herstellers, steril filtriert.

FCS (Life Technologies) Additiv zum Zellkulturmedium

HAM-F12 (Gibco) F-12 Nutrient Mixture (Ham)

IPL-41 (HyClone)

Präparation nach Anleitung des Herstellers, steril filtriert.

Material und Methoden

L-Glutamin (Biochrom)	Additiv zum Zellkulturmedium
Penicillin (Biochrom)	Additiv zum Zellkulturmedium (Endkonzentr.: 100 U/ml)
Streptomycinsulfat (Biochrom)	Additiv zum Zellkulturmedium (Endkonzentr.: 100 µg/ml)
Trypan Blau (Biochrom)	1:4 verdünnt mit PBS
10×Trypsin	0,5% Trypsin (Biochrom) 0,2% EDTA in PBS → steril filtriert.
TNE-Lysispuffer	20mM Tris-HCl, pH:7,4 150mM NaCl 1%(v/v) Triton X-100 1mM EDTA 50mM NaF 10mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1mM Na ₃ VO ₄ 1 Tablette Complete Protease Inhibitors (/50ml)

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Steriles Arbeiten:

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen werden an einer Sterilbank durchgeführt. Vor jeglichen Arbeitsschritten werden die Hände und die Arbeitsfläche mit einer 70%igen Ethanollösung gereinigt. Alle verwendeten Lösungen und Materialien werden vor dem Gebrauch durch Autoklavieren für 30 min bei 120°C und 1,2 bar (Sterico Vapoklav Dampfsterilisator) oder durch Filtration (Porendurchmesser 0,2µM) sterilisiert. Die verwendeten Arbeitsmaterialien werden vor jedem Arbeitsschritt abgeflammt.

3.3.2 Insektenzellkultur

Die Zelllinie *Sf-9* (*Spodoptera frugiperda*) wird in IPL41-Medium mit 5% FCS und 10% P/S als Monolayer oder in Suspension bei 27°C kultiviert.

3.3.2.1 Monolayer-Kultur

Die Kultivierung der Insektenzellen als Monolayer erfolgt in 175cm²-Zellkulturflaschen. Nach Erreichen der Konfluenz werden adhärente Zellen durch einige Schläge auf die Flaschenkante vom Boden abgelöst und auf neue Flaschen aufgeteilt.

3.3.2.2 Suspensions-Kultur

Für Virusamplifikationen und Expressionen werden die *Sf-9* Zellen als Suspensionszellen in Rollerflaschen kultiviert. Zellen aus konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen werden in Rollerflaschen überführt, die Zelldichte auf 1,5×10⁶ Zellen/ml eingestellt und in einem

Brutschrank mit Drehvorrichtung inkubiert. Bei einer Zelldichte von $2,5-3 \times 10^6$ Zellen/ml werden die Zellen auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

3.3.3 Säugerzellkultur:

Die Kultivierung von ATDC5 Zellen erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator. MPC11 Zellen werden bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Für die Subkultivierung werden MPC11 Zellen, die in Suspension wachsen durch Verdünnung der Zellen mit neuem Medium subkultiviert. Die adhärent wachsenden ATDC5 Zellen werden bei ca. 80% Konfluenz mit 2x Trypsin abgelöst und in neue Kulturflaschen überführt. Die verwendeten Medien der einzelnen Zellstämme sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Zelltyp	Wachstumsmedium
ATDC5	Ham F12 + DMEM (1:1), 1% P/S, 2mM Gln, 5% FCS
MPC11	DMEM, 1% P/S, 1mM Natrium-Pyruvat, 4mM Gln, 10%FCS
C2C12	DMEM, 1% P/S, 1mM Natrium-Pyruvat, 4mM Gln, 10%FCS

Tabelle 2.3: Kulturmedien der verwendeten Zelllinien

3.3.4 Zellassays:

Smad-Assay

2×10^5 Zellen pro Well werden in einer 6 Well Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellmedium abgesaugt und für eine weiter eintägige Inkubation durch FCS-freies DMEM-Medium ersetzt. Anschließend werden die Zellen mit

der jeweiligen Menge BMP-2 für verschiedene Zeiten stimuliert. Nach der Stimualtion folgt ein zweimaliger Waschschrift mit PBS. Daraufhin werden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, pelletiert und der Überstand verworfen. Die abschließende Lyse der Zellen wird in TNE-Puffer für 20 Minuten auf Eis durchgeführt.

Die Lysate werden anschließend abzentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße pipettiert. Die Proteinmengenbestimmung erfolgt mittels BCA-Assay. Um die Menge phosphorylierter Smad Proteine zu ermitteln, wird ein Western Blot mit einem PSmad reaktivem Antikörper durchgeführt.

3.3.5 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Für die Quantifizierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP Assay) in Abhängigkeit von verschiedenen Stimulatoren/Inhibitoren werden $1,2 \times 10^4$ C2C12-Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag werden die Zellen in Hungermedium (DMEM, 2% Serum) mit den entsprechenden Proteinen für 72h stimuliert. Es folgt die Zell-Lyse durch Zugabe von je 100 μ l ALP1. Die enzymatische Reaktion wird durch Zusatz von 100 μ l ALP 2 gestartet. Die Messung der enzymatischen Aktivität wird an einem ELISA-Reader bei 405 nm durchgeführt.

3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

MOWIOL

20 g Mowiol4-88 in 80 ml PBS, pH: 7,4, über Nacht rühren

40 ml Glycerin zugeben, über Nacht rühren

Zentrifugation der Lösung für eine Stunde bei maximalen rpm

→ aliquotiert bei -20°C lagern

Um bestimmte Antigene in Zellen zu lokalisieren, werden Zellen auf Deckgläschen in PBS gewaschen und sofort mit 4%iger Formaldehyd oder 4%iger Paraformaldehyd Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit einer 0,5%igen Triton-X Lösung in PBS für 5 Minuten permeabilisiert. Nach dem erneuten Waschen der Zellen mit PBS wurden diese in einer Feuchtkammer für eine Stunde mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in PBS entfernt und anschließend werden die fixierten Zellen mit dem fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper für 30 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift für je fünf Minuten in PBS werden die Zellen in MOWIOL eingedeckelt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Poly-L-Lysin Beschichtung von Deckgläschen:

Deckgläschen mit einem Durchmesser von 10 Millimetern werden kurz in Ethanol getaucht und in sterilem Wasser gewaschen. Anschließend werden sie in einer 1:10 mit sterilem Wasser verdünnten Poly-L-Lysine Hydrobromide Lösung (Sigma-Aldrich) für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach getrocknet. Nach dreimaligem Waschen in sterilem PBS werden die Deckgläschen bei 4°C gelagert.

3.5 Bestimmen des Zelldurchmessers am Coulter-Counter

Um schnell eine große Anzahl an Zellen vermessen zu können, werden Zellen mit dem Coulter Counter vermessen. Bei diesem Gerät steht eine dünnwandige Glasröhre, in welche die zu vermessende Zellsuspension gepumpt wird, mit einem Flüssigkeitsreservoir über ein mikroskopisch kleines Loch mit definiertem Durchmesser in Verbindung. Der Flüssigkeitsstand in der inneren Glasröhre ist dabei höher als der des umgebenden Gefäßes, sodass die Flüssigkeit aus der inneren Röhre langsam durch das Loch nach außen strömt. Zudem besitzen beide Gefäße eine Elektrode ((-) innen, (+) außen), sodass neben der Flüssigkeit mit den zu analysierenden Zellen, auch Elektronen von Innen nach Außen

wandern. Über zwei weitere Elektroden im Inneren kann das Gerät eine vorgegebene Flüssigkeitsmenge abmessen. Jede Zelle, die das Loch passiert, erhöht kurzfristig den Widerstand des Stromflusses, wobei die Widerstandserhöhung proportional zur Größe des zu messenden Partikels ist, hier der Zelle. Auf diese Weise kann das Gerät die Gesamtzahl an Zellen in einem vorgegebenen Flüssigkeitsvolumen bestimmen und zudem Aussagen über die Größenverteilung liefern, wobei bis zu 300.000 Partikel pro Sekunde gezählt werden können.

Die Zellen werden 1: 200 verdünnt und mit dem Coulter Counter vermessen.

3.6 Molekularbiologische Methoden

Klonierung von ActR-2Becd_MxeGyrA

Aus dem Plasmid pET32a[TRX-ActR-2B] wird mittels spezifischer Primer die gesamte Expressionskassette bestehend aus dem Thioredoxin, der Thrombin-Spaltstelle, dem hexa-Histidin-tag und der ActR-2Becd mit einer PCR amplifiziert. Nach der Gelextraktion des Amplifikats wird das Expressionsplasmid pTWIN1 und das PCR-Produkt mit den Restriktionsendonukleasen *SapI/XbaI* für eine Stunde bei 37°C verdaut. Die einzelnen Ansätze werden wiederum auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und extrahiert. Anschließend folgt die Ligation des linearisierten Vektors und des Inserts im Mengenverhältnis 1:3 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Amplifikation der rekombinierten DNA wurde diese in den *E.Coli* Stamm MM294(DE3) transformiert und auf eine Selektivplatte ausgestrichen. Von 10 Klonen wird eine Kolonie-PCR angefertigt und von 3 positiven Klonen eine DNA Plasmid-Minipräparation durchgeführt. Die Korrektheit der Plasmide wird durch eine Sequenzierung (Service der Humangenetik, Biozentrum der Universität Würzburg) überprüft. Aus einem fehlerfreien Klon wird eine DNA Plasmid-Maxipräparation hergestellt und die gewonnene DNA in den Expressionsstamm transformiert.

3.7 Expression rekombinanter Proteine in *E. Coli*

Waschpuffer: 20mM Tris-HCl pH 7,5

150mM NaCl

Antibiotika: Ampicillin: Stock: 50mg/ml in H₂O

Tetracyclin: Stock 12,5mg/ml in H₂O

Kanamycin: Stock: 30mg/ml in H₂O

→ alle Antibiotika werden in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt

Schüttler:	Braun Certomat RM
Zentrifuge:	Sorvall RC C5 / Beckmann J2-21
Rotor:	Beckmann JA-10 / Sorvall SLA-3000

Zur Fermentation werden 10 Schüttelkolben mit je 800ml TB-Medium (s. 2.2.6) inklusive der entsprechenden Antibiotika mit einer Übernachtskultur (Inkubation bei 37°C) angeimpft (20ml Kultur auf 800ml Medium) und bei 30°C und ca. 120rpm geschüttelt. Um Schaumbildung vorzubeugen, wurde jedem Ansatz 0,2ml 10%ige AntiFoam Emulsionslösung zugesetzt. Ab einer OD₅₅₀ von ca. 0,4 werden die Fermentationsansätze auf Raumtemperatur (21°C) abgekühlt und die ca. 16 stündige Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Die Expression wird beendet, indem die Zellen bei 4°C für 10 Minuten bei 6000rpm abzentrifugiert werden. Die sedimentierten Bakterien werden mit Hilfe eines Pinsels in gekühltem Waschpuffer resuspendiert und wiederum für 10 Minuten bei 4°C und 6000rpm zentrifugiert. Das Feuchtgewicht der pelletierten Bakterien wird anschließend bestimmt und diese bei -80°C aufbewahrt.

Zellaufschluss

Resuspensionspuffer:	20mM Tris-HCl, pH 7,9
	500mM NaCl
	5mM Imidazol
Sonotrode:	System 585, Ultraschallkopf 512/1204 (KLM)

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

Das bei -80°C gelagerte Bakterienpellet wird in 10 Volumenteilen (w/v) Resuspensionspuffer bei 4°C resuspendiert. Die Suspension wird anschließend in eine Glasrosette in 5 Intervallen zu je 30s bei 300W beschallt. Zwischen den Intervallen wird der Schallkopf auf Eis gekühlt, um eine konstante Leistungsabgabe zu gewährleisten. Nach dem Aufschluss wird das Lysat durch Ultrazentrifugation bei 18°C und 40000rpm geklärt. Der Überstand enthält das lösliche Fusionsprotein und kann weiter prozessiert werden.

3.8 Expression rekombinanter Proteine in SF9-Zellen

3.8.1 Plaque Assay

Mit Hilfe des Plaque Assays können einzelne Virenklone isoliert oder der verwendete Virentiter bestimmt werden. In einer „6-well“ Zellkulturplatte Platte werden in jede der 6 Schalen $1,2 \times 10^6$ SF9 Zellen in einem ml SF9-Medium ausgesät und für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Anschließend wird das Zellmedium abgesaugt und durch eine Virusverdünnungsreihe von 1×10^{-1} – 1×10^{-6} Viren/ml Medium ersetzt. Nach einer erneuten einstündigen Inkubation bei 27°C wird der Überstand abgesaugt und mit einem Gemisch aus 700 μl FCS, 6,6ml 1,3 \times SF-900 Medium und 3,3ml 2,7% Seaplaque-Agarose (0,54 g SeaPlaque®-Agarose (BioRad) durch Autoklavieren in 20ml ddH₂O gelöst) überschichtet. Die Kulturplatte wird anschließend in einer mit Parafilm isolierten Feuchtkammer für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Die Plaques können anschließend durch die Reduktion von MTT in Formazan sichtbar gemacht werden. Durch die Division der Anzahl der Plaques durch die jeweilige Verdünnung erhält man so den Virustiter.

3.8.2 Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Um für die Expression rekombinanter Proteine in SF9 Zellen ausreichende Mengen rekombinanter Baculoviren zu generieren, wurden vier Virenamplifikationen durchgeführt.

Für die erste Virusamplifikation (VA) werden je $1,5 \times 10^6$ Zellen/Schale auf einer „6-well“-Platte ausgesät, für eine Stunde inkubiert und anschließend mit rekombinanten Baculoviren infiziert. Nach vier Tagen Inkubationszeit bei 27°C wird der Überstand abgenommen und die Viren durch eine Zentrifugation für 5min bei 1000rpm pelletiert. Die Herstellung der zweiten VA wird analog zur ersten Amplifikation in einer „6-well“-Platte mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/Schale durchgeführt. Mit Hilfe eines Western Blots wird der Klon ermittelt, der die höchste Expressionsrate des rekombinanten Proteins aufweist. Zur Erzeugung des dritten Virusstocks wird der Klon mit der stärksten Expression gewählt und 4×10^7 Zellen in einer 175cm^2 - Zellkulturflasche mit den rekombinanten Viren für 4 Tage kultiviert. Die vierte Virenamplifikation wird im 100ml Maßstab in einer „Rollerbottle“ durchgeführt. Hierfür werden $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 5 ml der dritten VA infiziert und für 4 Tage bei 27°C inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 1000rpm für fünf Minuten wird die vierte VA geklärt und die rekombinanten Viren im Dunkeln bei 4°C gelagert.

3.8.3 Expression in SF9 Zellen

Pro Rollerflasche werden maximal 300ml Zellsuspension ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit $3 \times \text{MOI}$ (3 pfU/Zelle) der vierten VA infiziert und bei 27°C für vier Tage inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 6000rpm pelletiert und der Überstand gegen Waschpuffer (s. 2.7) für die nachfolgende Metall-Affinitätschromatographie dialysiert.

Vorsäulenmaterial:	Sephacryl S-100 (Pharmacia)
Säulenmatrix:	Chelating Sepharose® FF (Pharmacia)
Säulenkartuschen:	Econo-Column Glassäule (BioRad)
Pumpe:	Minipuls 3 (Gilson)
	Detektor 2210 Recorder 2-Channel, 2238 Uvicord SII (LKB Bromma)
Fraktionssammler:	Model 203 Gilson
Flussrate:	2,5ml/min

Die Metall-Affinitätschromatographie an der Ni²⁺-komplexierten Chelating Sepharose wird bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Zunächst werden 10ml Chelating Sepharose in eine Econo-Glassäule gefüllt und mit 10 Säulenvolumen (SV) (100ml) H₂O gewaschen. Im nächsten Schritt wird die Sepharose mit 5 SV einer 50mM NiCl₂-Lösung beladen und anschließend mit 100mL Auftragspuffer equilibriert. Zusätzlich werden ca. 2ml Sephacryl S-100 Sepharose in eine weitere Econo-Säule gefüllt, ebenfalls mit Auftragspuffer equilibriert und der Ni²⁺-komplexierten Chelating-Sepharose vorgeschaltet. Im nächsten Schritt kann das geklärte bakterielle Lysat auf die Säule aufgetragen werden, wobei die Vorsäule als Filter fungiert. Im nächsten Schritt wird die Säule mit 5 SV gespült. Nach dem Entfernen der Vorsäule wird die Säule mit 5 SV gewaschen. Die abschließende Elution des gebundenen Proteins erfolgt durch Zugabe von Elutionspuffer, wobei die Fraktionsgröße 10ml beträgt. Die proteinbeinhaltenden Fraktionen werden gepoolt und gegen EDTA-Puffer dialysiert, um enthaltene Nickel-Ionen abzufangen.

Die Säulenmatrix kann durch Zugabe von 5 SV 100mM EDTA, pH:8,0 regeneriert werden.

3.9.2 Metallaffinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Sepharose (*Batch* Verfahren)

Für die Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Hexahistidin Tag aus *SF9*-Zellen wird die Ni-NTA-Agarose (Qiagen) im Batch-Verfahren als erster Aufreinigungsschritt bei 4°C verwendet.

Waschpuffer: 50mM NaH₂PO₄, pH 8,3

300mM NaCl

10mM Imidazol

Elutionspuffer: 50mM NaH₂PO₄, pH8,3

300mM NaCl

300mM Imidazol

EDTA-Puffer 20mM Tris-HCl, pH 7,4

150mM NaCl

1mM EDTA

Säulenkartuschen: Econo-Column Glassäule (BioRad)

Zentrifuge: Sorvall RC C5

Rotor: SLA-3000

Das gegen Waschpuffer dialysierte *SF-9* Medium mit dem rekombinanten, sezernierten Protein wird durch Zentrifugation (15min, 6000rpm) geklärt. Zur Proteinlösung wird die mit Waschpuffer equilibrierte NI-NTA-Agarose zugegeben (2ml Agarose / 1 Medium) und die Suspension bei 4°C für eine Stunde unter Rühren inkubiert. Anschließend wird der Ansatz über eine Econo-Säulenkartusche gegeben und die sedimentierte Agarose zweimal mit je 50 SV gewaschen. Die gebundenen Proteine werden abschließend durch Zugabe von 30ml Elutionspuffer eluiert und zu 5ml Fraktionen aufgeteilt. Die einzelnen Fraktionen werden durch eine SDS-PAGE Analyse auf den Proteingehalt untersucht und die proteinbeinhaltenden Fraktionen gegen EDTA-Puffer dialysiert.

3.9.3 Gelfiltrationschromatographien

3.9.3.1 Gelfiltration an einer HiLoad 16/60TM Superdex 200® Säule

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

Die Gelfiltrationen wurden bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 0,5ml/min durchgeführt. Die HiLoad 16/60TM Superdex 200® Säule wird mit Laufpuffer equilibriert, bis eine konstante Nulllinie erreicht ist. Die auf maximal 500µl eingeeengte Probe wird über eine Injektionsschleife aufgetragen und fraktionell eluiert. Die Fraktionsgröße beträgt 0,5ml.

Die einzelnen Fraktionen werden nach dem Lauf am Spektralphotometer und mittels einer SDS-PAGE analysiert.

3.9.3.2 Gelfiltration an einer Bio-Gel P6 Säule

Laufpuffer: 10mM HEPES, pH: 7,4
300mM NaCl
0,1mg/ml BSA

Säulenkartusche: Econo-Pac (Biorad)

Die Gelfiltrationen an der Bio-Gel P6 Säulenmatrix wurden bei Raumtemperatur ohne Pumpe, also nur durch Schwerkraft betrieben und dienten der Abtrennung von unkonjugiertem ¹²⁵I. 3ml Säulenvolumen werden in eine Econo-Pac Säulenkartusche gefüllt und mit Laufpuffer equilibriert. Anschließend wird der Iodierungsansatz (V:50µl) auf die Säule geladen und gewartet, bis der Fluss stoppt. Anschließend werden 300µl Laufpuffer auf die Säule gegeben und das Eluat in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nachdem die 300µl die Säule passiert haben, wird erneut 300µl Laufpuffer auf die Säule pipettiert, wobei in jedem Schritt das Eluat in einem Reaktionsgefäß gesammelt wird. Dies wird solange wiederholt, bis das ungebundene Iod eluiert wird.

3.9.4 Anionenaustausch-Chromatographie

Laufpuffer: 20mM Tris-HCl, pH 7,4

Elutionspuffer: 20mM Tris-HCl, pH 7,4
1M NaCl

Matrix:	Fractogel EMD TMAE 650 (S) (Merck, Darmstadt)
Säule:	Superperformance 10 (Merck, Darmstadt)
Pumpe:	2x LKB P 500 (Pharmacia, GE Healthcare)
Detektor:	UV MII (Pharmacia, GE Healthcare)
Fraktionssammler:	FRAC 100 (Pharmacia, GE Healthcare)
Controller:	LCC 501 Plus (Pharmacia, GE Healthcare)
Peristaltikpumpe:	Minipuls 3 (Gilson)

Die Anionenaustauschchromatographie wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Ca. 10ml TMAE Säulenmatrix werden in eine Superperformance 10 Säulenkartusche gefüllt, mit 5 SV gespült und luftblasenfrei komprimiert. Anschließend wird die Säule mit Laufpuffer equilibriert, bis eine konstante Nulllinie erreicht ist. Die Proteinlösung wird danach mit Hilfe einer Peristaltikpumpe auf die Säule aufgetragen und danach so lange mit Laufpuffer gespült, bis die ursprüngliche Nulllinie wieder erreicht ist. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt im Salzgradienten mit einer Flussrate von 1ml/min, wobei 1ml Fraktionen gesammelt werden. Die Programme für die einzelnen Rezeptoren sind in Tabelle 2.4 zusammengefaßt. Die Fraktionen mit dem zu analysierenden Protein wurden photometrisch vermessen und mittels SDS-PAGE analysiert.

ActR-2Becd		BMPR-1Aecd	
Zeit [min]	c: (NaCl)[mM]	Zeit [min]	c: (NaCl)[mM]
0	0	0	0
35	300	60	350
40	1000	70	1000
50	1000	80	1000
55	0	90	0

Tabelle. 2.4: Programme der Anionenaustauschchromatographien zur Aufreinigung der BMP-Rezeptor-Ektodomänen

3.9.5 BMP-2 Affinitätschromatographie:

Laufpuffer: 10mM HEPES, pH: 7,4

500mM NaCl

3,4mM EDTA

Lagerpuffer: 10mM HEPES, pH: 7,4

150mM NaCl

3,4mM EDTA

Elutionspuffer: 4M MgCl₂

Säulenmatrix: 20mg BMP-2 gebunden an 10mg Cyanbromid-aktivierte Sepharose (Pharmingen)

Säulenkartusche: Econo-Column Glassäule (BioRad)

Pumpe:	Minipuls 3 (Gilson)
Detektor:	2210 Recorder 2-Channel (LKB Bromma)
	2238 Uvicord SII (LKB Bromma)
Fraktionssammler:	Model 203 Gilson

Die BMP-2-Affinitätschromatographie wird bei 4°C durchgeführt. Die BMP-2-komplexierte CnBr-aktivierte Sepharose wird in HBS150 gelagert und direkt vor Gebrauch mit HBS500 bei einer Flussrate von 1,5ml/min equilibriert, bis eine konstante Nulllinie erreicht ist. Die Proteinlösung wird durch eine Druckdialyse auf ein Volumen von maximal 3ml eingengt und direkt auf die Säulenmatrix aufgetragen. Nachdem die Lösung eingewandert ist, wird die Säulenmatrix mit HBS500 überlagert und solange gewaschen, bis die Nulllinie wieder erreicht ist. Der Durchfluss wird gesammelt und erneut eingengt. Der HBS500 Puffer wird daraufhin entfernt und die Säule mit 4M MgCl₂ überlagert. Die Elution erfolgt bei einer Flussrate von 0,45ml/min durchgeführt, wobei Fraktionen zu je 4ml gesammelt werden. Anschließend wird die Säule in HBS500 reequilibriert und der aufkonzentrierte Durchfluss erneut auf die Säule pipettiert. Diese Prozedur wird solange wiederholt, bis die Menge an eluiertem Protein abnimmt, die Säulenkapazität also nicht mehr überschritten wird. Die Elutionsfraktionen werden spektralphotometrisch vermessen und die proteinbeinhaltenden Fraktionen gegen HBS150 dialysiert. Abschließend wird das Protein aufkonzentriert, die Konzentration bestimmt und durch eine SDS-PAGE analysiert. Abschließend wird das Protein aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.9.6 Reverse Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Laufpuffer:	TFA-Lösung: 0,1 % (v/v) TFA in ddH ₂ O
Elutionspuffer:	Acetonitril (AN)

Säule - Analytisch:	Vydac-214TP; C4; 10 μ M Porengröße; 0,46 x 25 cm (MZ-Analysentechnik) Kapazität: 2mg
Pumpe:	2150 HPLC-pump (LKB)
Detektor:	655A Variable Wavelength UV Monitor (Merck/Hitachi) 2210 Recorder 2-Channel (LKB)
Fraktionssammler:	2211 Superrac

Sämtliche HPLC Analysen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Säule wird mit 1ml/min mit Laufpuffer equilibriert, bis eine konstante Nulllinie erreicht ist. Die Proteinlösung wird im Verhältnis von 1:1 bis 1:20 mit Laufpuffer versetzt und über eine Injektionsschleife auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag der Probe wird die Injektionsschleife aus dem System entfernt und die Säule solange mit Laufpuffer gewaschen, bis die ursprüngliche Nulllinie wieder erreicht ist. Anschließend werden die gebundenen Proteine mit einem Acetonitril-Gradienten mit einer Flussrate von 1ml/min von der Säule eluiert. Die Gradienten sind in der Tabelle 2.5 aufgeführt.

ActR-2Beed		BMPR-1Aecd		Bamylierte Proteine	
Zeit [min]	% ACN	Zeit [min]	% ACN	Zeit [min]	% ACN
0	0	0	0	0	0
5	25	5	25	60	100
50	35	50	35	65	100
60	100	60	100	70	0

Tabelle 2.5: RP-HPLC Programme

Die Fraktionen werden am Spektralphotometer vermessen und von den proteinbeihaltenden Fraktionen des entsprechenden Peaks werden 10µl in der SpeedVac (Bachofer) getrocknet. Die Proteine werden mit Protein Probenpuffer in Lösung gebracht und durch eine SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die das aufzureinigende Protein enthalten, werden gefriergetrocknet und anschließend in HBS150 oder H₂O resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.10 Proteinbiochemische Methoden

3.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE Analyse ermöglicht das Auftrennen von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts (Laemmli, 1970). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Perfect Blue Doppelsystem Twin S (Peqlab) verwendet.

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

4X Lower Tris: 1,5M Tris-HCl, pH 8,8

0,4% SDS

4X Upper Tris: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

0,4% SDS

SDS-Laufpuffer: 25mM Tris-HCl, pH 8,6

0,19M Glycin

0,15% SDS

SDS-Probenpuffer: 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8

2% SDS

20% Glycerin (87%)

2% BPB in H₂O

(für reduzierende Bedingung: 2% 2-Mercaptoethanol)

Um die Bandenschärfe zu erhöhen, wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet, mit einem 12%igen Polyacrylamid-Trenngel und einem überlagerten 5%igen Sammelgel. Die Zusammensetzung beider Gele ist in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Das Trenngel wird bis ca. 2,5cm unterhalb des oberen Randes der Glasplatten gefüllt und mit Wasser überschichtet, um eine plane Oberkante zu erhalten. Nachdem das Trenngel vollständig auspolymerisiert ist, wird es bis zum Rand mit der Sammelgellösung überschichtet und ein Kamm eingesteckt. Die Proben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt (red/n.red) und für 5 Minuten im Wasserkocher denaturiert. Anschließend werden die Proben in die Geltaschen eingebracht. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 300V bei einer Strömstärke von 40mA/Gel betrieben.

	Trenngel	Sammelgel
AA/BAA[ml]	4,0	0,5
Upper Tris[ml]	2,5	-
Lower Tris[ml]	-	1,25
Glycerin[ml]	2,0	-
H ₂ O[ml]	1,5	3,2
Temed[μ l]	14	12
APS (40%)[μ l]	14	12

Tabelle 2.6: Zusammenstzung von Trenn- und Sammelgel einer SDS-PAGE

3.10.2 Proteinfärbung

3.10.2.1 Coomassie-Blau Färbung

Färbelösung: 0,25% (w/v) Brillant Blue

45% (v/v) MetOH

10% (v/v) Eisessig

Entfärbelösung: 10% (v/v) Eisessig

10% (v/v) Isopropanol

Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel für ca. 30 Minuten in einer Glaskammer in der Färbelösung bei Raumtemperatur auf einer Tischwippe inkubiert. Anschließend wird das Gel über Nacht in Entfärbelösung gelegt. Um das Gel zu dehydrieren, wird es nach der Entfärbung für ca. 30 Minuten in eine 30%ige Methanollösung gelegt. Abschließend kann das Gel zwischen zwei Celluphanfolien im Rahmen getrocknet werden.

3.10.2.2 Silberfärbung:

Nach dem Ablauf der Elektrophorese wird das Gel mit Handschuhen in eine Glasschale gelegt und mit den 5 Lösungen nach der in Tabelle 2.7 zusammengefassten Abfolge inkubiert. Abschließend wird das Gel solange in Lösung 5 inkubiert, bis der erwünschte Färbegrad erreicht ist. Die Färbereaktion wird mit einer 1%igen Essigsäurelösung abgestoppt. Das Gel kann in einer 30%igen Methanollösung dehydriert und in Celluphanfolie getrocknet werden.

Lösung 1: 60ml 50% (v/v) Aceton in dH₂O

1,5ml 50% (w/v) TCA in dH₂O

25µl 37% Formaldehyd

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

Lösung 3: 100µl 10% (w/v)

Na₂S₂O₃ in dH₂O

60ml dH₂O

Lösung 4: 0,8ml 20% (w/v) AgNO₃ in dH₂O

0,6ml 37% Formaldehyd

60ml dH₂O

Lösung 5: 1,2 g Na₂CO₃

25µl 37 % Formaldehyd

25µl 10 % (w/v) Na₂S₂O₃

60ml dH₂O

Zeit	Lösung
5min	Lösung 1
3x5sec waschen	H ₂ O
5min	H ₂ O
3x5sec waschen	H ₂ O
5min	Lösung 2
1min	Lösung 3
8min	Lösung 4
5x5sec	H ₂ O

Tabelle: 2.7: Protokoll einer SDS-PAGE Silberfärbung

3.10.3 Western Blot

Der Western Blot stellt eine hochsensitive Möglichkeit dar, Proteine in komplexen Mischungen zu detektieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Semi-Dry Methode (Kyhse-Andersen, J., 1984) verwendet.

TBS: 10 mM Tris-HCl, pH: 7,5

150 mM NaCl

TBST: 0,1 % (v/v) Tween in TBS

TBST/BSA: 5% (w/v) BSA in TBST

Luminol-Lösung: 2,5 mM Luminol (3-Aminophtalhydrazid)

	1 % (v/v) DMSO
	ad. 50ml 0,1M Tris-HCl, pH: 8,5
Enhancer-Lösung:	90 mM p-Cumarsäure, 2,5 ml DMSO
H ₂ O ₂ -Lösung:	5,4 mM H ₂ O ₂
	0,1 M Tris/HCl, pH: 8,5
Detektionslösungen	(A): 5ml 0,1M Tris-HCl, pH: 7,4
	3µl H ₂ O ₂ -Lösung
	(B): 5ml Luminol-Lösung
	22µl Enhancer-Lösung (Mengenangabe pro Blot)
Transferpuffer:	25 mM Tris-HCl
	192 mM Glycin
	20% Methanol (v/v)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in einer SDS-PAGE, bei der in diesem Fall der vorgefärbte Proteinmarker SDS7B2 (Invitrogen) verwendet wird, wird das Gel zusammen mit 6 Lagen Whatman-Papier und einer Nitrocellulosemembran (beides auf Gelgröße zurechtgeschnitten) in Transferpuffer getränkt. Die einzelnen Komponenten werden im Semidry Blotter (Peqlab) nach folgender Reihenfolge luftblasenfrei aufgebaut:

Kathode → 3 Lagen Whatman Papier → Polyacrylamidgel → Nitrocellulosemembran → 3 Lagen Whatman Papier → Anode

Der elektrophoretische Transfer wurde bei 250mA pro Gel und Maximalspannung (max. 300V) für 35 – 38 Minuten durchgeführt.

Nach dem Blotten wird die Nitrocellulosemembran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Tischwippe in TBST/BSA inkubiert. Anschließend wird die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wird der Blot 3x für 10 Minuten gewaschen und für eine Stunde mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Die einzelnen Antikörperverdünnungen und Puffer sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst.

Nach dem erneuten 3maligen Waschen für je 10 Minuten wird der Blot für eine Minute in Detektionslösung inkubiert und mit einem Röntgenfilm (Konica Minolta A3) in eine Filmkassette gelegt. Der Röntgenfilm kann nach einer ein- bis zehn-minütigen Belichtungszeit in der Dunkelkammer entwickelt werden.

Antigen	Primärantikörper	Waschschritt	Sekundärantikörper	Waschschritt
pSmad 1/5	1:1000 in BSA/TBST	BSA/TBST	Goat anti rabbit 1:5000 in BSA/TBST	BSA/TBST
Smad1	1:1000 in BSA/TBST	5Milchpulver (w/v) in TBST		
PentaHisTag	1:1000 in BSA/TBS	BSA/TBS		

Tabelle 2.8: Protokolle der verwendeten Antikörper für Western Blots

3.10.4 BCA-Assay:

Für quantitative Analysen von Zellysaten wird deren Proteinkonzentration mit Hilfe des Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assay) nach Redinbaugh und Turley ermittelt (REDINBAUGH and TURLEY 1986).

Lösung A:	1,35% (w/v) NaHCO ₃
	0,58% (w/v) NaOH
	1% BCA (w/v)
	0,57% (w/v) K-Na Tartrat
	→ In H ₂ O lösen
Lösung B:	2,3% CuSO ₄ × 5 H ₂ O
	→ Lösen in H ₂ O

Mit Hilfe einer BSA-PBS Lösung einer Proteinkonzentration von 0,1mg/ml wird eine Eichgerade erstellt. Hierfür wird eine lineare Verdünnungsreihe der BSA-Lösung von 0-10µg Gesamtproteinmenge pro Well in einer 96-Well Platte vorgelegt. Alle Wells werden anschließend auf 100µl Gesamtvolumen pro Well mit PBS aufgefüllt. Zudem wird je 1µl der zu analysierenden Zellysate in je ein Well pipettiert und ebenfalls auf 100µl mit PBS aufgefüllt. Anschließend werden Lösung A und B im Verhältnis 49:1 vermischt, wobei die Lösung eine grünliche Farbe annimmt. Von dieser Lösung werden in jedes Well 200µl pipettiert und die Platte anschließend bei 55°C inkubiert. Die zur jeweiligen Proteinmenge korrespondierende Violettfärbung der einzelnen Ansätze kann anschließend mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 550nm ausgelesen werden. Die Berechnung der in den Zellysaten enthaltenen Proteinmengen erfolgt anschließend mit Hilfe der Eichgerade.

3.10.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Konzentrationsbestimmung gelöster Proteine wird eine photometrische Messung am Spektralphotometer durchgeführt. Die Konzentration kann mit Hilfe des Lambert- Beerschen Gesetzes und der Absorption des Analyts bei 280nm.

$$E_{280} = \epsilon_{280} * c * d$$

E: Extinktion

ϵ : Exkinktionskoeffizient des Proteins [$M^{-1} * cm^{-1}$]

c: Konzentration [mol/l]

d: Dicke der durchstrahlten Schicht [cm]

3.10.6 Thrombinspaltung:

Die im Rahmen dieser Arbeit in *E.Coli* exprimierten Proteine weisen eine Thrombinschnittstelle (LVPRGS) auf, die es ermöglicht, das Thioeredoxin nach der Expression abzutrennen.

Puffer zur Thrombinspaltung: 50mM Tris-HCl pH: 7,5

150mM NaCl

2,5mM CaCl₂

Thrombinlösung: 10mg Thrombin (Sigma T4648) wird in 0,5ml Puffer zur Thrombinspaltung gelöst, dann 0,5ml Glycerin (87%) zugegeben.

Das Fusionsprotein wird gegen Thrombinspaltpuffer dialysiert und auf eine Endkonzentration von ca. 200 μ M eingestellt. Anschließend wird pro Milligramm Protein 1 Unit Thrombin zugegeben und wird 5 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Spaltung kann mit Hilfe einer SDS-PAGE verfolgt werden.

3.10.7 Lysin spezifische Proteinlipidierung mit Hilfe von BAM Molekülen

Um die exprimierten Rezeptor-Ektodomänen zu lipidieren, wurden BAM-Moleküle (NOF Company, Japan) („*biocompatible anchor for membranes*“) verwendet. Diese Moleküle besitzen eine endständige N-Hydroxy-Succinimidyl Gruppe, die über eine Polyethylenglykoleinheit (PEG) mit einem Oleyl-Lipid verbunden ist. Durch die PEG-Gruppe sind diese Moleküle trotz des Lipid-Anteils bis zu einer Konzentration von ca. 10mM in H₂O löslich.

Kopplungspuffer: 500mM NaHCO₃, pH: 8,3

Stoppuffer: 2M Tris-HCl, pH: 8,3

BAM2000/4000/8000: gelöst in DMSO

Die Proteinlösung wird mit dem jeweiligen BAM Molekül (BAM2000/4000/8000) im angegebenen molaren Verhältnis umgesetzt. Zudem wird je 1/10tel Volumenanteil Kopplungspuffer zugegeben und der Ansatz anschließend für 3-24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Um eventuelle BAM-Micellen aufzubrechen und damit die Kopplungseffizienz zu steigern, wird in manchen Ansätzen eine 10mM CHAPS-Lösung zugegeben. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 1/10tel Volumenanteil Stoppuffer beendet. Nach der Reaktion dient eine SDS-PAGE zur Analyse der Reaktion. Mit einer RP-HPLC kann die unkonjugierte Rezeptorpopulation vom den Konjugaten abgetrennt werden,

wobei eine Auftrennung der mono- di- und oligobamylierten Rezeptoren ebenfalls möglich ist.

3.10.8 Lysin spezifische OregonGreen® Markierung

Die OregonGreen® Markierung der Ektodomäne des BMPR-1A aus *E.Coli* verlief analog zur Protein-Lipidierung, s. 2.14.

Kopplungspuffer:	500mM NaHCO ₃ , pH: 8,3
Stoppuffer:	2M Tris-HCl, pH: 8,3
Fluorochrom:	Oregon Green® 488 Carboxylsäure - Succinimidylester 5-Isomer

Das Protein wird im Mengenverhältnis 1:10 mit dem Amin-reaktive Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt und die Reaktion nach 4 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln durch Zugabe von 1/10tel Volumen Stoppuffer beendet. Unkonjugierter Farbstoff kann anschließend durch mehrmalige Zentrifugfiltration (MILIPORE, Amicon Ultra 4 - 5,000 MWCO) abgetrennt werden. Die Kopplungseffizienz kann anschließend mit photometrischen Messungen bestimmt werden:

Korrektur der Proteinabsorptionsänderung durch den Fluoreszenzfarbstoff:

$$A_{\text{Protein}} = A_{280} - A_{\text{max}} * (\text{CF}) \quad \text{mit} \quad \text{CF} = A_{280(\text{freier Farbstoff})} / A_{\text{max}(\text{freier Farbstoff})}$$

A = Absorption

Bestimmung der Kopplungseffizienz:

$DOL = A_{\max} * MW / c: [Protein] * \epsilon_{\text{Farbstoff}}$ mit DOL = Degree Of Labeling

3.10.9 ¹²⁵Iod-Markierung von Proteinen

Die Iodierung der Rezeptoren wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Chloramin T Methode durchgeführt. Sämtliche Arbeiten mit radioaktiven Stoffen wurden unter einem Abzug mit entsprechender Schutzkleidung durchgeführt.

Raktionspuffer: 1M NaPO₄, pH: 7,4

Stoppuffer A: 10mM Acetyltrosin

Stoppuffer B: 500mM Kaliumiodid

Markierungsansatz:

1,5µl Protein (50pmol)

3,5µl H₂O

5µl Reaktionspuffer

2µl ¹²⁵I-Lösung (200µCi)

2µl Chloramin-T (250µg/ml)

→ 2 Minuten bei Raumtemperatur

+ 2µl Chloramin-T

→ 90 Sekunden bei Raumtemperatur

+ 2µl Chloramin T

→ 1 Minute bei Raumtemperatur

+ 20µl Stopppuffer A

→ 2 Minuten bei Raumtemperatur

+ 20µl Stopppuffer B

→ 4 Minuten bei Raumtemperatur

Die Abtrennung des nicht konjugierten Iods erfolgte durch eine Gelchromatographie an einer Bio-P6 Säule.

3.11 Lipidbiochemische Methoden

3.11.1 Liposomenherstellung:

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Liposomen hatten eine Zusammensetzung von 79% Palmitoyl-Oleyl-Phosphatidylcholin (POPC), (Avanti Polar Lipids, USA), 20% SOA (Chelatlipid, Prof. Dr. Jacob Piehler) und 1% Texas Red® 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin (Texas Red® DHPE), 99% POPC und 1% Texas Red® DHPE.

Das SOA wurde in einer 3:1 Lösung aus Chloroform und Methanol gelöst, die übrigen Lipide in Chloroform.

Die gelösten Lipide werden entsprechend der oben angegebenen Mengenanteile gemischt und unter einem Stickstoffstrom bei ca. 35°C eingedampft. Anschließend wird soviel PBS zur Lipidschicht gegeben, um eine 1mM Lipid-Suspension zu generieren (Gesamtkonzentration). Die Lipidschicht mit überlagertem PBS wird mit Hilfe eines Ultraschallbads in Suspension gebracht. Auf diese Weise entsteht eine Suspension inhomogener LMVs („*multi lamellar vesicle*“), die sich in ihrer Größe und der Anzahl der übereinander gelagerten Lipidschichten unterscheiden. Durch eine Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250) auf Eis werden die LMVs aufgebrochen, wobei SUVs („*small unilamellar vesicles*“) entstehen. Nachdem die Suspension vollständig durchsichtig geworden ist, wird sie für weitere 3 Minuten beschallt.

Anschließend wird die Liposomen-Suspension aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor dem Gebrauch werden die Liposomen mit Hilfe eines CupHorn Schallkopfes 2 x eine Minute (Branson Sonifier 250, max W, 80% Cycles) beschallt.

Danach werden die Chelatlipide mit Ni²⁺/Zn²⁺-Ionen beladen, indem eine 100mM NiCl₂-oder ZnCl₂-Lösung in Wasser im Volumenverhältnis 1:100 zugegeben wird. Um eine vollständige Beladung der NTA-Gruppen zu gewährleisten, werden die Liposomen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Chelatlipid liegt in einer Endkonzentration von 200µM vor. Jedes dieser Lipide trägt drei NTA-Gruppen, sodass von einer 600µM NTA-Konzentration

ausgegangen werden kann. Bei einer Zugabe von 1mM Metallsalz sollten dementsprechend alle Chelatgruppen beladen sein.

3.11.2 Fusion von Liposomen mit Zellmembranen

ATDC5 Zellen werden mit PBS-basiertem, proteasefreiem Dissoziationspuffer (Gibco, USA) von der Gewebekulturschale abgelöst. Um im Puffer enthaltene Komplexbildner abzutrennen, werden die Zellen bei 400xg für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 50ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wird dreimal wiederholt. Anschließend werden je 2×10^6 Zellen in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert und erneut abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden in 40 μ l Liposomensuspension, mit oder ohne bivalentes Metallkation komplexiert, resuspendiert und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach je 5 Minuten werden die abgesunkenen Zellen durch kurzes Schütteln aufgewirbelt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden nun in einer 15%igen PEG₄₀₀-Lösung (PEG: Sigma-Aldrich, Hamburg) in PBS in Suspension gebracht und für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden anschließend zentrifugiert und die Polyethylenglykollösung abgezogen. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen. Die Fusionsrate kann am Fluoreszenzmikroskop, mittels FACS Analyse, oder mit Hilfe eines ELISA-Readers durch das TexasRed gekoppelte DHPE (Anregung:590nm, Emission: 615nm) evaluiert werden.

3.11.3 Kopplung von His₆-getagten Proteinen an Zellmembran-integrierte Chelatlipide

Die Zellen mit integrierten SOA-Chelatlipid werden in 40µl einer Proteinlösung resuspendiert und bei 4°C auf einem Rotary-Mischer bei 30rpm/min für 40 Minuten inkubiert. Die Zellen werden anschließend pelletiert, die Proteinlösung wird abgezogen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

4 Ergebnisse

4.1 Expression rekombinanter BMP Rezeptor Ektodomänen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden BMP Rezeptorektodomänen mit pegylierten Lipiden konjugiert und in Plasmamembranen integriert (s.4.1.4). Die Ektodomänen des humanen BMPR-1A und des murinen ActR-2B wurden als Thioredoxin-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt.

4.1.1 Expression rekombinanter BMP Rezeptor Ektodomänen in *E. Coli*

Die Ektodomänen des murinen *Activin Receptor Type 2 B* (ActR-2B) und des humanen *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A* (BMPR-1A) wurden in den *E. Coli* Stämmen AD494(DE3) (BMPR-1A) und Origami(DE3) (ActR-2B) exprimiert. Die Expression erfolgte nach den von Dr. T. Kirsch und Dr. D. Weber ausgearbeiteten Protokollen.

4.1.1.1 Expression und Aufreinigung der Ektodomäne des humanen BMPR-1A

Klonierung und Expression

Die zur Ektodomäne (Reste 24-152) des BMPR-1A korrespondierende DNA-Sequenz wurde in den von Dr. T. Kirsch modifizierten prokaryotischen Expressionsvektor pET32a über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *Bpu1102I* kloniert. Auf diese Weise codiert der resultierende Expressionsvektor pET32a[Trx-BMPR-1A] für ein 28kDa Fusionsprotein bestehend aus Thioredoxin, einem Hexa-Histidin Tag, einer Thrombinschnittstelle, gefolgt von der BMP Rezeptor Ektodomäne (s. Abb. 4.1). Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 1mM IPTG induziert und erfolgte im 7,2 Liter Maßstab (8x800ml) bei einer Temperatur von 22°C über Nacht.

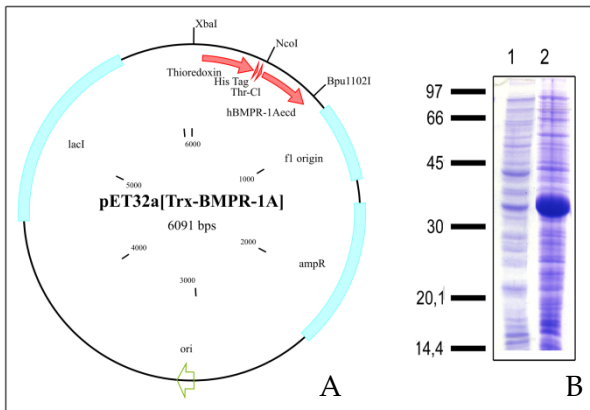


Abbildung 4.1: Expressionssystem pET32a[Trx-BMPR-1A]
A: Schematische Darstellung des pET32a[Trx-BMPR-1A] Expressionsplasmids **B:** Induktionskontrolle des rekombinanten Proteins TRX-BMPR-1A in AD494 Zellen vor (1) und nach (2) der Expressionsinduktion mit 1mM IPTG

Zellaufschluss, Nickel-Chelat Chromatografie und Thrombinspaltung:

Je 10g Bakterienpellet wurden in 100mL Resuspensionspuffer bei 4°C resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung (300W, fünf einminütige Schallintervalle) aufgeschlossen. Das Fusionsprotein lag dabei zum größten Teil in löslicher Form vor. Das bakterielle Lysat wurde anschließend mittels Ultrazentrifugation (Rotor: 45Ti) geklärt, und der Überstand in einem ersten chromatographischen Schritt auf eine Ni²⁺ komplexierten Chelat-Sepharose geladen. Gebundene Proteine konnten mit 500mM Imidazol eluiert werden.

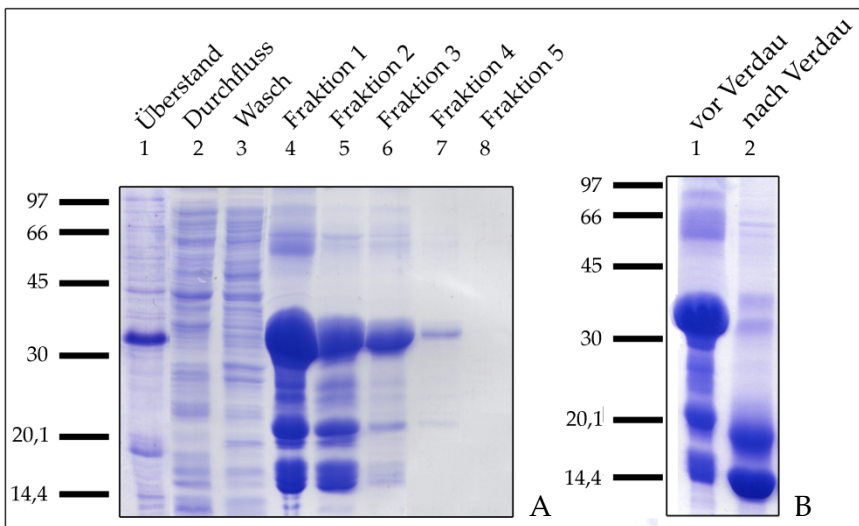


Abbildung 4.2: SDS PAGE (red.) der IMAC und des Thrombinverdaus des TRX-BMPR-1A
A: Metallaffinitätschromatografie von TRX-BMPR-1A Das Protein wurde in den Fraktionen 1-3 eluiert.
B: Thrombinverdau des TRX-BMPR-1A Fusionsproteins

In Abbildung 4.2A ist deutlich zu erkennen, dass das Fusionsprotein in den ersten drei Fraktionen konzentriert vorlag. Die TRX-BMPR-1Aecd beinhaltenden Fraktionen wurden vereint und gegen EDTA Puffer dialysiert, um eventuell ausgewaschene Nickel-Ionen zu komplexieren. Die Proteinlösung wurde daraufhin gegen Thrombinspaltpuffer dialysiert und im Mengenverhältnis 1:300 mit Thrombin versetzt. Nach 5 Stunden wurde der Verdau auf Vollständigkeit hin mittels einer SDS-PAGE (red.) überprüft (Abb. 4.2B).

Anionenaustauschchromatographie an einer Fractogel TMAE Säule:

Mit Hilfe einer Anionenaustauschchromatographie an einer Trimethylaminoethyl (TMAE) Säule konnten die BMPR-1A Multimere und das Thioredoxin abgetrennt werden. Nach dem Verdau wurde der Ansatz 2x über Nacht bei 4°C gegen Niedrigsalzpuffer dialysiert und die Proteinlösung mit einem einstündigen, linearen Gradienten bis zu einer Salzkonzentration von 350mM aufgetrennt. Der prominente Peak bei einer Salzkonzentration von 180-200mM entspricht dem abgespaltenen Thioredoxin. Die monomeren BMPR-1A Ektodomänen wurden bei ca. 200mM NaCl von der Säule gewaschen, die höhermolekularen BMPR-1Aecd Multimere dagegen bei höheren Salzkonzentrationen (s. Abb. 4.3A). Die Fraktionen, welche die monomer vorliegenden BMPR-1Aecds beinhalteten, wurde mittels einer SDS-PAGE (red.) analysiert (Abb. 4.3B). In den Fraktionen 14 und 15 ist deutlich das Thioredoxin bei einer Laufhöhe von ca. 14kDa zu erkennen. Die BMPR-1A Monomere sind in den Fraktionen 17-19 eluiert worden und liefen in der Elektrophorese bei ca. 20kDa.

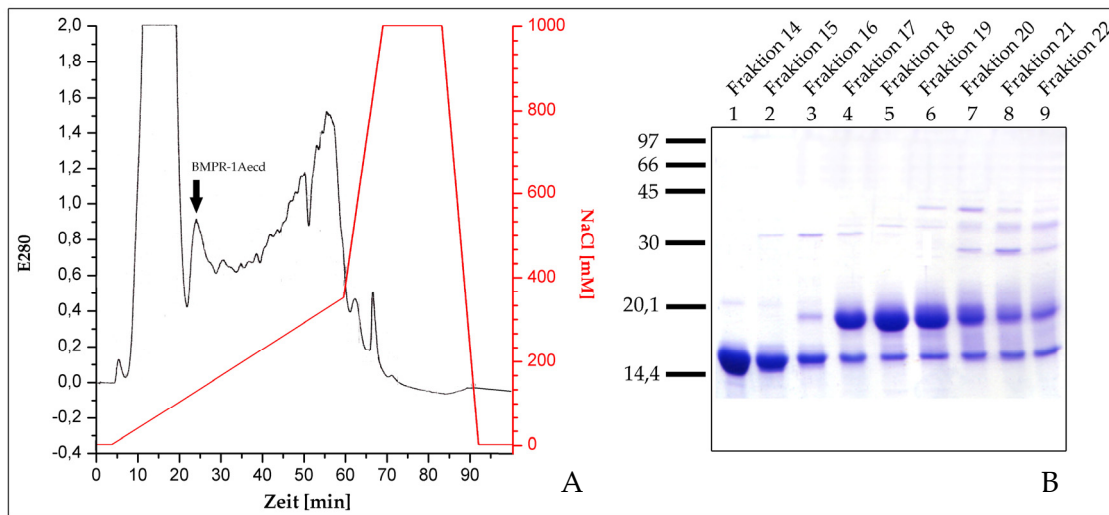


Abbildung 4.3: Anionenaustauschchromatographie an einer TMAE-Säule.

A: Elutionsprofil des BMPR-1Aecd - Thioredoxin Verdaus einer TMAE Anionenaustauschsäule (schwarz). In rot ist der NaCl-Gradient eingezeichnet. In den Fraktionen 17-19 ist der monomere Rezeptor bei einer Laufhöhe von ca. 20kDa zu erkennen.

B: SDS-PAGE (red.) der Anionenaustauschchromatographie an einer TMAE Säule. In den Fraktionen 17- 19 ist auf einer Laufhöhe von ca. 20kDa der monomere BMPR-1A zu erkennen

BMP-2-Affinitätschromatographie:

Um biologisch inaktive Rezeptormonomere und weitere bakterielle Proteine in einem finalen Aufreinigungsschritt abzutrennen, wurde eine Affinitätsmatrix durch Kopplung von BMP-2 an eine CnBr-aktivierte Sepharose hergestellt. Die Matrix hatte eine Kapazität von ca. 6mg Protein. Die Monomer-Fractionen der Ionenaustausch-Chromatographie wurden gegen HBS₅₀₀ dialysiert und auf ein Volumen von ca. 2mL mittels Druckdialyse eingengt. Die Proteinlösung wurde anschließend manuell auf die Säule geladen und gewartet, bis sie vollständig in die Matrix eingewandert war. Nicht gebundene Proteine wurden mit HBS₅₀₀ ausgewaschen, bis die ursprüngliche Nulllinie wieder erreicht war. Der Durchfluss wurde aufgefangen und erneut aufkonzentriert. Die gebundenen Ektodomänen konnten mit 4M MgCl₂ von der Affinitätsmatrix eluiert werden. Nach der Reäquilibrierung der Säulenmatrix mit HBS₅₀₀ wurde der Durchfluss erneut auf die Säule geladen und diese Prozedur so lange wiederholt, bis kein Rezeptor mehr durch das Magnesiumchlorid eluiert werden konnte. Das Elutionsprofil eines solchen Zyklus' ist in Abbildung 4.4A dargestellt. Die gewonnenen Fraktionen wurden am Spektralphotometer vermessen und die

proteinbeinhaltenden Fraktionen gegen HBS₁₅₀ dialysiert. Die Rezeptor-Ektodomänen wurden eingengt und durch eine SDS-PAGE analysiert (s. Abb. 4.4B).

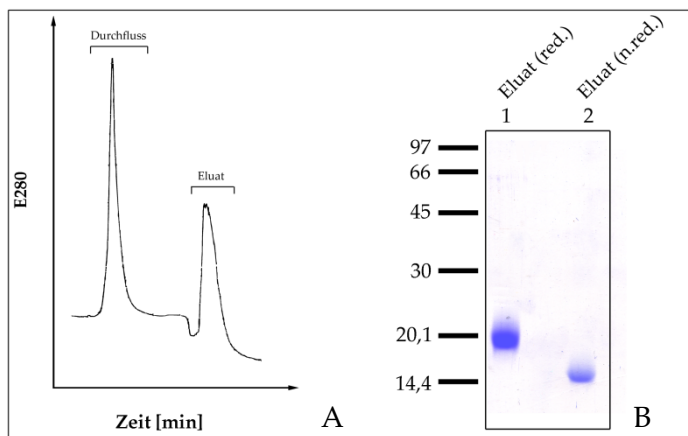


Abbildung 4.4: BMP-2-Affinitätschromatographie

A: Elutionsprofil eines einzelnen Zyklus der BMP-2 Affinitätschromatographie (Einzelheiten s. Text).

B: SDS-PAGE der aufgereinigten Rezeptor-Ektodomäne nach der Dialyse gegen HBS₁₅₀ und Aufkonzentrierung.

4.1.1.2 Expression und Aufreinigung der Ektodomäne des murinen ActR-2B

Die für die Reste 2-109 codierende DNA Sequenz des murinen ActR-2B wurde homolog zum BMPR-1A in den Expressionsvektor pET32a über die Restriktionsschnittstellen *NcoI/Bpu1102I* kloniert (s. Abb. 4.5). Die Expression des resultierenden Fusionsproteins aus Thioredoxin, einem Hexa Histidin Tag, einer Thrombinschnittstelle, gefolgt von der extrazellulären Domäne des ActR-2B inklusive N-terminaler Verlängerung GSGAMA erfolgte im Gegensatz zum BMPR-1A im *E.Coli* Stamm OrigamiB (DE3), bei dem beide Reduktase Systeme mutiert sind, wodurch wesentlich größere Ausbeuten an korrekt gefalteter ActR-2B ECD nach der Fermentation möglich sind. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde mit 1mM IPTG induziert. Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte im 8 Liter Maßstab bei einer Temperatur von 22°C über Nacht. Ein Beispiel einer Induktion ist in Abbildung 4.5B dargestellt.

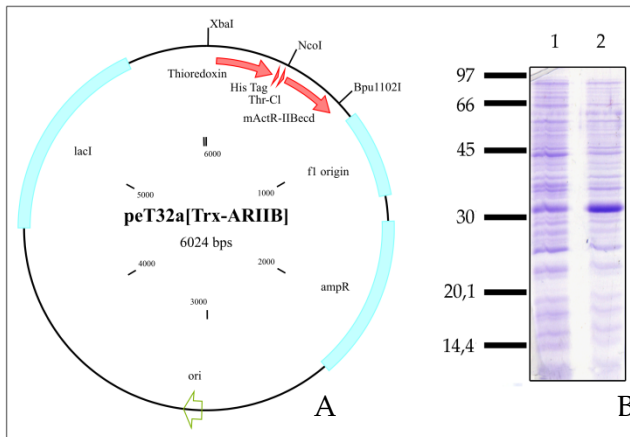


Abbildung 4.5: Expressionssystem pET32a[Trx-ActR-2B]

A: Schematische Darstellung des pET32a[Trx-ActR-2B] Expressionsplasmids

B: SDS-PAGE der Induktionskontrolle des rekombinanten Proteins TRX-ActR-2B in OrigamiB Zellen vor (1) und nach (2) der Expressionsinduktion mit 1mM IPTG (red.).

Zellaufschluss, Nickel-Chelat Chromatografie und Thrombinspaltung:

Der erste Aufreinigungsschritt an einer Nickel-Chelat Sepharose und die folgende Thrombinspaltung verliefen homolog zur BMPR-1A Aufreinigung. 10g Bakterienpellet wurden in Resuspensionspuffer bei 4°C in Suspension gebracht und mittels Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Das bakterielle Lysat wurde anschließend durch Ultrazentrifugation geklärt und der Überstand mit Hilfe der Nickel-Chelat Sepharose aufgetrennt. Das rekombinante Protein konnte mit 500mM Imidazol eluiert werden (s. Abb 4.6A). Die proteinbeinhaltenden Fraktionen wurden im ersten Schritt gegen EDTA-Puffer dialysiert, um lösliche Nickel-Ionen zu binden und anschließend gegen Thrombinspaltpuffer. Das Fusionsprotein wurde am Spektralphotometer vermessen und Thrombin im Mengenverhältnis 1:300 zugegeben. Der Ansatz wurde 5 Stunden bei 30°C inkubiert, wobei der Verdau mittels SDS-PAGE verfolgt wurde (Abb. 4.6B). Das Thrombin wurde durch zweimalige Dialyse gegen Niedrigsalzpuffer (35mM NaCl, 20mM Tris-HCl; pH: 7,4) inaktiviert. Das Protein wurde für 7 Tage bei 4°C im Niedrigsalzpuffer inkubiert, um die Menge an korrekt gefaltetem Protein zu erhöhen (s. Dr. D. Weber, Dissertation). Im nächsten Schritt sollte das Thioredoxin und Rezeptor-Multimere durch eine Anionenaustauschchromatographie an einer Trimethylaminoethyl (TMAE) Säule abgetrennt werden.

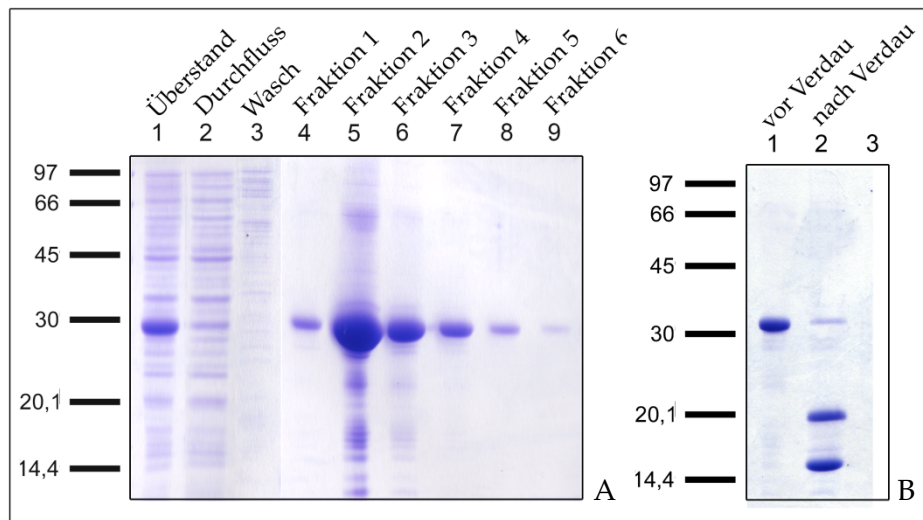


Abbildung 4.6: SDS PAGE (red.) der IMAC und des Thrombinverdaus des TRX-ActR-2B

A: Metallaffinitätschromatographie von TRX-ActR-2B. Das Protein wurde hauptsächlich in den Fraktionen 2-4 eluiert.

B: Thrombinverdaus des TRX-ActR-2B Fusionsproteins. Die Probenentnahme erfolgte vor und 5 Stunden nach dem Verdaus.

Anionenaustauschchromatographie an einer Fractogel TMAE Säule

Im Unterschied zum BMPR-1A wurde der monomere ActR-2B durch einen linearen Salzgradienten von 0 auf 300mM innerhalb 35 Minuten eluiert. Bei ca. 200mM NaCl konnte der monomere Rezeptor eluiert werden (s. Abb. 4.7 A, B). Die Fraktionen 18-20, die den monomeren Rezeptor beinhalten, wurden gegen HBS500 dialysiert und auf ein Volumen von ca. 2mL eingengt.

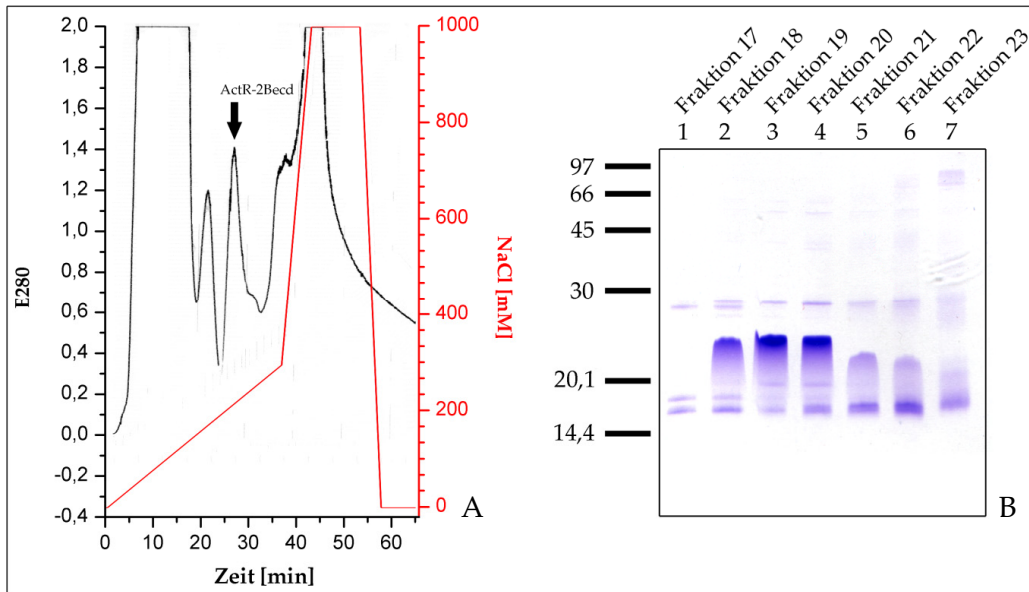


Abbildung 4.7: Anionenaustauschchromatographie an einer TMAE-Säule.

A: Elutionsprofil des ActR-2BAecd - Thioredoxin Verdau einer TMAE Anionenaustauschsäule (schwarz). In rot ist der NaCl-Gradient eingezeichnet. In den Fraktionen 18-20 ist der monomere Rezeptor bei einer Laufhöhe von ca. 25-20 kDa zu erkennen.

B: SDS-PAGE (n.red.) der Anionenaustauschchromatographie an einer TMAE Säule. In den Fraktionen 18- 20 ist auf einer Laufhöhe von ca. 20kDa der monomere ActR-2B zu erkennen.

BMP-2-Affinitätschromatographie und biochemische Analyse der ActR-2B Ektodomäne:

Der letzte Aufreinigungsschritt bestand wie bei der Aufreinigung des BMPR-1A in einer BMP-2-Affinitätschromatographie an einer BMP-2 Affinitätssäule. Die in HBS500 gelösten Proteine wurden auf die BMP-2-komplexierte Sepharose geladen und die spezifisch gebundenen Proteine isokratisch mit 4M MgCl₂ eluiert. Der Durchlauf wurde dabei mittels Druckdialyse wiederum eingengt und erneut über die Säule gegeben, bis kein Protein mehr eluierbar war. In Abbildung 4.8A ist das Elutionsprofil eines solchen Durchgangs aufgezeigt. Der eluierte Rezeptor wurde anschließend gegen HBS150 dialysiert, und die Homogenität durch eine SDS-PAGE verifiziert (s. Abb. 4.8B). 100µg BMP-2-Affinitätsgereingte Rezeptor-Ektodomäne wurde auf eine analytische Vydac C4 Säule aufgetragen und konnten als einzelner Peak durch einen Acetonitrilgradienten eluiert werden (s. Abb. 4.8C).

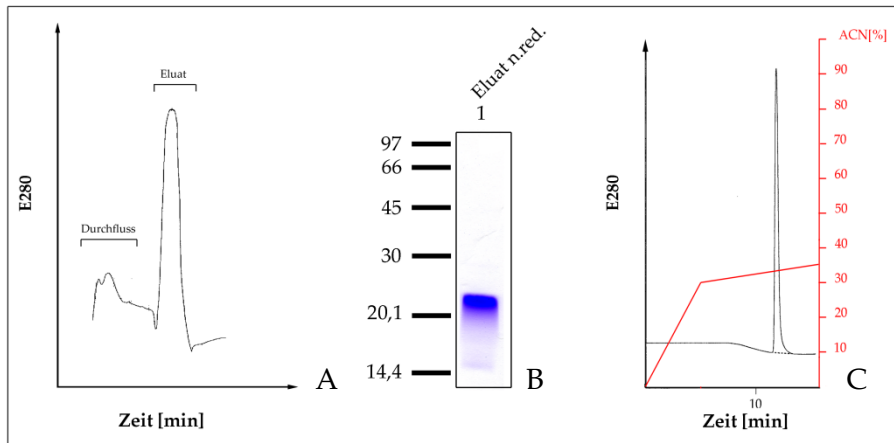


Abbildung 4.8: BMP-2 Affinitätschromatographie der ActR-2Becd.
A: Elutionsprofil der ActR-2Becd einer BMP-2-Affinitätschromatographie.
B: SDS-PAGE (n.red.) des eluierten Proteins.
C: Elutionsprofil eines HPLC-Laufs an einer analytischen Vydac C4 Säule.

Die Ausbeuten der einzelnen Schritte der Protein-Präparationen des ActR-2Becd und BMPR-1Aecd sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die aufgereinigten Ektodomänen wurden zu Aliquots je 500µg bei -80°C gelagert.

Rezeptor Ektodomäne	BMPR-1A	ActR-2B
Fermentation [g Bakterien / l Kulturmedium]	3,8-4,9	2,3-3,4
Ni-NTA [mg TRX Fusionsprotein / g Bakterien]	39-51	28-44
TMAE [mg Monomer / g Bakterien]	1,9-2,6	1,8-2,5
BMP-2-Affi [mg aktive Rezeptor ecd / g Bakterien]	0,4-0,9	0,5-1,4

Tabelle 4.1: Ausbeutetabelle der Expression rekombinanter BMP Rezeptorektodomänen in *E.Coli*. BMPR-1A: AD494; ActR-2B: OrigamiB

4.1.1.3 Expression und Aufreinigung der Ektodomäne des ActR-2B_MxeGyrA Fusionsproteins

Eine Möglichkeit, ektope Proteine in Zellmembranen zu integrieren, stellt die Lipidierung der Proteine dar. Modifizierte Inteine ermöglichen die spezifische Konjugation beliebiger Moleküle mit einer Sulfhydrylgruppe an den C- oder N-Terminus eines Proteins.

Um BMP Rezeptoren C-terminal zu lipidieren, wurden diese als Fusionsprotein mit dem Mini-Intein MxeGyrA in *E.Coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Fusionsproteine können durch ein Thiolreagens gespalten werden, wodurch eine reaktive Thioesterbindung generiert wird, welche in der folgenden Kopplungsreaktion genutzt werden kann.

Die Sequenz der Ektodomäne (ECD) des ActR-2B (Maus) wurde mittels der Primer *A2B_Xba5'* und *A2B_Sap3'* und dem von Dr. T. Kirsch modifizierten Expressionsplasmid pET32a[TRX_ActR-2B] amplifiziert. Das Amplifikat umfasste die gesamte, von Dr. D. Weber beschriebene Expressionskassette bestehend aus einem N-terminalen Thioredoxin, einem Hexa-His Tag, einer Thrombin-Schnittstelle, sowie der ActR-2Becd mit der N-terminalen Verlängerung GSGAMA (s. D. Weber, Dissertation). Nach dem Verdau des PCR-Produkts mit den Restriktionsenzymen *Xba1/Sap1* wurde es in den Vektor pTWIN1 (New England Biolabs) ligiert, direkt vor die MxeGyrA codierende Sequenz (Abb. 4.9A). Für die Expression wurde das Konstrukt in den *E. Coli* Stamm Origami B (DE3) transformiert und die Expression des rekombinanten Proteins bei einer $OD_{550} \leq 0,5$ mit 1mM IPTG induziert (s. Abb. 4.9B).

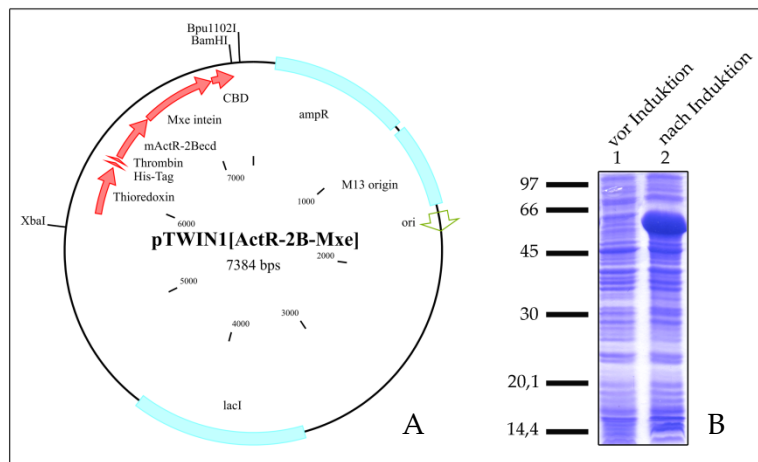


Abbildung 4.9: Expressionssystem pTWIN1[Trx-ActR-2B-MxeGyrA]

A: Expressionsvektor pTWIN1-ActR2B-MxeGyrA. Über die Schnittstellen *Xba1* und *Sap1* wurde die TRX_ActR2B_MxeGyrA Sequenz in den Vektor ligiert. Das rekombinante Protein wird N-terminal mit einem Thioredoxin gefolgt von einem HexaHis Tag und einer Thrombin Schnittstelle exprimiert. Zur Abtrennung des MxeGyrA ist dieses C-terminal mit einer Chitin bindenden Domäne (CBD) versehen.

B: SDS PAGE (red.) der Expressionskontrolle des rekombinanten Proteins vor (1) und 3,5h nach (2) 1mM IPTG Zugabe.

Die Expression erfolgte im 8l Maßstab für 16h bei einer Temperatur von 22°C. Nach der Induktion ist ein stark exprimiertes Protein bei 60kDa erkennbar. Dies entspricht dem errechneten Molekulargewicht des rekombinanten TRX_ActR-2B_MxeGyrA. Die Bakterien wurden pelletiert und für die weiteren Schritte bei -80°C weggefroren.

Zellaufschluss:

Die gefrorenen Bakterien wurden in Sonifikationspuffer bei 4°C resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Dabei wurden fünf einminütige Schallintervalle mit 300W Leistungsaufnahme gewählt. Das bakterielle Lysat wurde anschließend mittels Ultrazentrifugation (Rotor: 45-Ti) geklärt und die Löslichkeit des rekombinanten Proteins durch SDS-PAGE (red.) analysiert. Wie in Abbildung 4.10 zu erkennen ist, lagen ca. 60% des Proteins im Überstand vor.

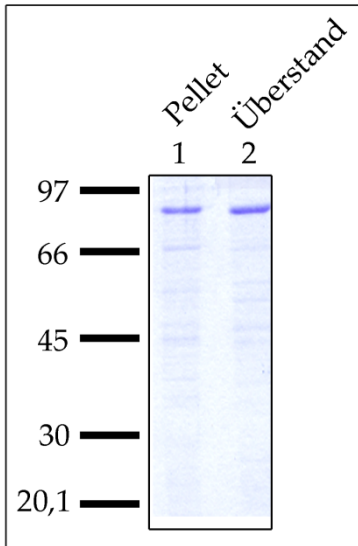


Abbildung 4.10: SDS-PAGE (red.) des Ultraschallaufschlusses des Expressionsklons. Wie deutlich zu erkennen ist lagen ca. 60% (Quantifizierung mit Image J 1.41) in löslicher Form vor.

Ni²⁺-Chelat Säule und Thrombinverdau:

Als ersten Aufreinigungsschritt wurde eine Metallaffinitätschromatographie an einer Ni²⁺-komplexierten Chelat-Sepharose durchgeführt. Aufgrund des Hexahistidin Tags konnte das rekombinante Protein an der Säulenmatrix immobilisiert und isokratisch mit 500mM Imidazol eluiert werden. Abb. 4.11 zeigt das Ergebnis einer SDS-PAGE (red.) mit der die proteinbeinhaltenden Fraktionen ermittelt werden sollten.

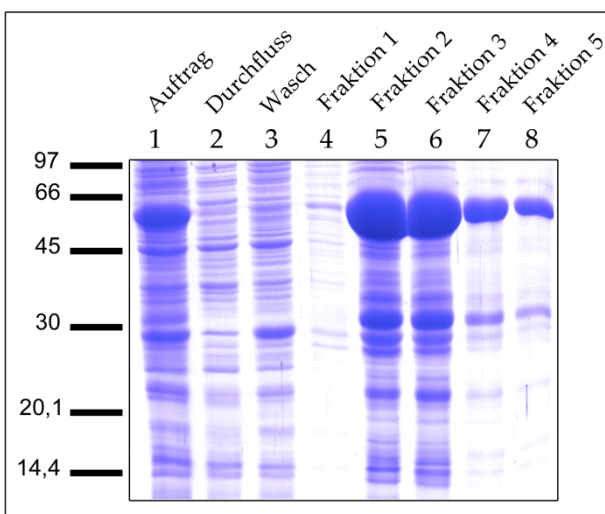


Abbildung 4.11: SDS PAGE (red.) der Metallaffinitätschromatographie von ActR-2B_MxeGyrA. Im Überstand ist deutlich das ActR-2B_MxeGyrA bei einer Laufhöhe, die 60kDa entspricht, zu erkennen. Weder im Durchfluss, noch im Waschschrift, der mit 50mM Imidazol durchgeführt wurde, ist das rekombinante Protein erkennbar. Die Fraktionen 2 und 3 beinhalten den größten Anteil des Fusionsproteins.

Der größte Teil des Proteins wurde in Fraktion 2 und 3 eluiert. Zudem war ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30kDa detektierbar (s. Abb. 4.11, Stern). Die Hauptfraktionen wurden vereinigt und gegen EDTA-Puffer dialysiert, um überschüssige Ni²⁺-Ionen zu komplexieren. Das Thioredoxin (TRX) erhöht die Löslichkeit des Fusionsproteins während der Expression (HLAVAC and ROUER 1997).

Durch die Thrombinschnittstelle (LVPRGS) kann es inklusive des His-Tags von der Ektodomäne und dem Intein abgespalten werden. Das gelöste Protein wurde gegen Thrombinspaltpuffer dialysiert, die Spaltung erfolgte in einem Mengenverhältnis von 300:1 (TRX_ActR-2B_MxeGyrA : Thrombin) für 4h bei 30°C. Der Spaltvorgang wurde mittels SDS-PAGE (red.) analysiert (Abb. 4.12).

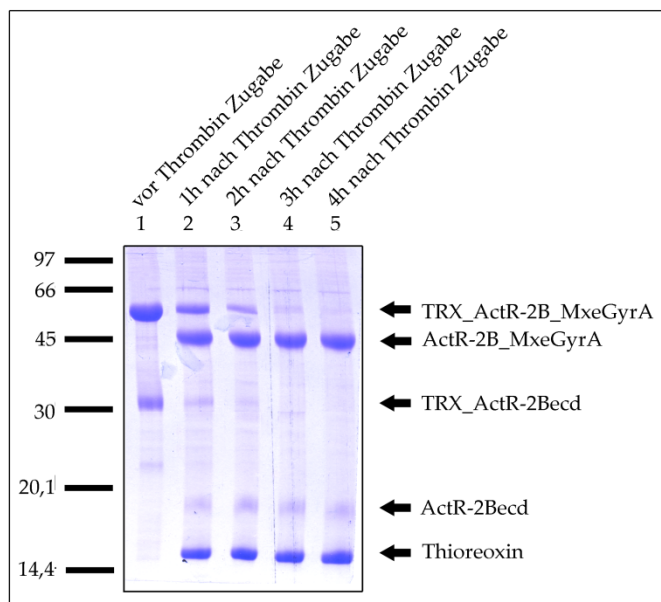


Abbildung 4.12: SDS-PAGE des Thrombinverdaus des Thioredoxin_{6xHis} Konstrukts. Vor der Thrombinzugabe ist deutlich das gesamte Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 60kDa erkennbar. Nach 4h ist das Thioredoxin vollständig abgespalten. Zudem ist eine Bande bei ca. 30kDa vor dem Verdau zu erkennen. Diese Bande resultiert aus der Abspaltung des Mini-Inteins MxeGyrA während der vorangegangenen Schritte. Dieses Protein ist ebenfalls durch Thrombin spaltbar. Durch die proteolytische Spaltung des kompletten rekombinanten Proteins entsteht ein 45kDa Protein bestehend aus ActR-2B und dem Intein MxeGyrA, sowie dem abgespaltenen Thioredoxin das auf einer Höhe von ca. 15kDa läuft. Durch die Spaltung des TRX_ActR-2B ist auf einer Laufhöhe von ca. 18kDa zudem der ActR-2B zu erkennen.

Wie auf der SDS-PAGE (red.) (Abb. 4.12) zu erkennen ist, konnte das Thioredoxin nach 4h quantitativ abgespalten werden. Vor der Thrombinzugabe ist zudem noch ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30kDa erkennbar, das ebenfalls proteolytisch durch Thrombin spaltbar ist. Aufgrund der enthaltenen Thrombinschnittstelle und den entstehenden Fragmenten, die bei ca. 15- und 18kDa in der Elektrophorese laufen, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem 30kDa Protein um das Fusionsprotein mit bereits abgespaltenem MxeGyrA handelt. Das 15kDa Protein stellt dabei das Thioredoxin dar, das Protein mit 18kDa den ActR-2B. Mit dem ActR-2B_MxeGyrA Fusionsprotein sollten im Folgenden Bedingungen für die Generierung der reaktiven Thioesterbindung ermittelt werden.

4.1.2 Expression rekombinanter BMP Rezeptor Ektodomänen in SF9 Zellen

Zellmembranintegrierte Lipide mit metallionkomplexierten NTA-Kopfgruppen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um BMP Rezeptorektodomänen an Plasmamembranen zu verankern. Um eine korrekte Orientierung der Proteine zu gewährleisten, waren Rezeptoren mit C-terminalem His-Tag nötig. Diese rekombinanten Proteine wurden in SF9-Zellen exprimiert und aufgereinigt.

Expression und Aufreinigung der Ektodomäne der BMPR-1A Ektodomäne

Für die Verankerung rekombinanter Ektodomänen auf zelluläre Plasmamembranen mit Hilfe von Chelatlipiden waren Proteine mit C-terminalem His-Tag nötig. Die codierenden Sequenzen der Ektodomänen der BMP Rezeptoren ActR-1, ActR-2A, BMPR-1A, BMPR-1B und BMPR-2 inklusive C-terminaler Extension bestehend aus einer Thrombin-Schnittstelle und einem Hexa Histidintag im Bacuogold® Transfervektor pBAC-3 wurden von Dr. J. Nickel in Form viraler Überstände zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe eines Plaque-Assays wurden rekombinante Baculoviren (*Autographa californica*) isoliert. Von jeder zu exprimierenden Rezeptorektodomäne wurden 3 Virenplaques aufgenommen und die

rekombinanten Viren durch 4 Amplifikationsschritte vermehrt. Nach der zweiten Virusamplifikation wurden die sezernierten BMP Rezeptoren in den zellulären Überständen durch Western Blots detektiert (Abb. 4.13A). Die Klone, die die höchste Expressionsrate vorwiesen, wurden für die weiteren Schritte verwendet.

Die Aufreinigung der Ektodomänen wird im Folgenden exemplarisch detailliert für die BMPR-1A Ektodomäne besprochen.

Ni-Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie:

Die einzelnen Ektodomänen wurden in einem ersten Aufreinigungsschritt durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie im Batch Verfahren angereichert und die einzelnen Elutionsfraktionen mit einer SDS-PAGE (red.) untersucht (s. Abb. 4.13B). Nach der Dialyse gegen Niedrigsalzpuffer (35mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH: 7,4) wurden multimer vorliegende Rezeptoren und unspezifisch gebundene Proteine an einer TMAE-Säulenmatrix mit einem NaCl-Gradienten abgetrennt (Abb. 4.13C). In Abbildung 4.13 D ist das Ergebnis einer SDS-PAGE (n. red.) zu erkennen. Die Fraktionen, die die monomeren Rezeptoren beinhalteten, wurden vereinigt und gegen HBS500 dialysiert.

Das inhomogene Laufverhalten des monomeren Rezeptors in der Elektrophorese ist durch die Glykosilierung der sezernierten Rezeptorektodomänen zu erklären, welche in prokaryotischen Systemen exprimierte, rekombinante Proteine nicht aufweisen.

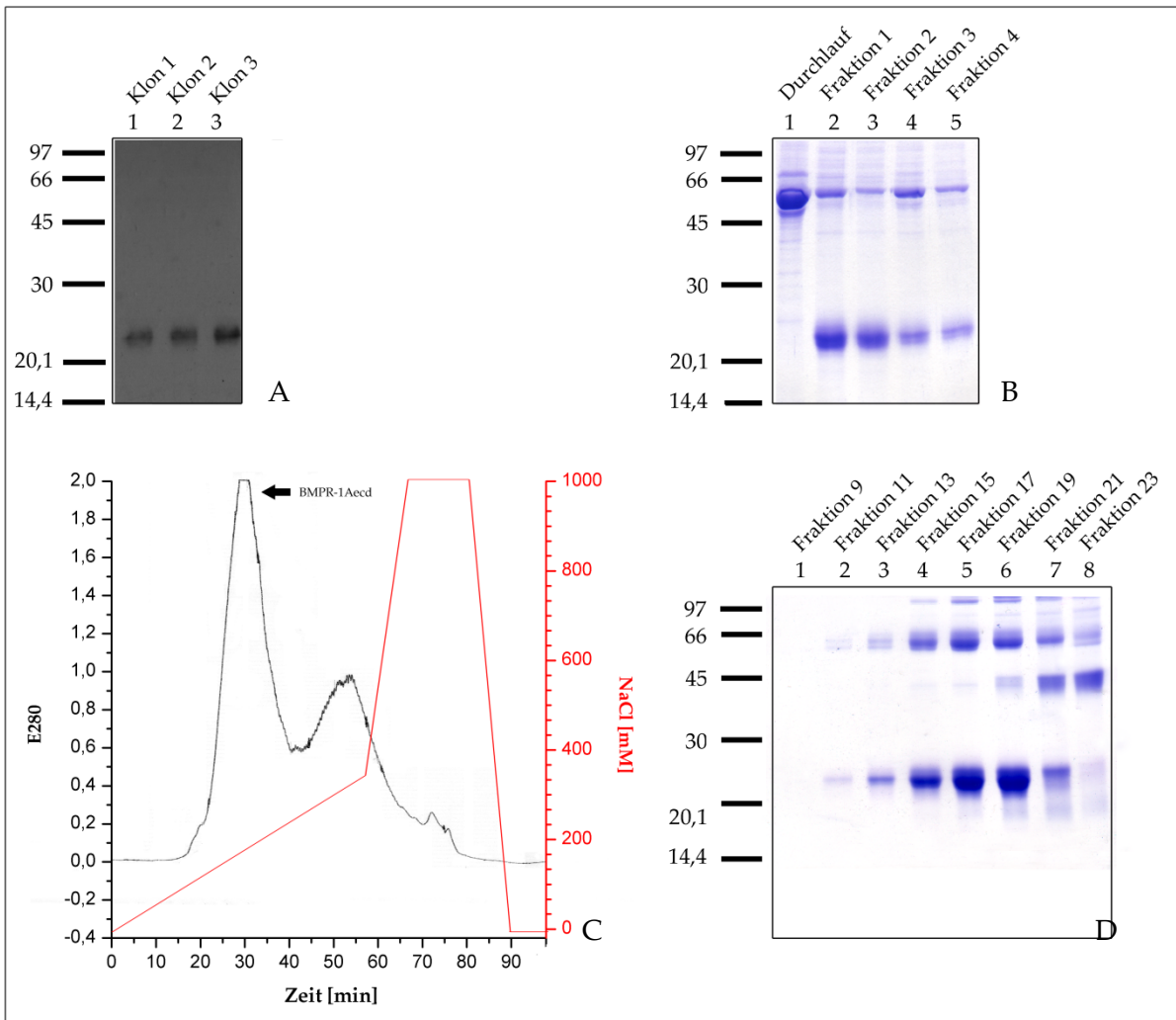


Abbildung 4.13: Zusammenfassung der BMPR-1Aecd Aufreinigung aus SF9 bis zur Anionenaustauschchromatographie an einer TMAE-Matrix.
A: Western Blot von Zellkulturüberständen dreier BMPR-1Aecd sezernierender Klone (Antikörper: Primär: mouse anti His; sekundär: rabbit anti mouse HRP-gekoppelt).
B: SDS-PAGE (red.) einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie im Batch Verfahren.
C: Elutionsprofil der BMPR-1Aecd (schwarz) an einer TMAE-Matrix (Salzgradient in rot).
D: SDS-PAGE (n.red.) der TMAE-Eluate.

Affinitätschromatographie an einer BMP-2-Affinitätssäule

Der finale Aufreinigungsschritt der in SF-9 Zellen exprimierten Rezeptoren bestand in einer Affinitätschromatographie an einer BMP-2 komplexierten Sepharose, mit deren Hilfe noch vorhandene Multimere und nicht funktionelle, monomer vorliegende Rezeptoren abgetrennt werden sollten. Der gelöste Rezeptor wurde auf ein Volumen von ca. 2ml mittels Druckdialyse (AMICON) eingengt und direkt auf die equilibrierte Säulenmatrix pipettiert.

Nachdem die Lösung vollständig in die Säule eingewandert war, wurde diese so lange mit HBS500 gespült, bis nach der Passage des Durchflusses die ursprüngliche Nulllinie wieder erreicht war. Anschließend wurde der gebundene Rezeptor mit 4M MgCl₂ eluiert. Der Durchfluss wurde wiederum eingengt und erneut auf die Säule gegeben. Dies wurde solange wiederholt, bis kein funktionelles Protein mehr im Durchlauf vorlag. Das Elutionsprofil eines solchen Durchlaufs ist in Abbildung 4.14A dargestellt. Die eluierten Fraktionen wurden am Spektralphotometer vermessen und gegen HBS150 dialysiert. Abschließend wurde das Protein auf die gewünschte Konzentration eingengt und mit Hilfe einer SDS-PAGE (n.red.) analysiert (Abb. 3.14B). Die Lagerung der aliquotierten Ektodomänen erfolgte bei -80°C.

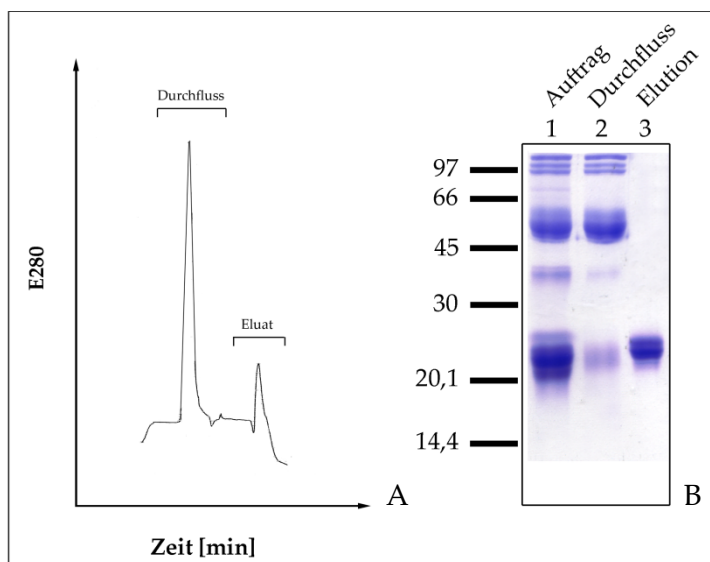


Abbildung 4.14: BMP-2-Affinitätschromatographie der BMPR-1Aecdaus SF-9 Zellen.

A: Elutionsprofil einer BMP-2-Affinitätschromatographie.

B: SDS-PAGE (n. red.) einer BMP-2-Affinitätschromatographie.

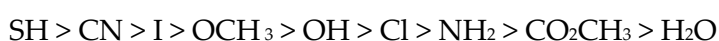
4.2 Integration von BMP Rezeptorektodomänen in Plasmamembranen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene methodische Ansätze evaluiert, die eine Kopplung von BMP Rezeptorektodomänen an Plasmamembranen ermöglichen. Im Folgenden möchte ich auf die Ergebnisse der Verwendung eines Inteins, das die Generierung eines reaktiven Thioester für eine Lipidkopplungsreaktion ermöglicht, auf die lysinspezifische Lipidierung mit Hilfe pegylierter Lipide mit einer N-Hydroxy-Succinimidylgruppe und auf die Kopplung von His-getaggten Ektodomänen an membranintegrierte Chelatlipide eingehen.

4.2.1 BMP-Rezeptor Lipidierung durch eine „Expressed Protein Ligation“

Der der „Expressed Protein Ligation“ zu Grunde liegende Mechanismus wird unter 1.4.1.2 beschrieben. Nach dem initialen *NS-Acylshift* der in *cis* vorliegenden Peptidbindung zwischen Position -1 und 1 wird die Abspaltung des Mini-Inteins im *Impact Twin* System durch Zugabe eines Thiolreagens induziert. Die Thiolgruppe wirkt dabei in einer S_N2 -Reaktion als Nukleophil und stellt anschließend eine gute Abgangsgruppe in der Ligationsreaktion dar.

In Abb. 4.11 war bereits das spontan abgespaltene MxeGyrA im Überstand zu erkennen. Während der Metallaffinitätschromatografie konnte es mit 50mM Imidazol von der Ni^{2+} komplexierten Chelatsepharose eluiert und so abgetrennt werden. Das Fusionsprotein wurde demnach schon vor der induzierten S_N2 Reaktion an der *cis*-Peptidbindung teilweise gespalten. Die Spaltung der Thioesterbindung zwischen dem ActR-2B und dem MxeGyrA kann neben Thiolgruppen, die in der organischen Chemie das stärkste nukleophile Potential aufweisen, auch von anderen nukleophilen Gruppen induziert werden. Generell lässt sich folgende Reihenfolge der Nukleophilie aufstellen:



(Quelle: <http://www.organicchemistryreview.com/NUCLEOPHILICSUBSTITUTION.html>)

Für sämtliche Schritte bis hin zur Thrombinspaltung wurden Puffersysteme auf Tris-Basis verwendet, welches drei Hydroxyl- und eine Aminogruppe beinhaltet und somit als Nukleophil die Thioesterbindung gespalten haben könnte. Zudem könnten Hydroxidgruppen, Sulfhydrylgruppen, primäre oder sekundäre Amine anderer Proteine, oder sogar entsprechende Seitenketten des TRX_ActR-2B_MxeGyrA Fusionsproteins selbst die Thioesterspaltung induziert haben. Aufgrund sterischer Hinderung ist davon auszugehen, dass eine Spaltung der Esterbindung durch den nukleophilen Angriff einer entsprechenden Seitenkette, wenn überhaupt, dann nur sehr langsam ablaufen sollte. Tris stellt ein sterisch weit weniger anspruchsvolles Nukleophil dar. Aufgrund der hohen Mobilität des niedermolekularen Stoffes ist von einer Tris induzierten Umesterung auszugehen. Ein Umstieg auf HEPES basierte Puffersysteme führte dabei zu keiner Reduzierung der spontanen Spaltung.

Spaltung der Thioesterbindung

Die Intein vermittelte Ligationsreaktion umfasst zwei Substitutionen an der Thioesterbindung zwischen Position -1 und 1. Im ersten Schritt bewirkt ein niedermolekulares Reagens mit einer Sulfhydrylgruppe eine Umesterung und verdrängt so das CBD-getaggte Intein, wodurch ein frei zugänglicher Thioester mit guter Abgangsgruppe für die zweite Substitution generiert wird. Im zweiten Schritt erfolgt eine weitere S_N2 -Reaktion, wobei hier das vorgesehene Molekül mit endständiger SH-Gruppe als Nukleophil fungiert.

Die Ektodomäne des ActR-2B beinhaltet zehn Cysteine, die 5 intramolekulare Schwefelbrücken ausbilden (Cys29 – Cys59, Cys49 – Cys77, Cys84 – Cys103, Cys90 – Cys102, Cys104 – Cys109). Um zu verhindern, dass die Disulfide während der Abspaltung des Inteins reduziert werden, wurde die Mindestkonzentration verschiedener Thiole für eine 50%ige Spaltung ermittelt. Die Spaltung erfolgte bei Raumtemperatur für 24h in HBS₃₀₀ bei pH 8,5. Kürzere Inkubationszeiten führten zu einer drastisch reduzierten Umesterung. Die einzelnen Ansätze wurden mittels SDS-PAGE (red.) analysiert und die Spalteffizienz quantifiziert. Natrium 2-Mercaptoethansulfonat (MESNA) zeigte in diesen Versuchen die

höchste Aktivität (s. Abbildung 4.15). So war es möglich, mit 50mM MESNA ca. 80% des Inteins abzutrennen, eine weitere Erhöhung auf 100mM MESNA hatte praktisch keinen Effekt. In einem zusätzlichen Ansatz wurde die dosisabhängige Spaltung durch MESNA bei 4°C untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Spalteffizienz bei einer Konzentration von 25mM MESNA und 4°C um 30% verringert war. Ab einer Konzentration von 50mM MESNA war kein Unterschied zwischen den Ansätzen bei Raumtemperatur und 4°C erkennbar.

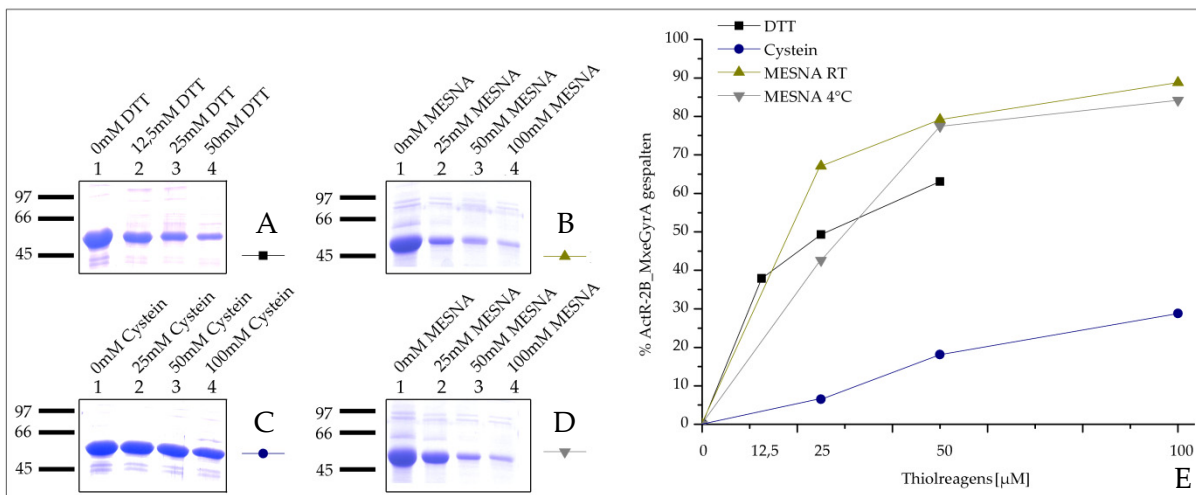


Abbildung 4.15: Dosisabhängigkeit verschiedener Thiole bei der Abspaltung des Inteins.

A-D: SDS-PAGEs (red.) der verschiedenen Spaltansätze.

E: Quantifizierung der Banden. Die höchste Spalteffizienz war bei der Verwendung von MESNA zu beobachten.

Um zu überprüfen, ob die benötigte MESNA-Konzentration die Schwefelbrücken der ActR-2B ECD reduziert, wurde wildtypische ActR-2Becd mit 12,5mM MESNA versetzt und zeitabhängig Proben mittels SDS-PAGE (ox.) und einer Superdex200-Gelchromatographie untersucht. Vor der MESNA-Zugabe, 4h, 24h und 48h danach wurden Proben entnommen und analysiert. Der Versuch wurde bei 4°C durchgeführt. Das überschüssige MESNA in den Ansätzen wurde vor der SDS-PAGE (ox.) mit einem zehnfachen Überschuss Iodacetamid (125mM) inaktiviert. Bereits nach 4 Stunden zeigte die Ektodomäne eine erhöhte Mobilität in der Elektrophorese, was auf eine zumindest teilweise Reduzierung der Schwefelbrücken zurückzuführen ist. Nach 24 Stunden ist zudem eine Dimerenbande erkennbar, nach 48 Stunden ist eine weitere Bande bei ca. 40kDa zu detektieren (Abb 4.16A). Die Di- und

Oligomeren entstehen durch Bildung intermolekularer Disulfidbindungen einzelner Ektodomänen. Sie stellen somit einen weiteren Beweis dar, dass bereits 12,5mM MESNA die strukturelle Integrität des ActR-2B zerstört. Die einzelnen Ansätze wurden ebenfalls gelchromatografisch aufgetrennt (s. Abb. 4.16B). Der korrekt gefaltete ActR-2B wurde nach 29 Minuten eluiert. Bei 35 Minuten ist ein weiterer Peak erkennbar, der mit zunehmender Inkubationszeit immer prominenter wurde. Des Weiteren ist erkennbar, dass der zum Monomer korrespondierende Peak mit zunehmender Dauer des Experiments eine vorgelagerte Schulter aufweist (Vergleich Abb. 34B und C). Nach 48 Stunden (4.16C) wurde zudem der dimere Rezeptor nach 12 Minuten eluiert.

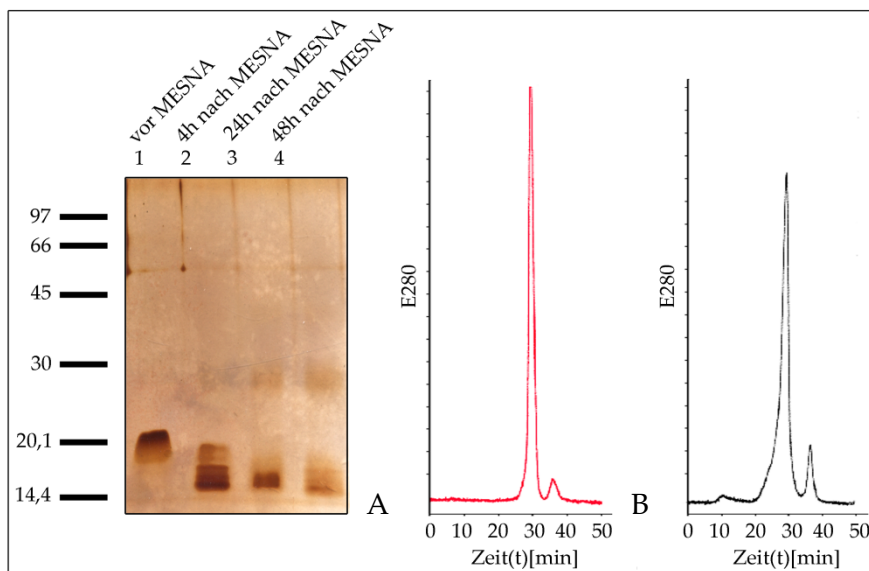


Abbildung. 4.16: MESNA induzierte Reduktion der ActR-2B ECD Disulfidbrücken.

A: SDS-PAGE (n.red.) der ActR-2B MESNA Behandlung: Bereits nach 4 Stunden Inkubation bei 4°C zeigte die Ektodomäne ein verändertes Laufverhalten, was für eine teilweise Reduzierung der Schwefelbrücken spricht. Nach 24- und 48 Stunden waren zusätzlich Di- bzw. Oligomere erkennbar.

B: Superdex200 Elutionsprofil der ActR-2B ECD vor (rot) und 48h (schwarz) nach MESNA Zugabe. Die korrekt gefaltete ActR-2B ECD wurde nach 29 Minuten eluiert. Bei 35 Minuten ist ein weiterer Peak erkennbar, der mit zunehmender MESNA-Inkubationszeit immer prominenter wurde. Nach 48 Stunden wird ein weiteres Protein nach 10 Minuten eluiert, der wahrscheinlich die dimer vorliegende Ektodomäne entspricht.

Aus den erhaltenen Ergebnissen wurde ersichtlich, dass eine spezifische Umesterung der Intra-Peptidbindung ohne gleichzeitige Reduzierung der Disulfidbrücken nicht möglich war. Um die Spalteffizienz zu optimieren, wurde an Position -1, am C-Terminus des ActR-2B

durch Mutagenese ein Tyrosin gesetzt. Die Aminosäure an dieser Position ist für die NS-Acylumlagerung von größter Bedeutung. Das Act-2B[Tyr]_MxeGyrA Fusionsprotein wurde ebenfalls in Origami B Bakterien exprimiert. Hierbei wurde deutlich, dass der Thioester in diesem Fusionsprotein bei weitem instabiler war und das Intein bereits während der Expression zu großen Teilen abgespalten wurde. Es konnte daher kein reaktiver Thioester generiert werden.

4.2.2 Membran-Integration lipidierter BMP Rezeptorektodomänen

Eine seitenkettenspezifische, Intein vermittelte Lipidierung der Ektodomäne des murinen ActR-2B war aufgrund der Disulfid-Reduzierung durch MESNA nicht möglich. Eine weitere Möglichkeit, definierte Aminosäuren zu modifizieren, stellt die Lysin-spezifische Konjugation mit Hilfe von N-Hydroxysuccinimidylestern (NHS-Estern) dar. Kato et al. verwendeten 2004 Polyethylenglykol (PEG)- Oleyl Ether mit einer endständigen NHS-Gruppe, um verschiedene Proteine und Fluorochrome aminspezifisch zu lipideren (KATO *et al.* 2004). Durch die PEG Einheiten war es möglich, die Konjugation in wässriger Umgebung und leicht basischem pH durchzuführen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die so lipiderten Moleküle spontan in die Plasmamembranen verschiedener Zelltypen integrierten, ein Vorgang, der an den Zellmembran-Einbau ektopter GPI-konjugierter Proteine erinnert („*cell paint*“) (MEDOF *et al.* 1996).

Verwendete BAM-Moleküle:

Name	Molekulargewicht	PEG-Einheiten
BAM ₂₀₀₀	2104	36
BAM ₄₀₀₀	4352	87
BAM ₈₀₀₀	8525	182

Tabelle 4.2: Beschreibung der verwendeten BAM Moleküle

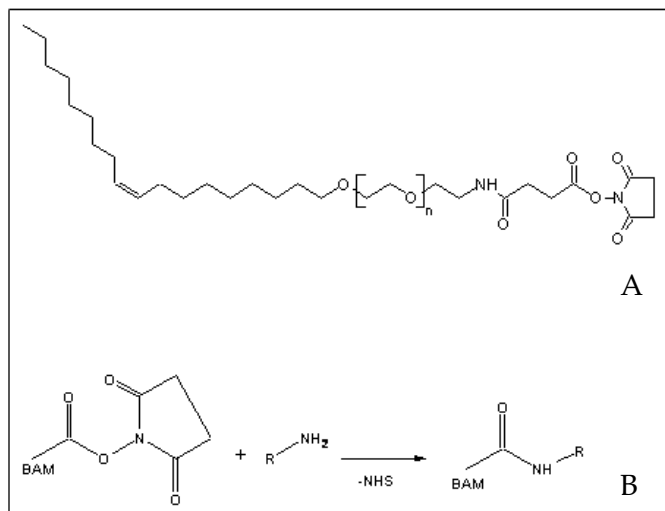


Abbildung. 4.17 Struktur und Mechanismus der Amin-reaktiven Lipide

A: Struktur eines „*biocompatible anchors for membranes*“ (BAM) mit endständiger, aminreaktiver N-Hydroxysuccinimid Gruppe (NHS).

B: Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion eines BAM-Moleküls mit einer Aminogruppe. R: beliebiger organischer Rest

In Abbildung 4.17A ist die Strukturformel der BAM-Moleküle dargestellt. Der Kopplungsmechanismus des N-Hydroxysuccinimidylesters mit einem primären Amin ist in Abbildung 4.17B zu erkennen.

Integration von Fluorescein-konjugierten BAM-Molekülen in die Plasmamembran von ATDC5 Zellen

Um die Integration der PEG-Oleyl Ether in die Plasmamembran lebender Zellen zu untersuchen, wurden BAM-Moleküle mit PEG-Linkern verschiedener Länge mit 5-Aminomethyl-Fluorescein konjugiert.

Die in DMSO gelösten BAM-Moleküle wurden im Mengenverhältnis 3:1 mit 5-Aminomethylfluorescein in 0,5M NaHCO₃, pH: 8,2 für 3 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Tris-HCl, pH: 8,2 abgestoppt und unkonjugierte Fluoresceinmoleküle durch eine Gelchromatographie (Matrix: Biogel-P6, Biorad) abgetrennt. Die Konjugatkonzentration wurde anschließend mit Hilfe eines ELISA-Readers bezogen auf die Fluoreszenzintensität normiert. Um die Integration der Fluorescein-gekoppelten BAM Moleküle in Plasmamembranen zu untersuchen, wurden auf Deckgläsern gewachsene ATDC5 Zellen mit PBS gewaschen und anschließend die Fluorescein-BAM_{2000/4000/8000}-Lösungen 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt in PBS auf die Zellen gegeben. Für die Integration der lipiderten Fluorescein Moleküle wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Kontrolle wurde mit unkonjugiertem 5-Aminomethylfluorescein auf dieselbe Weise verfahren. In Abbildung 4.18A-C ist gut zu erkennen, dass sich alle drei Konjugate in die Zellmembranen der ATDC5 Zellen integrierten. Die mit unkonjugiertem Fluorescein behandelten Zellen zeigten dagegen keine Fluoreszenz (Abb. 4.18D). Die behandelten Zellen wiesen nach der Integration der BAM Moleküle eine abgerundete Morphologie auf. Dies war auf den Fusionsprozess zurückzuführen.

Zudem wurde die Integrierung der BAM-Konjugate ebenfalls in MPC11 Zellen untersucht, um zu überprüfen, ob der Einbau in die Plasmamembranen zelltypenspezifisch ist. Wie auf Abbildung 4.18E-G zu erkennen ist, konnte die Integration der BAM-Moleküle in die Plasmamembran von MPC11 Zellen ebenfalls nachgewiesen werden. Auf den Aufnahmen ist teilweise auch eine leichte Fluoreszenz im Zytoplasma einzelner Zellen zu beobachten (Abb. 4.18C1, G1, F1, Pfeil). Da die Aufnahmen nicht mit einem konfokalen Mikroskop erstellt

wurden, ist es wahrscheinlich, dass diese Fluoreszenz von der Plasmamembran ober- oder unterhalb der optischen Ebene herrührt.

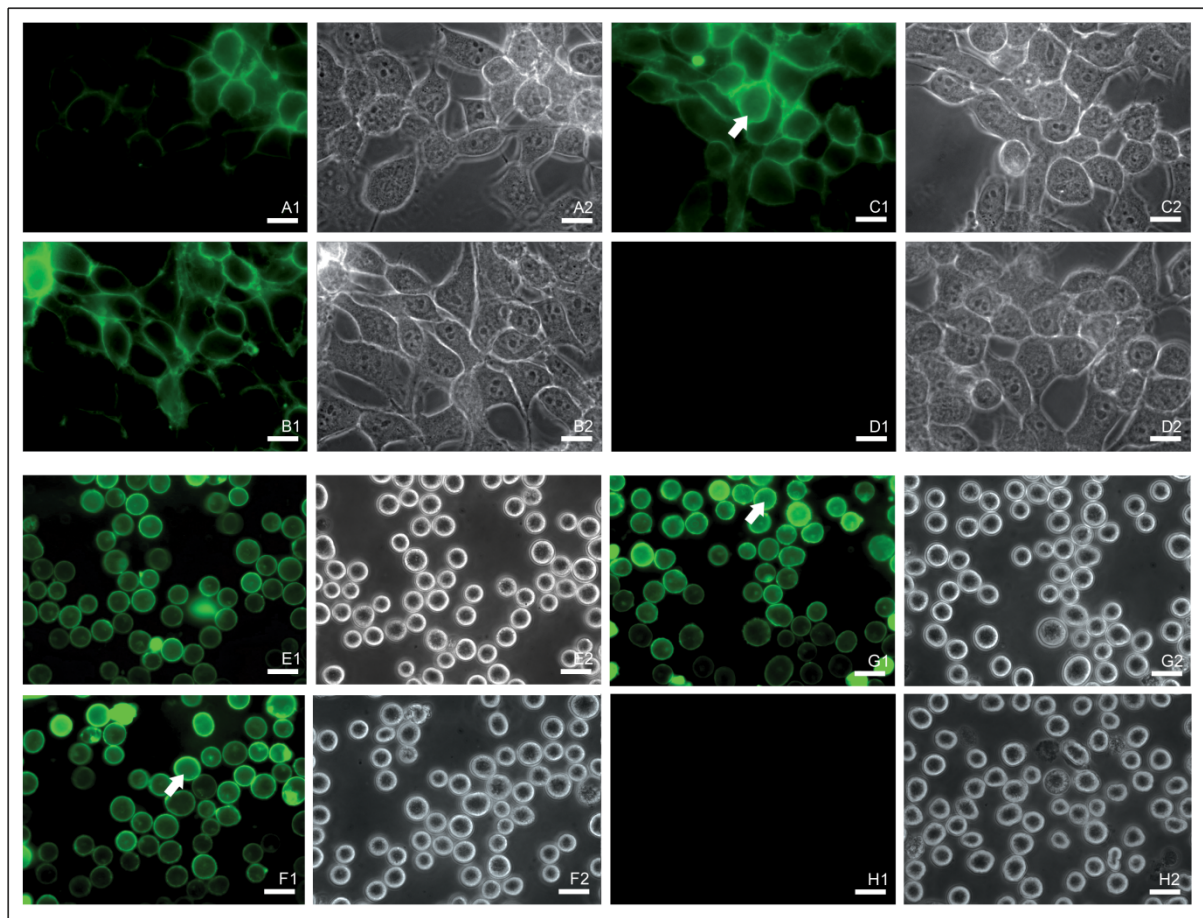


Abbildung 4.18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Fluorescein-BAM behandelter ATDC5 (A-D) Zellen und MPC11(E-H) Zellen. Auf den Bildern A, E (BAM8000), B, G (BAM4000), C, H (BAM2000) sind deutlich die Plasmamembranen der Zellen angefärbt. Abbildung D bzw. H zeigt eine Aufnahme von ATDC5 bzw. MPC11 Zellen, die mit unkonjugiertem Fluorescein behandelt wurden. Abbildungen A1-H1: Fluoreszenzaufnahmen, A2-H2: Phasekontrast. Alle Bilder entsprechen einer 1:100 Verdünnung der Konjugate. Größenskala: 15µM

Ziel der Bamylierung war es, BMP-Rezeptor Ektodomänen in die Plasmamembranen von Zellen zu integrieren, um mit einer genau definierten Anzahl an nicht funktionellen Rezeptoren BMP induzierte Signalwege zu blockieren. Um zu überprüfen, ob der Einbau der Lipide in die Plasmamembranen der ATDC5 Zellen deren Vitalität und damit auch zelluläre Signalwege beeinflusst, wurden Zellen mit den verschiedenen BAM-Konjugaten (1:100 in PBS) 10 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend identische Zellzahlen ausgesät. Als Kontrollen dienten unbehandelte ATDC5 Zellen und Zellen, die für 10 Minuten mit 1% (v/v)

Triton-X 100 behandelt wurden. Pro Ansatz wurden 3 Messungen durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die einzelnen Ansätze mit PBS gewaschen, die adhären Zellen mit Trypsin abgelöst und ausgezählt. Wie in Abbildung 4.19 deutlich zu erkennen ist, waren praktisch keine Unterschiede in der Zellzahl der BAM behandelten und unbehandelten Zellen zu erkennen. Die Integration der Lipide hatte demnach keinen Effekt auf die Vitalität der ATDC5 Zellen.

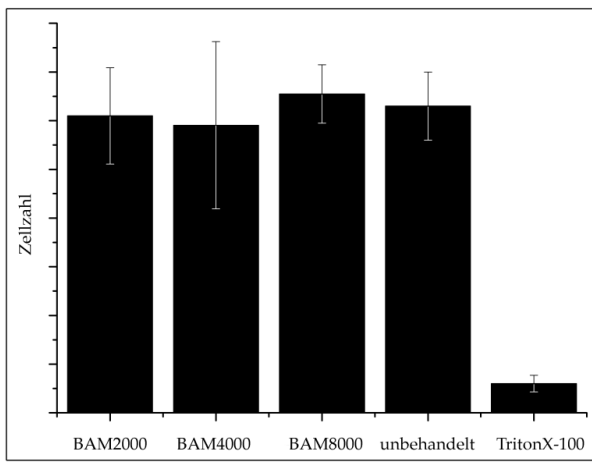


Abbildung. 4.19: Vitalitätstest von ATDC5 Zellen nach BAM-inkubation.

Die Integration von bamyliertem Fluorescein hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Um die Rate vitaler Zellen zu ermitteln, wurden unbehandelte, mit Triton-X, oder mit BAM-Molekülen der verschiedenen Molekulargewichte inkubiert.

Von einem Propidiumiodid-basierten Vitalitätstest (Lecoeur et al. 2002) wurde in diesem Fall abgesehen, da Membranfusionsprozesse die Integrität der Plasmamembran temporär beeinflussen können, wie Stebelska et al. 2006 zeigen konnten. Diese kurzzeitige Perforation der Zellmembran ist für Zellen tolerierbar.

Einbaukinetik und Retention der bamylierten Fluoresceine

Einbaukinetik:

Durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte eindeutig aufgezeigt werden, dass sich die bamylierten Fluoresceinmoleküle in Zellmembranen integrierten, unabhängig vom Zelltyp (s. Abb. 4.18). Um die Einbaukinetik der einzelnen Konstrukte zu ermitteln, wurden ATDC5-Zellen mit Trypsin-freiem Dissoziationspuffer in Suspension gebracht, mit PBS gewaschen und mit Fluorescein-BAM2000, Fluorescein-BAM4000, Fluorescein-BAM8000 und unkonjugiertem 5-Aminomethylfluorescein (je 20 μ M in PBS) bei Raumtemperatur, bzw. 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen pelletiert, mit PBS gewaschen und die Einbauraten mittels FACS-Analyse ermittelt. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 4.20 dargestellt.

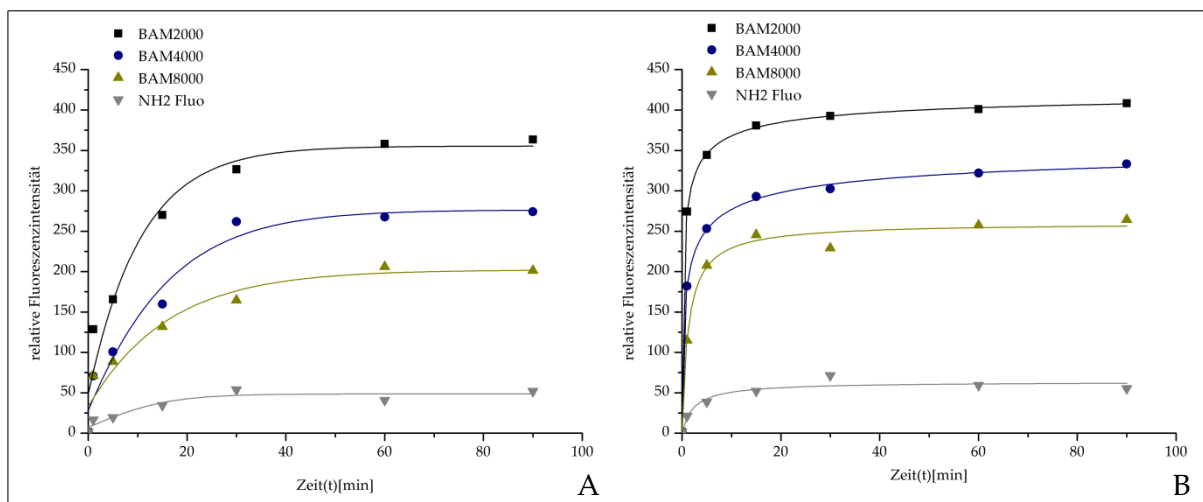


Abbildung 4.20: Fusionskinetik der Fluorescein-BAM Konjugate in ATDC5 Zellen.

ATDC5 Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit den BAM2000/4000/8000-Fluorescein Konjugaten inkubiert. Die Fusionsraten der Konjugate und von freiem 5-Aminomethylfluorescein wurden abhängig von der Zeit mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

A: Fusionsrate der Konjugate bei Raumtemperatur.

B: Fusionsrate der Konjugate bei 37°C.

Der Einbau der lipidierten Fluoresceine war dabei stark temperaturabhängig. Bei einer Inkubationstemperatur von 23°C betrug die Zeit für den halbmaximalen Einbau (EC_{50}) der Konjugate ca. 9 Minuten. Bei 37°C wurde der EC_{50} -Wert bereits nach 2 Minuten erreicht,

wobei sich die Maximalwerte in beiden Ansätzen praktisch nicht unterschieden. Das BAM2000-Fluorescein Konjugat zeigte die höchste Einbaurate, was aufgrund des im Verhältnis zum Gesamtmolekül größten hydrophoben Anteils zu erwarten war.

Retention:

Walter et al. konnten 1992 zeigen, dass ektope GPI-Proteine nach Integration in die Plasmamembranen eines zellulären Modellsystems eine abhängig von der Anzahl ihrer Lipideinheiten veränderte Retentionszeit aufwiesen (Walter et al. 1992). So waren aus Erythrocyten isolierte GPI Proteine mit 3 Lipideinheiten stabiler in der Plasmamembran verankert als GPI-verankerte Proteine mit 2 oder gar nur einer Lipideinheit. Zudem war es möglich, nur durch eine Acylkette verankertes DAF (*decay accelerating factor*) durch Zugabe von DMPC-Vesikel (*Dimyristyl Phosphatidylcholin*) aus den Plasmamembranen zu extrahieren. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass für eine stabile Integration der ektope GPI Proteine mindestens 2 Lipideinheiten nötig waren. In ihrer 2004 veröffentlichten Arbeit verwendeten Kato et al. Polyethylenglykol (PEG)- Oleyl Ether und Polyethylenglykol (PEG)- Dioeyle Ether und verglichen die Retentionszeit beider Konstrukte. Die Dioeyle-Konstrukte zeigten dabei eine stabile Integration über den gesamten Versuchszeitraum von 8 Stunden, während die Oleyl-Konstrukte nach 1 Stunde bereits auf 10% des ursprünglichen Wertes abgesunken waren. Um mit Hilfe bamylierter Rezeptoren bestimmte BMP-Signalwege zu blockieren, ist es nötig, dass diese über einen Zeitraum von ca. 60 Minuten stabil in der Plasmamembran verankert sind. Um die Retentionszeit der 3 BAM-Moleküle zu untersuchen, wurden MPC11-Zellen mit 20µM Fluorescein-BAM2000/4000/8000 für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und mit 2x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in DMEM ohne Zusätze bei 37°C inkubiert und die Fluoreszenz der Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten mittels FACS-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 4.39 zu erkennen ist, sank die Fluoreszenzintensität bereits nach 30 Minuten auf ca. 50% ab. Nach 60 Minuten war nur noch ein Fünftel der ursprünglichen Fluoreszenz detektierbar. Zudem wurde die Lokalisierung der BAM Moleküle nach 90 Minuten unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (nicht gezeigt). Die OrgenonGreen® markierten BAM Moleküle waren in den

Plasmamembranen der Zellen und zudem im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Die pegylierten Lipide wurden demnach teilweise internalisiert. Das Molekulargewicht des PEG-Linkers scheint auf die Retention der BAM-Moleküle in der Plasmamembran keinen Einfluss zu haben: Wie aus der Abbildung 4.21 ersichtlich wird, verringert sich die Fluoreszenzintensität bei allen drei getesteten Molekülen annähernd im gleichen Maße.

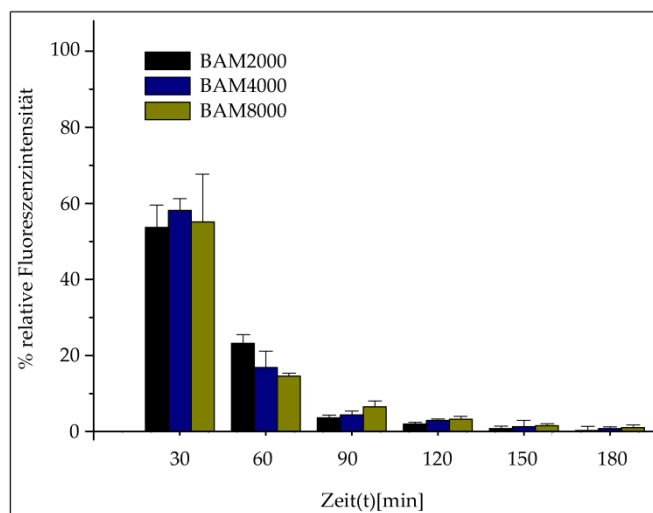


Abbildung 4.21: Retentionszeit der BAM-Moleküle.

MPC11 Zellen wurden mit Fluorescein markiertem BAM2000, BAM4000 und BAM8000 inkubiert und die Fluoreszenzintensität zeitabhängig mittels FACS-Analyse über einen Zeitraum von 3 Stunden nach der Inkubationszeit untersucht.

4.2.2.1 Bamylierung von BMP-Rezeptoren:

Für initiale Versuche wurden die Rezeptortodomänen ActR-1A (*SF9*), ActR-2B (*SF9*), ActR2B (*E. Coli*), BMPR-1A (*E. Coli*) und BMPR-2 (*SF9*) mit allen drei BAM-Molekülen umgesetzt. Um zu verhindern, dass durch die Kopplung der BAM-Moleküle an die Rezeptortodomänen BMP-Bindeepitope blockiert werden und damit die biologische Aktivität der Rezeptoren beeinflusst wird, sollten Bedingungen ermittelt werden, welche zu einem möglichst großen Anteil monokonjugierter Rezeptoren führen. Die Rezeptoren wurden mit den 3 BAM Molekülen in verschiedenen molaren Verhältnissen in Natriumcarbonatpuffer umgesetzt und für verschiedene Zeiten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konjugationsreaktionen wurden anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE Analysen (red.) untersucht. In den BAM2000 und BAM4000 Ansätzen waren

monokonjugierte Rezeptortodomänen nach der Silberfärbung der Gele nur im Falle des ActR-2B detektierbar. Die Oligokonjugate der beiden BAM Moleküle zeigten ein diffuses Laufverhalten in der Elektrophorese, was durch die BAM-Kopplung an verschiedene Lysinreste bei gleicher BAM-Gesamtzahl pro Ektodomäne zu erklären ist. Einzig die Kopplung des BAM8000 Moleküls an die Rezeptoren lieferte detektierbare Mengen an Monokonjugaten, wie exemplarisch für den BMPR-2 dargestellt (Abbildung 4.22). Für weitergehende Versuche sollten die in biologischen Systemen wichtigsten BMP-2 Typ I und Typ II Rezeptoren, BMPR-1A und BMPR-2, sowie der promiskuitive Rezeptor ActR-2B verwendet werden. In Abb. 4.22 ist die Quantifizierung der BAM8000-Kopplung an die drei Rezeptoren abhängig von der Anzahl der BAM Moleküle dargestellt. Um die Kopplungseffizienz zu erhöhen, wurden verschiedene Strategien verfolgt. Im Falle des ActR-2B war eine Verlängerung der Reaktionszeit auf drei Stunden bei Raumtemperatur ausreichend, um ca. 40% monokonjugierte Rezeptoren zu erhalten. Dagegen waren bei der Bamylierung des BMPR-1A selbst nach sieben Stunden praktisch keine Unterschiede zu den Ergebnissen nach einer Stunde erkennbar (nicht gezeigt). Eine Erhöhung des molaren Verhältnisses vergrößerte die Ausbeute an Monokonjugaten nur unwesentlich, während sich der Anteil an Oligokonjugaten deutlich erhöhte, wie in Abb. 4.22B zu erkennen ist. Die Verwendung von bis zu 4M Harnstoff, um die Zugänglichkeit der Lysin-Amine zu erhöhen, hatte praktisch keinen Effekt. Die Zugabe von CHAPS steigerte den Anteil an monokonjugiertem BMPR-1A auf bis zu 45%, wobei eine Konzentration von 10mM CHAPS die größten Ausbeuten ermöglichte (s. Abb. 4.22, graue Balken). Im Falle der BMPR-2ecd konnte durch eine Verringerung der Inkubationsdauer von drei auf eine Stunde eine ca. 35%ige Monobamylierung unter Verwendung eines zehnfachen Überschusses BAM8000 erzeugt werden.

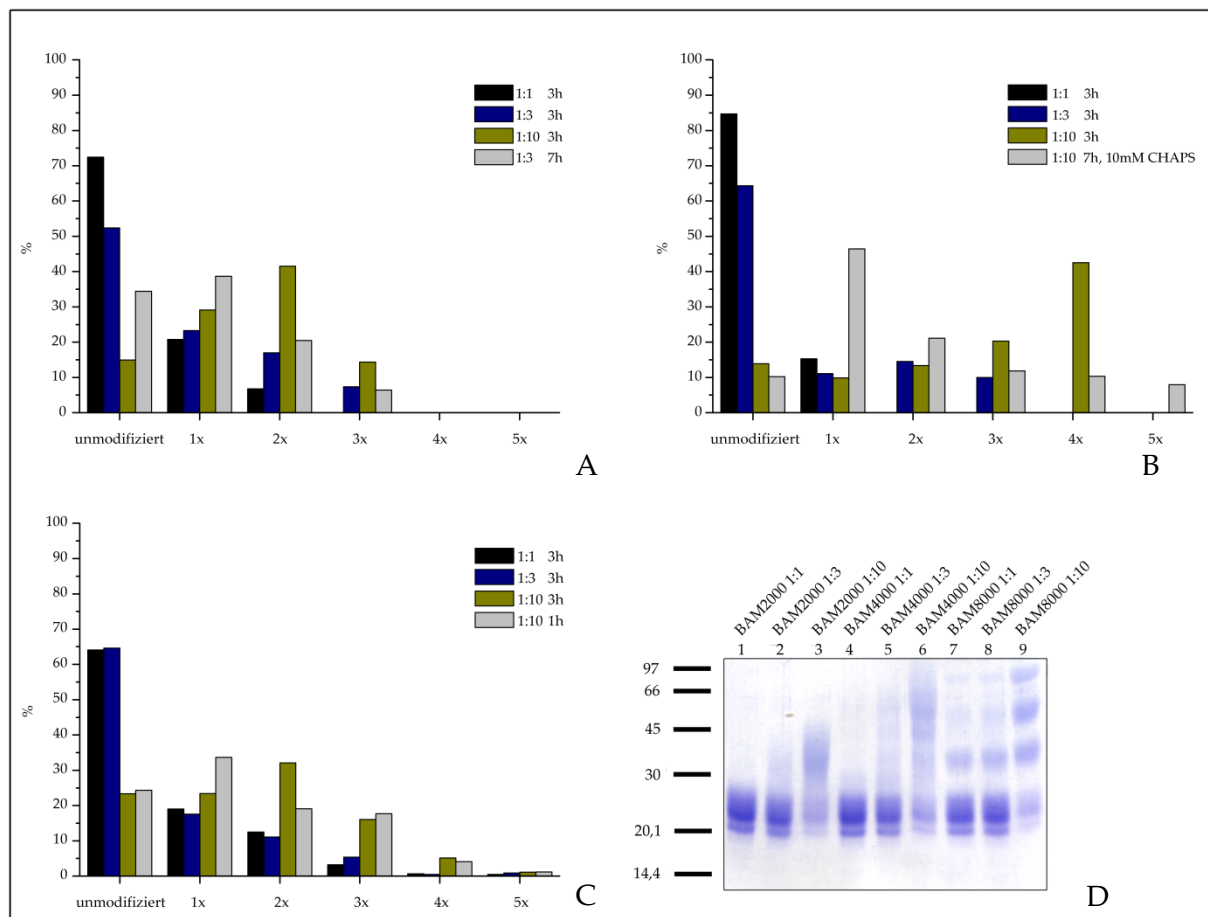


Abbildung 4.22: SDS-PAGE Quantifizierung der BMP-Rezeptor-Bamylierung.

Die Ektodomänen der Rezeptoren **(A)** ActR-2B, **(B)** BMPR-1A und **(C)** BMPR-2 wurden für verschiedene Zeiten mit BAM8000 äquimolar, mit dreifachem Überschuss, oder zehnfachem Überschuss umgesetzt. Die Kopplung wurde anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert und die Produktverteilung quantifiziert.

(D): SDS-PAGE (red.) der Bamylierung des BMPR-2. Markerangaben in kDa.

4.2.2.2 Aufreinigung der monobamylierten Rezeptoren

Die monobamylierten Rezeptoren wurden nach der Kopplung mit Hilfe einer RP-HPLC an einer analytischen Vydac C4-Säule von unkonjugierten Rezeptorektodomänen, Oligokonjugaten und BAM Molekülen abgetrennt. Hierfür wurden die Ansätze mit Hilfe eines 5ml Loops auf die Säule aufgetragen und das Protein in einem linearen Acetonitril Gradienten (in 60 Minuten auf 100%) bei einer Flussrate von 0,8ml/min von der Säulenmatrix eluiert. Abbildung 4.23A zeigt exemplarisch das Elutionsprofil des konjugierten ActR-2B. Der monobamylierte Rezeptor konnte dabei mit 70% ACN eluiert werden. Die

entsprechenden Fraktionen wurden photometrisch vermessen und die proteinbeinhaltenden Proben gefriergetrocknet und mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert (s. Abb. 4.23B).

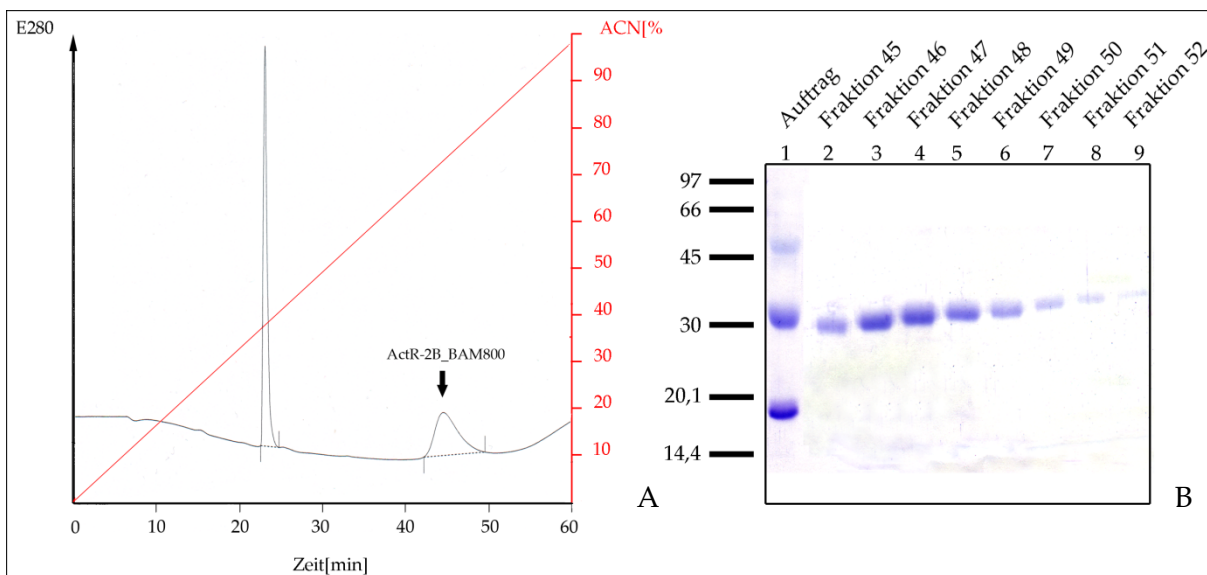


Abbildung 4.23: HPLC Elutionsprofil der ActR-2B BAM8000 Konjugation.

A: HPLC Elutionsprofil des bamylierten Rezeptors ActR-2B. Durch die HPLC konnten unkonjugierte Rezeptoren und oligobamylierte Ektodomänen abgetrennt werden.

B: SDS-PAGE (red.) des HPLC-Laufs. Auffallend ist die unterschiedliche Laufhöhe des Konjugats.

Auffallend hierbei war, dass der konjugierte Rezeptor in einem breiten Peak über einen Bereich von 8 Fraktionen eluiert wurde. Zudem zeigte der monobamylierte ActR-2B kein einheitliches Laufverhalten während der Elektrophorese. Dies ist wahrscheinlich durch die Bamylierung unterschiedlicher Lysinreste zu erklären.

4.2.2.3 Visualisierung der BMPR-1A_BAM8000 Membranintegration

Um den Einbau der bamylierten Rezeptoren zu überprüfen, wurde OregonGreen® markierter BMPR-1A mit BAM8000 umgesetzt. Um die Ektodomäne mit dem fluoreszierenden Farbstoff zu markieren, wurde bereits ein Amin-reaktives Fluorochrom verwendet, wobei im Durchschnitt 3 Lysinreste modifiziert wurden (photometrische Auswertung). Um die Zugänglichkeit der Lysinreste des bereits markierten Rezeptors zu erhöhen, wurde der Bamylierungsreaktion 50mM β -Mercaptoethanol beigemischt und ein 100facher BAM8000 Überschuss verwendet. Die Kopplungsreaktion konnte anschließend

anhand einer SDS-PAGE analysiert werden (nicht gezeigt). Der Rezeptor wurde gegen HBS150 dialysiert und der Einbau der Rezeptoren in die Plasmamembranen von ATDC5 Zellen am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und mit einer 5, bzw. 10 μ M Lösung des doppelt markierten Rezeptors für fünf Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. In Abbildung 4.24 sind ATDC5 Zellen mit in die Plasmamembranen integrierten BMPR-1A zu erkennen. Durch die Integration der bamylierten Rezeptoren zeigten die ATDC5 Zellen wiederum eine abgerundete Morphologie, entsprechend den Ergebnissen der Fluorescein gekoppelten BAM Moleküle. Zur Kontrolle, ob die Integration der Rezeptoren auf das BAM Molekül zurückzuführen ist, wurde nicht bamylierter, OregonGreen® markierter BMPR-1A in denselben Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Hierbei war nach dem Waschschrift keine Fluoreszenz erkennbar (nicht gezeigt). Im Vergleich zu den Fluorescein markierten BAM Molekülen zeigten die Rezeptorektodomänen eine wesentlich schwächere Integration in die Plasmamembranen (Erhöhung der Belichtungszeit um den Faktor ~100).

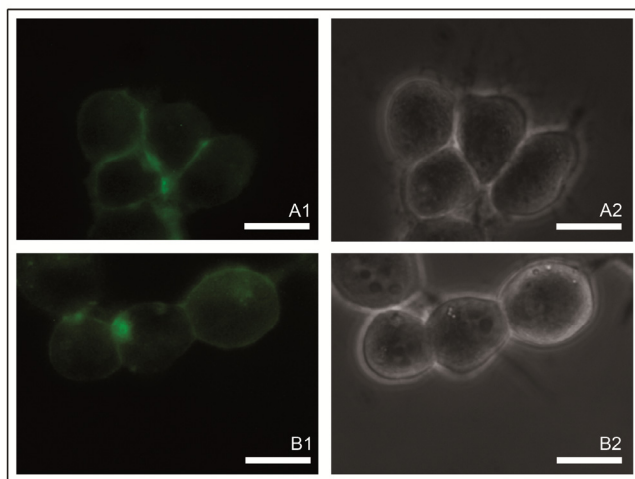


Abbildung 4.24: Integration der bamylierten Rezeptoren in die Plasmamembran von ATDC5 Zellen. Der fluoreszenzmarkierte, bamylierte Rezeptor wurde in die Zellmembran von ATDC5 Zellen integriert.

A1: ATDC5 Zellen mit 10 μ M BMPR-1A_BAM8000.

A2: Phasenkontrastaufnahmen

B1: ATDC5 Zellen mit 5 μ M BMPR-1A_BAM8000

B2: Phasenkontrastaufnahmen

Größenskala: 10 μ m

Um zu überprüfen, ob die plasmamembranintegrierten, monobamylierten Rezeptoren BMPR-1A, ActR-2B und BMPR-2 BMP-2 einen dominant negativen Effekt auf BMP-2 induzierte Signalwege zeigten, wurden ATDC5 Zellen für 10 Minuten mit je 5 μ M Rezeptorektodomänen in PBS bei 37°C inkubiert und die Zellen anschließend gewaschen.

Die Smad1, 5 Phosphorylierung wurde anschließend durch 0,3nM BMP-2 für 30min induziert. Hierbei zeigte sich, dass keine der Rezeptoren einen inhibierenden Effekt auf die Smad Aktivierung aufwies. Die BAM-vermittelte Integration von BMP-Rezeptortodomänen in Plasmamembranen konnte demnach nicht verwendet werden, um Rezeptor-Ligand Interaktionen innerhalb der Membranebene zu studieren.

4.2.3 Integration von BMP Rezeptoren mit Hilfe von Chelatlipiden

Eine Möglichkeit, ektope Proteine in die Plasmamembran von Zellen zu integrieren, stellen Chelatlipide dar (VAN BROEKHOVEN *et al.* 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Lipid mit drei NTA-Gruppen verwendet (s. Abb. 4.25), welches freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. J. Piehler zur Verfügung gestellt wurde. Das Tris-NTA-Lipid (SOA) wurde in Liposomen im Mengenverhältnis [Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC)] **80** : [SOA] **20** : [Texas-Red® 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin](DHPE Texas-Red®) **1** integriert. Nach der Fusion der Liposomen mit zellulären Plasmamembranen stehen die Tris-NTA-Gruppen als Anker für beliebige His₆ – Proteine zur Verfügung. Zudem erlaubt es das Fluorochrom-markierte Lipid, den Fusionsprozess direkt zu verfolgen. Die Fusion der Liposomen wurde mit Polyethylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 400g/mol induziert. Chelatlipide sind bisher vor allem zu in vitro Protein-Protein Interaktionsanalysen, der 2d-Kristallisation und zur Klärung von Membranfusionsprozessen verwendet worden (s. Einleitung). Des Weiteren konnten van Broekhoven et al. Zellen nach der Fusion von Chelatlipid-beinhaltenden Liposomen mit His₆-Proteinen beladen und dadurch Immunreaktionen hervorrufen. In dieser Arbeit sollten die gekoppelten Proteine nicht ausschließlich auf der Zelloberfläche als Epitope fungieren, sondern funktionell in die BMP-2 induzierte Signaltransduktion eingreifen.

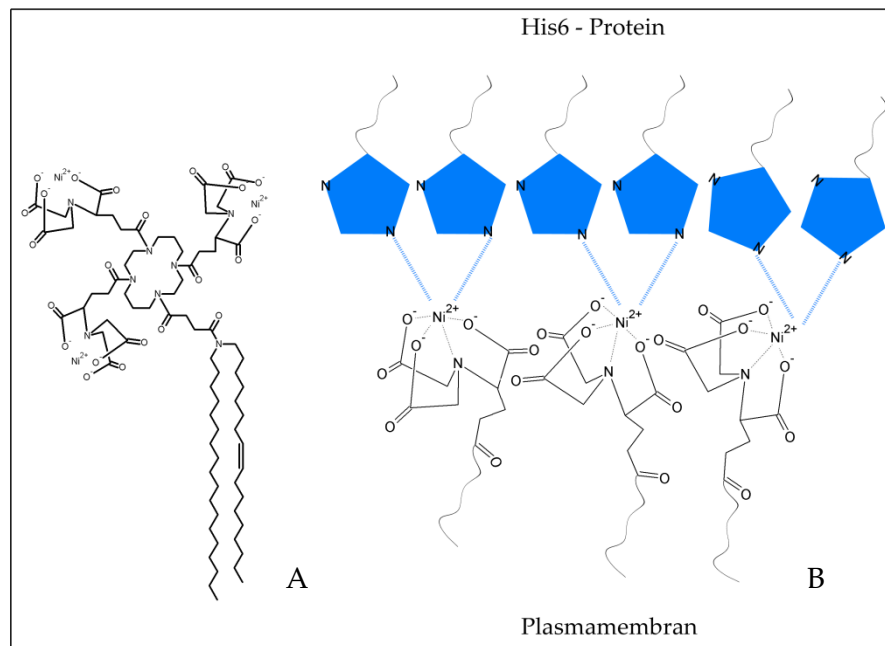


Abbildung 4.25: Schematische Darstellung der SOA-vermittelten Proteinbindung.

A: Struktur des verwendeten Chelatlipids SOA mit komplexierten Ni²⁺-Ionen.

B: Schema der Bindung eines Hexahistidintags an drei NTA-Gruppen mit komplexierten Ni²⁺-Ionen.

NTA (Nitrilotriacetat) stellt einen vierzähligen Komplexbildner dar, der eine Vielzahl verschiedener Metallionen binden kann. Für die Immobilisierung von BMP Rezeptor Ektodomänen mit Hexahistidin-Tag sind stabile Bindungen bivalenter Metallkationen sowohl an die NTA Gruppen, als auch an das His₆ Tag der rekombinanten Proteine von Bedeutung. In Abbildung 4.26 sind die Stabilitätskonstanten verschiedener Metallkation-NTA Komplexe und Metallkation-Histidin Komplexe nach Martell, A.E. (MARTELL'S NIST CSSCMC, 2006) aufgezeigt (http://george-eby-research.com/html/stability_constants.html).

Die Konstante berechnet sich nach:

$$k_{stab} = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]}$$

k_{stab} : Stabilitätskonstante, M: Metallkation, L: Ligand

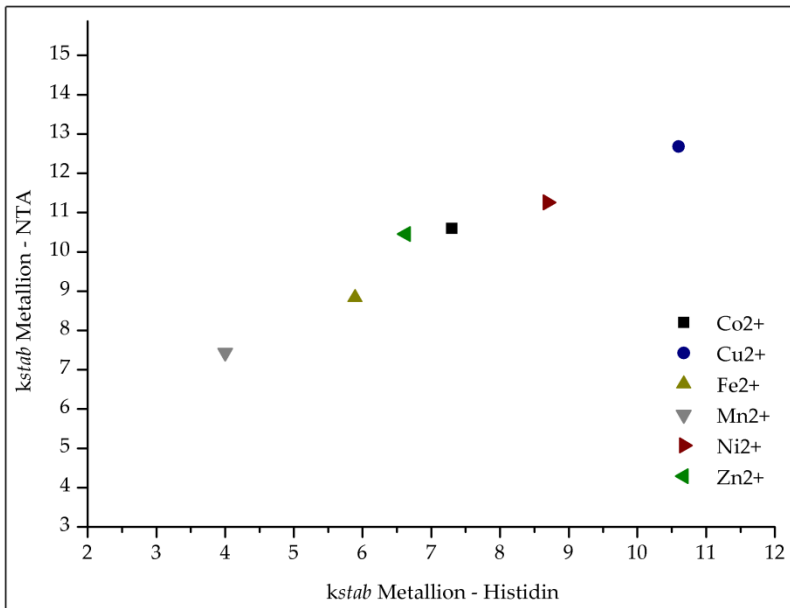


Abbildung 4.26: Stabilitätskonstanten von Metall-NTA und Metall-Histidin Komplexen

Die Metall-Ligand Komplexe werden dabei definitionsgemäß ab einer Stabilitätskonstanten von 6 in physiologischer Umgebung als stabil angesehen. Auffallend ist, dass die Bindung der verschiedenen Metallkationen an die NTA-Gruppe mit der Bindungsstabilität der NTA Gruppe zum Histidin-Tag korreliert zu sein scheint. Cu²⁺ weist in beiden Komplexen die höchste Stabilitätskonstante auf, jedoch ist eine Verwendung in Versuchen mit Zellen ebenso wie die von Cobaltsalzen aufgrund der Toxizität nicht sinnvoll. Generell lässt sich nach Jaromir et al. folgende Reihenfolge der Giftigkeit aufstellen: $Cd > Co > Cr > Cu > Pb > Ni > Zn > Al > Fe$ (LUKAVSKY *et al.* 2003). Aus den Daten wird ersichtlich, dass für die Immobilisierung der Rezeptoren auf die Plasmamembran von Zellen Zink- oder Nickelmetallsalze die günstigsten Eigenschaften in Bezug auf Affinität und Toxizität besitzen.

4.2.3.1 Fusion der Liposomen mit Plasmamembranen

Die Liposomen wurden nach der Präparation aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde ein Aliquot aufgetaut und erneut für 60 Sekunden beschallt. Auf diese

Weise wurde sichergestellt, dass die Liposomen als SUVs („*small unilamellar vesicles*“) vorlagen (VAN BROEKHOVEN *et al.* 2000). Die Liposomenfusion sollte durch FACS Analysen prinzipiell überprüft und durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. MPC11 und ATDC5 Zellen wurden hierfür in PBS gewaschen und mit Liposomen (Lipidkonzentration: 1mM) inkubiert. Die Fusion der Liposomen wurde nach dem Waschen der Zellen mit PBS durch eine 15%ige PEG-Lösung in PBS induziert. Um zu überprüfen, ob die Liposomen in die Plasmamembran integriert wurden, wurden die Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Hierbei zeigten beide Zelltypen eine Steigerung der Fluoreszenz um das ca. 100fache (s. Abb. 4.27 A1, A2), wobei die ATDC5 Zellen eine höhere Fluoreszenz aufwiesen. In beiden Fällen zeigten die liposomenbehandelten Zellen keine einheitliche Liposomenaufnahme. Die unbehandelten Zellen sind in rot dargestellt, die liposomenbehandelten Zellen in schwarz.

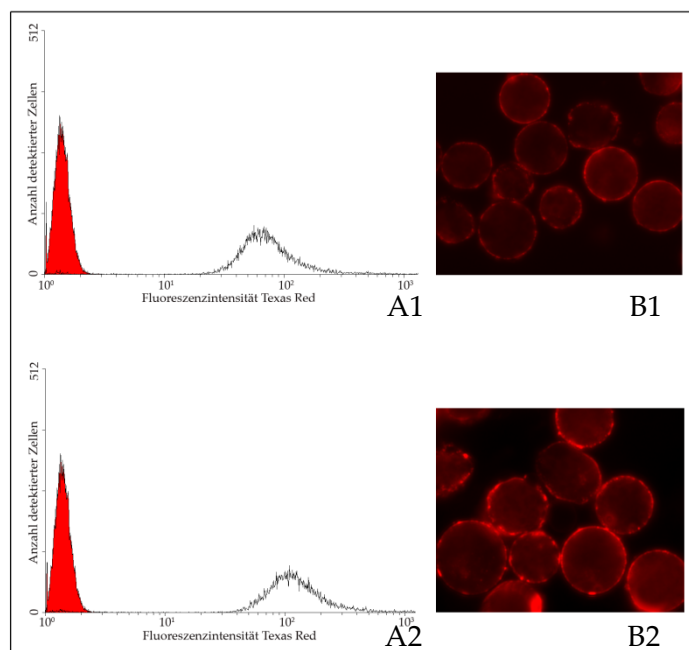


Abbildung 4.27: FACS Analyse und Visualisierung der Liposomenfusion. ATDC5 und MPC11 Zellen wurden mit Ni²⁺-komplexierten Liposomen (1mM Lipide, 1mM NiCl₂) fusioniert und am FACS, bzw. fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

A1: FACS Analyse der MPC11 Zellen nach Liposomenzugabe. Rot: unbehandelte Zellen; Schwarz: Liposomenbehandelte Zellen.

B1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der liposomenbehandelten MPC11 Zellen

A2: FACS Analyse der ATDC5 Zellen nach Liposomenzugabe. Rot: unbehandelte Zellen; Schwarz: Liposomenbehandelte Zellen.

B2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der liposomenbehandelten ATDC5 Zellen

Mit zusätzlichen Untersuchungen der Zellen am Fluoreszenzmikroskop konnte belegt werden, dass sich die Lipide in die Plasmamembran integriert hatten und nicht auf anderem Wege von den Zellen aufgenommen wurden. In den Abbildungen 4.27B1, B2 sind exemplarische Aufnahmen der mit Liposomen behandelten Zellen zu erkennen. In beiden Fällen sind die Plasmamembranen deutlich angefärbt. Dies zeigt, dass mit dem ausgearbeiteten Protokoll der Liposomenfusion die Lipide in die Plasmamembran integriert werden konnten.

Auffallend hierbei war, dass die Fusionsrate der Liposomen stark abhängig war von der Komplexierung der Chelatlipide mit einem bivalenten Metallion. ATDC5 Zellen wurden mit Liposomen verschiedener Konzentration fusioniert und die Fusionsrate abhängig von den verwendeten Metallionen am ELISA-Reader ermittelt. Hierbei wurde ersichtlich, dass Zn^{2+} -komplexierte Liposomen die Fusion um das bis zu Fünffache, verglichen mit Ni^{2+} -Ionen, steigerten (s. Abb. 4.28). Gegenüber Liposomen ohne Metallion wird die Fusion durch Nickel um bis das Sechsfache gesteigert, durch Zink um das ca. 30-fache.

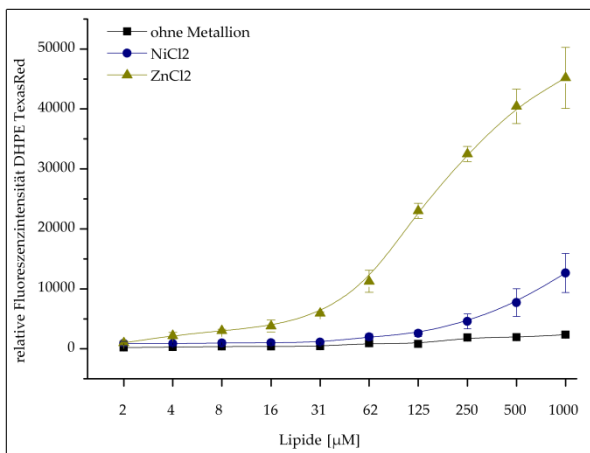


Abbildung 4.28: Einfluss bivalenter Metallionen auf die Fusionsrate der Liposomen. ATDC5 Zellen wurden mit verschiedenen Liposomenkonzentrationen inkubiert und die Fusionsrate der Liposomen mit Hilfe eines ELISA Readers anhand der Fluoreszenzintensität der Zellen bestimmt.

Die Fusionsrate der Liposomen erfolgte dabei abhängig von der Konzentration der verwendeten Liposomenkonzentration.

Entsprechend der Versuche, die unter 4.19 vorgestellt werden, sollte überprüft werden, ob die Integration ektopter Lipide durch die Fusion zellulärer Plasmamembranen mit

Liposomen die Vitalität der Zellen beeinträchtigte. Hierfür wurden ATDC5 und MPC11 Zellen mit Liposomen einer 1mM Lipidkonzentration fusioniert. Anschließend wurden identische Zellzahlen ausgesät und die Anzahl der lebenden Zellen nach 24 Stunden in der Neubauer Kammer untersucht. Dabei zeigten weder Zn^{2+} noch Ni^{2+} -komplexierte Liposomen einen Effekt auf die Vitalitätsrate der untersuchten Zellen. In Abbildung 4.29 ist der Effekt von Ni^{2+} - und Zn^{2+} -komplexierten Liposomen auf die Vitalität der Zellen dargestellt.

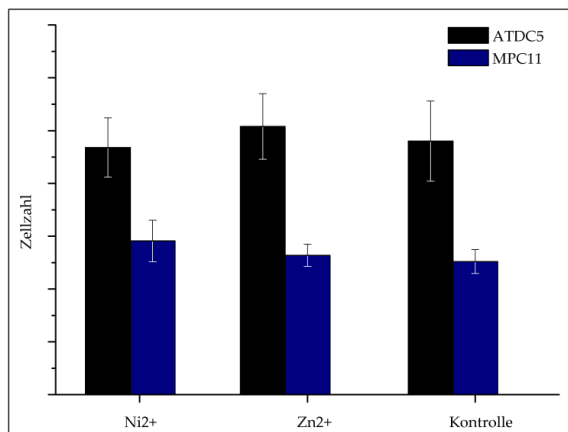


Abbildung 4.29: Einfluss der Liposomenfusion auf die Vitalität von ATDC5- und MPC11 Zellen.

Die Zellen wurden mit Nickel/Zink beladenen Liposomen einer Lipidkonzentration von 1mM fusioniert und identische Zellzahlen in den jeweiligen Ansätzen ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Anzahl lebender Zellen bestimmt.

Um genauere Aussagen über die Fusionsrate und die daraus resultierende Menge ektopter Lipide in den Plasmamembranen der verwendeten Zellen treffen zu können, wurden die Zellen mit Zn^{2+}/Ni^{2+} -beladenen Liposomen fusioniert und die Zellen am Coulter Counter® Z2 vermessen. Die in die Zellmembranen eingebrachten Lipide sollten den Zellumfang abhängig von der Anzahl der eingebauten Lipide vergrößern. ATDC5 und MPC11 Zellen wurden mit Metallion-komplexierten Lipiden unterschiedlicher Lipidkonzentrationen (10-1000 μ M) inkubiert und die Zellgröße nach der Fusion vermessen. Vor dem Erstellen der Liposomenverdünnungsreihe wurden die Chelatlipide mit Ni^{2+}/Zn^{2+} äquimolar beladen. In der Abbildung 4.30 sind die Ergebnisse der Untersuchungen von ATDC5 und MPC11 Zellen am Coulter Counter dargestellt. Entsprechend der vorangegangenen Ergebnisse war die Größendifferenz unter Verwendung von Zink Ionen größer als bei Ni^{2+} komplexierten Liposomen. Die Größenzunahme war zum einen abhängig von der Lipid Konzentration,

zum anderen abhängig von der Metallionen Konzentration. So führten Liposomen, die vor dem Erstellen der Verdünnungsreihe mit 100-600 μ M Metallionen beladen wurden, zu einer geringeren Größenzunahme der Zellen nach der Fusion (nicht gezeigt). Liposomen ohne gebundene Metallionen führten selbst bei einer Lipidkonzentration von 1mM zu annähernd keiner Oberflächenvergrößerung beider Zelltypen. Zn²⁺-beladenen Liposomen vergrößerten den Durchmesser von 10% der ATDC5 Zellen von 18,9 auf 21,8 μ m. Selbst unter der Verwendung einer Liposomensuspension einer 10 μ M Lipid-Lösung konnten 10% der Zellen von 18,9 auf 19,2 μ m vergrößert werden. Im Falle der Nickelionen beladenen Liposomen war eine maximale Größenzunahme von 18,9 μ m auf 21 μ m der ATDC5 Zellen zu verzeichnen. Die MPC11 Zellen zeigten eine maximale Größenzunahme des Zelldurchmessers der Zellen von 12,9 auf 15,97 μ m mit Hilfe von Zn²⁺-beladenen Liposomen und von 12,9 auf 15,2 μ m unter Verwendung von Ni²⁺-Ionen. Da die Größenverteilung der fusionierten Zellen der Normalverteilung folgte, stellten die Werte, die der Größenzunahme von 50% der Zellen entsprach, eine gute Näherung dar für die durchschnittliche Menge an fusionierten Lipiden in beiden Zelltypen. Zudem wurden Liposomen ohne das SOA-Chelatlipid hergestellt. Die Liposomen, welche aus 99% POPC und 1% DHPE TexasRed® zusammengesetzt waren, wurden ebenfalls mit ATDC5 und MPC11 Zellen fusioniert. Obwohl die Lipidkonzentration dieser Liposomen bis auf das Zehnfache gesteigert wurde, konnten keine vergleichbaren Fusionsraten nach Analyse der Zellen am Fluoreszenzmikroskop und dem Vermessen der Zellen am Coulter Counter ermittelt werden. Mit steigender Lipidkonzentration sank die Rate vitaler Zellen nach dem Fusionsprozess erheblich. Die Verwendung von Liposomen einer Lipidkonzentration von 10mM führte zu ca. 80% abgestorbenen Zellen. Ohne das mit Metallionen beladene SOA-Lipid war es folglich nicht möglich, ähnliche Fusionsraten zu erreichen.

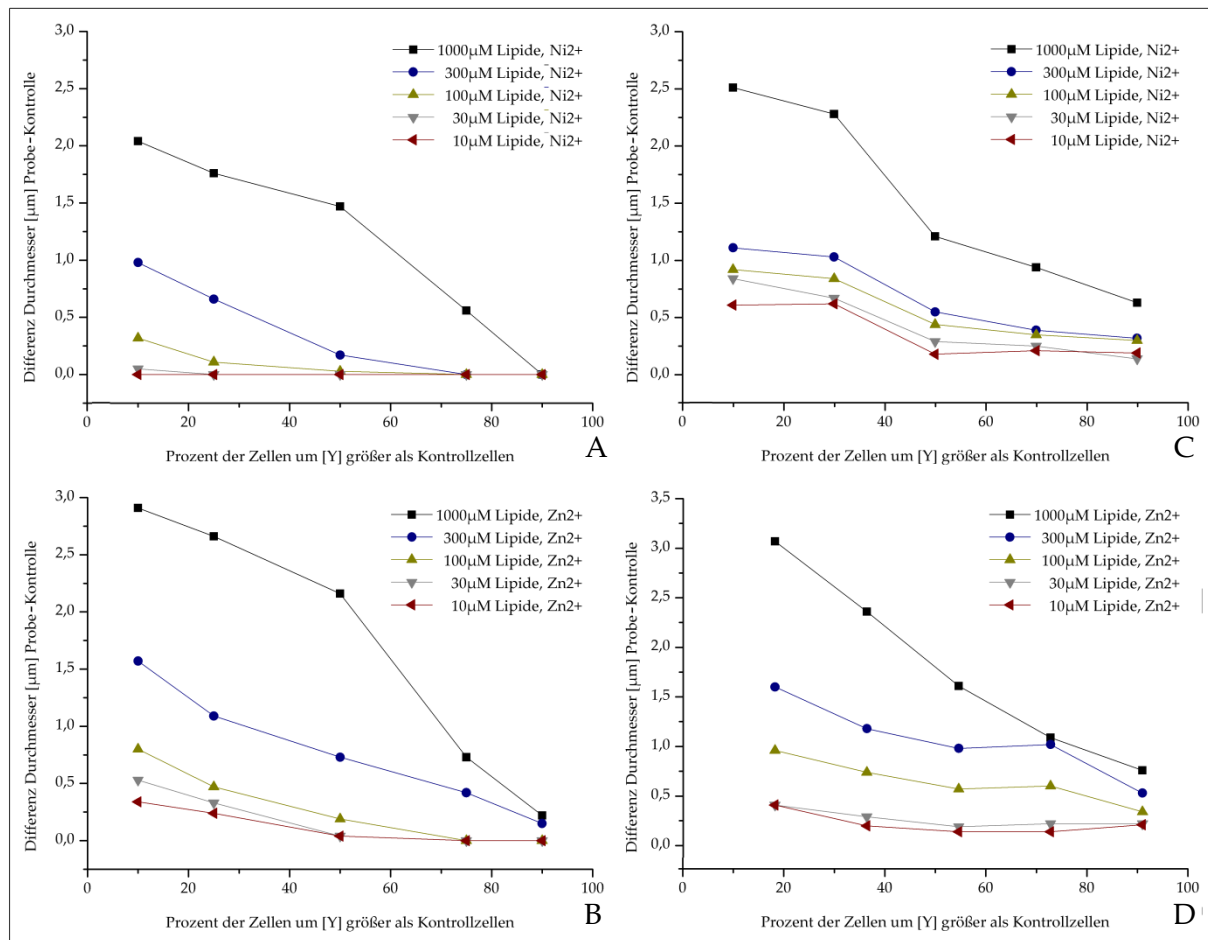


Abbildung 4.30: Größenzunahme von ATDC5 und MPC11 Zellen nach der Fusion mit Liposomen.

Die Zellen wurden mit Liposomen unterschiedlicher Lipidkonzentrationen inkubiert und die Größenzunahme der Zellen abhängig vom komplexierten Metallion am Coulter Counter ausgewertet.

A: Größenzunahme von ATDC5 Zellen durch Ni^{2+} -komplexierten Liposomen.

B: Größenzunahme von ATDC5 Zellen durch Zn^{2+} -komplexierten Liposomen.

C: Größenzunahme von MPC11 Zellen durch Ni^{2+} -komplexierten Liposomen.

D: Größenzunahme von MPC11 Zellen durch Zn^{2+} -komplexierten Liposomen.

Die Werte, die der Größenzunahme von 50% der ATDC5- und MPC11 Zellen entsprechen, sind in Abbildung 4.31A und B für Ni^{2+} und Zn^{2+} beladene Liposomen angegeben. Mit Hilfe dieser Werte lassen sich Kalkulationen aufstellen über die Menge integrierter Lipide und die Fusionsrate der Liposomen. Zudem wurde ersichtlich, dass die Fusion der Lipide nicht linear mit der Lipidkonzentration anstieg. MPC11 Zellen konnten bereits durch Liposomenkonzentrationen von $10\mu\text{M}$ messbar in ihrem Durchmesser vergrößert werden. Dies kann zum einen in zelltypspezifischen Unterschieden bezüglich der Lipid-Aufnahme begründet sein. Zum anderen weisen ATDC5 Zellen einen im Durchschnitt ca. $6\mu\text{m}$ größeren Durchmesser auf als MPC11 Zellen, weswegen sie im Vergleich mehr Lipide aufnehmen

müssen, um die gleiche Oberflächenvergrößerung vorzuweisen. Die ATDC5 Zellen wurden für die Größenbestimmung mit Hilfe eines Protease-freien Dissoziationspuffers in Suspension gebracht, wodurch die Zellen eine runde Oberfläche aufweisen. MPC11 Zellen wachsen in Suspension. Die Oberfläche beider Zelltypen in den Fusionsansätzen berechnet sich daher durch: $A_{(Zelle)} = 4 * \pi * r^2$. Eine typische eukaryotische Zelle weist pro Quadratmikrometer 5×10^6 Lipide auf (HAGVE *et al.* 1988).

Die daraus resultierenden Ergebnisse für die Fusion von Ni^{2+} - und Zn^{2+} komplexierten Liposomen sind in den Tabelle 4.3A und 4.3B zusammengefasst, dienen aber lediglich als Orientierung. Exakt quantitative Aussagen lassen sich durch das Vermessen der Zellgrößen nicht treffen, lediglich die Größenordnung der verschiedenen Parameter kann auf diese Weise ermittelt werden.

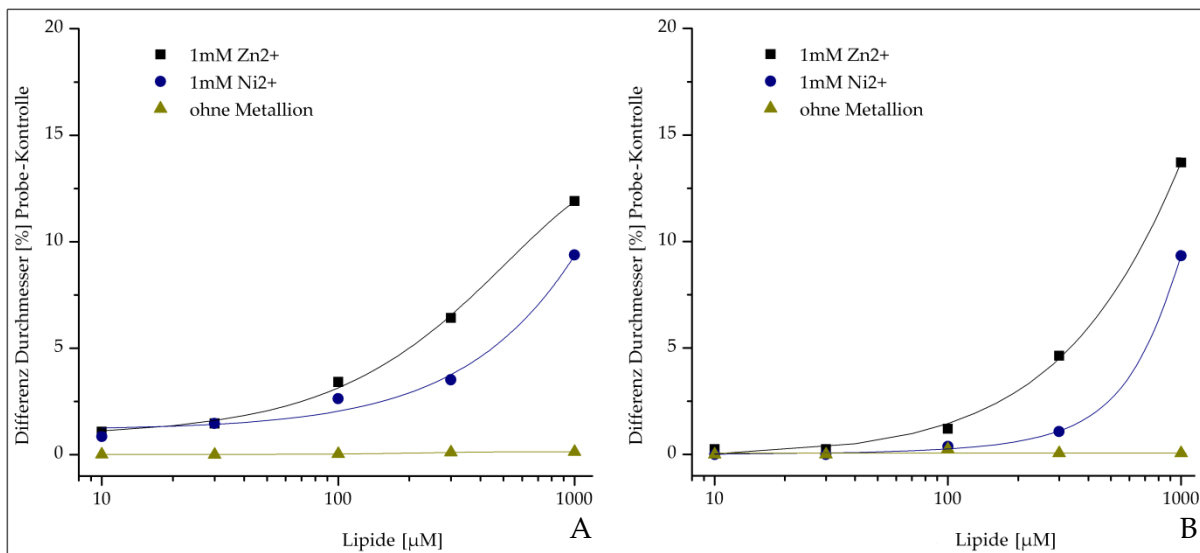


Abbildung 4.31: Mittelwerte der Größenzunahme von MPC11 und ATDC5 Zellen nach der Liposomen Fusion. Die erhaltenen Werte für die prozentuale Größenzunahme von 50% Zellen (A: MPC11, B: ATDC5) wurden für die drei Ansätze (Ni^{2+} , Zn^{2+} , ohne Metallion) abhängig von der verwendeten Lipidkonzentration dargestellt.

Metallion	c:(Lipide)[μM]	$\Delta A_{\text{Zelle}}[\mu\text{m}^2]$	ektopen Lipidmoleküle/Zelle	Fusionsrate[%]	SOA-Moleküle/Zelle
Ni^{2+}	1000	152	$7,6 \times 10^8$	13	$1,5 \times 10^8$
Ni^{2+}	300	17	$8,5 \times 10^7$	1,4	$1,7 \times 10^7$
Ni^{2+}	100	5,9	$2,9 \times 10^7$	0,5	$5,9 \times 10^6$
Ni^{2+}	30	/	/	/	/
Ni^{2+}	10	/	/	/	/
Zn^{2+}	1000	229	$1,1 \times 10^9$	19	$2,3 \times 10^8$
Zn^{2+}	300	74	$3,7 \times 10^8$	6	$7,4 \times 10^7$
Zn^{2+}	100	19	$9,5 \times 10^7$	1,5	$1,9 \times 10^7$
Zn^{2+}	30	4	2×10^7	0,3	4×10^6
Zn^{2+}	10	4	2×10^7	0,3	4×10^6

Tabelle 4.3A: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellgrößenvermessung bei ATDC5 Zellen. ΔA der Tabelle gibt die Vergrößerung der Zelloberfläche an, die ektopen Lipidmoleküle entsprechen der Anzahl durch die Fusion eingebauter Lipide in die Plasmamembranen. Die Fusionsrate bezieht sich auf die Gesamtmenge an Lipiden in den Liposomen in einem Fusionsansatz. In den nicht ausgefüllten Feldern waren keine Vergrößerungen der Zellradien detektierbar.

Metallion	c:(Lipide)[μM]	$\Delta A_{\text{Zelle}}[\mu\text{m}^2]$	ektopen Lipidmoleküle/Zelle	Fusionsrate[%]	SOA-Moleküle/Zelle
Ni^{2+}	1000	103	$5,1 \times 10^8$	8,6	1×10^8
Ni^{2+}	300	33	$1,6 \times 10^8$	2,7	$3,2 \times 10^7$
Ni^{2+}	100	28	$1,4 \times 10^8$	2,3	$2,7 \times 10^7$
Ni^{2+}	30	15	$7,3 \times 10^7$	1,2	$1,4 \times 10^7$
Ni^{2+}	10	8	4×10^7	0,6	$8,1 \times 10^6$
Zn^{2+}	1000	130	$6,5 \times 10^8$	10,8	$1,3 \times 10^8$
Zn^{2+}	300	68	$3,4 \times 10^8$	5,6	$6,8 \times 10^7$
Zn^{2+}	100	36	$1,8 \times 10^8$	3	$3,6 \times 10^7$
Zn^{2+}	30	14	$7,3 \times 10^7$	1,2	$1,4 \times 10^7$
Zn^{2+}	10	11	$5,7 \times 10^7$	0,9	$1,1 \times 10^7$

Tabelle 4.3B: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellgrößenvermessung bei MPC11 Zellen. ΔA der Tabelle gibt die Vergrößerung der Zelloberfläche an, die ektopen Lipidmoleküle entsprechen der Anzahl durch die Fusion eingebauter Lipide in die Plasmamembranen. Die Fusionsrate bezieht sich auf die Gesamtmenge an Lipiden in den Liposomen in einem Fusionsansatz.

4.2.3.2 Kopplung von His6-Proteinen an die integrierten Chelatlipide

Die Bindung Hexahistidin getaggtter Proteine wurde mit OregonGreen® markiertem BMPR-1A (BMPR-1A_OG) untersucht. ATDC5 bzw. MPC11 Zellen wurden in einem ersten Schritt mit $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ präinkubierten Liposomen fusioniert und anschließend mit dem rekombinanten Protein in PBS inkubiert. Als Kontrolle, ob die Bindung der Ektodomäne an die Plasmamembran der Zellen durch die spezifische Interaktion der 6 Histidine am C-Terminus der BMP Rezeptor Ektodomäne mit den komplexierten Metallionen zu Stande kam, wurden Liposomen mit ATDC5 Zellen fusioniert und mit der gleichen Konzentration OregonGreen® markierter BMPR-1A (SF-9 Zellen) Ektodomäne ohne Hexahistidin-Tag inkubiert.

Die so behandelten Zellen wurden mittels FACS Analyse und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Abbildung 4.32A zeigt das Ergebnis der FACS Analyse. Die MPC11 Zellen, die mit Nickel- oder Zink Ionen beladenen Liposomen fusioniert waren, zeigten nach der Inkubation mit BMPR-1A_OG ($3\mu\text{M}$) eine 10- bis 100-fache Steigerung der Fluoreszenz bei 488nm, wobei die mit Zn^{2+} -behandelten Liposomen fusionierten MPC11 Zellen mehr fluoreszenzmarkierte Ektodomänen aufwiesen als die Zellen, die mit Ni^{2+} -komplexierten Liposomen behandelt wurden.

In Abbildung 4.32A1-B2 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der in die Plasmamembran einer MPC11 Zelle integrierten Lipide mit (4.32A1,A2) und ohne (4.32B1,B2) Metallion dargestellt. Die grüne Fluoreszenz der BMPR-1A Ektodomänen ist deutlich in Abbildung 4.32A2 zu erkennen. Ohne His6-Tag konnte keine Bindung der rekombinanten Ektodomäne festgestellt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine metallaffinitätsvermittelte Immobilisierung von BMP Rezeptor Ektodomänen durch die Kopfgruppe der Chelatlipide auf zelluläre Plasmamembranen möglich war. Durch weitere mikroskopischen Untersuchungen wurde zudem ersichtlich, dass die Zellen bei einer Inkubationstemperatur von 20°C und darüber die markierte Rezeptor Ektodomänen teilweise durch Endocytose aufnahmen und das Protein in ca. 20-30% der Zellen diffus verteilt im Zytoplasma vorlag (nicht gezeigt). Durch Verringern der Inkubationstemperatur auf 4°C konnte dieser Mechanismus inhibiert werden.

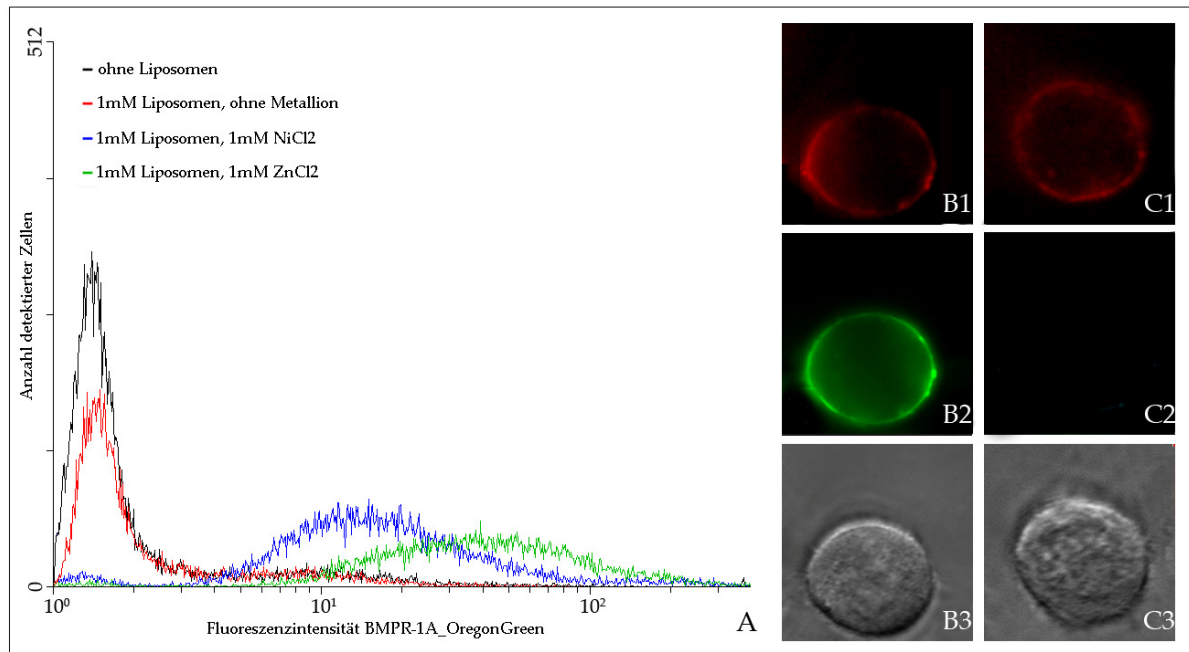


Abbildung 4.32: Detektion an Plasmamembran-integrierte Chelatlipide gebundener BMPR-1A Ektodomänen. Nach der Fusion der Liposomen mit MPC11 Zellen wurden diese bei 4°C mit OregonGreen® markiertem BMPR-1A (3µM) inkubiert.

A: FACS Analyse der BMPR1A-OG Integration. Als Kontrolle wurden MPC11 Zellen mit Liposomen ohne komplexiertes Metallion fusioniert und anschließend mit OregonGreen markiertem BMPR-1A inkubiert (schwarzer Graph). Die Zellen zeigte praktisch keine Bindung des rekombinanten Proteins. Die Zellen, die mit Nickel- und Zink-beladenen Liposomen behandelt wurden, zeigte eine 10 bis 20-fache Steigerung der Fluoreszenz bei 488nm (grüner Graph, blauer Graph). MPC11 Zellen, die mit einem BMPR-1A_OG Fusionsprotein ohne Histidin-Tag inkubiert wurden, wiesen dagegen keine erhöhte Fluoreszenz gegenüber den Kontrollzellen auf (roter Graph).

Spalte B: Mikroskopische Aufnahmen von MPC11 Zellen nach Inkubation mit Liposomen mit komplexierten Ni²⁺-Ionen und fluoreszenzmarkiertem BMPR-1A mit Histidin-Tag.

B1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der integrierten Lipide (NiCl₂-komplexiert).

B2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der gebundenen BMPR-1A Ektodomänen (3µM). Deutlich ist der gebundene Rezeptor im Bereich der Plasmamembran erkennbar.

B3: Phasenkontrastaufnahme der dargestellten Zelle.

Spalte C: Mikroskopische Aufnahmen von MPC11 Zellen nach Inkubation mit Liposomen mit

C1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der integrierten Lipide (NiCl₂-komplexiert).

C2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der fluoreszenzmarkierten BMPR-1A Ektodomänen (3µM) ohne Histidin-Tag. Weder in der FACS Analyse noch mit dem Fluoreszenzmikroskop konnten gebundene Rezeptoren nachgewiesen werden.

C3: Phasenkontrastaufnahme der dargestellten Zelle.

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass Zn²⁺ Ionen die Fusion der Liposomen mit Plasmamembranen stärker begünstigten als Ni²⁺. Des Weiteren war die absolute Menge an immobilisierten Ektodomänen durch Chelatlipiden, die Zn²⁺ komplexierten, ca. 5-10-fach größer als im Falle von Ni²⁺-komplexierten Chelatlipiden (s. 4.28). Um die Proteinbindung

beider Ionen genauer vergleichen zu können, wurden ATDC5 Zellen mit $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ beladenen Liposomen fusioniert und anschließend mit fluoreszenzmarkiertem BMPR-1A ($3\mu\text{M}$ in HBS150) inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der DHPE TexasRed® Lipide (DHPE-TR) und der OregonGreen® markierten Rezeptor Ektodomänen wurde am ELISA Reader (Tecan) abhängig vom verwendeten Metallion bei 488nm, bzw. 593nm ausgelesen. Von Vorteil ist hierbei, dass beide Fluorochrome spezifisch angeregt und das emittierte Licht in einem Bereich von $\pm 5\text{nm}$ detektiert werden kann. Hierdurch wird sichergestellt, dass die Detektion der integrierten Lipide und der gebundenen Ektodomänen ohne Überlagerungen erfolgt.

In Abbildung 4.33B ist dabei zu erkennen, dass die Zellen, die mit Zink-Ionen beladenen Liposomen inkubiert wurden, die ca. 5 fache Menge an Rezeptor Ektodomänen auf der Plasmamembran gebunden hatten. Um die Bindung der His₆-Rezeptoren durch die Metallionen zu vergleichen, wurde zudem der Quotient aus der BMPR-1A_OG Fluoreszenz (Abb. 4.33B) und der Liposomenfluoreszenz (Abb. 4.33A) gebildet, der entsprechende Graph ist in Abbildung 4.33C dargestellt. Hierbei zeigte sich deutlich, dass Nickelionen die ca. dreifache Menge Ektodomänen pro integriertem Lipid gebunden hatten.

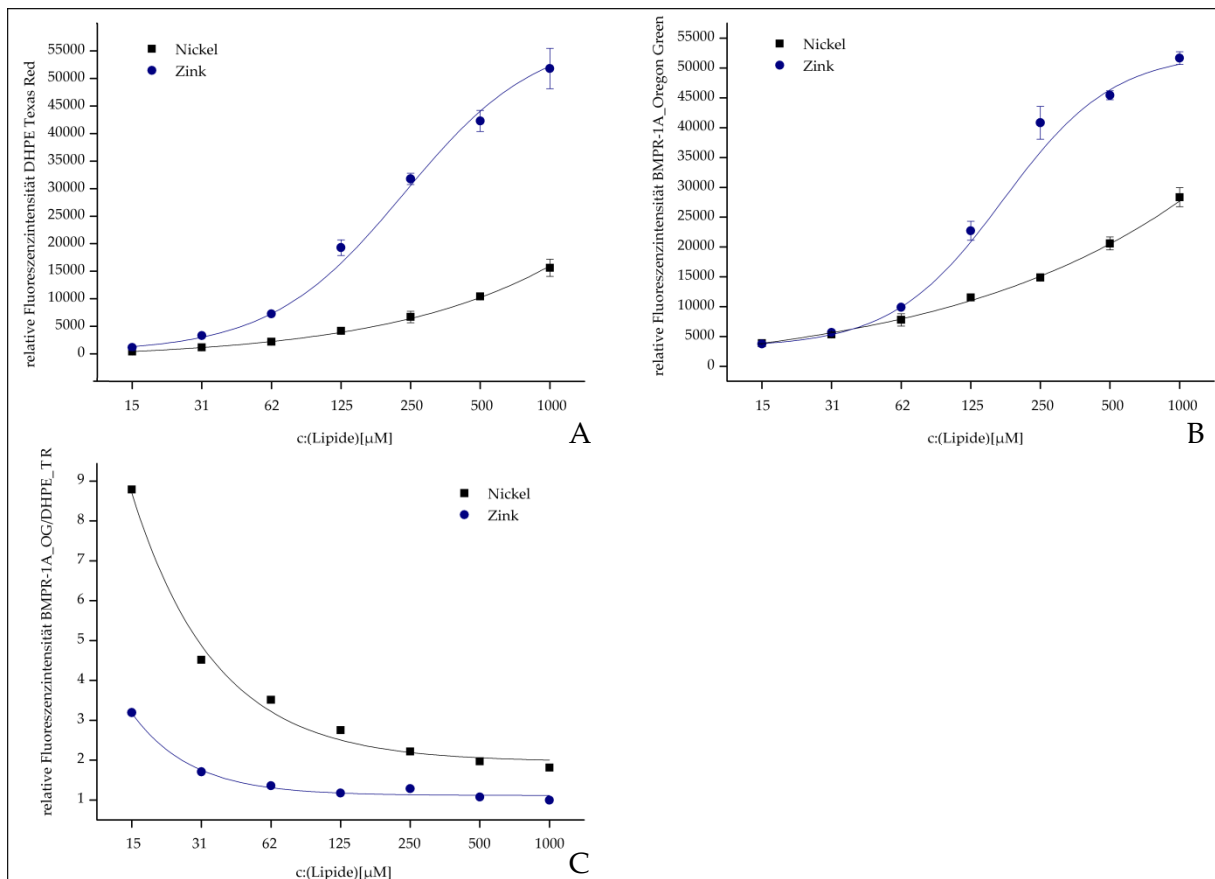


Abbildung 4.33: Bindung von BMPR-1A_OG an ATDC5 Zellen an Nickel- bzw. Zink-Ionen.

ATDC5 Zellen wurden mit Zn^{2+} - oder Ni^{2+} -beladenen Liposomen fusioniert und anschließend mit OregonGreen® markiertem BMPR-1A beladen.

A: Fluoreszenzintensität der integrierten DHPE TexasRed Lipide.

B: Fluoreszenzintensität der gekoppelten BMPR-1A Ektodomänen. Dabei zeigten die Zellen, die mit Zn^{2+} -komplexierten Liposomen behandelt wurden, eine ca. 3fach größere absolute Menge an fluoreszenzmarkiertem Rezeptor verglichen Ni^{2+} -komplexierten Liposomen.

C: Normierung der Proteinbindung durch Ni^{2+} -SOA und Zn^{2+} -SOA. ATDC5 Zellen wurden mit Zn^{2+} - oder Ni^{2+} -beladenen Liposomen fusioniert und anschließend mit OregonGreen® markiertem BMPR-1A beladen. Um die Bindungskapazität beider Metallionen vergleichen zu können, wurde die BMPR-1A_OG Fluoreszenz auf die DHPE-TR Fluoreszenz bezogen. Hierbei zeigten die Ni^{2+} -Ionen eine ca. 3fach größere Menge gebundener Ektodomänen.

Die Nickelionen beladenen Liposomen hatten pro Chelatlipid die etwa dreifache Menge an BMPR-1A gebunden. Da es möglich war, sowohl mit Ni^{2+} , als auch mit Zn^{2+} komplexierten Liposomen ca. $1 \cdot 10^8$ Lipide pro Zelle zu integrieren, die Kopplung von Proteinen durch Ni^{2+} aber effektiver war, wurden folgende Versuche mit Nickel durchgeführt. Analoge Versuche wurden ebenfalls mit OregonGreen® markiertem MBP (Maltose Bindendes Protein) durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen den vorangegangenen, woraus ersichtlich wurde,

dass die Immobilisierung einer Vielzahl von Proteinen durch die Interaktion eines His₆-Tags mit dem SOA-Lipid auf Plasmamembranen möglich war (nicht gezeigt).

Um effektiv quantitative Aussagen über die Bindung der Rezeptortodomänen treffen zu können, wurde die Bindung verschiedener ¹²⁵I markierter Rezeptoren an SOA-Lipide in den Plasmamembranen von ATDC5 und MPC11 Zellen gemessen. Die Iodierung der Rezeptoren (pro Ansatz 50pmol) wurde mit Hilfe der Chloramin-T Methode durchgeführt (HUNTER and GREENWOOD 1962). Die iodierten Proteine wurde durch eine Bio-Gel P6 Gelfiltration von freiem ¹²⁵Iod abgetrennt und die spezifische Aktivität der Proteinfractionen ermittelt.

Die spezifische Aktivität der BMPR-1A Ektodomäne betrug $1,11 \times 10^6$ cpm/pmol, die des BMPR-2 betrug $1,24 \times 10^6$ cpm/pmol. ATDC5 und MPC11 Zellen wurden mit Liposomen mit und ohne komplexierten Nickel-Ionen inkubiert. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Proteine 1:10⁶ mit nicht markierten Rezeptoren verdünnt und für 40 Minuten bei 4°C auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und die Radioaktivität am Szintillationszähler vermessen. In Abbildung 4.34A ist die Anzahl gebundener Rezeptoren an ATDC5 und MPC11 Zellen abhängig von der Lipidkonzentration der Liposomen dargestellt. An ADC5 Zellen konnten bei der höchsten Lipidkonzentration ca. $5,5 \times 10^5$ Rezeptortodomänen pro Zelle gebunden werden, im Falle der MPC11 Zellen waren es ca. 1×10^5 Rezeptoren. Unterschiede in der Anzahl der Rezeptoren konnten durch die Fusionsraten der Liposomen und die Größe der Zellen erklärt werden.

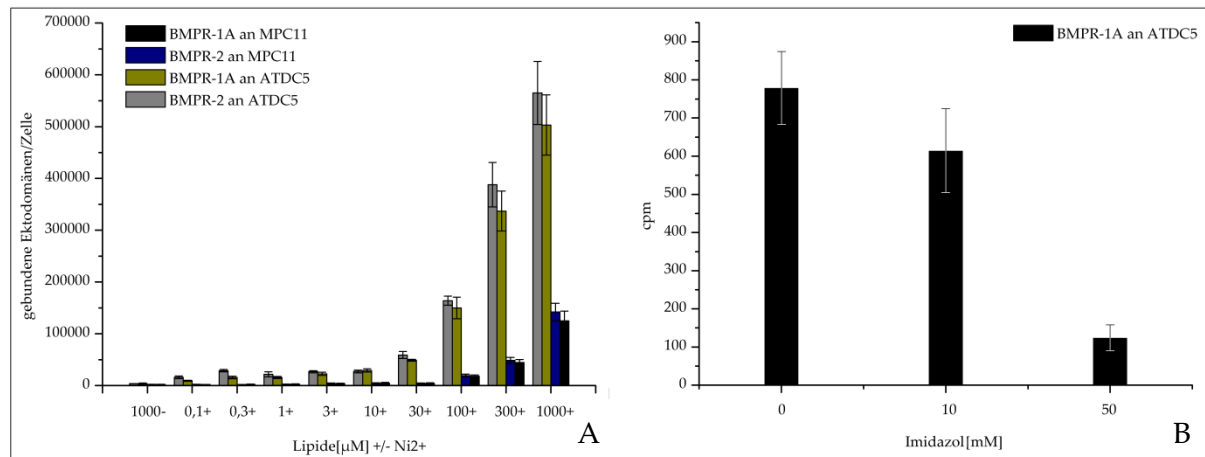


Abbildung 4.34: Kopplung ^{125}I -markierter BMP Rezeptoren.

A: Quantifizierung der an die SOA-Lipide gebundenen BMP Rezeptoren. Nach der Fusion Ni^{2+} komplexierter Liposomen unterschiedlicher Konzentration wurden ATDC5- und MPC11 Zellen mit radioaktiv markierten BMP Rezeptor Ektodomänen (BMPR-1A und BMPR-2) bei 4°C inkubiert und die Radioaktivität der einzelnen Ansätze vermessen.

B: Konkurrenz der Rezeptor-SOA Interaktion durch Imidazol. Nach der Rezeptorkopplung wurden Zellen mit gebundenem BMPR-1A mit verschiedenen Konzentrationen Imidazol in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurde die Radioaktivität der Zellen erneut bestimmt.

Durch Vergleich der Ergebnisse aus den Experimenten am Coulter Counter konnte zudem die Bindungseffizienz ermittelt werden. Nach der Bindung der Rezeptoren waren ca. 0,5-1% der SOA-Lipide besetzt (siehe Tab. 4.3A, 4.3B). Die Bindung der beiden Ektodomänen BMPR-1A und BMPR-2 zeigten nur geringe Unterschiede in der Menge der gebundenen Rezeptoren. Durch die Zugabe von Imidazol zu den Zellen mit gebundenen Rezeptoren war es zudem möglich, die Rezeptoren von der Zelloberfläche zu waschen (s. Abb.4.34B). Dadurch konnte bewiesen werden, dass die Rezeptoren über die komplexierten Nickel Ionen an der Plasmamembran der Zellen verankert waren.

4.2.3.3 Retentionszeit der verankerten BMP Rezeptoren

Um die Stabilität der Rezeptor Bindung über einen längeren Zeitraum zu überprüfen, wurden ATDC Zellen mit Ni^{2+} -komplexierten Liposomen ($1000\mu\text{M}$) fusioniert, mit fluoreszenzmarkiertem BMPR-1A ($3\mu\text{M}$ in PBS) beladen (30min, 4°C) und die Zellen bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenzintensität des Rezeptors auf der Zelloberfläche und der

integrierten DHPE_TR Lipide wurde zeitabhängig mit Hilfe eines Mikroplatten-Readers (Tecan Ltd.) untersucht. In Abbildung 4.35A sind die Fluoreszenzintensitäten beider Parameter abhängig von der Inkubationsdauer dargestellt. Innerhalb des Messzeitraums von 2 Stunden war keine Reduzierung des prozentualen Anteils positiver Zellen in beiden Messreihen zu erkennen. Nach zwei Stunden wurde zudem die Verteilung der membranintegrierten Lipide und der gekoppelten Rezeptoren am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Wie in den Abbildungen 4.35B und C zu erkennen ist, waren die Lipide und die fluoreszenzmarkierten BMPR-1Aecds im Bereich der Plasmamembranen lokalisiert. Die Chelatlipide stellen somit eine Möglichkeit dar, ektope Rezeptoren stabil auf der Zelloberfläche zu verankern.

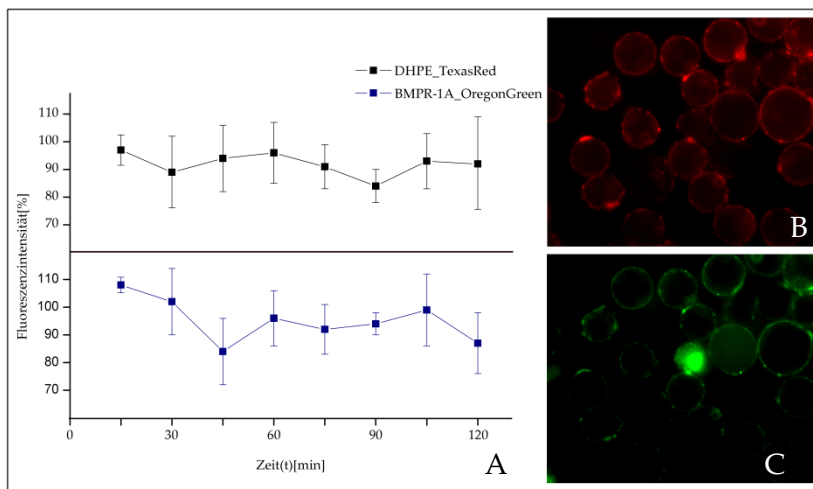


Abbildung 4.35: Retentionszeit His6-getaggtter Proteine auf Plasmamembran integrierten Chelatlipiden. ATDC5 Zellen wurden mit Ni²⁺-komplexierten Liposomen fusioniert und anschließend mit fluoreszenzmarkiertem BMPR-1A beladen. Die Fluoreszenzintensitäten der ektope Proteine und der Membran-integrierten Lipids wurden mittels Dot-Blot Analyse (FACS) untersucht.

A: Quantifizierung der integrierten DHPE TexasRed Lipide und OregonGreen markierter BMPR-1A Ektodomänen

B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der integrierten Lipide nach zwei Stunden.

C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der integrierten fluoreszenzmarkierten Ektodomänen nach zwei Stunden.

Die Fusion von Liposomen mit einem 80%igen Anteil an POPC und 20% SOA Chelatlipid und zellulären Plasmamembranen führte zur stabilen Integrierung von bis zu ca. 2×10^8 (ATDC5), bzw. ca. 1×10^8 (MPC11) SOA-Molekülen pro Zelle. Nach der Inkubation der Zellen mit rekombinanten BMP Rezeptor Ektodomänen konnten 6×10^5 (ATDC5) bzw, $1,5 \times 10^5$ (MPC11) Rezeptoren pro Zelle gebunden werden, wobei diese über einen Zeitraum von

mindestens zwei Stunden ohne detektierbare Dissoziation nachweisbar waren. Das entwickelte System zur Generierung ektopter „Decoy-Rezeptoren“ stellt somit prinzipiell eine wertvolle Möglichkeit dar, Rezeptor-Ligand Interaktionen auf zellulärer Ebene zu studieren.

4.2.3.4 Inhibierung der Smad 1,5 Phosphorylierung durch membranintegrierte BMP Rezeptortodomänen

Um herauszufinden, ob die gebundenen Rezeptortodomänen die BMP-abhängige Rezeptoraktivierung beeinflussen, wurde die Smad 1,5,8-Phosphorylierung in ATDC5- und MPC11 Zellen nach der Kopplung rekombinanten Proteine untersucht.

4.2.3.4.1 Charakterisierung des Smad Signalwegs in ATDC5 und MPC11 Zellen

BMPs entfalten ihre zellulären Effekte durch das Aktivieren verschiedener Rezeptoren beziehungsweise Rezeptorkomplexe, die wiederum das extrazelluläre Signal über die Zellmembran hinweg in das Zellinnere transferieren, indem zytosolische Effektorproteine aktiviert werden. Eine solche, durch BMPs aktivierte Signalkaskade, ist der Smad-1, 5, 8 Signal Weg. Die aktivierten Rezeptorkomplexe aktivieren die RSmads 1, 5 oder 8 durch Phosphoylierung. Die aktivierten Smads bilden dann mit dem so genannten Co-Smad Smad4 einen Proteinkomplex, der im Zellkern angereichert wird, wo er die Expression verschiedener Zielgene reguliert. Aufgrund der schnellen Aktivierung der Smad Proteine nach Stimulation der Zellen mit dem jeweiligen BMP eignet sich dieser Signalweg besonders für Hemmversuche.

Um BMP-2 Signalwege zu blockieren, sollte idealerweise die BMP-2-Konzentration zur Stimulierung der Zellen verwendet werden, die zu einer halbmaximalen Smad-Phosphorylierung führt, da inhibierende Effekte in diesem Bereich die deutlichsten Effekte zeigen. Zudem ist es sinnvoll, für Hemmversuche mit Ni²⁺-gekoppelten Ektodomänen die kürzeste BMP-Stimulationsdauer zu verwenden, die zu einer maximalen Smad-

Phosphorylierung führt, auch wenn gezeigt werden konnte, dass die Kopplung an metallionkomplexierte NTA Gruppen äußerst stabil ist (s.4.35).

In Abbildung 4.36A1 ist der Western Blot der dosisabhängige Stimulierung von ATDC5 Zellen mit BMP-2 dargestellt. Die Banden wurden zudem quantifiziert und die einzelnen Messwerte abhängig von der BMP-2 Dosis und dem erhaltenen ECL Signal dargestellt (Abb. 4.36A). Die Dosis für eine halbmaximale Stimulierung der ATDC5 Zellen (EC_{50}) betrug ca. 0,3nM BMP-2. Ab einer Stimulation der Zellen mit 1- 3nM BMP-2 war die maximale Phosphorylierung der Smad Proteine 1 und 5 erreicht.

Um die Kinetik der Smad-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden ATDC5 Zellen mit 0,3nM BMP-2 stimuliert und die Zellen nach verschiedenen Zeiten lysiert. Die Lysate wurden wiederum mittels Western Blot Analyse untersucht und die erhaltenen Phospho-Smad 1,5 spezifischen Banden quantifiziert. Das Western Blot Ergebnis der Kinetik-Untersuchung ist in Abbildung 4.36B1 dargestellt. Nach 30 Minuten war die maximale Smad-Phosphorylierung erreicht und blieb bis 60 Minuten nach der Stimulation stabil. Anschließend sank die Menge an phosphorylierten Smad 1, 5 Proteinen annähernd linear ab, bis nach 4 Stunden noch ca. ein Sechstel der ursprünglichen Menge an P-Smad detektierbar war.

Nach 300 Minuten war kein Signal mehr erkennbar. Die Bandenquantifizierung ist in Abbildung 4.36B abgebildet.

In Abbildung 4.37 sind die entsprechenden Ergebnisse der Versuche mit MPC11 Zellen zu erkennen. Für eine halbmaximale Smad-Phosphorylierung war eine BMP Konzentration von etwa 3nM notwendig (4.37A, A1).

Die Abbildung 4.37B und 4.37B1 zeigen das Ergebnis der Kinetikuntersuchung. MPC11 Zellen, die mit 3nM BMP-2 stimuliert wurden, wiesen nach 30 Minuten ein maximales Phospho-Smad Signal auf, das über einen Zeitraum von 4 Stunden stabil war.

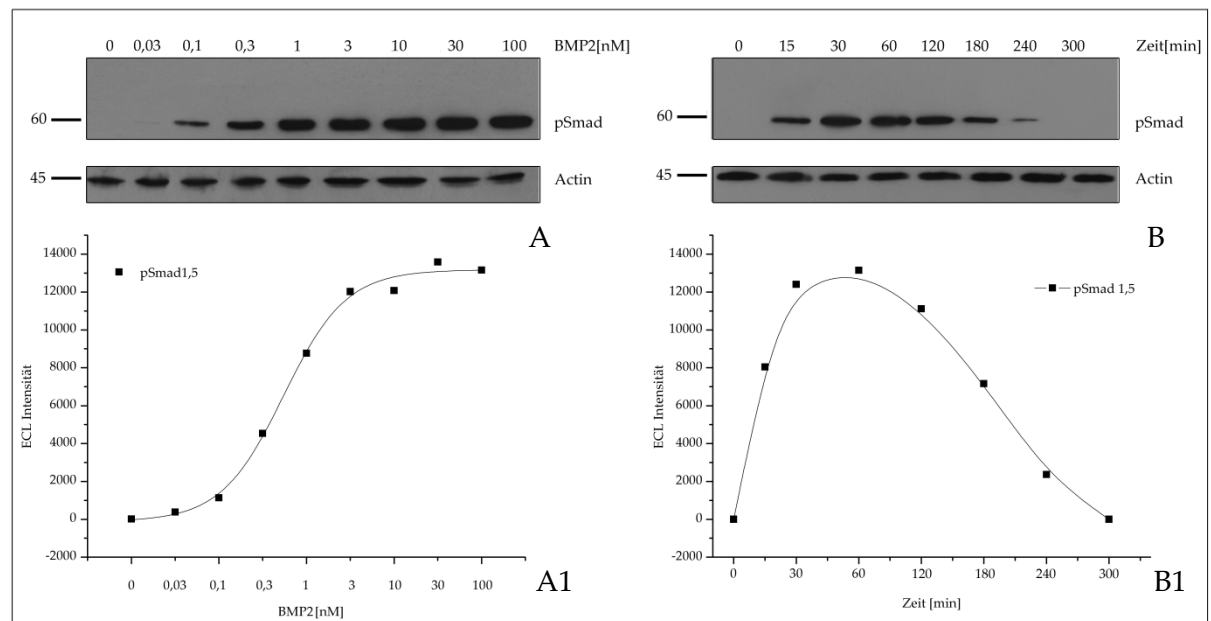


Abbildung 4.36: Smad 1,5 Phosphorylierung von ATDC5 Zellen.

A: Dosisabhängigkeit der BMP-2 induzierten Smad-Phosphorylierung. ATDC5 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen BMP-2 stimuliert und das Ausmaß der Smad1, 5 Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht.

A1: Quantifizierung der Western Blot Banden.

B: Kinetik der Smad 1,5 Phosphorylierung in ATDC5 Zellen. ATDC5 Zellen wurden mit 0,3nM BMP-2 stimuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten die Smad-Phosphorylierung mit Hilfe eines Western Blots ermittelt.

B1: Quantifizierung der Western Blot Banden. B2: Western Blot Ergebnis der Kinetik der Smad-Phosphorylierung.

BMPs können auf der Zelloberfläche an bereits präformierte Rezeptorkomplexe (PFCs) binden oder durch Bindung an einen hochaffinen Typ I Rezeptor die Bildung eines funktionellen Rezeptor-Ligand Komplexes durch Rekrutierung niederaffiner Typ II Rezeptoren initiieren (BISCs). Der Bindungsmodus entscheidet dabei über die aktivierte Signalkaskade im Zytoplasma (HASSEL *et al.* 2003). Diese Hypothese der differentiellen Aktivierung BMP vermittelter Signalkaskaden konnte inzwischen weiter präzisiert werden. In ATDC5 Zellen werden durch die Zugabe von 0,3nM BMP-2 die hochaffinen Bindeepitope, welche durch die PFCs generiert werden, adressiert. Dies führt zu einer kurzzeitigen Smad-Phosphorylierung, während für eine längerfristige Aktivierung des Smad 1, 5, 8 Signalwegs etwa zehnfach höhere BMP-2 Konzentrationen nötig sind, welche zusätzlich die niederaffinen Bindestellen ebenfalls adressieren, wodurch die Bildung von BISCs auf der Zelloberfläche initiiert wird. Auf diese Weise kann das Smad Signal im Zellinneren sowohl quantitativ als auch qualitativ gesteuert werden (HEINECKE *et al.* 2009).

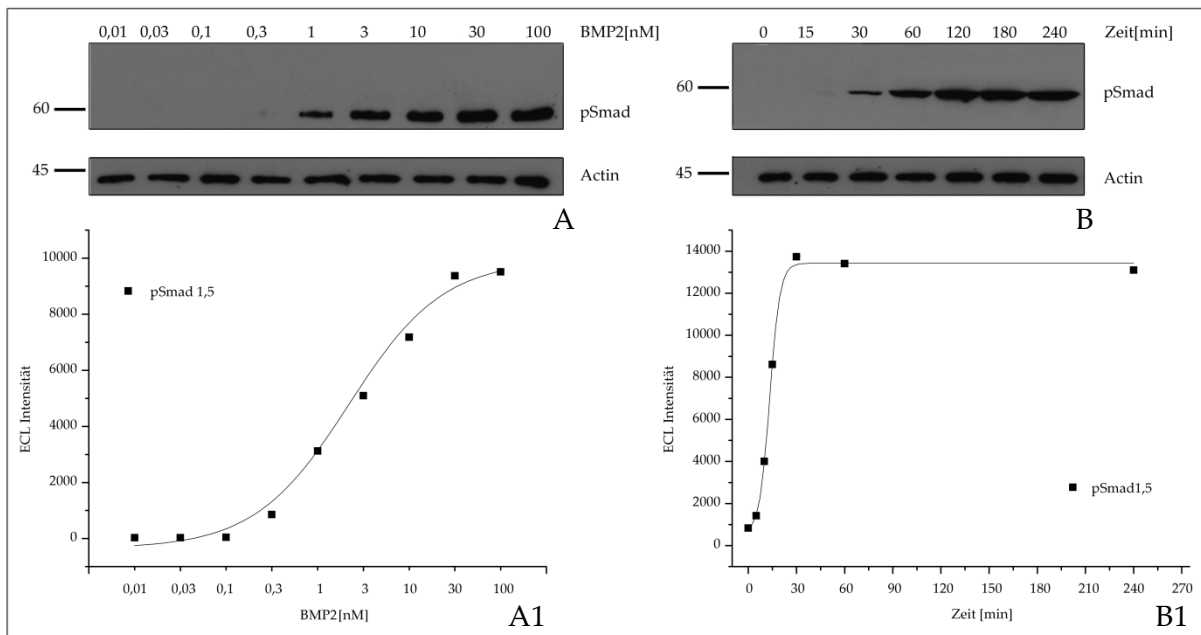


Abbildung 4.37: Smad 1,5 Phosphorylierung von MPC11 Zellen.

A: Dosisabhängigkeit der BMP-2 induzierten Smad-Phosphorylierung. MPC11 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen BMP-2 stimuliert und die Smad1, 5 Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht.

A1: Quantifizierung der Western Blot Banden.

B: Kinetik der Smad 1,5 Phosphorylierung in MPC11 Zellen. MPC11 Zellen wurden mit 3nM BMP-2 stimuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten die Smad-Phosphorylierung mit Hilfe eines Western Blots ermittelt.

B1: Quantifizierung der Western Blot Banden.

Im Gegensatz zu den ATDC5 Zellen zeigten MPC11 Zellen eine halbmaximale Smad-Phosphorylierung bei ca. 3nM BMP-2, die über den gesamten Messzeitraum von 4 Stunden zu einer konstanten Phosphorylierung der RSmads 1 und 5 führte.

4.2.3.4.2 Einfluss der Liposomenfusion auf die Smad-Phosphorylierung

Um zu überprüfen, ob die Fusion der Liposomen mit Zellmembranen per se einen Einfluss hat auf die Smad Phosphorylierung, wurden ATDC5 mit Ni^{2+} , bzw. Zn^{2+} komplexierten Liposomen unterschiedlicher Konzentrationen fusioniert und die Zellen anschließend für 30 Minuten mit 0,3nM BMP-2 stimuliert. In Abbildung 4.38 ist das Ergebnis der Western Blots dargestellt. Die Liposomen inhibierten die Smad Phosphorylierung, wobei die Hemmung abhängig war von der Konzentration der Liposomen. Wie in Abbildung 4.38A zu erkennen ist, zeigten die Zn^{2+} beladenen Liposomen über einen weiteren Konzentrationsbereich eine

hemmende Wirkung als die Ni²⁺ beladenen Liposomen. Die ermittelten EC₅₀ Werte betragen etwa 50µM (Zn²⁺), bzw. 120µM (Ni²⁺). Interessanterweise wurden nach den Tabellen 4.3A und B in diesem Bereich etwa die gleichen Mengen Lipide in die Zellmembranen integriert (Ni²⁺(100µM): 2,9*10⁷, Zn²⁺(30µM): 2*10⁷), was einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der Phosphorylierung und dem Fusionsprozess wahrscheinlich machte.

Die Fusion von Liposomen ohne komplexiertes Metallion führte dagegen zu keiner erkennbaren Hemmung der Smad Phosphorylierung (s. Abb. 4.38F). Die Zugabe der Metallionen in den entsprechenden Konzentrationen während der BMP-2 Stimulierung der Zellen hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Signalintensität (4.38 D, E).

Wie in Abb. 4.29 zu erkennen ist, waren die Liposomen im verwendeten Konzentrationsbereich nicht toxisch für die Zellen, weswegen die Hemmung nicht durch Einflussnahme auf die Zellvitalität begründet sein kann.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Metallsalze zwar die BMP-2 vermittelte ALP Induktion inhibieren, was im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (nicht gezeigt) (MACNAIR *et al.* 1997; MCKAY *et al.* 1996). Die Hemmung war allerdings nur zu beobachten, wenn die Zellen während der gesamten dreitägigen BMP-2-Stimulationszeit den Metallsalzen exponiert waren. Kurzzeitige Zugaben über einen Zeitraum von bis zu 5 Stunden sowohl von NiCl₂ als auch von ZnCl₂ hatten keine Auswirkungen auf die ALP Induktion.

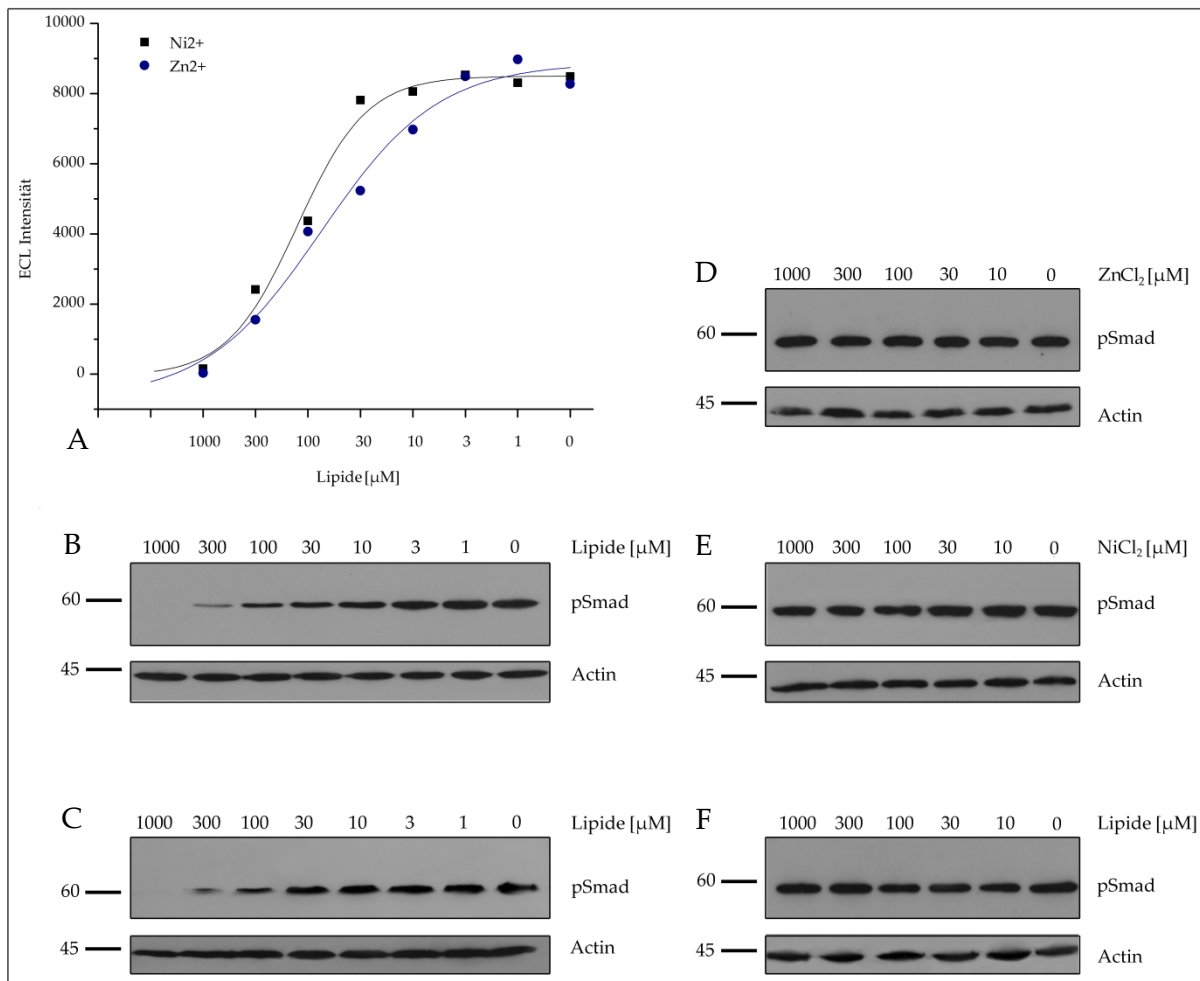


Abbildung 4.38: Einfluss der Liposomenfusion auf die Smad 1, 5 Phosphorylierung.

ATDC5 Zellen wurden mit Nickel- oder Zink-Ionen beladenen Liposomen fusioniert und anschließend für 30 Minuten mit 0,3nM BMP-2 stimuliert. Als Kontrollen wurden die ATDC5 Zellen mit Liposomen ohne Metallion oder mit den entsprechenden Metallsalzen inkubiert.

A: Quantifizierung der Western Blot Banden aus B und C. Die Fusion der metallionkomplexierten Liposomen mit den ATDC5 Zellen führte zu einer von der Lipidkonzentration abhängigen Verringerung der Smad Phosphorylierung.

B: Western Blot der Smad Phosphorylierung nach der Fusion mit Zn²⁺ beladenen Liposomen.

C: Western Blot der Smad Phosphorylierung nach der Fusion mit Ni²⁺ beladenen Liposomen.

D: Western Blot der Smad Phosphorylierung nach der Inkubation der Zellen mit Zinkchlorid.

E: Western Blot der Smad Phosphorylierung nach der Inkubation der Zellen mit Nickelchlorid.

F: Western Blot der Smad Phosphorylierung nach der Fusion mit Liposomen ohne komplexierte SOA-Lipide.

Im Verlauf des durchgeführten Smad-Assays sind die Zellen dagegen nur während der Liposomenfusion maximalen Metallion-Konzentrationen von 1000 μM ausgesetzt. Zwar führt die Integration des metallionkomplexierten SOA-Lipids in die zellulären Plasmamembranen zu einer lokal sehr hohen Konzentration an bivalenten Metallionen, allerdings beeinflusste dies die Ergebnisse des Vitalitätsassays nicht, sodass eine vermehrte Aufnahme der extrazellulär komplexierten Ionen unwahrscheinlich ist. Die Hemmung durch die Metallion

komplexierten Liposomen ließ sich durch 2 Faktoren beeinflussen. Zum einen durch die Lipidkonzentration der verwendeten Liposomen, zum anderen durch die Menge an komplexierten Metallionen bei gleichbleibender Lipidkonzentration. Durch die Versuche am Coulter Counter und durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte belegt werden, dass beide Faktoren die Fusionsrate der Liposomen beeinflussten. So zeigten 1mM Liposomen, welche nur mit 600 μ M Metallionen beladen wurden, eine durchschnittlich um 60% (Ni^{2+}), bzw 65% (Zn^{2+}) verringerte Vergrößerung der Zellen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Smad-Phosphorylierung nach Stimulation der ATDC5 Zellen mit 0,3nM BMP-2 durch die Liposomenfusion inhibiert wird, wobei die Hemmung abhängig war von dem Ausmaß der Fusion der Liposomen. Dies würde bedeuten, dass sich ein BMP-2 induzierter Signalweg durch die Integration exogener Lipide in die Zellmembran beeinflussen lässt.

4.2.3.4.3 Inhibierung der Smad-Phosphorylierung durch lösliche BMP-Rezeptortodomänen

Lösliche BMP Rezeptortodomänen hemmen die Smad-Phosphorylierung kompetitiv, da sie mit dem endogen vorliegenden Rezeptor in der Membran um den Liganden konkurrieren. Dies wurde bestätigt (s. Abb.4.39), aber nur, wenn die ATDC5 Zellen mit einer Konzentration von 3nM BMP-2 stimuliert worden waren. Hier zeigte die lösliche Ektodomäne eine halbmaximale Hemmung bei einer Konzentration von 1 μ M.

Überraschenderweise konnte die Smad-Phosphorylierung nach 0,3nM BMP-2 nicht durch die lösliche BMPR-1A Domäne gehemmt werden. Dies kann derzeit nicht erklärt werden, da auch hier im Bereich der hochaffinen EC_{50} gearbeitet wurde. Daher sollte die durch die lösliche Ektodomäne bewirkte Erniedrigung des Liganden zu einer Hemmung führen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, wobei das Ergebnis reproduziert werden konnte.

Da MPC11 Zellen nach einer Stimulation mit 0,3nM BMP-2 keine Rezeptoraktivierung aufwiesen (s. Abb. 4.37), konnte hier lediglich die Hemmung bei 3nM

Ligandenkonzentration untersucht werden. Die Hemmung wies dabei dieselbe EC50 auf, die bei den ATDC5 Zellen beobachtet worden war (nicht gezeigt).

Eine Inhibierung mit Hilfe der Typ II Rezeptoren ActR-2A und BMPR-2 war nicht zu beobachten (nicht gezeigt).

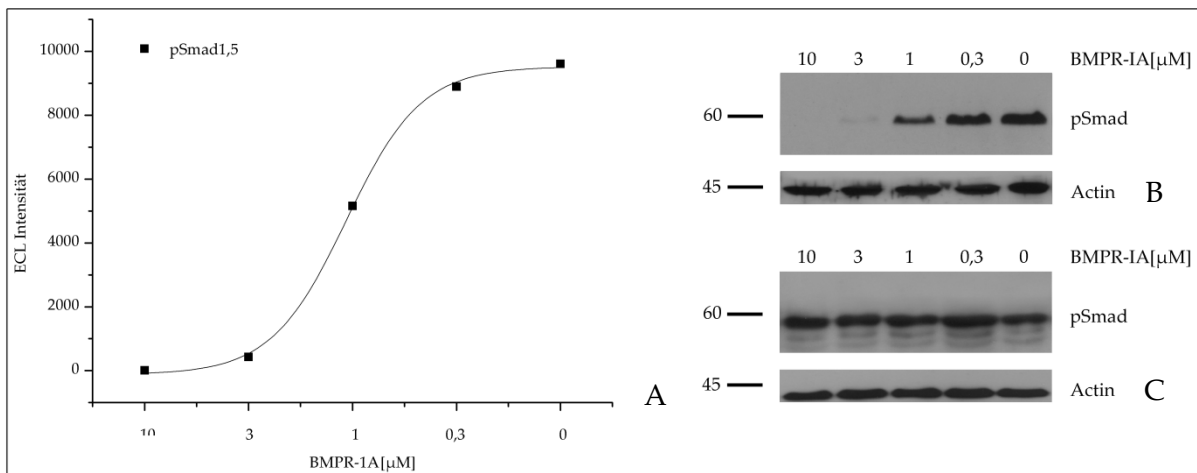


Abbildung 4.39: Inhibierung der Smad-Phosphorylierung in ATDC5 Zellen nach Stimulation mit 0,3 und 3nM BMP-2 durch gelöste BMPR-1A Ektodomänen.

A: Quantifizierung der pSmad Inhibierung nach Stimulation mit 3nM BMP-2. Für eine halbmaximale Inhibierung der Phosphorylierung war eine BMPR-1A Konzentration von 1μM nötig.

B: Western Blot der pSmad Inhibierung nach der Stimulation mit 3nM BMP-2. **C:** Western Blot der pSmad Inhibierung nach der Stimulation mit 0,3nM BMP-2.

4.2.3.4.4 Inhibierung der Smad Phosphorylierung durch Chelatlipid-gekoppelte Rezeptoren

Ein wesentliches Anliegen der vorliegenden Arbeit war es zu bestimmen, ob Rezeptorektodomänen, wenn über Chelatlipide an die Membran gebunden, die BMP-abhängige Rezeptoraktivierung beeinflussen können. Membran-gebundene Rezeptordomänen könnten als Korezeptor dienen, die den BMP Liganden auf der Membran aufkonzentrieren. Sie könnten aber auch als Inhibitor wirken, vergleichbar mit dominant-negativen Rezeptorkonstrukten (POULIOT *et al.* 2003; ROUNTREE *et al.* 2004; WUNNENBERG-STAPLETON *et al.* 1999).

Wie unter 4.2.3.4.2 (Abb. 4.38) gezeigt, hemmt bereits die Liposomenfusion die Smad 1,5 Phosphorylierung (0,3nM BMP-2) in Abhängigkeit von der Liposomen/Ni²⁺(Zn²⁺) Konzentration. Um eine mögliche Hemmwirkung der Chelat-verankerten BMPR-1A Domäne zu untersuchen, mussten also Bedingungen gefunden werden, unter denen einerseits genügend Rezeptor gebunden wird, andererseits aber noch eine von der Liposomenfusion unbeeinträchtigte Smad-Phosphorylierung möglich ist. Bei einer Lipidkonzentration der Liposomen von 1mM mit 600µM komplexierten Nickelionen resultierte eine ca. 50%ige Hemmung der Smad-Phosphorylierung.

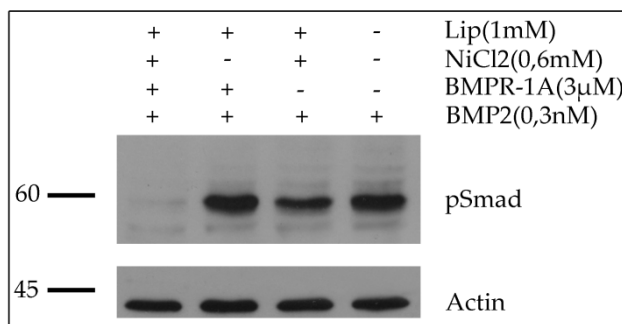


Abbildung 4.40: Inhibierung der Smad Phosphorylierung durch Chelatlipid-gebundenen BMPR-1A Ektodomänen nach Stimulation mit 0,3nM BMP-2.

Die Fusion der Liposomen inhibierte die Smad-Phosphorylierung zu ca. 50%. (3. Spalte). Ohne Nickelchlorid war keine Hemmung zu erkennen (2. Spalte). Durch die Bindung des Typ I Rezeptors konnte die Smad-Phosphorylierung vollständig blockiert werden.

Nach Zugabe des Typ I Rezeptors BMPR-1A konnte die Phosphorylierung der Smad Proteine 1 und 5 vollständig inhibiert werden. Da ohne Nickelchlorid keine Inhibierung beobachtet wurde, verdeutlicht dies, dass die chelat-gebundenen Ektodomänen die BMP-2 induzierte Rezeptoraktivierung blockierte (s. Abb.4.30).

Durch die Stimulation von ATDC5 Zellen mit 3nM BMP-2 über einen Zeitraum von zwei Stunden hinweg sollten sowohl die PFCs als auch die BISCs Liganden binden und zur Signaltransduktion beitragen. In Versuchen mit ATDC5 Zellen zeigte sich hierbei, dass es möglich war, den inhibierenden Effekt der Fusion Nickelion-beladener SOA-Liposomen mit den Plasmamembranen durch eine Verlängerung der BMP-2-Stimulationszeit und Erhöhung der BMP-2 Konzentration auf 3nM zu umgehen. Nach diesem Protokoll wurde ebenfalls mit MPC11 Zellen verfahren, die verglichen mit den ATDC5 Zellen eine ca. fünf bis zehnfach höhere Konzentration BMP-2 benötigen, um eine halbmaximale Smad Phosphorylierung zu

erhalten. In beiden Zelllinien war es möglich, den inhibierenden Effekt einzig auf die gebundenen Rezeptoren zurückzuführen (s. Ab. 4.31).

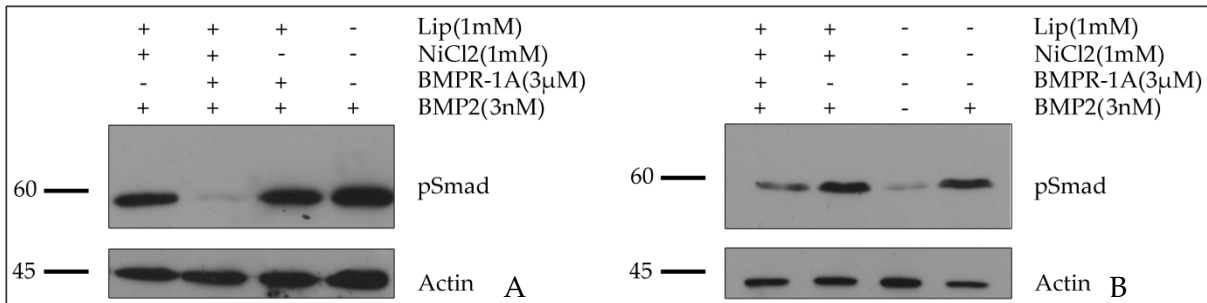


Abbildung 4.41: Inhibierung der Smad Phosphorylierung durch Chelatlipid-gebundenen BMPR-1A Ektodomänen nach Stimulation mit 3nM BMP-2.

A: ATDC5 Zellen: Western Blot der Smad 1,5-Phosphorylierung. Die prominente Bande der Positivkontrolle (Spalt 4) ist durch eine erhöhte Proteinmenge beim Auftrag zu erklären (vergleiche Ladekontrolle). Durch die BMPR-1A Kopplung konnte die Smad1, 5 Phosphorylierung nahezu vollständig blockiert werden.

B: MPC11 Zellen: Western Blot der Smad 1,5-Phosphorylierung.

Somit konnte eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, BMP-Rezeptorektodomänen quantifizierbar in Plasmamembranen zu integrieren, um auf diese Weise die Affinitäten der einzelnen Rezeptorketten in einem zweidimensionalen Reaktionsraum in zellbasierten *in vitro* Experimenten zu bestimmen.

Eine dosisabhängige Hemmung durch die chelatgebundene BMPR-1A Ektodomäne konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig erstellt werden. Die entsprechenden Hemmversuche mit der Ektodomäne des Typ II Rezeptors BMPR-2 lieferten dagegen reproduzierbare Ergebnisse in MPC11 Zellen.

Interessanterweise zeigten hierbei MPC11 Zellen nach der Kopplung der BMPR-2 Ektodomänen eine abhängig von der BMPR-2/Lipid Konzentration abhängige Verstärkung der Smad1, 5 Phosphorylierung, wie in Abbildung 4.32 dargestellt. MPC11 Zellen wurden mit Liposomen mit einer Lipidkonzentration von 1mM fusioniert und verschiedene Konzentrationen BMPR-2 in PBS bei 4°C an die Chelatgruppen gekoppelt.

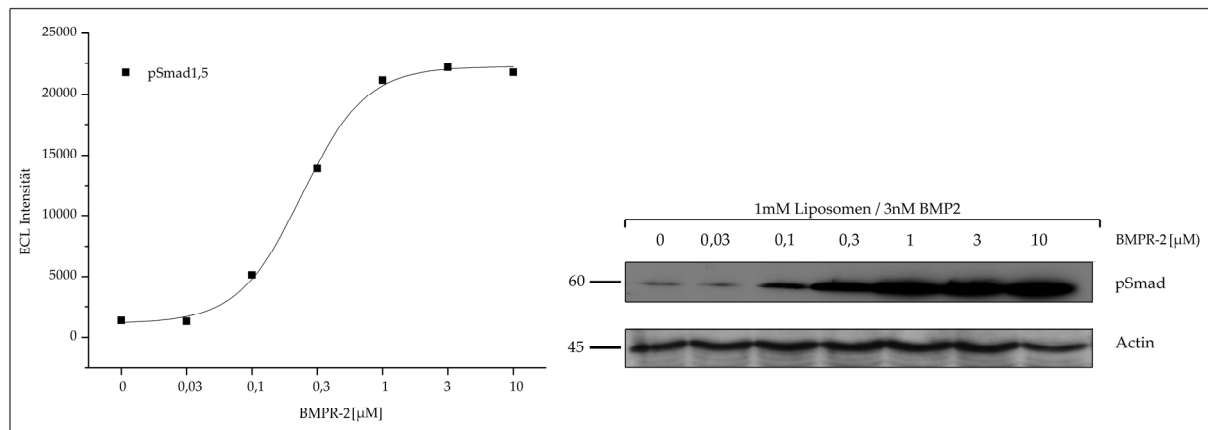


Abbildung 4.32: Verstärkung der Smad Signaltransduktion durch Kopplung der BMPR-2 ecd. MPC11 Zellen wurden mit 1mM Liposomen inkubiert und anschließend BMPR-2 gekoppelt. Die Stimulation erfolgte mit 3nM BMP-2

A: Quantifizierung der Smad-Phosphorylierung

B: Western der Blot der Smad-Phosphorylierung nach BMPR-2 Kopplung

Anschließend wurden die Zellen für 60 Minuten mit 3nM BMP-2 stimuliert. Die halbmaximale Verstärkung der Smad Phosphorylierung erfolgte bei ca. 200nM gekoppelter Ektodomänen.

So konnte gezeigt werden, dass die erarbeitete Kopplung von BMP Rezeptoren an Zellmembranen durch integrierte Chelatlipide eine geeignete Methode darstellt, um den Einfluss der Membrankopplung Rezeptoren zu untersuchen. Die vorgelegte Arbeit ist bis dato der einzige Versuch, Rezeptorsignalwege auf diese Art und Weise zu hemmen, um quantitative Messungen direkt auf der Zelloberfläche zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

BMPs vermitteln ihre zellulären Effekte durch Rekrutierung und Aktivierung von zwei Typen spezifischer, membranständiger Rezeptoren. Die genauen Mechanismen der Rezeptoraktivierung und die Komposition eines funktionellen, signalvermittelnden Komplexes auf der Zelloberfläche sind in den letzten Jahren genau untersucht worden. Die dimere Natur aller BMPs, die Promiskuitivität der BMPs sowie der entsprechenden Rezeptoren und die unterschiedlichen Rezeptorkonformationen (PFC, BISC) erschweren jedoch die experimentelle Zugänglichkeit dieser Proteinfamilie.

Von entscheidender Bedeutung für die Aufklärung der Rezeptor-Ligand Interaktionen war neben einer Vielzahl hochaufgelöster Strukturen die Oberflächen Plasmon-Resonanz-Spektroskopie. Die kombinierten Ergebnisse dieser beider Ansätze anhand isolierter Rezeptortodomänen und verschiedener BMPs führte zur Identifizierung und Klärung von Bindungsaffinitäten, Bindungsmodi und Bindungsdeterminanten.

Bemerkenswerterweise sind verschiedene Ergebnisse der Rezeptor-Ligand Interaktion, bzw. der Rezeptoraktivierung auf Zelloberflächen nicht durch die Interaktionsstudien mit rekombinanten Rezeptortodomänen erklärbar. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass unbekannte Protein-Protein Interaktionen oder die Organisation der Rezeptoren in Zellmembranen BMP vermittelte Signalwege beeinflussen.

Da es experimentell schwierig ist zu klären, welchen Einfluss die Membranständigkeit von BMP Rezeptoren auf die Affinität zu den jeweiligen Liganden in Zellen hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene methodische Ansätze getestet und ein Verfahren entwickelt, BMP Rezeptortodomänen in Plasmamembranen zu integrieren.

Prinzipiell wurden hierbei zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollten rekombinante BMP Rezeptoren lipidiert- und die so modifizierten Proteine in Zellmembranen verankert werden. Hierfür wurden verschiedene Ansätze getestet.

Modifizierte Inteine ermöglichen den seitenkettenspezifischen Einbau eines reaktiven Thioesters, der in einer Kopplungsreaktion für die Lipidierung genutzt werden kann. Dabei zeigte sich allerdings, dass das zur „Aktivierung“ des Thioesters benötigte Thiolreagens in Konzentrationen eingesetzt werden musste, die zur Reduktion der Disulfidbrücken führte.

Ein weiterer Ansatzpunkt war die Verwendung aminreaktiver, pegylierter Lipide, welche im äquimolaren Verhältnis an BMP Rezeptoren gebunden wurden. Die lipidierten Rezeptoren konnten in Zellmembranen integriert werden, allerdings blieben BMP Hemmversuche mit diesen Konjugaten erfolglos.

Der zweite Ansatz war die Kopplung von Hexa-His BMP-Rezeptortodomänen an metallionkomplexierte, membranintegrierte Chelatlipide. Die Integration der Chelatlipide in Zellmembranen erfolgte durch Liposomenfusion mit verschiedenen Zelllinien. Komplexierte Metallionen verstärkten die Fusion der Liposomen mit der Plasmamembran. Dabei führten komplexierte Zinkionen im Vergleich mit Nickelionen zu einer höheren Fusionsrate, allerdings konnten Nickel-komplexierte Chelatlipide mehr Ektodomänen binden.

Durch die Integration der NTA-Lipide konnten die Rezeptoren stabil und quantifizierbar in die Zellmembran verschiedener Zelllinien integriert werden und ermöglichten damit Hemmversuche mit BMP-2 als Liganden.

Interessanterweise inhibierte die Fusion der Liposomen mit den Zellmembranen die Smad-Phosphorylierung. Die Hemmung war dabei proportional zur Fusionsrate. Durch eine Erhöhung der Ligandenkonzentration konnte dieser Effekt minimiert werden, sodass in weitergehenden Versuchen eine Näherung der Rezeptoraffinitäten in Zellmembranen ermittelt werden kann.

Die Ektodomäne des BMPR-1A inhibierte nach Kopplung an Ni²⁺-komplexierte SOA-Lipide die BMP-2 vermittelte Smad-Phosphorylierung vollständig.

Die BMPR-2 Ektodomäne führte interessanterweise zu einer Verstärkung des Smad Aktivierung, wobei dieser Effekt abhängig war von der eingesetzten Menge BMPR-2.

Die Kopplung von Rezeptortodomänen über Chelatlipide stellt damit eine praktikable Möglichkeit dar, den Einfluss der Membranverankerung auf Ligand-Rezeptor Interaktionen quantifizierbar zu untersuchen.

5 Summary

BMPs elicit their cellular functions via recruitment and activation of specific receptor serin/threonine receptor kinases. The precise mechanisms leading to receptor activation and the composition of a functional signal transducing complex on the cell surface has been investigated intensively over the last decades. The dimeric nature of all BMPs, the promiscuity of both, the ligands and the receptors and the different receptor conformations on the cell surface (PFC, BISC) hamper the experimental accessibility of this protein family.

Beside many high resolution structures the surface plasmon resonance spectroscopy was of central importance for the enlightenment of ligand-receptor interactions. Combined results from both approaches using isolated receptor ectodomains and different recombinant BMPs lead to the identification and clarification of binding affinities, different binding modes and binding determinants.

Notably, several results of the ligand-receptor interaction and the receptor activation on cell surfaces cannot be explained by the interaction studies using recombinant receptor ectodomains. It is not possible to exclude that unknown protein-protein interactions or the organization of the receptors in cell membranes influence BMP triggered signaling pathways.

Given the experimental difficulty to clarify the influence of the membrane integration of BMP receptors, the aim of this study was to develop and test strategies to incorporate recombinant BMP receptor ectodomains in cell membranes.

Inherently, two basic strategies were followed. First, BMP receptors were lipidated and the modified proteins were anchored into cell membranes.

Modified inteins enable the integration of a reactive thioester at the c-terminus of any protein that can be used to couple thiol harbouring molecules to proteins in a site specific way.

Indeed, the thiol containing reagents, needed to activate the thioester group reduced the disulfide bridges of the BMP receptors even before the cleavage of the intein took place thereby disrupting the structural integrity of the ectodomains.

Another concept was the lipid-coupling with amine-reactive, pegylated lipids that were bound to the ectodomains in an equimolar ratio. The modified receptors spontaneously integrated into cell membranes but failed to block the BMP triggered Smad phosphorylation.

The second basic approach was the binding of hexahistidine tagged BMP receptors to membrane integrated metal ion complexed chelator lipids. The integration of the chelator lipids was performed by liposome fusion with different cell lines.

Interestingly, the bound metal cations enhanced the fusion process. Zinc ions lead to higher fusion rates compared to nickel ions but bound less recombinant protein.

The membrane integral chelator lipids allowed a stable and quantifiable binding of BMP receptors to cell membranes independent of the specific cell type, thereby allowing inhibition experiments using BMP-2 as a ligand.

Interestingly, the fusion of the liposomes with the cell membranes itself inhibited the Smad phosphorylation, whereas the amount of inhibition was proportional to the rate of fusion. By using higher ligand concentrations, this effect could be circumvented, so that in further experiments an approximation of the receptor affinities within a cell membrane can be evaluated.

The coupling of receptor ectodomains via chelator lipids is therefore a practicable way to study the influence on membrane integration on ligand receptor interactions in a quantifiable way.

6 Diskussion

BMPs stellen sekretierte dimere Proteine dar mit einem äußerst breiten Funktionsspektrum sowohl während früher Entwicklungsprozesse als auch im adulten Organismus in einer Vielzahl diverser Gewebetypen. Ihre biologischen Effekte vermitteln diese Proteine nach Bindung und Aktivierung spezifischer membranverankerter Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen. Der Aktivierung der Rezeptoren liegt dabei eine Oligomerisierung der verschiedenen Typ I und Typ II Rezeptoren nach der Ligandenbindung zu Grunde. Auffallend hierbei ist, dass es auf Zelloberflächen verschiedene Mechanismen dieser Rezeptoraktivierung zu geben scheint (NOHE *et al.* 2002).

Aufgrund der dimeren Natur der BMPs, der Promiskuität sowohl der BMPs selbst, als auch beider Rezeptortypen und der ligandenspezifischen Bindungsaffinitäten der einzelnen Rezeptoren sind eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen denkbar, welche zu aktiven Rezeptor-Ligand Komplexen auf der Zelloberfläche führen können (NICKEL *et al.* 2009).

Fragen bezüglich der Affinität und Spezifität konnten mit einer Reihe Mutationsanalysen, der Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie und durch das Aufklären von Strukturen verschiedener BMPs im Komplex mit Rezeptoren beantwortet werden (GREENWALD *et al.* 2003; GREENWALD *et al.* 1998; GREENWALD *et al.* 2004; HEINECKE *et al.* 2009; NICKEL *et al.* 2001; NICKEL *et al.* 2009; SEBALD and MUELLER 2003; SEBALD *et al.* 2004; SEBALD *et al.* 2010; WEBER *et al.* 2007).

Experimentell sind die Rezeptoren aufgrund des hydrophoben Transmembranbereichs schwer zugänglich, weswegen in allen *in vitro* Experimenten lediglich mit dem extrazellulären Teil, der Ektodomäne, gearbeitet werden konnte.

Zwar scheinen weder die einfach die Plasmamembran durchspannenden Transmembrandomänen, noch die intrazellulären Domänen direkt miteinander zu interagieren (WEBER *et al.* 2007), jedoch hat die Membranverankerung von Proteinen selbst weit reichenden Einfluss auf Protein-Protein Interaktionen, wie unter 1.2.2 beschrieben. Durch die Kombination der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) Methode mit der Plasmon-Resonanz-Spektroskopie konnten Rezeptor-Ligand Interaktionen in einem dynamischen Membranmodellsystem in Echtzeit dargestellt werden (ALONSO *et al.* 2008;

GAVUTIS *et al.* 2006a; GAVUTIS *et al.* 2006b). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nach einer Möglichkeit gesucht werden, ektope BMP-Rezeptoren in Zellmembranen zu integrieren, um in Hemmversuchen mit BMP-2 als Ligand Affinitätsbestimmungen auf Zelloberflächen zu ermöglichen.

6.1 Intein vermittelte BMP Rezeptor Lipidierung

Ein Ansatz, welcher im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde, war die direkte Lipidierung der Rezeptortodomänen. Die lipidierten Proteine sollten sich anschließend, ähnlich GPI-verankerte Proteine, spontan in Zellmembranen integrieren (MEDOF *et al.* 1996). Inteine stellen Proteininsertionen dar, welche in einem posttranslationalen Prozess aus dem reifen Protein entfernt werden. Aufgrund der mechanistischen Ähnlichkeit zum Spleiß-Vorgang während der Prozessierung von mRNA Molekülen wurde dieser Vorgang „Protein-Spleißen“ genannt (ELLEUCHE and POGGELER 2010).

Durch die Manipulation verschiedener Inteine ist es möglich, Fusionsproteine mit einer internen Thioesterbindung zu generieren (s. Einleitung). Diese reaktive Bindung kann in einem mehrstufigen Prozess für eine seitenkettenspezifische Proteinmodifikation genutzt werden (ALEXANDROV *et al.* 2002; BRUNSVELD *et al.* 2006; BRUNSVELD *et al.* 2005; WU *et al.* 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Fusionsprotein TRX_His₆_TCS_ActR-2B_MxeGyrA in *E.coli* exprimiert und mittels einer NTA-komplexierten Sepharose aufgereinigt. In Titrationsversuchen mit verschiedenen Thiolreagenzien wurde die Mindestkonzentration für die Spaltung der reaktiven Thioesterbindung ermittelt. Hierbei zeigte MESNA (2-Mercaptoethansulfonat-Natrium, Uromexitan®) die höchste Spalteffizienz, wie schon in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Abb. 4.15) (EVANS *et al.* 1999; TAN *et al.* 2004).

In einem weiterführenden Experiment mit aufgereinigter ActR-2B Ektodomäne zeigte sich, dass die für die Spaltung notwendige MESNA-Konzentration zur Reduktion der Disulfidbrücken führte (Abb. 4.16).

In einem ähnlichen Ansatz wurden BMP Rezeptortodomänen mit C-terminalem Cystein exprimiert. Diese rekombinanten Proteine wurden als Dimere aufgereinigt. Anschließend

sollten die intermolekularen Disulfide durch verschiedene Reduktionsmittel, wie beispielsweise eine reduzierende Gelsuspension (TCEP®, Pierce) reduziert werden, ohne die intramolekularen Schwefelbrücken zu spalten (nicht gezeigt). In diesen Versuchen zeigte sich ebenfalls, dass die Disulfide der BMP Rezeptoren äußerst sensibel auf Thiolverbindungen reagierten.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse zeigte sich ebenfalls, dass die Intein-vermittelte Lipidierung von BMP Rezeptortodomänen nicht durchführbar war.

6.2 Lysin-spezifische Lipidierung von BMP Rezeptortodomänen

Neben der Lipidierung des C-Terminus von BMP Rezeptortodomänen mit Hilfe des rekombinanten Inteins MxeGyrA wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lysin-spezifische Lipidierung durch Polyethylenglykol (PEG)- Oleyl Ether mit einer endständigen NHS-Gruppe (BAM, „*biocompatible anchor for membranes*“) durchgeführt (BRUNSVELD *et al.* 2006; KATO *et al.* 2004; KATO *et al.* 2003).

Die Membranfusion von drei BAM Molekülen der molaren Massen 2000g/mol, 4000g/mol und 8000g/mol, welche aus unterschiedlich langen PEG-Untereinheiten resultierte, wurde durch die Kopplung an 5-Aminomethylfluorescein am Fluoreszenzmikroskop überprüft (Abb. 4.18).

Die Fusionskinetik und Retentionszeit der verschiedenen BAM Moleküle konnte durch FACS-Messungen ermittelt werden.

Hierbei zeigten alle verwendeten BAM Moleküle eine temperaturabhängige Fusionsrate, wobei die halbmaximale Sättigung nach 1 Minute (37°C), bzw. 5 Minuten (22°C) zu beobachten war. Dies ist vor allem auf die erhöhte Membranfluidität bei höheren Temperaturen zurückzuführen (Abb. 4.20) (WILSCHUT *et al.* 1985). Zudem zeigte das BAM2000 Konjugat die höchste Membraninsertionsrate. Dieses weist aufgrund des kleineren PEG Anteils eine höhere Lipophilie auf, wodurch die Membranfusion energetisch begünstigt ist.

Von besonderem Interesse war die Stabilität der Membranverankerung. Die BAM Moleküle weisen lediglich eine Oleyl-Kette, wodurch die Retentionszeit im Vergleich zum homologen Molekül mit zwei Acylketten herabgesetzt ist (KATO *et al.* 2004).

Für Hemmversuche mit BAM-konjugierten Rezeptortodomänen ist eine stabile Verankerung von mindestens ca. 15-30 Minuten erforderlich. Die Retentionszeit der einzelnen BAM Moleküle wurde wiederum durch FACS Messungen mit Fluorescein-Konjugaten ermittelt (Abb. 4.21) und zeigte bereits nach 30 Minuten eine 50%ige Reduktion der ursprünglich fusionierten Konjugate.

Die Stimulation der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien ATDC5 und MPC11 mit rekombinantem BMP-2 führte bereits nach 30 Minuten zur maximalen Smad-Phosphorylierung, sodass Hemmversuche mit BAM-Rezeptorkonjugaten prinzipiell möglich sind, jedoch müsste die „Dissoziation“ der Rezeptoren bei der Affinitätsbestimmung mit einkalkuliert werden.

NHS-Ester reagieren präferentiell mit Lysinen (CANTU *et al.* 2005; MADLER *et al.* 2009; WU and BRAND 1997). Um eine Rezeptor-Ligand Interaktion nach der BAM-Kopplung auf der Zelloberfläche zu gewährleisten, mussten für die einzelnen Rezeptortodomänen Bedingungen gefunden werden, die zu einem möglichst großen Anteil monobamylierter Ektodomänen führte.

Auffallend bei der Bamylierung war, dass lediglich der BAM8000 NHS-Ester equimolar mit den BMP Rezeptortodomänen umsetzbar war. Die beiden BAM-Moleküle mit den kürzeren PEG-Ketten reagierten unter Bildung von Proteinaggregaten, welche sich nicht in einer SDS-PAGE auftrennen ließen (Abb. 4.22 D).

Die Optimierung der Konjugationsreaktion wurde daher ausschließlich mit dem BAM8000 Ester durchgeführt. Durch Variation der Inkubationsdauer, der Temperatur und des molaren Verhältnisses konnten für die drei Ektodomänen ActR-2B, BMPR-1A und BMPR-2 Bedingungen ermittelt werden, die zur equimolaren Umsetzung von 30-50% der Rezeptoren führte (Abb. 4.22 A-C).

Im Falle des BMPR-1A war die Zugabe von 10mM 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS) nötig, um die Reaktion voran zu treiben. Dies lässt auf die Bildung von Micellen schließen, welche neben der Interaktion der BAM-Moleküle auch BAM-Protein Interaktionen einschließen müssen, da die

CHAPS Zugabe ausschließlich für die Umsetzung der BMPR-1A Ektodomäne erforderlich war.

Bereits in einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich bamylierte Proteine zu Micellen zusammenlagern, wobei die Aggregatbildung von der PEG Kettenlänge abhängig war (KATO *et al.* 2004).

Nach der Umsetzung der Ektodomänen konnten die Monokonjugate durch eine HPLC an einer Vydac C-4 Säule abgetrennt werden. Interessant war, dass die einfach bamylierten Rezeptoren kein einheitliches Laufverhalten in der Chromatographie zeigten (Abb. 4.23), was auf die Bamylierung verschiedener Lysinreste zu erklären ist.

BMP-Rezeptorkomplexe mit gebundenem Ligand scheinen ca. 20Å oberhalb der Plasmamembran verankert (WEBER *et al.* 2007).

Polyethylenglykolketten können prinzipiell in drei verschiedenen Konformationen vorliegen, in völlig relaxierter Form, als Mäander oder als hypotetisches Knäuel. Bereits 1977 veröffentlichten Tanford *et al.*, eine Arbeit, worin Berechnungen zur räumlichen Ausdehnung von PEG-Ketten vorgestellt wurden (TANFORD *et al.* 1977).

Demnach misst die im BAM8000 Molekül vorliegende PEG-Kette als relaxiertes Molekül ~640Å, als Mäander ~320Å und in der Knäuelkonformation ~40Å.

PEG-Ketten mit mehr als 10 Einheiten liegen zum größten Teil in der Mäanderstruktur vor (s. Einleitung), weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die bamylierten Rezeptoren ca. 300Å oberhalb der endogenen Rezeptoren lokalisiert sind.

Aufgrund der räumlichen Ausdehnung des BAM8000 Moleküls muss in Betracht gezogen werden, dass es die Rezeptor-Ligand Interaktion sterisch behindert. Für die Komplexe von BMP-2 mit der Ektodomäne des BMPR-1A und ActR-2B liegen hochauflösende Strukturdaten vor (WEBER *et al.* 2007) (s. Abb.6.1).

Die Ektodomäne des BMPR-1A weist vier Lysinreste auf (K37, K79, K88, K92), wobei einzig die Kopplung des BAM8000 an das sekundäre Amin des Lysin79 durch seine Nähe zum *wrist* Epitop die Rezeptor-Ligand Interaktion beeinflussen könnte.

Der extrazelluläre Teil des ActR-2B beinhaltet drei Lysinreste (K55, K74, K75). In diesem Fall ist eine Hemmung der BMP-2 Interaktion nach Kopplung an die Lysinreste 55 und 75 aufgrund der Orientierung und Distanz zum *knuckle* Epitop möglich. Strukturdaten zum BMPR-2 BMP-2 Komplex sind noch nicht aufgelöst, sodass hier keine Aussagen über eine

Beeinträchtigung der Rezeptor Ligand Interaktion durch die BAM8000 Moleküle getroffen werden kann.

Nach der Kopplungsreaktion konnten die mono-bamylierten Ektodomänen durch eine *high performance* Chromatographie an einer Vydac C4 Säule von di- und oligo-bamylierten Rezeptoren abgetrennt werden (s. Abb 4.23). Hierbei war auffällig, dass die mono-bamylierten Ektodomänen über einen breiten Peak eluiert wurden und die entsprechenden Fraktionen kein einheitliches Laufverhalten in einer SDS-PAGE zeigten, was durch die Modifikation der verschiedenen Lysinreste zu erklären ist (s. Abb. 4.23B).

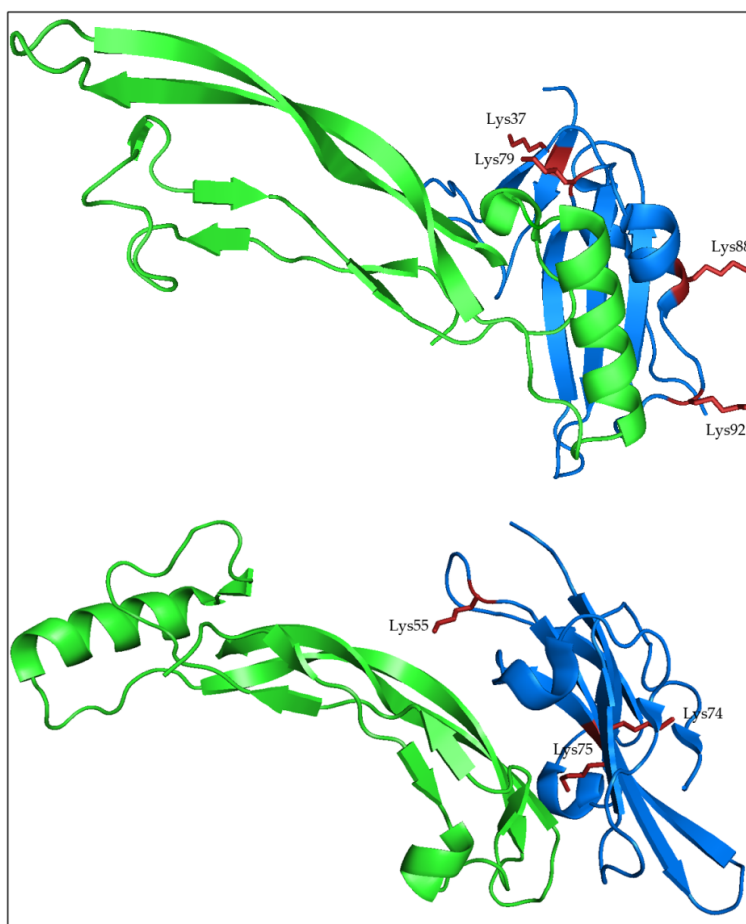


Abbildung 6.1: Ausrichtung der Lysinreste des ActR-2B und BMPR-1A. A: BMPR-1A Ektodomäne (blau) mit gebundenem BMP-2 Monomer (grün). Die Lysinreste sind rot markiert. B: ActR-2B Ektodomäne (blau) mit gebundenem BMP-2 Monomer (grün). Die Lysinreste sind rot markiert.

Die biologische Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde anschließend mit Hilfe der Oberflächen Plasmon Resonanz Spektroskopie ermittelt (nicht gezeigt), wobei keine der vermessenen Fraktionen eine verringerte Affinität zu BMP-2 aufwies.

Die Integration der bamylierten Rezeptoren konnte durch Oregon Green® -markierte BMPR-1A Ektodomänen nachgewiesen werden (s Abb. 4.24). Im Vergleich zu den bamylierten Fluorochromen wiesen die Rezeptorkonjugate eine bei Weitem verringerte Hydrobilität auf, wodurch sie die Triebkraft für die Membraninsertion verringert.

In Hemmversuchen mit bamylierten BMPR-1A Ektodomänen zeigte sich, dass diese die BMP-2 induzierte Signaltransduktion nicht beeinflussten. Dies kann teilweise durch die geringe Integrationsrate erklärt werden. Zudem ist hier die Länge des PEG-Linkers zu erwähnen. Wie schon beschrieben, ist die Polyethylenglykolkette im BAM8000 Molekül ca. 320Å lang. In Kombination mit der Flexibilität der PEG Gruppe ist es daher möglich, dass die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand eher der einer löslichen Ektodomäne mit dem Liganden entspricht. Zudem ist eine Interaktion und damit Blockierung von Typ II Rezeptoren aufgrund der räumlichen Distanz unwahrscheinlich.

Aufgrund der beschriebenen Faktoren eignen sich BAM Moleküle nicht, um Rezeptor-Ligand Interaktionen auf Zelloberflächen zu studieren.

6.3 Integration von Ektodomänen mit Hilfe von Chelatlipiden

Liposomen bieten weitreichende Möglichkeiten, um eukaryotische Zellen zu modifizieren. Dies schließt zum einen das Einbringen von Molekülen in das Zytoplasma ein, zum anderen können auch diverse Moleküle in verschiedene zelluläre Membrankompartimente eingebracht werden (HIGASHI *et al.* 1996; MACDONALD *et al.* 1978; PAGANO and WEINSTEIN 1978; PAPAHAJDOPOULOS *et al.* 1975; POSTE and PAPAHAJDOPOULOS 1976).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Chelatlipide verwendet, um Ektodomänen mit C-terminalem His-Tag in der Zellmembran zu verankern. Die Chelatlipide (SOA) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. J. Piehler zur Verfügung gestellt, der die Chelatlipide bereits in künstlichen Membranen verwendet hat, um Rezeptor-Ligand Interaktionen (Interferon-Rezeptor) in Echtzeit in einem zweidimensionalen, dynamischen Raum zu studieren (GAVUTIS *et al.* 2006a; LATA *et al.* 2006a).

NTA Gruppen können eine Vielzahl verschiedener bivalenter Metallionen komplexieren. Für die beschriebenen Studien wurden Nickel- und Zinkionen verwendet, da diese trotz relativ geringer Toxizität für die Zellen eine stabile Bindung an die NTA Gruppe aufwiesen. Erstaunlicherweise scheinen die Stabilitätskonstanten der Metallionen an NTA Gruppen und an Histidine korreliert zu sein (s. Abb. 4.26).

In initialen Versuchen wurden die Liposomen mit Nickelionen komplexiert. Sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop, als auch mit Hilfe von FACS Messungen konnte die Integration der Liposomenlipide in die Zellmembranen nachgewiesen werden. Die verwendeten Liposomen wiesen zu 1% ein TexasRed® markiertes Lipid auf, sodass die Fusion direkt verfolgt werden konnte.

Um die Interaktionsfläche der Liposomen und Zellmembranen zu maximieren, wurden die Zellen vor der Fusion abgelöst und anschließend in Suspension mit den Liposomen inkubiert.

Um die bestmöglichen Bedingungen für die Fusion zu finden, wurden Liposomen mit Nickel- bzw. Zinkchlorid inkubiert und die komplexierten Liposomen anschließend in verschiedenen Konzentrationen mit ATDC5 Zellen fusioniert.

Die Fusionsrate wurde mit einem Fluoreszenz-Elisareader (Tecan) ausgewertet. Auffallend hierbei war, dass die Fusion selbst bei Lipidkonzentrationen von 1mM keine Sättigung aufwies. Dies ist deshalb bemerkenswert, da in einer Arbeit, in der immunreaktive Proteine *in vitro* durch Chelatlipide an Zelloberflächen gebunden wurden, keine Steigerung der Fusionsrate oberhalb 250µM Lipidkonzentration erreicht werden konnte (VAN BROEKHOVEN *et al.* 2000). In dieser Arbeit wurden Liposomen derselben prozentualen Zusammensetzung verwendet, allerdings wies das verwendete Chelatlipid lediglich eine NTA-Gruppe auf, wohingegen das hier verwendete SOA-Lipid drei NTA-Gruppen beinhaltet.

Bei gleicher Liposomenkomposition weisen demnach die hier beschriebenen Liposomen mehr positive Ladungen auf, bzw. mehr gebundene Kationen, wodurch die Fusion scheinbar vorangetrieben wird.

So zeigten die metallionkomplexierten Liposomen eine ca. 20-100fache Steigerung der Fusionsrate gegenüber unkomplexierten Liposomen, zum anderen war die Fusion selbst bei 1mM Lipidkonzentration nicht saturierbar.

Die Fusionsrate der Liposomen war demnach abhängig von der Liposomenkonzentration und vom komplexierten Metallkation.

Die Bindung der Rezeptorektodomänen an die membranintegrierten Chelatlipide wurde anhand OregonGreen® (OG) markierter BMPR-1A Ektodomänen überprüft. Die Bindung der Rezeptoren konnte dabei sowohl am Fluoreszenzmikroskop als auch mit Hilfe von FACS Analysen bestätigt werden (s. Abb 4.32). Als Kontrolle wurden die Zellen nach der Fusion mit fluorochrom markiertem BMPR-1A ohne His-Tag inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass keine Proteinbindung an die Zellmembranen nachweisbar war.

Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung der Proteine nach der Inkubation der Zellen mit den markierten Rezeptoren bei 4°C ausschließlich durch die Interaktion der Hexahistidin-Tags mit den metallionkomplexierten NTA-Gruppen zu Stande kam.

Wurden die Rezeptoren bei 37°C mit den Zellen inkubiert, so wiesen diese neben der Membranfärbung eine deutliche Fluoreszenz bei 488nm auf, was für die endozytotische Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Rezeptoren spricht.

Auf diese Weise wurde zum einen die korrekte Orientierung der Ektodomänen auf der Zelloberfläche gewährleistet, zum anderen beeinflussen auch endozytotisch aufgenommene Rezeptoren BMP vermittelte Signalwege (HARTUNG *et al.* 2006), weswegen nur eine Inkubation bei 4°C sinnvoll war.

Die fluoreszenzmarkierten Rezeptoren wurden des Weiteren verwendet, um die Protein-Bindungseigenschaften der Nickel- und Zinkionen zu untersuchen. Liposomen wurden mit den entsprechenden Metallionen komplexiert und in verschiedenen Konzentrationen mit ATDC5 Zellen fusioniert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C mit einer 3µM BMPR-1A-OG Lösung inkubiert. Die gewaschenen Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenz-Elisareaders ausgewertet. Wie in vorangegangenen Versuchen bereits gezeigt, führte die Inkubation Zink-komplexierter Metallionen zu einer Steigerung der Fusionsrate um das ca. Fünffache verglichen mit den Nickel-beladenen Liposomen. Die Zinkionen beladenen Chelatlipide konnten zudem die ca. doppelte Menge an Ektodomänen binden, wiesen demnach allerdings eine geringe relative Bindungskapazität auf.

Die Messungen an dem Elisa-Reader hatten den großen Vorteil, dass die Exzitation und Emissionsdetektion annähernd monochromatisch durchgeführt werden konnte. So wurden die Fluorochrome mit Licht eines Wellenlängenspektrums von ca. 10-15nm angeregt, die Detektion erfolgte in einem ähnlich schmalen Fenster. Da die Emission der fluoreszenzmarkierten Lipide bei 593nm, die der markierten Rezeptoren bei 488nm lag, kann ausgeschlossen werden, dass die einzelnen Kanäle ineinander gestrahlt und somit das Messergebnis verfälscht hatten (s. Abb. 4.33).

Die erhaltenen Ergebnisse veranschaulichen deutlich, dass Nickel-komplexierte Liposomen für Hemmversuche besser geeignet sind, da sie bei hoher Fusionsrate die höhere Bindungskapazität gegenüber den Hexa-His Rezeptoren aufwiesen.

Die Retentionszeit der integrierten Lipide ist ein entscheidender Faktor für die geplanten Hemmeversuche. Die SOA-Chelatlipide weisen zwei Acylketten auf (C16, C18), wodurch diese über einen Zeitraum von mehreren Stunden stabil in der Zellmembran verankert sein sollten (KATO *et al.* 2004).

Die Retentionszeit der Chelatlipide wurde wiederum am Fluoreszenz-Elisareader ausgewertet. Die erhaltenen Daten veranschaulichten, dass sowohl die Lipide stabil integriert waren als auch die Rezeptoren über einen Zeitraum von zwei Stunden gebunden blieben (s. Abb. 4.35).

Da BMP-2 bereits nach 15-30 Minuten zu einer maximalen Smad-Phosphorylierung führt (HEINECKE *et al.* 2009), (s. Abb. 4.36, 4.37), stellen Chelatlipide prinzipiell eine geeignete Methode dar, Rezeptor-Ligand Interaktionen auf Zelloberflächen zu studieren.

Um sicherzustellen, dass sowohl die Lipide als auch die Proteine nach der Inkubationsdauer von zwei Stunden noch in der Membran verankert waren, wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, wobei sowohl die Lipide als auch die Rezeptoren eine deutliche Membranfärbung zeigten (s. Abb. 4.35).

Bei der Fusion der Liposomen mit adhärennten ATDC5 und C2C12 Zellen (nicht gezeigt) zeigte sich, dass sich durch den Fusionsprozess die Zellen abrundeten. Ein Effekt, der bereits durch Stebelska (STEBELSKA *et al.* 2007) beschrieben wurde und auf der kurzzeitigen Permeabilisierung der Plasmamembran beruht.

Wie nachgewiesen werden konnte, beeinträchtigte dies die Zellvitalität nicht (s. Abb. 4.29).

In einer anderen Studie wurde N-Alkyl-3 β -Cholesterylamin mit einer endständigen NTA Gruppe verwendet, um künstliche Rezeptoren zu generieren. Die durch das Cholesterin verankerten Rezeptoren zeigten dabei bereits nach kurzer Zeit eine partielle Lokalisation in Endosomen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte (BOONYARATTANAKALIN *et al.* 2006). Dies ist deshalb erwähnenswert, da diese verankerten Rezeptoren zusammen mit dem gebundenen Lipid nach der Endozytose teilweise auf der Innenseite der Membran lokalisiert sein könnten (RAJENDRAN and SIMONS 2005).

Um sicherzustellen, dass die verankerten BMP Rezeptoren in der äußeren Membran verankert- und so die gebundenen Rezeptoren auf der Zelloberfläche lokalisiert waren, wurden die Rezeptoren BMPR-1A und BMPR-2 mit ¹²⁵Iod markiert.

Nach der Bindung der Rezeptoren an die membranintegrierten Chelatlipide, konnten die gebundenen Rezeptoren am Szintillationszähler nachgewiesen und quantifiziert werden. Für nachfolgende Hemmversuche ist es also möglich, die Anzahl gebundener Rezeptoren pro Zelle zu bestimmen und daher die Affinität der einzelnen Rezeptorketten in der Membran zu determinieren (s. Abb. 4.34A).

Des Weiteren war es möglich, die gebundenen Rezeptoren durch eine Behandlung mit Imidazol kompetitiv zu verdrängen. Dies verdeutlicht zum einen, dass die Rezeptoren durch die Interaktion des His-Tags mit den NTA-Gruppen der Chelatlipide verankert waren und zudem konnte so sichergestellt werden, dass die Rezeptoren auf der Zelloberfläche lokalisiert waren (s. Abb. 4.34B).

Eine grobe Bestimmung der Anzahl integrierter Lipide pro Zelle konnte durch Zellgrößenvermessungen am Coulter Counter® erreicht werden. Die Größenzunahme in MPC11 und ATDC5 Zellen war dabei wiederum von der Liposomenkonzentration und vom verwendeten Metallsalz abhängig (s. Abb. 4.30, Abb. 4.31).

MPC11 Zellen zeigten eine Vergrößerung des Durchmessers von maximal 3,07 μ m unter Verwendung von Zn²⁺-beladenen Liposomen und maximal 2,3 μ m nach der Fusion mit Ni²⁺-komplexierten Liposomen. ATDC5 Zellen zeigten nach der Fusion der Liposomen eine Durchmesservergrößerung von 2,9 μ m (Zn²⁺) bzw. 2,1 μ m (Ni²⁺). Da ATDC5 Zellen einen Durchschnittsdurchmesser von 18,9 μ m aufweisen, MPC11 Zellen dagegen von 12,9 μ m, werden für eine Vergrößerung des Durchmessers im Falle der ATDC5 Zellen eine höhere Fusionsrate benötigt, um dieselbe Vergrößerung zu erreichen.

Die prozentuale Verteilung der Größenveränderungen beider Zelltypen nach der Fusion folgte der Normalverteilung. Daher stellen die Werte, die einer Größenzunahme von 50% der Zellen entsprechen, die Mittelwerte der Größenzunahme dar. Unter der Annahme, dass die Zellen eine ideale runde Form in Suspension aufweisen und ca. 5×10^6 Lipide pro Quadratmikrometer beinhalten (Quelle: Bruce Alberts, *The Cell*, 4. Ed.), konnten Näherungen aufgestellt werden über die Anzahl integrierter Lipide pro Zelle (s. Tab. 4.3A, 4.3B).

Zudem ermöglichten diese Werte eine Näherung des Anteils Rezeptor-gebundener Chelatlipide zu ermitteln, die demnach bei 0,5-1% der SOA-Lipide (bei einer 1mM Liposomensuspension) unter Verwendung einer $3 \mu\text{M}$ Rezeptorlösung lag.

Ziel dieser Arbeit war es, BMP-Rezeptortodomänen in Zellmembranen zu integrieren, um die Affinität der einzelnen Rezeptorketten auf Zelloberflächen zu ermitteln.

Der best beschriebene BMP induzierte Signalweg ist der Smad Signalweg (KRETZSCHMAR *et al.* 1997; LIU *et al.* 1996; NOHE *et al.* 2002).

In den Zelllinien ATDC5 und MPC11 wurde die BMP-2 Dosis für eine halbmaximale Smad-Phosphorylierung ermittelt (s. Abb. 4.36, Abb. 4.37). Für MPC11 Zellen lag sie bei ca. 3nM BMP-2, bei ATDC5 Zellen bei ca. 0,3nM. Für die MPC11 Zellen ist bislang kein EC_{50} Wert dieses Signalwegs publiziert, allerdings stimmen die ermittelten Werte der ATDC5 Zellen mit Literaturwerten überein (HEINECKE *et al.* 2009).

Für Hemmversuche sind diese Werte wichtig, da hemmende oder stimulierende Effekte in diesem Bereich die stärkste Wirkung entfalten, wie schon aus den Graphen 4.36A1 und 4.37A1 ersichtlich wird.

In ATDC5 Zellen werden durch die Zugabe von 0,3nM BMP-2 vor allem die Preformed Complexes (PFCs) adressiert. Bei einer Konzentration von ca. 3nM BMP-2 führt die Ligandenbindung an einzelne Rezeptorketten zu deren Oligomerisierung und Aktivierung (BMP induced signaling complexes, BISCs) (HASSEL *et al.* 2003). Wie kürzlich gezeigt werden konnte, determiniert die Ligandenkonzentration in der BMP-2-Rezeptorinteraktion die Signalqualität. Aufgrund der präformierten bzw. ligandinduzierten homo/heterooligomeren Rezeptorkomplexe, die BMP-2 binden können, kann das Signal im Zellinneren qualitativ und quantitativ gesteuert werden. (HEINECKE *et al.* 2009)

MPC11 Zellen weisen auf RNA Ebene ein vergleichbares Expressionsmuster der BMP Rezeptoren, vor allem des Typ I Rezeptors BMPR-1A und des Typ II Rezeptors BMPR-2 mit den ATDC5 Zellen auf (Dr. S. Gebhardt, pers. Gespräch). Der höhere EC_{50} Wert ist also nicht in differentiell exprimierten Rezeptorketten begründet.

Zum derzeitigen Standpunkt kann nur spekuliert werden, ob die fehlende extrazelluläre Matrix der Suspensionszellen zu einer veränderten Anordnung der Rezeptorketten auf der Oberfläche führt und daher keine Smad-Phosphorylierung bei 0,3nM BMP-2 erfolgt.

Die BMP-2 induzierte Smad Phosphorylierung wurde, um Vergleiche mit membran-assoziierten Rezeptoren aufstellen zu können, mit löslichen BMPR-1A Rezeptoren gehemmt.

In diesen Hemmversuchen zeigte die lösliche Ektodomäne eine halbmaximale Hemmung in ATDC5 und MPC11 Zellen bei 1 μ M, wenn diese mit 3nM BMP-2 stimuliert wurden (s. Abb. 4.39). Überraschenderweise war eine Hemmung durch lösliche Ektodomänen in ATDC5 Zellen mit 0,3nM BMP-2 nicht möglich. Dies kann zum derzeitigen Standpunkt nicht erklärt werden, da die löslichen Rezeptoren die Konzentration an freiem BMP-2 herabsetzen sollten. Analoge Versuche waren in MPC11 Zellen nicht möglich, da diese bei 0,3nM BMP-2 keine Smad-Phosphorylierung zeigten.

Für Hemmversuche mit Chelatlipid-verankerten Ektodomänen ist es wichtig auszuschließen, dass die Liposomenfusion selbst Einfluss nimmt auf die BMP-2 induzierte Smad-Phosphorylierung. Daher wurden ATDC5 Zellen mit Ni^{2+} , bzw. Zn^{2+} -komplexierten Liposomen verschiedener Lipidkonzentrationen fusioniert und die Zellen anschließend mit 0,3nM BMP-2 stimuliert (s. Abb 4.38A-C). Die Liposomen inhibierten die Smad Phosphorylierung, wobei die Hemmung abhängig war von der Konzentration der Liposomen und dem verwendeten Metallion. Die Zn^{2+} -Ionen, welche zu ca. fünffach höheren Fusionsraten in ATDC5- und MPC11 Zellen führten, verglichen mit Nickelionen, zeigten in diesen Hemmversuchen wiederum bei kleineren Lipidkonzentrationen eine hemmende Wirkung. Die ermittelten EC_{50} Werte betragen etwa 50 μ M (Zn^{2+}), bzw. 120 μ M (Ni^{2+}). Interessanterweise wurden nach den Tabellen 4.3A und B in diesem Bereich etwa die gleichen Mengen Lipide in die Zellmembranen integriert (Ni^{2+} (100 μ M): $2,9 \cdot 10^7$), (Zn^{2+} (30 μ M): $2 \cdot 10^7$).

Dies lässt vermuten, dass die Hemmung durch die Fusion der Liposomen herbeigeführt wird. Eine einfache Erklärung für diesen Effekt wäre sicherlich ein durch die Fusion

bedingtes Absterben der Zellen, was jedoch durch die in Abb. 4.29 vorgestellten Ergebnisse ausgeschlossen werden kann.

Zwar ist bekannt, dass bestimmte Metallionen, wie Ni^{2+} die BMP-2 vermittelte Induktion der alkalischen Phosphatase (ALP) hemmen, was im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (MOLDERS *et al.* 2007). Die hemmende Wirkung in diesem Zellaassay war jedoch nur zu beobachten, wenn Nickelionen während der kompletten, mehrtägigen BMP-2 Stimulation vorhanden waren. Eine kurzzeitige Inkubation der Zellen mit NiCl_2 , vergleichbar mit der Stimulationsdauer der Zellen im Smad-Assay hatte dagegen keinen Effekt (nicht gezeigt).

Zudem konnte ebenfalls belegt werden, dass beide Metallionen in Lösung keinen Einfluss nahmen auf die Smad-Phosphorylierung (s.Abb. 4.38D, E).

Die Liposomen ohne komplexiertes Metallion inhibierten die Phosphorylierung der Smad Proteine 1, 5, und 8 ebenfalls nicht (s. Abb. 4.38F). Die Inkubation der Liposomen ohne komplexiertes Metallion führte zu einer drastisch reduzierten Fusionsrate, wie bereits besprochen.

All diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Integrierung der ektopen Lipide in die Zellmembran der ATDC5 Zellen die BMP-2 vermittelte Smad-Aktivierung blockierte.

Die Fusionsrate der Liposomen ließ sich durch zwei Faktoren beeinflussen. Zum einen durch die Lipidkonzentration, zum anderen auch durch die Menge komplexierter Metallionen. In einer Reihe von Experimenten wurden nun Bedingungen ermittelt, in welchen es möglich war, ausreichende Rezeptormengen zu koppeln, ohne die Smad-Phosphorylierung per se zu inhibieren.

Dies war durch eine Inkubation der Zellen mit einer 1mM Liposomensuspension, welche mit $600\mu\text{M}$ NiCl_2 komplexiert wurden, möglich (s. Abb. 4.40). Die eigentliche Fusion verringerte die P-Smad-Konzentration lediglich um ca. 30% (Quantifizierung mit der Image J Software), während gebundene BMPR-1A Rezeptoren die Smad Phosphorylierung annähernd vollständig inhibierten. Die Ektodomänen zeigten diesen Effekt nur, wenn metallion-komplexierte Liposomen für die Fusion verwendet wurden, sodass bewiesen war, dass die Hemmung durch membranverankerte Rezeptoren und nicht durch eventuell vorhandene Ektodomänen in Lösung zu Stande kam.

Bei einer weiteren Verringerung der Metallsalzkonzentration war es nicht mehr möglich, die Smad-Phosphorylierung durch die gekoppelten BMPR-1A Rezeptoren zu inhibieren. Größere Konzentrationen an NiCl₂ dagegen verstärkten den inhibierenden Effekt.

Mit Hilfe der Chelatlipide ist es also prinzipiell möglich, Rezeptor-Ligand Interaktionen direkt auf Zellmembranen zu studieren.

Wie bereits erwähnt, werden durch die Zugabe von 0,3nM BMP-2 vor allem die PFCs adressiert. Durch eine Erhöhung auf 3nM werden kurzzeitig sowohl die PFCs gebunden, über längere Stimulationszeiten vor allem die BISCs (HEINECKE *et al.* 2009).

Es ist denkbar, dass durch die große Anzahl ektopter Lipidmoleküle, die durch die Liposomenfusion in die Zellmembranen integriert werden, die präformierten Komplexe desintegriert werden.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Hemmversuche mit Chelatgebundenen Ektodomänen mit einer 3mM BMP-2 Lösung wiederholt. In diesen Versuchen zeigte sich, dass der inhibierende Effekt durch die Fusion weitestgehend aufgehoben werden konnte (s. Abb. 4.41), während gebundene BMPR-1A Ektodomänen die Smad-Phosphorylierung wiederum annähernd vollständig inhibierten.

Im Rahmen der Arbeit konnte dagegen keine dosisabhängige Hemmkurve durch die Kopplung der BMPR-1A Ektodomäne erstellt werden, da die erhaltenen Ergebnisse nicht reproduzierbar waren. Eine mögliche Erklärung wären falsch gefaltete Ektodomänen. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Ektodomänen durch eine BMP-2 Affinitätssäule gereinigt wurden (s. Abb. 4.14) und Herr Prof. W. Sebald freundlicherweise die korrekte Affinität der präparierten Ektodomäne zum Ligand BMP-2 mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie bestätigte (nicht gezeigt).

Die Hemmung durch die gekoppelten Rezeptoren wäre auf zwei Mechanismen zurückzuführen: zum einen durch Verringerung der freien Liganden, welche mit endogenen Typ I Rezeptoren interagieren. Zum anderen wäre es auch möglich, dass die Liganden-gebundenen ektopten Rezeptoren funktionsuntüchtige Rezeptorkomplexe mit Typ II Rezeptoren nach der BMP-2 Bindung eingehen und so ebenfalls die Konzentration an freien Typ II Rezeptoren herabsetzen. Dies wäre denkbar, da bisher im Bereich der zytoplasmatischen- und Transmembran-Domänen keine Rezeptor-Rezeptor Interaktionen nachgewiesen werden konnten (WEBER *et al.* 2007).

In analogen Versuchen mit dem Typ II Rezeptor BMPR-2 dagegen konnte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe der Effekt des ektopen Rezeptors auf die Smad-Phosphorylierung dosisabhängig untersucht werden (s. Abb. 4.32).

Interessanterweise zeigte die BMPR-2 Ektodomäne in diesen Versuchen keine Hemmung der Smad-Phosphorylierung, sondern verstärkte das p-Smad Signal in Abhängigkeit von der Menge gebundener Rezeptoren. Der EC_{50} lag hier bei ca. 200nM gekoppelten Ektodomänen.

Dieser Effekt ist derzeit nur durch die besonders schnelle Bindekinetik des BMPR-2 zu erklären. In Plasmon-Resonanz-Spektroskopien wurde ersichtlich, dass sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation einer äußerst schnellen Kinetik folgen, was durch ein annähernd rechteckiges Bindungsdiagramm ersichtlich wird (HEINECKE *et al.* 2009).

Demzufolge könnten die Chelatlipid-gebundenen Ektodomänen freie Liganden kurzzeitig binden und dadurch die relative Konzentration an BMP-2 in der Nähe der Membran erhöhen.

Da in diesen Versuchen keine Hemmung beobachtet wurde, ist es hier unwahrscheinlich, dass die ektopen Rezeptoren mit BMPR-1A/BMP-2 Komplexen interagierten, da dies die Signalweiterleitung hemmen würde.

In weiterführenden Experimenten können die gewonnenen Daten verwendet werden, um mit Hilfe einer Kombination von Smad-Assays unter Verwendung von Konzentrationsreihen der einzelnen Rezeptorektodomänen und radioaktiver Markierungen die Affinitäten der Rezeptoren zu BMP-2 innerhalb der Membranebene zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese weiterführenden Daten nicht gewonnen werden, da die erhaltenen Ergebnisse nach der Kopplung der BMPR-1A ECD als Positivkontrolle nicht einheitlich waren.

Die Anwendbarkeit von Chelatlipid-verankerten Ektodomänen, um Rezeptor-Ligand Interaktionen auf Zelloberflächen zu studieren, konnte dagegen belegt werden.

7 Literaturverzeichnis

- AHKONG, Q. F., J. I. HOWELL, J. A. LUCY, F. SAFWAT, M. R. DAVEY *et al.*, 1975 Fusion of hen erythrocytes with yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. *Nature* **255**: 66-67.
- ALEXANDROV, K., I. HEINEMANN, T. DUREK, V. SIDOROVITCH, R. S. GOODY *et al.*, 2002 Intein-mediated synthesis of geranylgeranylated Rab7 protein in vitro. *J Am Chem Soc* **124**: 5648-5649.
- ALLENDORPH, G. P., M. J. ISAACS, Y. KAWAKAMI, J. C. IZPISUA BELMONTE and S. CHOE, 2007 BMP-3 and BMP-6 structures illuminate the nature of binding specificity with receptors. *Biochemistry* **46**: 12238-12247.
- ALONSO, J. M., A. REICHEL, J. PIEHLER and A. DEL CAMPO, 2008 Photopatterned surfaces for site-specific and functional immobilization of proteins. *Langmuir* **24**: 448-457.
- ANEZ-ROJAS, N., P. GARCIA-LUGO, G. CRISANTE, A. ROJAS and N. ANEZ, 2006 Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* **97**: 140-145.
- ATTISANO, L., J. CARCAMO, F. VENTURA, F. M. WEIS, J. MASSAGUE *et al.*, 1993 Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* **75**: 671-680.
- BABITT, J. L., F. W. HUANG, D. M. WRIGHTING, Y. XIA, Y. SIDIS *et al.*, 2006 Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* **38**: 531-539.
- BAKER, J. C., and R. M. HARLAND, 1996 A novel mesoderm inducer, *Madr2*, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* **10**: 1880-1889.
- BALEMANS, W., and W. VAN HUL, 2002 Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* **250**: 231-250.
- BELL, E., I. MUNOZ-SANJUAN, C. R. ALTMANN, A. VONICA and A. H. BRIVANLOU, 2003 Cell fate specification and competence by *Coco*, a maternal BMP, TGFbeta and Wnt inhibitor. *Development* **130**: 1381-1389.
- BEPPU, H., M. KAWABATA, T. HAMAMOTO, A. CHYTL, O. MINOWA *et al.*, 2000 BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol* **221**: 249-258.
- BIER, E., 2008 Intriguing extracellular regulation of BMP signaling. *Dev Cell* **15**: 176-177.
- BINNERTS, M. E., X. WEN, K. CANTE-BARRETT, J. BRIGHT, H. T. CHEN *et al.*, 2004 Human *Crossveinless-2* is a novel inhibitor of bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 272-280.
- BOONYARATTANAKALIN, S., S. ATHAVANKAR, Q. SUN and B. R. PETERSON, 2006 Synthesis of an artificial cell surface receptor that enables oligohistidine affinity tags to function as metal-dependent cell-penetrating peptides. *J Am Chem Soc* **128**: 386-387.
- BOTCHKAREV, V. A., 2003 Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J Invest Dermatol* **120**: 36-47.

- BRUNSVELD, L., J. KUHLMANN, K. ALEXANDROV, A. WITTINGHOFER, R. S. GOODY *et al.*, 2006 Lipidated ras and rab peptides and proteins--synthesis, structure, and function. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**: 6622-6646.
- BRUNSVELD, L., A. WATZKE, T. DUREK, K. ALEXANDROV, R. S. GOODY *et al.*, 2005 Synthesis of functionalized rab GTPases by a combination of solution- or solid-phase lipopeptide synthesis with expressed protein ligation. *Chemistry* **11**: 2756-2772.
- BUMGARNER, G. W., J. C. ZAMPELL, S. NAGARAJAN, N. J. POLOSO, A. S. DORN *et al.*, 2005 Modified cell ELISA to determine the solubilization of cell surface proteins: Applications in GPI-anchored protein purification. *J Biochem Biophys Methods* **64**: 99-109.
- CAIN, J. E., S. HARTWIG, J. F. BERTRAM and N. D. ROSENBLUM, 2008 Bone morphogenetic protein signaling in the developing kidney: present and future. *Differentiation* **76**: 831-842.
- CANTU, M. D., S. HILLEBRANDA and E. CARRILHO, 2005 Determination of the dissociation constants (pKa) of secondary and tertiary amines in organic media by capillary electrophoresis and their role in the electrophoretic mobility order inversion. *J Chromatogr A* **1068**: 99-105.
- CAPDEVILLE, Y., M. L. CARDOSO DE ALMEIDA and C. DEREGNAUCOURT, 1987 The membrane-anchor of Paramecium temperature-specific surface antigens is a glycosylinositol phospholipid. *Biochem Biophys Res Commun* **147**: 1219-1225.
- CARCAMO, J., F. M. WEIS, F. VENTURA, R. WIESER, J. L. WRANA *et al.*, 1994 Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* **14**: 3810-3821.
- CHEN, Y. G., A. HATA, R. S. LO, D. WOTTON, Y. SHI *et al.*, 1998 Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **12**: 2144-2152.
- CHEN, Y. G., and J. MASSAGUE, 1999 Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem* **274**: 3672-3677.
- CHERNOMORDIK, L. V., and M. M. KOZLOV, 2008 Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 675-683.
- CHUNG, H. A., K. KATO, C. ITOH, S. OHHASHI and T. NAGAMUNE, 2004 Casual cell surface remodeling using biocompatible lipid-poly(ethylene glycol)(n): development of stealth cells and monitoring of cell membrane behavior in serum-supplemented conditions. *J Biomed Mater Res A* **70**: 179-185.
- CONSTAM, D. B., and E. J. ROBERTSON, 1999 Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* **144**: 139-149.
- CUNNINGHAM, N. S., V. PARALKAR and A. H. REDDI, 1992 Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11740-11744.
- DALE, L., G. HOWES, B. M. PRICE and J. C. SMITH, 1992 Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* **115**: 573-585.
- DALE, L., and C. M. JONES, 1999 BMP signalling in early *Xenopus* development. *Bioessays* **21**: 751-760.
- DAVID, R., M. P. RICHTER and A. G. BECK-SICKINGER, 2004 Expressed protein ligation. Method and applications. *Eur J Biochem* **271**: 663-677.

- DAVSON, H., and J. F. DANIELLI, 1936 Studies on the permeability of erythrocytes: The alleged reversal of ionic permeability at alkaline reaction. *Biochem J* **30**: 316-320.
- DE BANK, P. A., B. KELLAM, D. A. KENDALL and K. M. SHAKESHEFF, 2003 Surface engineering of living myoblasts via selective periodate oxidation. *Biotechnol Bioeng* **81**: 800-808.
- DE CAESTECKER, M., 2004 The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**: 1-11.
- DERYNCK, R., and Y. E. ZHANG, 2003 Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**: 577-584.
- DORN, I. T., K. PAWLITSCHKO, S. C. PETTINGER and R. TAMPE, 1998 Orientation and two-dimensional organization of proteins at chelator lipid interfaces. *Biol Chem* **379**: 1151-1159.
- EBENDAL, T., H. BENGTSSON and S. SODERSTROM, 1998 Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain. *J Neurosci Res* **51**: 139-146.
- EBNER, R., R. H. CHEN, S. LAWLER, T. ZIONCHECK and R. DERYNCK, 1993 Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin. *Science* **262**: 900-902.
- ELLEUCHE, S., and S. POGGELER, 2010 Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 479-489.
- EVANS, T. C., JR., J. BENNER and M. Q. XU, 1999 The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing inteins. *J Biol Chem* **274**: 18359-18363.
- FAN, J., M. SAMMALKORPI and M. HAATAJA, 2010 Formation and regulation of lipid microdomains in cell membranes: theory, modeling, and speculation. *FEBS Lett* **584**: 1678-1684.
- FOLEY, T. L., and M. D. BURKART, 2007 Site-specific protein modification: advances and applications. *Curr Opin Chem Biol* **11**: 12-19.
- FRANZEN, P., P. TEN DIJKE, H. ICHIJO, H. YAMASHITA, P. SCHULZ *et al.*, 1993 Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* **75**: 681-692.
- FUTERMAN, A. H., R. GHIDONI and G. VAN MEER, 1998 Lipids: regulatory functions in membrane traffic and cell development. Kfar Blum Kibbutz Guest House, Galilee, Israel, May 10-15, 1998. *EMBO J* **17**: 6772-6775.
- GARCIA-SAEZ, A. J., and P. SCHWILLE, 2010 Surface analysis of membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1798**: 766-776.
- GAVUTIS, M., E. JAKS, P. LAMKEN and J. PIEHLER, 2006a Determination of the two-dimensional interaction rate constants of a cytokine receptor complex. *Biophys J* **90**: 3345-3355.
- GAVUTIS, M., S. LATA and J. PIEHLER, 2006b Probing 2-dimensional protein-protein interactions on model membranes. *Nat Protoc* **1**: 2091-2103.
- GILBOA, L., A. NOHE, T. GEISSENDORFER, W. SEBALD, Y. I. HENIS *et al.*, 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.
- GOETZ, J. G., B. JOSHI, P. LAJOIE, S. S. STRUGNELL, T. SCUDAMORE *et al.*, 2008 Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell Biol* **180**: 1261-1275.

- GOGARTEN, J. P., A. G. SENEJANI, O. ZHAXYBAYEVA, L. OLENDZENSKI and E. HILARIO, 2002 Inteins: structure, function, and evolution. *Annu Rev Microbiol* **56**: 263-287.
- GOTTLIEB, D., C. GRUNWALD, C. NOWAK, J. KUHLMANN and H. WALDMANN, 2006 Intein-mediated in vitro synthesis of lipidated Ras proteins. *Chem Commun (Camb)*: 260-262.
- GOUMANS, M. J., and C. MUMMERY, 2000 Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* **44**: 253-265.
- GOUMANS, M. J., G. VALDIMARSDOTTIR, S. ITOH, F. LEBRIN, J. LARSSON *et al.*, 2003 Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**: 817-828.
- GRASBERGER, B., A. P. MINTON, C. DELISI and H. METZGER, 1986 Interaction between proteins localized in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 6258-6262.
- GREENWALD, J., W. H. FISCHER, W. W. VALE and S. CHOE, 1999 Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nat Struct Biol* **6**: 18-22.
- GREENWALD, J., J. GROPPE, P. GRAY, E. WIATER, W. KWIATKOWSKI *et al.*, 2003 The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* **11**: 605-617.
- GREENWALD, J., V. LE, A. CORRIGAN, W. FISCHER, E. KOMIVES *et al.*, 1998 Characterization of the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor. *Biochemistry* **37**: 16711-16718.
- GREENWALD, J., M. E. VEGA, G. P. ALLENDORPH, W. H. FISCHER, W. VALE *et al.*, 2004 A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors. *Mol Cell* **15**: 485-489.
- GRIFFITH, D. L., P. C. KECK, T. K. SAMPATH, D. C. RUEGER and W. D. CARLSON, 1996 Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 878-883.
- GROPPE, J., J. GREENWALD, E. WIATER, J. RODRIGUEZ-LEON, A. N. ECONOMIDES *et al.*, 2002 Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **420**: 636-642.
- GU, Z., E. M. REYNOLDS, J. SONG, H. LEI, A. FEIJEN *et al.*, 1999 The type I serine/threonine kinase receptor ActRIA (ALK2) is required for gastrulation of the mouse embryo. *Development* **126**: 2551-2561.
- GUO, H. B., M. RANDOLPH and M. PIERCE, 2007 Inhibition of a specific N-glycosylation activity results in attenuation of breast carcinoma cell invasiveness-related phenotypes: inhibition of epidermal growth factor-induced dephosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **282**: 22150-22162.
- GUTHER, M. L., S. LEAL, N. A. MORRICE, G. A. CROSS and M. A. FERGUSON, 2001 Purification, cloning and characterization of a GPI inositol deacylase from *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* **20**: 4923-4934.
- HAGVE, T. A., E. CHRISTENSEN, M. GRONN and B. O. CHRISTOPHERSEN, 1988 Regulation of the metabolism of polyunsaturated fatty acids. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **191**: 33-46.
- HANCOCK, J. F., 2006 Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 456-462.

- HART, P. J., S. DEEP, A. B. TAYLOR, Z. SHU, C. S. HINCK *et al.*, 2002 Crystal structure of the human TbetaR2 ectodomain--TGF-beta3 complex. *Nat Struct Biol* **9**: 203-208.
- HARTSOUGH, M. T., and K. M. MULDER, 1997 Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Pharmacol Ther* **75**: 21-41.
- HARTUNG, A., K. BITTON-WORMS, M. M. RECHTMAN, V. WENZEL, J. H. BOERGERMANN *et al.*, 2006 Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* **26**: 7791-7805.
- HASSEL, S., S. SCHMITT, A. HARTUNG, M. ROTH, A. NOHE *et al.*, 2003 Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**: 44-51.
- HATA, A., G. LAGNA, J. MASSAGUE and A. HEMMATI-BRIVANLOU, 1998 Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* **12**: 186-197.
- HATA, A., R. S. LO, D. WOTTON, G. LAGNA and J. MASSAGUE, 1997 Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* **388**: 82-87.
- HEINECKE, K., A. SEHER, W. SCHMITZ, T. D. MUELLER, W. SEBALD *et al.*, 2009 Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC Biol* **7**: 59.
- HELDIN, C. H., K. MIYAZONO and P. TEN DIJKE, 1997 TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**: 465-471.
- HIGASHI, N., M. YAMAUCHI, Y. OKUMURA, M. NAKANISHI and J. SUNAMOTO, 1996 Fusion between Jurkat cell and PEO-lipid modified liposome. *Biochim Biophys Acta* **1285**: 183-191.
- HINCK, A. P., S. J. ARCHER, S. W. QIAN, A. B. ROBERTS, M. B. SPORN *et al.*, 1996 Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* **35**: 8517-8534.
- HLAVAC, F., and E. ROUER, 1997 Expression of the protein-tyrosine kinase p56lck by the pTRX vector yields a highly soluble protein recovered by mild sonication. *Protein Expr Purif* **11**: 227-232.
- HOCHULI, E., H. DOBELI and A. SCHACHER, 1987 New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **411**: 177-184.
- HOGAN, B. L., 1996 Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 432-438.
- HOLLMANN, A., L. DELFEDERICO, G. DE ANTONI, L. SEMORILE and E. A. DISALVO, 2010 Interaction of bacterial surface layer proteins with lipid membranes: Synergism between surface charge density and chain packing. *Colloids Surf B Biointerfaces*.
- HSU, D. R., A. N. ECONOMIDES, X. WANG, P. M. EIMON and R. M. HARLAND, 1998 The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* **1**: 673-683.
- HUNTER, W. M., and F. C. GREENWOOD, 1962 Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**: 495-496.
- IKEYA, M., M. KAWADA, H. KIYONARI, N. SASAI, K. NAKAO *et al.*, 2006 Essential pro-Bmp roles of crossveinless 2 in mouse organogenesis. *Development* **133**: 4463-4473.
- IKEZAWA, H., 2002 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull* **25**: 409-417.

- IMAMURA, T., M. TAKASE, A. NISHIHARA, E. OEDA, J. HANAI *et al.*, 1997 Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* **389**: 622-626.
- INMAN, G. J., and C. S. HILL, 2002 Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J Biol Chem* **277**: 51008-51016.
- JENSEN, E. D., R. GOPALAKRISHNAN and J. J. WESTENDORF, 2010 Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors* **36**: 25-32.
- JONES, C. M., K. M. LYONS, P. M. LAPAN, C. V. WRIGHT and B. L. HOGAN, 1992 DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* **115**: 639-647.
- JONES, W. K., E. A. RICHMOND, K. WHITE, H. SASAKI, W. KUSMIK *et al.*, 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.
- KANE, P. M., C. T. YAMASHIRO, D. F. WOLCZYK, N. NEFF, M. GOEBL *et al.*, 1990 Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. *Science* **250**: 651-657.
- KANOMATA, K., S. KOKABU, J. NOJIMA, T. FUKUDA and T. KATAGIRI, 2009 DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. *Genes Cells*.
- KATO, K., C. ITOH, T. YASUKOUCHI and T. NAGAMUNE, 2004 Rapid protein anchoring into the membranes of Mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glycol) derivatives. *Biotechnol Prog* **20**: 897-904.
- KATO, K., K. UMEZAWA, D. P. FUNERIU, M. MIYAKE, J. MIYAKE *et al.*, 2003 Immobilized culture of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified surface. *Biotechniques* **35**: 1014-1018, 1020-1011.
- KAWABATA, M., T. IMAMURA and K. MIYAZONO, 1998 Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**: 49-61.
- KILLIAN, J. A., 1998 Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1376**: 401-415.
- KIM, J., K. JOHNSON, H. J. CHEN, S. CARROLL and A. LAUGHON, 1997 *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**: 304-308.
- KIRSCH, T., J. NICKEL and W. SEBALD, 2000a BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J* **19**: 3314-3324.
- KIRSCH, T., W. SEBALD and M. K. DREYER, 2000b Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* **7**: 492-496.
- KLABUNDE, T., S. SHARMA, A. TELENTI, W. R. JACOBS, JR. and J. C. SACCHETTINI, 1998 Crystal structure of GyrA intein from *Mycobacterium xenopi* reveals structural basis of protein splicing. *Nat Struct Biol* **5**: 31-36.
- KNAUS, P., and W. SEBALD, 2001 Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol Chem* **382**: 1189-1195.
- KOSTER, M., S. PLESSOW, J. H. CLEMENT, A. LORENZ, H. TIEDEMANN *et al.*, 1991 Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), a member of the TGF-beta family, in early embryos of *Xenopus laevis*: analysis of mesoderm inducing activity. *Mech Dev* **33**: 191-199.

- KRETZSCHMAR, M., F. LIU, A. HATA, J. DOODY and J. MASSAGUE, 1997 The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* **11**: 984-995.
- KURISAKI, A., S. KOSE, Y. YONEDA, C. H. HELDIN and A. MOUSTAKAS, 2001 Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Mol Biol Cell* **12**: 1079-1091.
- KUSUMI, A., I. KOYAMA-HONDA and K. SUZUKI, 2004 Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* **5**: 213-230.
- LAJOIE, P., J. G. GOETZ, J. W. DENNIS and I. R. NABI, 2009a Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol* **185**: 381-385.
- LAJOIE, P., L. D. KOJIC, S. NIM, L. LI, J. W. DENNIS *et al.*, 2009b Caveolin-1 regulation of dynamin-dependent, raft-mediated endocytosis of cholera toxin b-subunit occurs independently of caveolae. *J Cell Mol Med*.
- LATA, S., M. GAVUTIS and J. PIEHLER, 2006a Monitoring the dynamics of ligand-receptor complexes on model membranes. *J Am Chem Soc* **128**: 6-7.
- LATA, S., M. GAVUTIS, R. TAMPE and J. PIEHLER, 2006b Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation. *J Am Chem Soc* **128**: 2365-2372.
- LATA, S., A. REICHEL, R. BROCK, R. TAMPE and J. PIEHLER, 2005 High-affinity adaptors for switchable recognition of histidine-tagged proteins. *J Am Chem Soc* **127**: 10205-10215.
- LAUDE, A. J., and I. A. PRIOR, 2004 Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* **21**: 193-205.
- LAVERY, K., P. SWAIN, D. FALB and M. H. ALAOUI-ISMAILI, 2008 BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* **283**: 20948-20958.
- LEE, J. H., T. J. BAKER, L. K. MAHAL, J. ZABNER, C. R. BERTOZZI *et al.*, 1999 Engineering novel cell surface receptors for virus-mediated gene transfer. *J Biol Chem* **274**: 21878-21884.
- LEHMANN, K., P. SEEMANN, S. STRICKER, M. SAMMAR, B. MEYER *et al.*, 2003 Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12277-12282.
- LEMIEUX, G. A., and C. R. BERTOZZI, 1998 Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Trends Biotechnol* **16**: 506-513.
- LEMIEUX, G. A., and C. R. BERTOZZI, 2001 Modulating cell surface immunoreactivity by metabolic induction of unnatural carbohydrate antigens. *Chem Biol* **8**: 265-275.
- LENTZ, B. R., 2007 PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Eur Biophys J* **36**: 315-326.
- LIN, H. Y., X. F. WANG, E. NG-EATON, R. A. WEINBERG and H. F. LODISH, 1992 Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* **68**: 775-785.
- LINGWOOD, D., and K. SIMONS, 2010 Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**: 46-50.
- LITTLE, S. C., and M. C. MULLINS, 2004 Twisted gastrulation promotes BMP signaling in zebrafish dorsal-ventral axial patterning. *Development* **131**: 5825-5835.

- LIU, F., A. HATA, J. C. BAKER, J. DOODY, J. CARCAMO *et al.*, 1996 A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* **381**: 620-623.
- LIU, F., C. POUPONNOT and J. MASSAGUE, 1997 Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* **11**: 3157-3167.
- LIU, F., F. VENTURA, J. DOODY and J. MASSAGUE, 1995 Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* **15**: 3479-3486.
- LOMMERSE, P. H., H. P. SPAINK and T. SCHMIDT, 2004 In vivo plasma membrane organization: results of biophysical approaches. *Biochim Biophys Acta* **1664**: 119-131.
- MA, Z., Z. MAO and C. GAO, 2007 Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* **60**: 137-157.
- MACDONALD, R. C., V. M. CARR, R. I. MACDONALD, P. P. CARBALLO and J. A. FISHER, 1978 Interactions between lipid vesicles and cell membranes. *Ann N Y Acad Sci* **308**: 200-214.
- MACIAS-SILVA, M., S. ABDOLLAH, P. A. HOODLESS, R. PIRONE, L. ATTISANO *et al.*, 1996 MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* **87**: 1215-1224.
- MACNAIR, R., E. H. RODGERS, C. MACDONALD, A. WYKMAN, I. GOLDIE *et al.*, 1997 The response of primary rat and human osteoblasts and an immortalized rat osteoblast cell line to orthopaedic materials: comparative sensitivity of several toxicity indices. *J Mater Sci Mater Med* **8**: 105-111.
- MADLER, S., C. BICH, D. TOUBOUL and R. ZENOBI, 2009 Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *J Mass Spectrom* **44**: 694-706.
- MAHAL, L. K., K. J. YAREMA and C. R. BERTOZZI, 1997 Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science* **276**: 1125-1128.
- MALININ, V. S., P. FREDERIK and B. R. LENTZ, 2002 Osmotic and curvature stress affect PEG-induced fusion of lipid vesicles but not mixing of their lipids. *Biophys J* **82**: 2090-2100.
- MANNING, G., D. B. WHYTE, R. MARTINEZ, T. HUNTER and S. SUDARSANAM, 2002 The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912-1934.
- MANOVA, K., V. DE LEON, M. ANGELES, S. KALANTRY, M. GIARRE *et al.*, 1995 mRNAs for activin receptors II and IIB are expressed in mouse oocytes and in the epiblast of pregastrula and gastrula stage mouse embryos. *Mech Dev* **49**: 3-11.
- MARSH, D., 2008 Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1545-1575.
- MARTIN, S. E., and B. R. PETERSON, 2003 Non-natural cell surface receptors: synthetic peptides capped with N-cholesteryl-glycine efficiently deliver proteins into Mammalian cells. *Bioconjug Chem* **14**: 67-74.
- MASSAGUE, J., 1998 TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**: 753-791.
- MASSAGUE, J., J. ANDRES, L. ATTISANO, S. CHEIFETZ, F. LOPEZ-CASILLAS *et al.*, 1992 TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev* **32**: 99-104.
- MASSAGUE, J., S. W. BLAIN and R. S. LO, 2000 TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**: 295-309.
- MATHEWS, L. S., and W. W. VALE, 1991 Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* **65**: 973-982.
- MATZUK, M. M., T. R. KUMAR and A. BRADLEY, 1995 Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* **374**: 356-360.

- MCKAY, G. C., R. MACNAIR, C. MACDONALD and M. H. GRANT, 1996 Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line. *Biomaterials* **17**: 1339-1344.
- MCPHERSON, P. S., B. K. KAY and N. K. HUSSAIN, 2001 Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* **2**: 375-384.
- MEDOF, M. E., T. KINOSHITA and V. NUSSENZWEIG, 1984 Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J Exp Med* **160**: 1558-1578.
- MEDOF, M. E., S. NAGARAJAN and M. L. TYKOCINSKI, 1996 Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins. *FASEB J* **10**: 574-586.
- MITTL, P. R., J. P. PRIESTLE, D. A. COX, G. MCMASTER, N. CERLETTI *et al.*, 1996 The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding. *Protein Sci* **5**: 1261-1271.
- MIYAZAWA, K., M. SHINOZAKI, T. HARA, T. FURUYA and K. MIYAZONO, 2002 Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* **7**: 1191-1204.
- MOLDERS, M., J. FELIX, D. BINGMANN, A. HIRNER and M. WIEMANN, 2007 Uptake of nickel from 316L stainless steel into contacting osteoblastic cells and metal ion interference with BMP-2-induced alkaline phosphatase. *J Biomed Mater Res A* **83**: 303-312.
- MOLONEY, D. J., V. M. PANIN, S. H. JOHNSTON, J. CHEN, L. SHAO *et al.*, 2000 Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**: 369-375.
- MOUREK, J., M. LANGMEIER and J. POKORNY, 2009 Significance of the plasma membrane for the nerve cell function, development and plasticity. *Neuro Endocrinol Lett* **30**: 694-699.
- MOUSTAKAS, A., S. SOUCHELNYTSKYI and C. H. HELDIN, 2001 Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* **114**: 4359-4369.
- MURRAY-RUST, J., N. Q. MCDONALD, T. L. BLUNDELL, M. HOSANG, C. OEFNER *et al.*, 1993 Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure* **1**: 153-159.
- NAGASO, H., A. SUZUKI, M. TADA and N. UENO, 1999 Dual specificity of activin type II receptor ActRIIb in dorso-ventral patterning during zebrafish embryogenesis. *Dev Growth Differ* **41**: 119-133.
- NAKANISHI, M., and H. MIZUGUCHI, 1998 [Preparation of unilamellar fusogenic liposomes using the Sendai virus]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **112**: 299-305.
- NAKANISHI, M., H. MIZUGUCHI, K. ASHIHARA, T. SENDA, A. EGUCHI *et al.*, 1999 Gene delivery systems using the Sendai virus. *Mol Membr Biol* **16**: 123-127.
- NICKEL, J., M. K. DREYER, T. KIRSCH and W. SEBALD, 2001 The crystal structure of the BMP-2:BMPIA complex and the generation of BMP-2 antagonists. *J Bone Joint Surg Am* **83-A Suppl 1**: S7-14.
- NICKEL, J., A. KOTZSCH, W. SEBALD and T. D. MUELLER, 2005 A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB. *J Mol Biol* **349**: 933-947.
- NICKEL, J., W. SEBALD, J. C. GROPPE and T. D. MUELLER, 2009 Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 367-377.
- NOHE, A., S. HASSEL, M. EHRLICH, F. NEUBAUER, W. SEBALD *et al.*, 2002 The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* **277**: 5330-5338.

- NOHE, A., E. KEATING, P. KNAUS and N. O. PETERSEN, 2004 Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* **16**: 291-299.
- NOHE, A., E. KEATING, T. M. UNDERHILL, P. KNAUS and N. O. PETERSEN, 2005 Dynamics and interaction of caveolin-1 isoforms with BMP-receptors. *J Cell Sci* **118**: 643-650.
- NOHNO, T., T. ISHIKAWA, T. SAITO, K. HOSOKAWA, S. NOJI *et al.*, 1995 Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* **270**: 22522-22526.
- NOREN, C. J., J. WANG and F. B. PERLER, 2000 Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications. *Angew Chem Int Ed Engl* **39**: 450-466.
- OHNO, S., M. MATSUI, T. YOKOGAWA, M. NAKAMURA, T. HOSOYA *et al.*, 2007 Site-selective post-translational modification of proteins using an unnatural amino acid, 3-azidotyrosine. *J Biochem* **141**: 335-343.
- OLIVER, J. M., and R. D. BERLIN, 1982 Distribution of receptors and functions on cell surfaces: quantitation of ligand-receptor mobility and a new model for the control of plasma membrane topography. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **299**: 215-235.
- ONICHTCHOUK, D., Y. G. CHEN, R. DOSCH, V. GAWANTKA, H. DELIUS *et al.*, 1999 Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**: 480-485.
- PAGANO, R. E., and J. N. WEINSTEIN, 1978 Interactions of liposomes with mammalian cells. *Annu Rev Biophys Bioeng* **7**: 435-468.
- PAPAHADJOPOULOS, D., S. HUI, W. J. VAIL and G. POSTE, 1976a Studies on membrane fusion. I. Interactions of pure phospholipid membranes and the effect of myristic acid, lysolecithin, proteins and dimethylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta* **448**: 254-264.
- PAPAHADJOPOULOS, D., G. POSTE and E. MAYHEW, 1975 The interaction of phospholipid vesicles with mammalian cells in vitro. *Biochem Soc Trans* **3**: 606-608.
- PAPAHADJOPOULOS, D., W. J. VAIL, W. A. PANGBORN and G. POSTE, 1976b Studies on membrane fusion. II. Induction of fusion in pure phospholipid membranes by calcium ions and other divalent metals. *Biochim Biophys Acta* **448**: 265-283.
- PARKER, L., D. G. STATHAKIS and K. ARORA, 2004 Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Prog Mol Subcell Biol* **34**: 73-101.
- PAULUS, H., 2001 Inteins as enzymes. *Bioorg Chem* **29**: 119-129.
- PERLER, F. B., 2006 Protein splicing mechanisms and applications. *IUBMB Life* **58**: 63.
- PICCOLO, S., E. AGIUS, L. LEYNS, S. BHATTACHARYYA, H. GRUNZ *et al.*, 1999 The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**: 707-710.
- PICCOLO, S., Y. SASAI, B. LU and E. M. DE ROBERTIS, 1996 Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**: 589-598.
- POLAND, B. W., M. Q. XU and F. A. QUIOCHO, 2000 Structural insights into the protein splicing mechanism of PI-SceI. *J Biol Chem* **275**: 16408-16413.
- POSTE, G., and D. PAPAHADJOPOULOS, 1976 Lipid vesicles as carriers for introducing materials into cultured cells: influence of vesicle lipid composition on mechanism(s) of vesicle incorporation into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 1603-1607.
- POULIOT, F., A. BLAIS and C. LABRIE, 2003 Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res* **63**: 277-281.

- RAJENDRAN, L., and K. SIMONS, 2005 Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**: 1099-1102.
- RAMOS, M., M. W. LAME, H. J. SEGALL and D. W. WILSON, 2006 The BMP type II receptor is located in lipid rafts, including caveolae, of pulmonary endothelium in vivo and in vitro. *Vascul Pharmacol* **44**: 50-59.
- RAZANI, B., S. E. WOODMAN and M. P. LISANTI, 2002 Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* **54**: 431-467.
- REDDI, A. H., 1994 Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 737-744.
- REDDI, A. H., 2000 Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection. *Pediatr Nephrol* **14**: 598-601.
- REDINBAUGH, M. G., and R. B. TURLEY, 1986 Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem* **153**: 267-271.
- ROJAS, A., P. GARCIA-LUGO, G. CRISANTE, N. ANEZ-ROJAS and N. ANEZ, 2008 Isolation, purification, characterization and antigenic evaluation of GPI-anchored membrane proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop* **105**: 139-144.
- ROSENZWEIG, B. L., T. IMAMURA, T. OKADOME, G. N. COX, H. YAMASHITA *et al.*, 1995 Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7632-7636.
- ROSS, J. J., O. SHIMMI, P. VILMOS, A. PETRYK, H. KIM *et al.*, 2001 Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* **410**: 479-483.
- ROUNTREE, R. B., M. SCHOOR, H. CHEN, M. E. MARKS, V. HARLEY *et al.*, 2004 BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol* **2**: e355.
- SAKAMOTO, K., A. HAYASHI, A. SAKAMOTO, D. KIGA, H. NAKAYAMA *et al.*, 2002 Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **30**: 4692-4699.
- SAMAD, T. A., A. REBBAPRAGADA, E. BELL, Y. ZHANG, Y. SIDIS *et al.*, 2005 DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* **280**: 14122-14129.
- SAMPATH, T. K., and A. H. REDDI, 1981 Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 7599-7603.
- SAVAGE-DUNN, C., 2001 Targets of TGF beta-related signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**: 305-312.
- SCHEUFLER, C., W. SEBALD and M. HULSMAYER, 1999 Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* **287**: 103-115.
- SCHLESSINGER, J., 2002 Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**: 669-672.
- SCHOFFELEN, S., M. H. LAMBERMON, M. B. VAN ELDIJK and J. C. VAN HEST, 2008 Site-specific modification of *Candida antarctica* lipase B via residue-specific incorporation of a non-canonical amino acid. *Bioconjug Chem* **19**: 1127-1131.
- SEBALD, W., and T. D. MUELLER, 2003 The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly. *Trends Biochem Sci* **28**: 518-521.
- SEBALD, W., J. NICKEL, J. L. ZHANG and T. D. MUELLER, 2004 Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem* **385**: 697-710.

- SEBALD, W., J. NICKEL, J. L. ZHANG and T. D. MUELLER, 2010 Molecular basis of cytokine signalling--theme and variations. *FEBS J* **277**: 106-118.
- SENGUPTA, P., B. BAIRD and D. HOLOWKA, 2007 Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 583-590.
- SIEBER, C., J. KOPF, C. HIEPEN and P. KNAUS, 2009 Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 343-355.
- SIMMONS, D. G., and T. G. KENNEDY, 2002 Uterine sensitization-associated gene-1: a novel gene induced within the rat endometrium at the time of uterine receptivity/sensitization for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* **67**: 1638-1645.
- SINGER, S. J., and G. L. NICOLSON, 1972 The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- SMYTH, J. W., and R. M. SHAW, 2008 Visualizing ion channel dynamics at the plasma membrane. *Heart Rhythm* **5**: S7-11.
- STEBELSKA, K., P. WYROZUMSKA, J. GUBERNATOR and A. F. SIKORSKI, 2007 Highly fusogenic cationic liposomes transiently permeabilize the plasma membrane of HeLa cells. *Cell Mol Biol Lett* **12**: 39-50.
- STROUD, R. M., and J. A. WELLS, 2004 Mechanistic diversity of cytokine receptor signaling across cell membranes. *Sci STKE* **2004**: re7.
- SUN, P. D., and D. R. DAVIES, 1995 The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**: 269-291.
- TAN, L. P., R. Y. LUE, G. Y. CHEN and S. Q. YAO, 2004 Improving the intein-mediated, site-specific protein biotinylation strategies both in vitro and in vivo. *Bioorg Med Chem Lett* **14**: 6067-6070.
- TANFORD, C., Y. NOZAKI and M. F. ROHDE, 1977 Size and shape of globular micelles formed in aqueous solution by n-alkyl polyoxyethylene ethers. *The Journal of Physical Chemistry* **81**: 1555-1560.
- TEN DIJKE, P., H. ICHIJO, P. FRANZEN, P. SCHULZ, J. SARAS *et al.*, 1993 Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* **8**: 2879-2887.
- TEN DIJKE, P., K. MIYAZONO and C. H. HELDIN, 1996 Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 139-145.
- TEN DIJKE, P., H. YAMASHITA, T. K. SAMPATH, A. H. REDDI, M. ESTEVEZ *et al.*, 1994 Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* **269**: 16985-16988.
- THOMPSON, T. B., T. K. WOODRUFF and T. S. JARDETZKY, 2003 Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions. *EMBO J* **22**: 1555-1566.
- UMANAH, G., L. Y. HUANG, P. G. SCHULTZ, F. NAIDER and J. M. BECKER, 2009 Incorporation of the unnatural amino acid p-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) into a G protein-coupled receptor in its native context. *Adv Exp Med Biol* **611**: 333-335.
- URIST, M. R., 1965 Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**: 893-899.
- VAN BROEKHOVEN, C. L., and J. G. ALTIN, 2002 A novel approach for modifying tumor cell-derived plasma membrane vesicles to contain encapsulated IL-2 and engrafted costimulatory molecules for use in tumor immunotherapy. *Int J Cancer* **98**: 63-72.

- VAN BROEKHOVEN, C. L., C. R. PARISH, G. VASSILIOU and J. G. ALTIN, 2000 Engrafting costimulator molecules onto tumor cell surfaces with chelator lipids: a potentially convenient approach in cancer vaccine development. *J Immunol* **164**: 2433-2443.
- VENTURA, F., J. DOODY, F. LIU, J. L. WRANA and J. MASSAGUE, 1994 Reconstitution and transphosphorylation of TGF-beta receptor complexes. *EMBO J* **13**: 5581-5589.
- VEREB, G., J. SZOLLOSI, J. MATKO, P. NAGY, T. FARKAS *et al.*, 2003 Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8053-8058.
- VERSCHUEREN, K., N. DEWULF, M. J. GOUMANS, O. LONNOY, A. FEIJEN *et al.*, 1995 Expression of type I and type IB receptors for activin in midgestation mouse embryos suggests distinct functions in organogenesis. *Mech Dev* **52**: 109-123.
- VON BUBNOFF, A., and K. W. CHO, 2001 Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol* **239**: 1-14.
- VUKICEVIC, S., F. P. LUYTEN and A. H. REDDI, 1989 Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8793-8797.
- WALTER, E. I., W. D. RATNOFF, K. E. LONG, J. W. KAZURA and M. E. MEDOF, 1992 Effect of glycoinositolphospholipid anchor lipid groups on functional properties of decay-accelerating factor protein in cells. *J Biol Chem* **267**: 1245-1252.
- WATANABE, M., N. MASUYAMA, M. FUKUDA and E. NISHIDA, 2000 Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep* **1**: 176-182.
- WEBER, D., A. KOTZSCH, J. NICKEL, S. HARTH, A. SEHER *et al.*, 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.
- WEGHUBER, J., S. SUNZENAUER, M. BRAMESHUBER, B. PLOCHBERGER, C. HESCH *et al.*, 2010 in-vivo detection of protein-protein interactions on micro-patterned surfaces. *J Vis Exp*.
- WICKNER, W., and R. SCHEKMAN, 2008 Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 658-664.
- WILKINSON, L., G. KOLLE, D. WEN, M. PIPER, J. SCOTT *et al.*, 2003 CRIM1 regulates the rate of processing and delivery of bone morphogenetic proteins to the cell surface. *J Biol Chem* **278**: 34181-34188.
- WILSCHUT, J., N. DUZGUNES, D. HOEKSTRA and D. PAPAHAJIOPOULOS, 1985 Modulation of membrane fusion by membrane fluidity: temperature dependence of divalent cation induced fusion of phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry* **24**: 8-14.
- WINKLER, D. G., C. YU, J. C. GEOGHEGAN, E. W. OJALA, J. E. SKONIER *et al.*, 2004 Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem* **279**: 36293-36298.
- WOZNEY, J. M., V. ROSEN, A. J. CELESTE, L. M. MITSOCK, M. J. WHITTERS *et al.*, 1988 Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**: 1528-1534.
- WRANA, J. L., L. ATTISANO, J. CARCAMO, A. ZENTELLA, J. DOODY *et al.*, 1992 TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**: 1003-1014.
- WRANA, J. L., L. ATTISANO, R. WIESER, F. VENTURA and J. MASSAGUE, 1994 Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**: 341-347.
- WU, P., and L. BRAND, 1997 N-terminal modification of proteins for fluorescence measurements. *Methods Enzymol* **278**: 321-330.

- WU, Y. W., L. K. OESTERLIN, K. T. TAN, H. WALDMANN, K. ALEXANDROV *et al.*, 2010 Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes. *Nat Chem Biol*.
- WUNNENBERG-STAPLETON, K., I. L. BLITZ, C. HASHIMOTO and K. W. CHO, 1999 Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development* **126**: 5339-5351.
- XIAO, Z., N. WATSON, C. RODRIGUEZ and H. F. LODISH, 2001 Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J Biol Chem* **276**: 39404-39410.
- XU, M. Q., D. G. COMB, H. PAULUS, C. J. NOREN, Y. SHAO *et al.*, 1994 Protein splicing: an analysis of the branched intermediate and its resolution by succinimide formation. *EMBO J* **13**: 5517-5522.
- XUE, J., N. SHAO and Z. GUO, 2003 First total synthesis of a GPI-anchored peptide. *J Org Chem* **68**: 4020-4029.
- YE, S., C. KOHRER, T. HUBER, M. KAZMI, P. SACHDEV *et al.*, 2008 Site-specific incorporation of keto amino acids into functional G protein-coupled receptors using unnatural amino acid mutagenesis. *J Biol Chem* **283**: 1525-1533.
- YIN, H., L. C. YE, A. P. HINCK and J. C. LEE, 2008 Characterization of ligand-binding properties of the human BMP type II receptor extracellular domain. *J Mol Biol* **378**: 191-203.
- YOON, B. S., D. A. OVCHINNIKOV, I. YOSHII, Y. MISHINA, R. R. BEHRINGER *et al.*, 2005 *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5062-5067.
- ZHANG, Y., D. B. MOHEBAN, B. R. CONWAY, A. BHATTACHARYYA and R. A. SEGAL, 2000 Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* **20**: 5671-5678.
- ZHU, H., P. KAVSAK, S. ABDOLLAH, J. L. WRANA and G. H. THOMSEN, 1999 A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**: 687-693.
- ZHUKOVSKY, M. A., E. LEIKINA, I. MARKOVIC, A. L. BAILEY and L. V. CHERNOMORDIK, 2006 Heterogeneity of early intermediates in cell-liposome fusion mediated by influenza hemagglutinin. *Biophys J* **91**: 3349-3358.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Jannes Ulbrich

Geboren in Bad-Cannstatt am 26.10.1979

Verheiratet mit Katrin Ulbrich geborene Hacker

Ausbildung

7/2009-7/2011

Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Daniel J. Murphy am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Martin Eilers.

11/2005 – 3/2009

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Lehrstuhl für Physiologische Chemie II im Zuge der Promotionsarbeit.

Thema der Dissertation: Integrierung und biochemische Charakterisierung ektooper BMP Rezeptoren in Zellmembranen

10/2000 - 11/2005 Universität Würzburg Diplom (Biologie)

Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie

Nebenfächer: Neurobiologie und Physiologische Chemie

Thema der Diplomarbeit: Der nukleoläre Transkriptionsfaktor Taf₆₈: Eine molekularbiologische und biochemische Charakterisierung

Abschlussnote: sehr gut

09/1991 - 07/1999

Gymnasium Ditzingen in der Glemsaue: Abitur

Zusätzliche Aktivitäten

08/1999 - 07/2000 Zivildienst

Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung für das „Deutsche Rote Kreuz“.

Publikationen

Hacker, C., Maier, E., Ulbrich, J., Scheer, U., Benz, R. and Dabauvalle, M.-C. (2010).
Illuminating the role of the major vault protein (MVP) during nuclear pore complex
assembly. *J. Cell Sci.* (in preparation)

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig 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, den 23. August 2010

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Walter Sebald, der es mir ermöglichte, diese Arbeit anzufertigen. Seine ständige Bereitschaft, anfallende Probleme zu diskutieren und die daraus resultierenden Lösungsvorschläge waren mir stets eine große Hilfe. Zudem gelang es Herrn Sebald, meine teils recht „konfusen“ Gedankengänge in geordnete Bahnen zu lenken. Darüber hinaus war seine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten auch abseits der am Lehrstuhl behandelten Themengebiete eine große Motivation. Vielen Dank dafür!

Herrn Prof. Roland Benz danke ich sehr herzlich für die Betreuung der Arbeit als Gutachter der Fakultät für Biologie.

Bei Herrn Prof. Jacob Piehler möchte ich mich hiermit für die zur Verfügung gestellten Chelatlipide und die Hilfe bedanken.

Bei Frau Prof. Marie-Christine Dabauvalle möchte ich mich dafür bedanken, Ihr Fluoreszenzmikroskop verwendet haben zu dürfen. Nochmals Entschuldigung für das Immersionsöl....

Dr. Joachim Nickel möchte ich danken für die vielen Diskussionen, seine Anregungen, verschiedene Probleme aus einer anderen Sicht zu betrachten, seine Hilfe sowohl in – als auch außerhalb des Labors, die freundlichen Gespräche und seinen Fahrservice. Danke!

Bei Herrn Dr. Werner Schmitz möchte ich mich für die Durchführung verschiedener massenspektrometrischer Messungen bedanken und für die Hilfe bei all den bürokratischen Unwegsamkeiten.

Bei allen, die sich mit mir während meiner Zeit am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II den Denkraum teilten, möchte ich mich für die tolle Atmosphäre bedanken- hier gabs immer was zu lachen, auch wenns mal nicht so lief.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Christian Söder bedanken, der sich immer wieder die Zeit nahm, mir verschiedene Methoden zu erklären und wissenschaftliche Probleme zu diskutieren. Darüber hinaus ist er ein guter Freund von mir geworden, mit dem

das Arbeiten und auch das Nicht-Arbeiten immer sehr witzig und unterhaltsam war. Danke!!!!!! „Gebt mir mein Gesicht zurück!!“ (Rorschach, 198x)

Bei Herrn (hoffentlich bald Dr.) Stefan Harth möchte ich mich als Freund und Kollege ebenfalls für die Hilfe an der Uni und all das nicht-universitäre Miteinander bedanken. 10 Jahre an der Forschungsfront in Würzburg, zusammen angefangen zu studieren...- war immer sehr lustig mit Ihnen Herr Harth!!! Alles Gute in Japan!!!

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern des Lehrstuhls PCII für das tolle Arbeitsklima und die nette Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Christian Hacker möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit bedanken. Darüber hinaus: ENTSCULDIGUNG!!!! Mit der kleinen Schwester von einem Kumpel was anfangen....macht man(n) nicht! Und dann auch noch heiraten!!! Tststs..... Auf ein Wort: JEEEEEEAAAAAH!!!

Ein großes Dankeschön auch allen anderen Freunden!!! Mit Euch wars hier in Würzburg während der vergangenen 10 Jahre immer richtig witzig!!!! Nur meine Leber mag Euch nicht.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken. Während meines gesamten Studiums habt Ihr mich unterstützt und mir Rückhalt gegeben. Am meisten möchte ich hier meiner Frau Katrin danken, die mich während meiner Doktorandenzeit immer wieder aufgebaut hat und die vergangenen Jahre zu den schönsten meines Lebens hat werden lassen! Danke, ich liebe Dich!!!