

BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE



**EINFLUSS DES COREZEPTORS
REPULSIVE GUIDANCE MOLECULE B (RGMB)
AUF DEN SIGNALWEG DER KNOCHENWACHSTUMSFAKTOREN**

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

VORGELEGT VON

TINA VERENA HELLMANN

GEBOREN IN ANKUM

WÜRZBURG 2013

EINGEREICHT AM:

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION:

VORSITZENDER: PROF. DR. WOLFGANG RÖSSLER

1. GUTACHTER: PROF. DR. THOMAS D. MÜLLER

2. GUTACHTERIN: PROF. DR. HEIKE WALLES

TAG DES PROMOTIONSKOLLOQUIUMS:

DOKTORURKUNDE AUSGEHÄNDIGT AM:

„Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts. Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.“

Teilhard de Chardin (1881-1955)

Meinen Eltern

ZUSAMMENFASSUNG

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bilden die größte Untergruppe der *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) Superfamilie sekretierter Wachstumsfaktoren. Sie haben vielfache Schlüsselfunktionen während der frühen Embryogenese inne und regulieren darüber hinaus wichtige Prozesse in der Entwicklung sowie der Homöostase zahlreicher Organe und Gewebe. BMPs vermitteln ihre Signale über zwei Typen transmembranärer Serin-/Threoninkinaserzeptoren, die als Typ I und Typ II Rezeptoren bezeichnet werden. Den etwa zwanzig BMP-Liganden stehen dabei nach aktuellem Kenntnisstand nur fünf Typ I und drei Typ II Rezeptorkinasen gegenüber, wodurch sich insbesondere die BMP-Familie durch eine hohe Promiskuität der Ligand-Rezeptor-Interaktion auszeichnet. Damit dennoch bei zeitlich und räumlich überlappender Expression verschiedener Wachstumsfaktoren spezifische Signale vermittelt werden können, müssen die Signaleigenschaften dieser Faktoren komplex reguliert werden. Die Mehrzahl der Regulationsmechanismen beeinflusst die Signaltransduktion negativ. Kürzlich wurden jedoch die ersten, spezifisch auf die BMP-Familie wirkenden membranassoziierten Agonisten beschrieben – die Corezeptoren der *Repulsive Guidance Molecule* (RGM) Familie bestehend aus RGMa, RGMb und RGMc. Für das Familienmitglied RGMb werden neben pro-BMP-Prozessen allerdings auch hemmende Wirkungen auf die BMP-abhängige Signaltransduktion diskutiert.

Um diese teils widersprüchlichen Funktionen näher zu beleuchten, wurde RGMb im Rahmen dieser Arbeit umfangreich biochemisch und biophysikalisch charakterisiert. Zunächst konnte erfolgreich ein Verfahren zur Herstellung und Isolierung von hochreinem rekombinanten RGMb Corezeptorprotein aus Insektenzellkultur etabliert werden. Dies ermöglichte die Entwicklung umfangreicher *in vitro* Interaktionsstudien mit verschiedenen Liganden sowie Rezeptor-ektodomänen der TGF- β Superfamilie basierend auf dem Verfahren der Oberflächen-Plasmonresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR). Dadurch konnte gezeigt werden, dass RGMb spezifisch und hochaffin mit Wachstumsfaktoren der BMP-Familie, nicht aber mit Vertretern anderer Untergruppen der TGF- β Superfamilie wechselwirkt. Im Widerspruch zu Literaturdaten konnten darüber hinaus mit Hilfe von Bindungsstudien keine direkten Interaktionen zwischen RGMb und den analysierten Typ I und Typ II Rezeptor-ektodomänen nachgewiesen werden. Zellbasierte Kompetitionsanalysen ergaben, dass der lösliche, nicht über einen Glykosylphosphatidylinositolrest verankerte RGMb Corezeptor BMP-induzierte Signale dosisabhängig inhibiert. Ein komplexeres Bild zeigte die Charakterisierung der Beeinflussung BMP-abhängiger Signaltransduktionen durch membranständiges RGMb. So konnten im Vergleich zu Kontrollzellen nur geringfügige Unterschiede in der zellulären Antwort

nachgewiesen werden. Diese deuten möglicherweise, wie auch in der Literatur beschrieben, auf eine Verstärkung des BMP-Signals durch eine Erniedrigung der halbmaximalen Ligandenkonzentration hin. Mittels Oberflächen-Plasmonresonanz konnte im Rahmen von Coinjektionsstudien außerdem beobachtet werden, dass RGMB die Bindung der untersuchten BMP-Liganden an die Typ I Rezeptorektodomänen hemmt. Daraus kann geschlossen werden, dass RGMB an das Typ I Rezeptorbindeepitop der BMP-Liganden bindet und dadurch deren Signalaktivität neutralisiert. Eine Charakterisierung der Interaktion unter Verwendung verschiedener BMP-Mutanten ergab, dass hierfür im Vergleich zur Typ I Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung andere Hauptbindeterminanten verantwortlich zeichnen. Ein abweichendes Bild zeigt sich für die Beeinflussung der BMP/Typ II Rezeptorinteraktion durch RGMB. So wurde im Rahmen von SPR-basierten Coinjektionsstudien beobachtet, dass BMP-Liganden in Gegenwart des Corezeptors RGMB ausschließlich mit der Ektodomäne des Typ II Rezeptors ActR-IIB, nicht aber mit den Rezeptoren ActR-II oder BMPRII interagieren können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwar der Kernbereich des Typ II Rezeptorepitops durch die Interaktion des Liganden mit RGMB unbeeinflusst bleibt, jedoch eine partielle periphere Überlagerung bei gleichzeitiger Bindung von RGMB und den Typ II Rezeptoren für die Ausbildung der beobachteten Selektivität verantwortlich sein muss. Um diese Wechselwirkungen auch auf zellulärer Ebene analysieren zu können, wurden darüber hinaus fluoreszenzbasierte Fusionskonstrukte, basierend auf der SNAP- und CLIP-tag® Technologie, für BMP-Rezeptoren sowie für RGMB synthetisiert und zudem ein funktionelles Färbeprotokoll für die konfokale Mikroskopie etabliert.

Die biochemischen Analysen sowie die in dieser Arbeit präsentierten umfassenden Charakterisierungen der Corezeptorinteraktionen mit einer Vielzahl an BMP-Liganden sowie deren Rezeptoren grenzen das RGMB-Bindeepitop ein und bilden so einen idealen Ausgangspunkt für die genaue Identifizierung und Charakterisierung dieses Epitops mittels gerichteter Mutagenese. Darüber hinaus weisen die vorliegenden in vitro Bindungsstudien auf einen deutlich komplexeren als bisher in der Literatur angenommenen, möglicherweise völlig neuartigen Modulationsmechanismus des BMP-Signalweges durch den Corezeptor RGMB hin. So wird in Anwesenheit von RGMB die Typ II Rezeptorspezifität und vermutlich auch die Lokalisierung der BMP-Liganden in bestimmten Membrankompartimenten - etwa *Lipid Rafts* - selektiv reguliert, wodurch BMP-induzierte Signale fein moduliert werden könnten. Die in dieser Arbeit synthetisierten fluoreszenzbasierten SNAP- und CLIP-Tag®-Fusionskonstrukte stellen zudem zusammen mit den etablierten Protokollen zur konfokalen Mikroskopie effektive Werkzeuge für eine zukünftige detaillierte Aufklärung (z. B. durch FRET-Studien) der komplexen RGMB-abhängigen Regulation des BMP-Signalweges auf zellulärer Ebene dar.

SUMMARY

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) comprise the largest subgroup of the Transforming Growth Factor- β (TGF- β) superfamily of secreted growth factors. They are key regulators of early embryogenesis and orchestrate the development as well as the homeostasis of several tissues and organs in adult organisms. BMPs transduce their signals through two types of transmembrane serine/threonine kinase receptors termed type I and type II receptors. An imbalance in BMP-ligand and receptor numbers - about twenty different BMP-ligands face only five type I and three type II receptors - causes a pronounced promiscuity in ligand/receptor interactions. Therefore, a complex regulatory network is necessary to enable specific signaling of each BMP ligand despite a temporospatial expression overlap. Most of the discovered regulatory processes inhibit BMP-signal transduction. Recently, the first membrane-associated BMP-specific agonists - the Repulsive Guidance Molecule (RGM) family of coreceptors comprised of RGMa, RGMb and RGMc - have been discovered. Aside from stimulatory effects, evidence for a potential inhibitory activity of the RGM family member RGMb on BMP-induced signal transduction has previously been described.

To clarify these contradictory RGMb functions, extensive biochemical and biophysical characterizations were carried out. In the course of this work, an efficient expression and purification strategy was established resulting in great yields of highly pure recombinant RGMb coreceptor protein. Subsequent *in vitro* binding assays based on surface plasmon resonance (SPR) showed that RGMb specifically interacts with BMP ligands, while no binding to other subfamily members could be detected. Contradicting published data, no direct interactions of the RGMb coreceptor with type I and type II receptor ectodomains were determined. Furthermore, cell-based competition assays revealed that soluble RGMb protein lacking the glycosylphosphatidylinositol anchor dose-dependently inhibits BMP-induced signal transduction. Characterizing the influence of the membrane anchored RGMb coreceptor on BMP signaling pointed to a more complex situation. Hence, only minor deviations of the BMP-dependent signal transduction in RGMb-transfected compared to control cells could be detected. These differences could possibly indicate a sensitizing activity of the RGMb coreceptor on BMP-signaling as it has been described before. SPR-based co-injection experiments revealed that BMP ligands bound to RGMb lose their ability to interact with type I receptor ectodomains. Thus, the coreceptor blocks the type I receptor binding epitope, thereby neutralizing the signaling activity of BMP ligands. However, comparative experiments using BMP variants pointed out that the coreceptor/ligand interface involves other binding hot spot residues than the type I

receptor/ligand interaction. Analyzing the influence of RGMb on the BMP/type II receptor interaction based on SPR measurements led to a different outcome: In the presence of the RGMb coreceptor, BMP ligands were solely able to interact with the extracellular domain of the type II receptor ActR-IIB, while no binding could be detected with neither ActR-II nor BMPRII ectodomains. Hence, binding of the coreceptor does not directly interfere with the BMP ligand/type II receptor core interface, whereas a partial peripheral overlap of RGMb with the type II receptor epitope may evoke the observed selectivity for ActR-IIB. In order to clarify the observed interactions in the cellular context, RGMb and BMP receptor fusion constructs based on the SNAP-/CLIP-tag[®] technology as well as efficient labeling protocols and confocal microscopic procedures were established.

The biochemical characterization of RGMb along with the extensive interaction studies of this coreceptor with a multiplicity of BMP-ligands and their receptors presented in this work, narrow down the location of the RGMb binding epitope, thus providing an ideal starting point for the subsequent determination of the coreceptor binding domain by site directed mutagenesis. Moreover, the presented *in vitro* binding studies point to a more complex and possibly novel regulatory mechanism of the BMP signal transduction by RGMb than previously assumed. Thus, the presence of the coreceptor selectively regulates the type II receptor specificity and potentially also the recruitment of BMP-ligands into certain membrane compartments (e.g. lipid raft-domains), herewith fine-tuning BMP-induced signals. The SNAP- and CLIP-tag[®] fusion constructs produced in this work together with the established protocols for confocal microscopy analyses provide efficient tools for subsequent extensive examinations of these regulatory processes in living cells (e.g. by FRET measurements).

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1. EINLEITUNG	13
1.1. DAS MENSCHLICHE SKELETT – EIN DYNAMISCHES GEWEBE	13
1.2. DIE KNOCHENWACHSTUMSFAKTOREN – AUFBAU UND BIOLOGISCHE FUNKTIONEN	20
1.3. DIE REZEPTOREN DER TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-SUPERFAMILIE	26
1.4. SIGNALTRANSDUKTION UND REGULATION DER KNOCHENWACHSTUMSFAKTOREN	29
1.5. DIE COREZEPTOREN DER REPULSIVE GUIDANCE MOLECULE-FAMILIE	37
1.6. ZIELE DER ARBEIT	43
2. MATERIAL UND METHODEN	45
2.1. MATERIALIEN	45
2.1.1. CHEMIKALIEN	45
2.1.2. KITS	45
2.1.3. ANTIBIOTIKA	46
2.1.4. ENZYME UND PUFFER	46
2.1.5. ANTIKÖRPER	46
2.1.6. WACHSTUMSFAKTOREN UND REZEPTOREKTODOMÄNEN	47
2.1.7. LABORGERÄTE	47
2.1.8. BAKTERIENSTÄMME	48
2.1.9. KULTURMEDIEN	49
2.1.10. STANDARD-PUFFERLÖSUNGEN	49
2.1.11. KONSTRUKTE FÜR PROKARYOTISCHE EXPRESSIONEN	51
2.1.12. VEKTOREN FÜR EUKARYOTISCHE EXPRESSIONEN	52
2.1.13. OLIGONUKLEOTIDE	52
2.1.14. EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	53

2.2.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	54
2.2.1.	STERILES ARBEITEN	54
2.2.2.	QUANTIFIZIERUNG VON DNA BZW. RNA.....	54
2.2.3.	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	54
2.2.4.	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	55
2.2.5.	KLONIERUNG DER PCR-FRAGMENTE IN EINEN KLONIERVEKTOR	55
2.2.6.	RESTRIKTIONSANALYSE	56
2.2.7.	LIGATIONSREAKTION	56
2.2.8.	TRANSFORMATION.....	57
2.2.9.	KOLONIE-PCR.....	58
2.2.10.	ANALYTISCHE RESTRIKTIONSANALYSE	59
2.2.11.	PLASMID-DNA-ISOLIERUNG	59
2.2.12.	KONSTRUKTE FÜR DIE PROTEINEXPRESSION IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	59
2.3.	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> BAKTERIEN.....	61
2.4.	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN INSEKTENZELLKULTUR.....	62
2.4.1.	KULTURHALTUNG VON SF9-, TRIEX™- UND HIGHFIVE™-ZELLEN.....	62
2.4.2.	VITALITÄTSFÄRBUNG UND ZELLZAHLBESTIMMUNG	63
2.4.3.	CO-TRANSFEKTION DER SF-9 ZELLEN MIT DEM BACVECTOR™-3000 DNA-SYSTEM	63
2.4.4.	PLAQUE-ASSAY.....	64
2.4.5.	VIRUSAMPLIFIKATION	65
2.4.6.	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN TRIEX™- ODER HIGHFIVE™- SUSPENSIONSZELLKULTUREN.....	66
2.5.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	67
2.5.1.	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	67
2.5.2.	FÄRBUNG VON PROTEINGELEN.....	68
2.5.3.	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN	69
2.5.4.	WESTERN BLOT	70
2.6.	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON REKOMBINANTEN BMP-LIGANDEN AUS <i>E. COLI</i> ZELLEN.....	71
2.7.	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON REKOMBINANTEN BMP-REZEPTOREN AUS <i>E. COLI</i> ZELLEN	72

2.8.	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON BMP REZEPTOREN AUS INSEKTENZELLKULTURÜBERSTAND (ACTR-II/BMPRII).....	72
2.8.1.	METALLAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.....	72
2.8.2.	UMKEHRPHASE-HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE.....	73
2.9.	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON RGMb AUS INSEKTENZELLKULTURÜBERSTAND	74
2.9.1.	METALLAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.....	74
2.9.2.	ANIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE.....	74
2.9.3.	UMKEHRPHASE-HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE.....	75
2.10.	BIOTINYLIERUNG VON PROTEINEN	75
2.11.	OBERFLÄCHEN-PLASMONRESONANZ ANALYSE	76
2.12.	ZIRKULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE	78
2.13.	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSEN	79
2.13.1.	ELEKTROSPRAY-IONISATION-(ESI)- FOURIERTRANSFORMATION-IONEN-ZYKLOTRONRESONANZ-(FTICR)-MASSENSPEKTROMETRIE	81
2.13.2.	MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION (MALDI) MASSENSPEKTROMETRIE	81
2.14.	PROTEINKRISTALLISATION.....	81
2.15.	METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER STÖCHIOMETRIE DER KOMPLEXBILDUNG	82
2.15.1.	ANALYTISCHE GELFILTRATION.....	82
2.15.2.	AUFTRENNUNG DES PROTEINKOMPLEXES MITTELS UMKEHRPHASE-HPLC.....	83
2.16.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	86
2.16.1.	KULTIVIERUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLINIEN	86
2.16.2.	ALKALISCHE PHOSPHATASE-NACHWEISVERFAHREN MIT LÖSLICHEM RGMb.....	86
2.16.3.	LUCIFERASE-REPORTERGEN-NACHWEISVERFAHREN MIT LÖSLICHEM RGMb.....	87
2.16.4.	LUCIFERASE-REPORTERGEN-NACHWEISVERFAHREN MIT MEMBRANSTÄNDIGEM RGMb.....	88
2.17.	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	90
2.18.	FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE METHODEN	91
2.18.1.	BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSCHEN	91
2.18.2.	FÄRBUNG DER SNAP- UND CLIP-ENZYM-FUSIONS-PROTEINE.....	91
2.18.3.	KONFOKALE MIKROSKOPIE	92

3.	ERGEBNISSE	95
3.1.	EXPRESSION UND REINIGUNG REKOMBINANTER HUMANER RGMB PROTEINE AUS INSEKTENZELLKULTUR.....	95
3.1.1.	REKOMBINANTE HERSTELLUNG VON HUMANEM RGMB.....	95
3.1.2.	CHARAKTERISIERUNG DER RGMB-CYSTEIN-DELETIONSMUTANTE RGMB _{ΔNcys}	103
3.2.	STRUKTUR- UND FUNKTIONSANALYSEN VON HUMANEM RGMB PROTEIN.....	114
3.2.1.	SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE UND UNTERSUCHUNG DER FALTUNGSSTABILITÄT VON REKOMBINANTEM RGMB	114
3.2.2.	INTERAKTIONSANALYSEN VON RGMB MIT LIGANDEN DER TGF-β SUPERFAMILIE.....	115
3.2.3.	INTERAKTIONEN VON RGMB MIT MODULATOREN DER TGF-β SUPERFAMILIE	121
3.2.4.	INTERAKTIONEN VON RGMB MIT REZEPTOREN DER TGF-β SUPERFAMILIE	123
3.3.	FUNKTIONELLE ANALYSEN DER RGMB SIGNALMECHANISMEN IN ZELLEN	127
3.3.1.	MODULATION DES BMP-SIGNALWEGES DURCH LÖSLICHES RGMB PROTEIN IN ZELLEN	127
3.3.2.	EINFLUSS DER GLYKOSYLIERUNG AUF DIE AKTIVITÄT VON RGMB	136
3.3.3.	UNTERSCHIEDE IN DER WIRKUNG VON MEMBRANSTÄNDIGEM UND LÖSLICHEM RGMB AUF DEN BMP-SIGNALWEG	141
3.4.	RGMB ALS TEIL HÖHERMOLEKULARER SIGNALKOMPLEXE.....	149
3.4.1.	UNTERSUCHUNGEN ZUR COLOKALISATION DES RGMB-COREZEPTORS UND BMP-REZEPTOREN.....	149
3.4.2.	BILDUNG DER BMP-LIGAND/REZEPTOR KOMPLEXE IN GEGENWART DES BMP COREZEPTORS RGMB.....	158
3.4.3.	DER COREZEPTOR RGMB SOWIE DIE BMP TYP I UND TYP II REZEPTOREN NUTZEN UNTERSCHIEDLICHE HAUPTBINDEDETERMINANTEN DES BMP-2 LIGANDEN.....	172
4.	DISKUSSION.....	175
4.1.	DIE BMP-SPEZIFISCHEN COREZEPTOREN DER RGM-FAMILIE	179
4.1.1.	RGMB INTERAGIERT SELEKTIV MIT BMP-, NICHT ABER MIT TGF-β LIGANDEN	180
4.2.	ANALYSE DER ZUGRUNDELIEGENDEN MOLEKULAREN MECHANISMEN DER BEEINFLUSSUNG DES BMP-SIGNALWEGES DURCH RGMB.....	184
4.2.1.	RGMB ZEIGT IN VITRO KEINE DIREKTEN INTERAKTIONEN MIT DEN EKTODOMÄNEN DER BMP TYP I UND TYP II REZEPTOREN	184

4.2.2.	DIE KOMPLEXBILDUNG VON RGMb MIT BMP-LIGANDEN INHIBIERT DEREN INTERAKTION MIT TYP I REZEPTOREN UND VERMITTELT EINE SELEKTIVITÄT GEGENÜBER DER TYP II REZEPTORWAHL .	186
4.3.	INTERAKTIONSMECHANISMEN VON RGMb MIT DEM SIGNALWEG DER KNOCHENWACHSTUMSFAKTOREN.....	188
4.4.	STRUKTURELLE ANALYSEN LIEFERN HINWEISE AUF MÖGLICHE MOLEKULARE MECHANISMEN DER TYP II REZEPTORSELEKTIVITÄT.....	195
4.5.	AUSBlick	207
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	209
6.	ANHANG	234
6.1.	DNA- SOWIE AMINOSÄURESEQUENZEN DER EXPRESSIONSKONSTRUKTE	234
	PUBLIKATIONEN	247
	DANKSAGUNG	249
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	251

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

m/v	Massenprozent (Masse in g pro 100 ml Lösung)
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
v/v	Volumenprozent (Volumen in ml pro 100 ml Lösung)
Abs _x	Absorption bei x nm
AcOH	Essigsäure
ACN	Acetonitril
Au	<i>Arbitrary units</i> (willkürliche Einheit)
AuC	<i>Area under Curve</i> (Fläche unterhalb der Kurve)
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (N=A, C, G, T)
DTT	Dithiotreitol
ECD	extrazelluläre Domäne (<i>Extracellular Domain</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	<i>hour</i> (Stunde)
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
kb	kilo-Basen
kV	kilo-Volt
λ	Wellenlänge in nm
l	Liter
μ	mikro
μl	Mikroliter
M	molar

MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> , Infektionspotenz einer Virensuspension
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
n	nano
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD _x	optische Dicht bei x nm gemessen
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pfu	<i>plaque forming unit</i>
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SFM	<i>Serum-Free Medium</i> (an Serum-freies Medium adaptiert)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Enzymaktivität [μmol bzw. μg/min])
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1. EINLEITUNG

1.1. DAS MENSCHLICHE SKELETT – EIN DYNAMISCHES GEWEBE

Das Skelett trägt entscheidend zum evolutionären Erfolg der Vertebraten bei und entwickelte sich aus einer ungegliederten *Chorda dorsalis* zu einem effizienten, hochkomplexen Endoskelett mit einer gegliederten Wirbelsäule, welche dem Axialskelett eine verbesserte Formstabilität und den Wirbeltieren Gestalt verleiht (für aktuelle Buchartikel siehe: (Hildebrand, M. und Goslow, G. 2003; Rieger, G. und Westheide, W. 2009)). Das menschliche Skelett besteht aus über 200 Knochen (für eine Übersicht siehe: (Gray, H. 2000)), wobei jeder einzelne an einem definierten Ort entsteht, mit anderen Knochen über Gelenke, Sehnen und Bänder verbunden wird und zu einer spezifischen Komposition aus Größe und Form heran wächst. Diese komplexe Konstruktion übernimmt zahlreiche wichtige Funktionen: So dient das Skelett der Insertion der Skelettmuskulatur und ermöglicht dadurch die Lokomotion, es beherbergt den Ort der Hämatopoese, schützt die inneren Organe vor äußeren, mechanischen Einwirkungen, dient als Speicher für Calcium und Phosphat und ermöglicht so deren Homöostase (für Buchartikel siehe: (Steele, D.G. und Bramblett, C.A. 1988; Martini, F.H. et al. 2012)).

Grundlagen der Knochenbiogenese

Entgegen seines unbelebten, statischen äußeren Erscheinungsbildes ist Knochen ein dynamisches, stoffwechselaktives Gewebe und obliegt während der gesamten Lebensspanne stetem Umbau – ein Prozess, der als Knochenumwandlung bezeichnet wird (für Übersichtsartikel (Henriksen, K. et al. 2009; Raggatt, L.J. und Partridge, N.C. 2010; Kular, J. et al. 2012)). Diese Umgestaltungsprozesse regulieren die Aufrechterhaltung der Knochenstruktur- und -funktion im adulten Organismus und zeichnen sich durch ein komplex reguliertes Zusammenspiel aus Knochen-aufbauenden und -abbauenden Prozessen aus (für Übersichtsartikel: (Henriksen, K. et al. 2009; Raggatt, L.J. und Partridge, N.C. 2010; Kular, J. et al. 2012)). Spezialisierte Zellen, die sogenannten Osteoblasten, sezernieren die kalzifizierenden Substanzen der extrazellulären Matrix und fügen somit neue Knochensubstanz hinzu (als Übersichtsartikel: (Ducy, P. et al. 2000)), während der Matrix-resorbierende Zelltyp der Osteoklasten Knochengewebe abträgt (für Übersichtsartikel: (Ducy, P. et al. 2000; Boyle, W.J. et al. 2003)). Osteoblasten gehen aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen hervor (Grigoriadis, A.E. et al. 1988; Pittenger, M.F. et al. 1999), welche auch den Ausgangspunkt für die Differenzierung zu Chondrozyten, Adipozyten sowie Myoblasten darstellen, wohingegen die

Osteoklasten dem hematopoetischen System entstammen (Ash, P. et al. 1980). Ein Teil der Osteoblasten differenziert zu Osteozyten, welche in Osteoid, die noch nicht mineralisierte organische Knochenmatrix, eingebettet werden und eine dendritische Morphologie ausbilden. Mittels dieser dendritischen Fortsätze bilden die Osteozyten über sogenannte *Gap-junction* Zell-Zell-Kontakte zu Knochenoberflächen lokalisierten Osteoblasten und Osteoklasten sowie zu bereits vollständig eingebetteten Osteozyten aus (als Übersichtsartikel (Bonewald, L.F. 2005)). Im Gegensatz zu einer lange angenommenen passiven Rolle in der Knochenhomöostase zeigen neuere Studien zahlreiche wichtige Funktionen der Osteozyten auf, so dienen sie unter anderem als Koordinatoren des Knochenumbaus durch Regulation der Osteoblasten- sowie der Osteoklasten-Aktivität und können zudem auch als endokrine Zellen fungieren (für eine Übersicht: (Bonewald, L.F. 2011)).

Der Knochenumbau findet in einer spezifischen multizellulären Einheit (*Basic Multicellular Unit*; BMU; (Frost, H.M. 1969)) bestehend aus Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und den Knochen-bedeckenden Saumzellen statt und verläuft in einem sequentiellen Ablauf, dem sogenannten „Aktivierung-Resorption-Formierung“ (ARF, (Frost, H.M. 1989))-Zyklus (siehe Abbildung 1; für aktuelle Übersichtsartikel: (Henriksen, K. et al. 2009; Raggatt, L.J. und Partridge, N.C. 2010; Kular, J. et al. 2012)). Saumzellen koppeln die Vorgänge der Knochenresorption sowie des Knochenaufbaus miteinander (Everts, V. et al. 2002), indem sie durch Ausbildung einer definierten Hüllschicht eine Kompartimentierung schaffen, unter welcher der Knochenumbau stattfindet (Andersen, T.L. et al. 2009). Osteozyten sekretieren unter basalen Bedingungen den Wachstumsfaktor TGF- β , welcher zusammen mit B-Zell gebildetem Osteoprotegerin (OPG) einer Osteoklastogenese entgegen wirkt (Maejima-Ikeda, A. et al. 1997; Bucay, N. et al. 1998; Heino, T.J. et al. 2002). Die Osteoklastogenese wird durch mechanische oder hormonelle Signale ausgelöst: So können beispielsweise Mikrofrakturen in der Knochenmatrix in einer lokalen Apoptose von Osteozyten resultieren (Verborgt, O. et al. 2002). Infolgedessen kommt es zu einer Erniedrigung des TGF- β Spiegels und dadurch zu einer erhöhten Rekrutierung von Osteoklasten (Heino, T.J. et al. 2002). Auch das endokrine Parathyroid-Hormon (PTH) ist ein Schlüsselregulator des Knochenumbaus und wird beispielsweise als Antwort auf eine systemische Erniedrigung des Serum-Calciumlevels sezerniert (für eine Übersicht siehe: (Swarthout, J.T. et al. 2002)). Bindung des Hormons an den PTH-Rezeptor, welcher auf der Osteoblasten-Oberfläche exprimiert wird (Juppner, H. et al. 1991; Abou-Samra, A.B. et al. 1992), löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus und induziert eine transkriptionelle Antwort, die die Osteoklastogenese unterstützt (als Übersichtsartikel siehe: (Swarthout, J.T. et al. 2002)).

Die Phase der PTH gesteuerten Knochenresorption zeichnet sich durch die Rekrutierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen an den Ort des Knochenabbaus aus (für Übersichtsartikel siehe:

(Teitelbaum, S.L. 2000; Boyle, W.J. et al. 2003)). Als Reaktion auf das PTH-Signal wird die Expression des Osteoklastogenese-Inhibitors Osteoprotegerin (OPG) durch die Osteoblasten erniedrigt, während die Sekretion der positiven Regulatoren M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) sowie RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand*) erhöht wird (Ma, Y.L. et al. 2001).

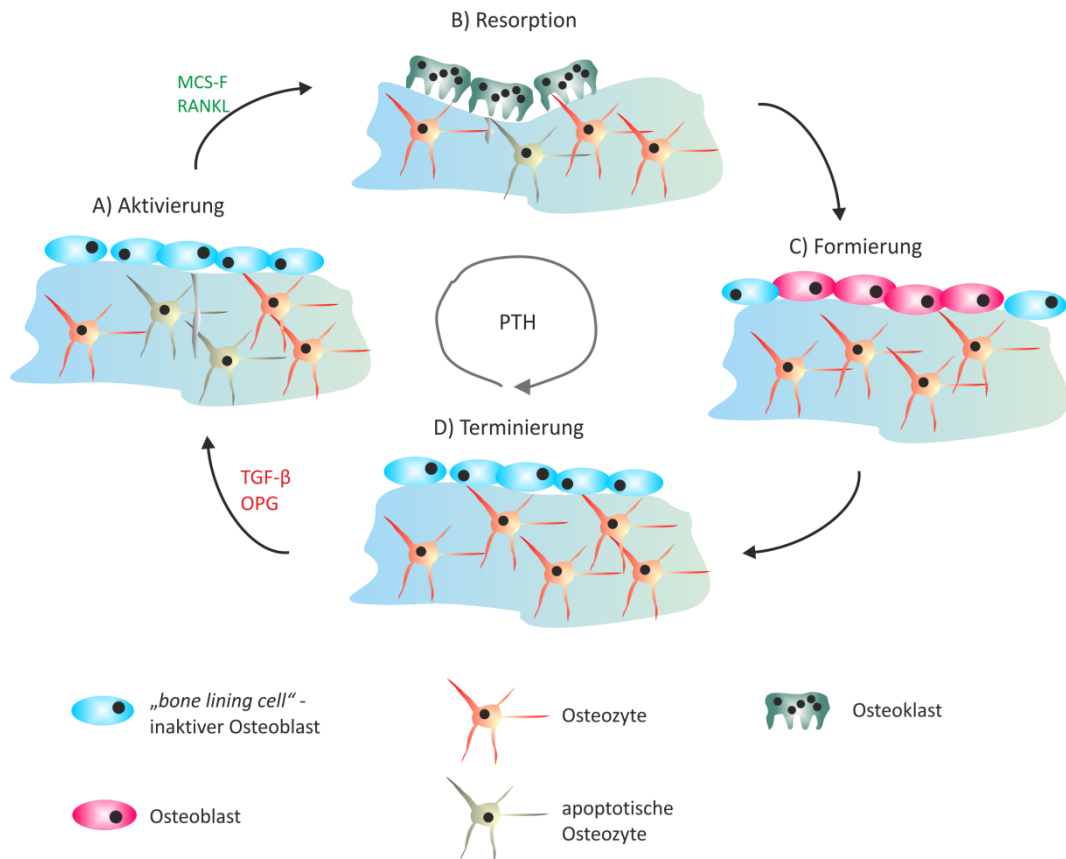


Abbildung 1: Der Zyklus von Aktivierung-Resorption-Formierung des Knochenbaus. A) Mechanische Stimuli durch beispielsweise Knochenmikrofrakturen oder hormonelle Signale als Antwort auf systemische Schwankungen der Calciumkonzentration führen zu einer lokalen Aktivierung der Osteoklastogenese. B) Osteoklasten-Vorläuferzellen werden an den Ort der Knochenresorption rekrutiert und differenzieren durch die von Osteoblasten sekretierten Faktoren M-CSF sowie RANKL zu reifen Osteoklasten. Nach der Verankerung an der Knochenoberfläche mittels Zell-Zell-Verbindungen sezernieren die Osteoklasten Salzsäure sowie Proteasen in den entstandenen Spalt und resorbieren so die kalzifizierte Knochenmatrix sowie Matrixproteine. C) Im Anschluss werden Saumzellen (*bone lining cells*) sowie reife Osteoblasten rekrutiert, welche die Resorption terminieren und den Knochenaufbau initiieren. Die reifen Osteoblasten sezernieren zunächst die Matrixkomponenten des Knochen, welche anschließend durch Einlagerung anorganischen Hydroxylapatits mineralisiert werden. D) Nach der Beendigung des Knochenbaus bzw. unter basalen Bedingungen überziehen Saumzellen die ruhende Knochenoberfläche und Osteozyten sekretieren TGF- β sowie OPG, die einer Osteoklastogenese entgegen wirken (Referenzen siehe Haupttext).

Diese Faktoren regulieren die Proliferation sowie die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläufern zu reifen Osteoklasten (Insogna, K.L. et al. 1997; Burgess, T.L. et al. 1999). Reife Osteoklasten verankern sich über Integrine der $\alpha\beta$ 3-Familie anschließend an der Oberfläche der Knochenmatrix, wodurch eine isolierte Mikroumgebung unterhalb des Osteoklasten gebildet wird (McHugh, K.P. et al. 2000). Die mineralischen Knochenkomponenten werden durch

Sekretion von Salzsäure in den Spalt herausgelöst, während Matrixproteine durch die Sezernierung von Proteasen wie Cathepsin K degradiert werden (Saftig, P. et al. 1998; McHugh, K.P. et al. 2000; Teitelbaum, S.L. 2000). Während der sich anschließenden Umkehrungsphase wird demineralisiertes, unverdautes Kollagen von der Knochenoberfläche entfernt und es werden Saumzellen sowie Osteoblasten rekrutiert (Everts, V. et al. 2002).

Während der Phase der Knochenbildung sorgen mechanische Stimuli sowie eine erhöhte PTH Aktivität für eine verringerte Sekretion von Sclerostin durch Osteozyten, wodurch ein Knochenaufbau durch den Wnt-Signalweg initiiert werden kann (Fermor, B. und Skerry, T.M. 1995; Robling, A.G. et al. 2008). Reife Osteoblasten sekretieren dann die Matrixkomponenten, darunter vor allem Kollagen Typ I, aber auch Proteoglykane, glykosylierte Proteine wie Alkalische Phosphatase sowie Lipide. Die Mineralisierung der neugebildeten Knochensubstanz wird durch Einlagerung des anorganischen Hydroxylapatits ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) erzielt (für Übersichtsartikel: (Ducy, P. et al. 2000; Raggatt, L.J. und Partridge, N.C. 2010)). Wird die fein abgestimmte Balance zwischen Knochen-aufbauenden und -abbauenden Prozessen gestört, resultieren daraus Knochenkrankheiten wie Osteoporose (für eine Übersicht: (Simon, L.S. 2007; Kular, J. et al. 2012)) oder Osteopetrose (Übersichtsartikel: (Balemans, W. et al. 2005; Kular, J. et al. 2012)).

Skeletogenese der Wirbeltiere

Die Entwicklung des Wirbeltierskeletts ist ein mehrstufiger Prozess und beginnt während der frühen embryonalen Organogenese mit der Ausbildung der Knochen- und Knorpel-Vorläuferzellen aus den drei embryonalen Keimblättern (als aktueller Übersichtsartikel: (Lefebvre, V. und Bhattaram, P. 2010)). Neuralleistenzellen, welche dem ektodermalen Gewebe des Neuralrohres entspringen, wandern in zahlreiche Bereiche des Embryos ein und entwickeln sich dort in der Folge zu neuronalen Zellen, Melanozyten oder zu Skelettzellen (für Übersichtsartikel: (Sauka-Spengler, T. und Bronner-Fraser, M. 2008; Iimura, T. et al. 2009; Lefebvre, V. und Bhattaram, P. 2010)). Letztere bilden zahlreiche Elemente des cranio-facialen Skelettsystems. Das Extremitätenskelett, die übrigen Strukturen des Gesichtsskeletts sowie das Brustbein gehen aus Zellen des Seitenplatten-Mesoderms hervor, wobei das Achsenskelett aus den Somiten gebildet wird (Übersichtsartikel: (Lefebvre, V. und Bhattaram, P. 2010)). Anschließend kondensieren die Knochenvorläuferzellen zu charakteristischen Bereichen hoher Zelldichte und differenzieren entweder zu Osteoblasten oder zu Chondrozyten (Knorpelzellen) (für Übersichtsartikel siehe: (Hall, B.K. und Miyake, T. 1992; Hall, B.K. und Miyake, T. 2000)). Ersteres findet in Bereichen des Gesichtsskeletts sowie des Schlüsselbeines statt, wo in der Folge Knochen direkt aus den Mesenchymzellen durch die sogenannte desmale Ossifikation gebildet wird (als Buchartikel siehe: (Gilbert, S.F. 2003)). Alle übrigen Skelettknochen entstehen durch

endochondrale Ossifikation, bei der zunächst durch Chondrogenese ein intermediäres Knorpelgewebe angelegt wird, welches sekundär verknöchert (Buchartikel siehe: (Gilbert, S.F. 2003)). Die Skeletogenese ist ein komplexer Prozess, der ein fein-abgestimmtes Zusammenspiel zahlreicher Faktoren wie Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren benötigt (für Übersichtsartikel siehe: (Hall, B.K. und Miyake, T. 2000; Sauka-Spengler, T. und Bronner-Fraser, M. 2008; Imura, T. et al. 2009; Lefebvre, V. und Bhattaram, P. 2010)). Dies soll exemplarisch anhand der Extremitätenentwicklung sowie der Ausbildung und Segmentierung der Fingerelemente beschrieben werden.

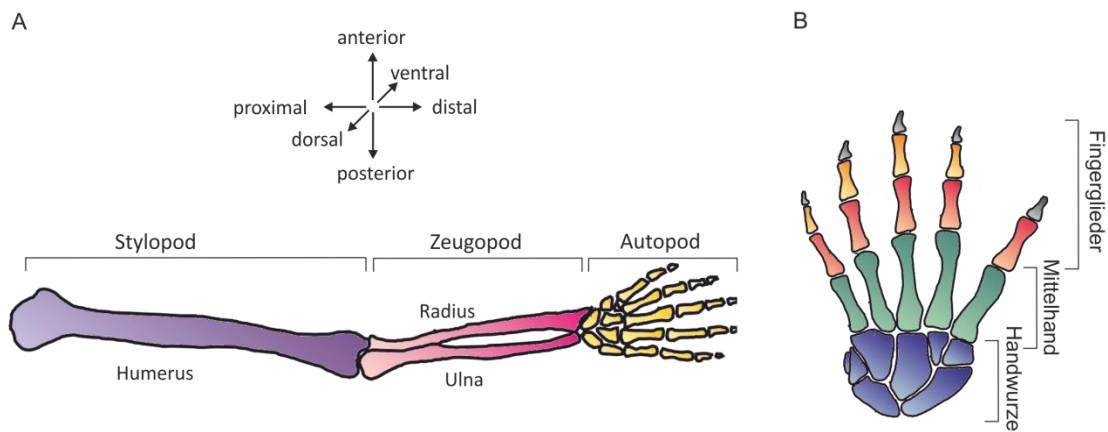


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Knochenelemente der oberen Extremität sowie der Hand (Autopod) des Menschen. A) Entlang der proximo-distalen Achse der Extremität befindet sich der Stylopod am proximalen Ende und bildet den Humerus. Der Zeugopod setzt sich aus Radius und Ulna zusammen. Am distalen Ende bildet der Autopod die knöchernen Elemente der Hand. B) Der Autopod besteht aus den Handwurzel- und den Mittelhandknochen sowie den Fingergliedern und erstreckt sich vom Daumen zum kleinen Finger über die anterior-posteriore Achse. Der Handrücken repräsentiert die dorsale, die Handinnenfläche die ventrale Ebene. Mit der Erlaubnis von InTech verändert nach (Hellmann, T.V. et al. 2012).

Im Anschluss an die Anlage der embryonalen Primärachse entwickeln sich die Extremitätenknospen an definierten Positionen relativ zur Lage der Somiten. Sie bestehen zunächst aus proliferierenden undifferenzierten Mesenchymzellen, welche von ektodermalen Zellen umgeben werden (Chevallier, A. et al. 1977; Christ, B. et al. 1977). Die auswachsende Extremitätenknospe entwickelt sich entlang von drei Achsen. Die proximo-distale Achse wird durch die primäre Wachstumsrichtung von der Schulter zu den Fingerspitzen definiert und resultiert in der Entwicklung von Stylopod, Zeugopod und Autopod. Die anterior-posteriore Achse wird durch die asymmetrische Anlage der Finger (Daumen zum kleinen Finger) festgelegt, wobei die dorso-ventrale Achse die Abflachung der Extremitätenknospe vom Handrücken zur Handinnenfläche definiert (siehe Abbildung 2 A) (für Übersichtsartikel: (Niswander, L. 2003; Tickle, C. 2003; Tickle, C. 2006)). Damit jedes Gewebe, jeder Knochen, Knorpel oder jedes Gelenk an seinem definierten Ort mit exakter Form entstehen kann, unterliegen die Prozesse, die zur

Ausbildung und Weiterentwicklung der Extremitätenknospe führen, einer komplexen Regulation (für Übersichtsartikel: (Niswander, L. 2003; Tickle, C. 2003; Tickle, C. 2006)). Dies erfordert die Differenzierung der anfangs homogenen und unspezialisierten Mesenchymzellen in zahlreiche hochspezialisierte Gewebe. Diese Phänomene können mit dem Konzept der „Positionsinformation“ erklärt werden, wonach Zellen durch sekretierte Botenstoffe einem Koordinatensystem ähnelnd ein Positionssignal entsprechend ihrer Lage in der Extremitätenknospe erhalten, welches sie in der Folge interpretieren, in eine bestimmte Entwicklungsrichtung differenzieren und so räumliche Strukturen etablieren (für eine Übersicht siehe: (Wolpert, L. 1971; Wolpert, L. 1989; Wolpert, L. 2011)).

Signalzentren sekretieren lösliche diffusionsfähige Faktoren, sogenannte Morphogene, die einen Konzentrationsgradienten ausbilden. Für die Entwicklung der Extremitäten zeichnen drei verschiedene Zentren verantwortlich (siehe hierzu auch Referenzen in den Übersichtsartikeln: (Tickle, C. 2003; Benazet, J.D. und Zeller, R. 2009; Towers, M. und Tickle, C. 2009)). Eine Verdickung in der Spitze der ektodermalen Randleiste zwischen ventralem und dorsalem Ektoderm, die apikale ektodermale Randleiste (*Apical Ectodermal Ridge*, AER), etabliert einen proximo-distalen Gradienten, welcher überwiegend aus Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*Fibroblast Growth Factors*, FGFs) besteht (Niswander, L. et al. 1993; Sun, X. et al. 2002; Mariani, F.V. et al. 2008) (siehe Abbildung 3). Hingegen etabliert die mesenchymale Zone polarisierender Aktivität (*Zone of Polarizing Activity*, ZPA) einen anterior-posterior Gradienten bestehend aus dem Faktor SHH (*Sonic Hedgehog*) (für Übersichtsartikel: (Mariani, F.V. et al. 2008; Allard, P. und Tabin, C.J. 2009; Towers, M. und Tickle, C. 2009; Zeller, R. et al. 2009)). Die Ausbildung der dorso-ventralen Achse steht unter der Kontrolle von dorsal exprimiertem Wnt7a sowie den ventral sekretierten Morphogenen der BMP-Familie und En-1 (Übersicht siehe: (Tickle, C. 2000; Niswander, L. 2003)). Die molekularen Mechanismen, die zur Ausbildung der drei Achsen führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt, weshalb verschiedene Modelle entwickelt wurden, um die komplexen Abläufe zu beschreiben (für Übersichtsartikel: (Bianco, P. et al. 2001; Tickle, C. 2003; Tickle, C. 2006; Tabin, C. und Wolpert, L. 2007; Zeller, R. et al. 2009; Zeller, R. 2010)). Entsprechend eines dieser Modelle zur Entwicklung der proximo-distalen Achse, des sogenannten *differentiation front* Modells, werden mesenchymale Zellen unterhalb des apikalen Ektoderms durch Signale der AER in einem undifferenzierten proliferativen Status gehalten, während proximale Zellen außerhalb dieser Reichweite zunehmend determinieren (Tabin, C. und Wolpert, L. 2007).

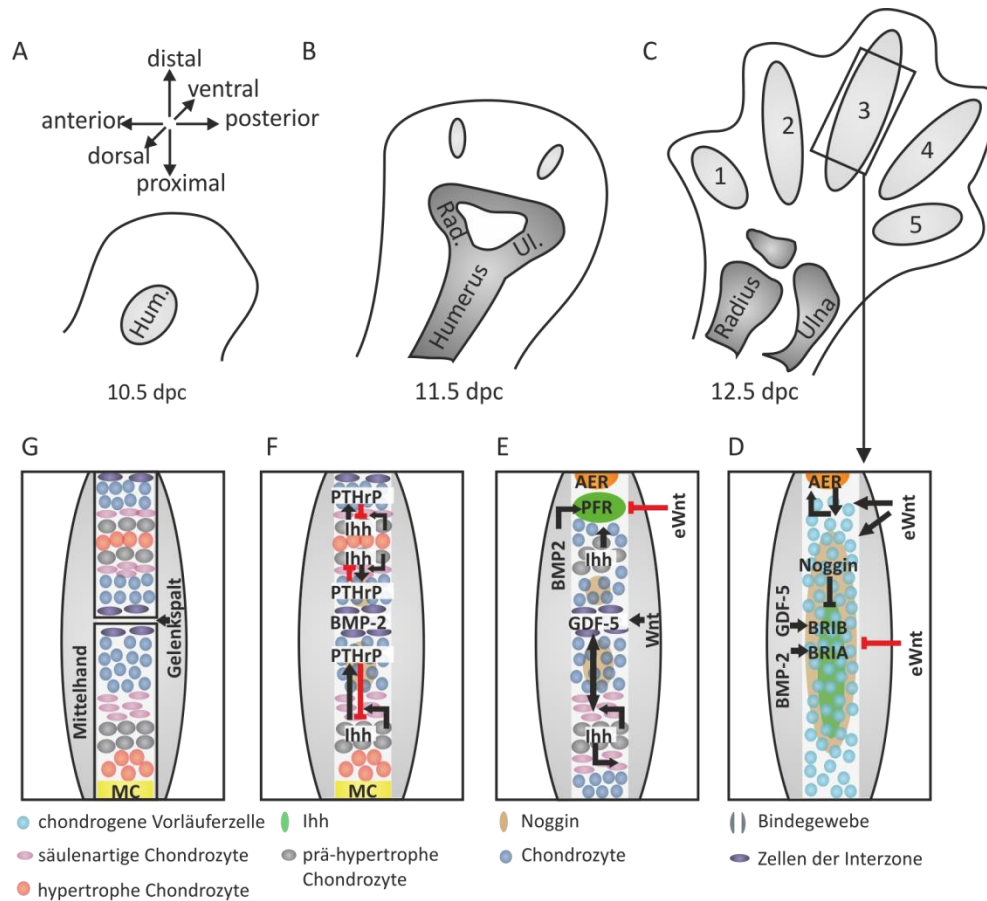


Abbildung 3: Entwicklungsschema der vorderen murinen Extremität sowie der Segmentation der Finger. A-C) Wachstum der Extremitätenknospe. Morphogengradienten initiieren die Ausbildung der drei Primärachsen. Spezielle Signalzentren kontrollieren die Ausbildung der Gradienten: die apikale ektodermale Randleiste (AER) etabliert ein proximo-distales Signal, die Zone Polarisierender Aktivität (ZPA) bildet einen anterior-posterioren Gradienten wobei Signale des dorsalen sowie ventralen Ektoderms die dorso-ventrale Achsenentwicklung erzielen. Ausgehend von Aggregaten mesenchymaler Zellen bilden sich Knorpelanlagen, welche in der Folge die Skelettelemente der Extremität formen. An Entwicklungstag 10.5 entsteht die mesenchymale Kondensation, die den Humerus bildet und sich an Tag 11.5 dpc Y-förmig aufspaltet und so die Knorpelanlagen für Radius und Ulna entstehen lässt. Finger entwickeln sich aus den durchgehenden Kondensationen der Fingerstrahlen und werden in den Entwicklungsphasen der Tage 13.5 bis 15.5 dpc in die Fingerglieder segmentiert. D) Bildung der Fingerstrahlen. Distale mesenchymale Zellen werden durch den Einfluss von FGFs aus der AER sowie ektodermalen Wnt (eWnt)-Faktoren in einem undifferenzierten, proliferierenden Zustand gehalten. Zellen, die diesem Einfluss entwachsen, differenzieren zu chondrogenen Vorläuferzellen und später zu Chondrozyten. BMPs sowie GDF-5 aus dem umgebenden Mesoderm beeinflussen die Chondrogenese positiv, während sie durch eWnt gehemmt wird. E) Wachstum und Segmentation der Fingerstrahlen. Gerichtetes Längenwachstum der Knorpelanlagen wird durch BMP-Signale der *Phalanx-Forming Region* (PFR) gefördert und durch eWnt-Signale inhibiert. Prä-hypertrophe Chondrozyten aus der Knorpelanlage sekretieren den Regulator IHH (*Indian Hedgehog*). In dem Bereich des zukünftigen Gelenkspaltes sorgen lokale eWnt-Signale für die Differenzierung der Vorläuferzellen zu abgeflachten spezialisierten Chondrozyten, den *interzone* Zellen, welche GDF-5 sezernieren. Dieser Prozess sowie die BMP-Signale in der PFR werden durch IHH positiv reguliert. F-G) Bildung des Gelenkspaltes und Wachstum des Fingers. IHH induziert die Expression des *Parathyroid Hormone-related Peptide* (PTHrP) von proliferativen säulenartigen Chondrozyten unterhalb des zukünftigen Gelenkes und bildet so einen negativen Rückkopplungsmechanismus. BMP-2 wird von Zellen der Interzone exprimiert und reguliert die lokale Apoptose der Zellen zur Bildung des Gelenkspaltes. Das Wachstum der Fingerglieder wird durch die Etablierung einer Wachstumszone erzielt, welche sich aus Chondrozyten zunehmender Differenzierungsstufen zusammensetzt. Die lokale Apoptose von hypertrophen Chondrozyten führt zur Ausbildung der Markhöhle (*Marrow Cavity*, MC) (für Referenzen: siehe Haupttext). Mit der Erlaubnis von InTech verändert nach (Hellmann, T.V. et al. 2012).

Die embryonale Anlage sowie das Wachstum der Skelett-Elemente verlaufen von den proximalen zu den distalen Strukturen, wobei sich zunächst die Mesenchymzellen verdichten und daraufhin Differenzierungsprozesse initiieren, die zur Entwicklung von Knorpel- und Knochengewebe führen (Wanek, N. et al. 1989; Storm, E.E. und Kingsley, D.M. 1996; Francis-West, P.H. et al. 1999). Die Aggregate, die den Humerus bilden, beginnen sich während des Entwicklungstages 10.5 dpc (*days post coitum*) in Mäusen zu bilden, nehmen anschließend an Größe zu und verzweigen sich an ihrem distalen Ende an 11.5 dpc schließlich, wodurch die Anlagen für Radius und Ulna gebildet werden (siehe Abbildung 2 A sowie Abbildung 3) (Wanek, N. et al. 1989; Storm, E.E. und Kingsley, D.M. 1996; Francis-West, P.H. et al. 1999). Zwischen den Entwicklungstagen 11 bis 12.5 dpc werden die Kondensationen der Autopodstrukturen angelegt (Storm, E.E. und Kingsley, D.M. 1996). Die Finger entwickeln sich aus durchgehenden Aggregaten, den Fingerstrahlen, und werden zwischen 13.5 und 15.5 dpc sequentiell in die Anlagen der Mittelhand- sowie Fingerknochen segmentiert (siehe Abbildung 2 B und Abbildung 3) (Storm, E.E. und Kingsley, D.M. 1996). Die Determinierung der anterior-posterioren Achse während der Fingerentwicklung erfolgt nach dem derzeitigen Kenntnisstand durch Integration der zeitlichen Einwirkung (temporäre Komponente) sowie der örtlichen Morphogenkonzentration (räumliche Komponente) des SHH Signals ausgehend von der ZPA (für Übersichtsartikel siehe: (Tickle, C. 2006; Benazet, J.D. und Zeller, R. 2009; Zeller, R. et al. 2009)). Ein komplexes Expressions- sowie Sekretionsmuster verschiedener Wachstumsfaktoren sowie ihrer Modulatoren und Rezeptoren reguliert die Segmentierungsprozesse, die Chondrogenese sowie die Ausbildung der synovialen Gelenke (siehe Abbildung 3, für Übersichtsartikel: (Abarca-Buis, R.F. et al. 2011; Stricker, S. und Mundlos, S. 2011)). Die genetische Analyse von Mäusen mit spezifischen Knochen- bzw. Knorpeldefekten führte zu der Entdeckung des *Growth and Differentiation Factor-5* (GDF-5), einem Mitglied der TGF- β -Familie. Diesem Wachstumsfaktor konnte eine entscheidende Bedeutung in der Entwicklung der Wirbeltierextremitäten und im Besonderen während der Gelenkentwicklung zugeordnet werden (Storm, E.E. et al. 1994). In den darauffolgenden Dekaden wurden die genetischen Grundlagen für zahlreiche weitere Knochen- und Knorpeldefektbildungen des Menschen untersucht, welche zeigten, dass nicht nur Mutationen des GDF-5-Gens dafür verantwortlich zeichnen, sondern viele weitere TGF- β -Liganden sowie deren Rezeptoren und Modulatoren involviert sind (siehe OMIM-Datenbank; für aktuelle Übersichtsartikel: (Anderson, E. et al. 2012; Hellmann, T.V. et al. 2012)).

1.2. DIE KNOCHENWACHSTUMSFAKTOREN – AUFBAU UND BIOLOGISCHE FUNKTIONEN

Bereits seit über einem Jahrhundert werden dekalzifizierte Knochenspäne zur Behandlung der entzündlichen Knochenkrankheit Osteomyelitis eingesetzt (Senn, N. 1889). Zwar wurde bereits

in den 1940er Jahren die Existenz eines Knochen-induzierenden Faktors – des Osteogenins – in der Knochensubstanz postuliert (Lacroix, P. 1945), jedoch dauerte es weitere 20 Jahre bis Marshall Urist die entscheidende Entdeckung machte, dass intramuskulär implantierte demineralisierte Knochenmatrix eine de novo Knochenbildung hervorruft (Urist, M.R. 1965). Daraufhin stellte M. Urist die These auf, dass bestimmte osteoinduktive Proteine, die er *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) nannte, dafür verantwortlich zeichnen (Urist, M.R. 1965). In den folgenden zwei Jahrzehnten konnten A. H. Reddi und Kollegen zunächst nachweisen, dass die Knochenmorphogenese in einer mehrstufigen Signalkaskade abläuft (Reddi, A.H. und Anderson, W.A. 1976; Weiss, R.E. und Reddi, A.H. 1980) (Übersichtsartikel: (Reddi, A.H. 1981)), bevor es 1988 der Arbeitsgruppe um J.M. Wozney schließlich gelang die ersten BMP-Proteine zu isolieren (Wang, E.A. et al. 1988) und ihre genetische Sequenz zu entschlüsseln (Wozney, J.M. et al. 1988). Aufgrund von Sequenzhomologien konnten die BMPs der *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) Superfamilie zugeordnet werden (Wozney, J.M. et al. 1988). Dieser Familie von Wachstumsfaktoren gehören neben den TGF- β s auch Activine, Inhibine, GDFs, Nodal, *Anti-Muellerian Hormone* (AMH) sowie die Vertreter der *Glial-Derived Neurotrophic Growth Factor* (GDNF) Subfamilie an (siehe Übersichtsartikel: (Massague, J. 1998)). Die Anzahl verschiedener TGF- β -Vertreter korreliert mit der Komplexität des Organismus. So konnten fünf Mitglieder in dem Invertebraten *Caenorhabditis elegans* (Savage-Dunn, C. 2005), sieben Liganden in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Newfeld, S.J. et al. 1999) und mehr als 30 Vertreter in Säugetieren nachgewiesen werden (zusammengefasst in: (Miyazawa, K. et al. 2002)).

Anhand von Aminosäuresequenzvergleichen kann diese Superfamilie in mehrere Subgruppen unterteilt werden, wobei die BMP-Subfamilie mit mehr als 20 Mitgliedern in Säugetieren die größte Untergruppe darstellt (siehe Abbildung 4) (für eine Übersicht: (Massague, J. 1998; Chen, D. et al. 2004)). Neben ihrer namensgebenden Schlüsselrolle bei der Regulation osteogener Prozesse, darunter Chemotaxis, Mitose und Differenzierung von Knorpel- und Knochenzellen sowie deren Homöostase (Cunningham, N.S. et al. 1992), konnten den Knochenwachstumsfaktoren darüber hinaus in den letzten Jahrzehnten auch zahlreiche nicht-osteogene Funktionen zugewiesen werden: So reglementieren BMPs beispielsweise zentrale Mechanismen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Chemotaxis sowie Apoptose (für eine Übersicht: (Hogan, B.L. 1996a; Hogan, B.L. 1996b)). Zahlreiche Geninaktivierungsstudien in Mausmodellen konnten zudem zeigen, dass BMPs während der Embryonalentwicklung als klassische Morphogene wirken und dabei fundamentale Prozesse wie Mesoderminduktion, Entwicklung der Links-Rechts-Asymmetrie, nervale Musterbildung sowie Vaskulogenese und Angiogenese regulieren (für Übersichtsartikel: (Hogan, B.L. 1996a; Hogan, B.L. 1996b; Wozney, J.M. 1998; Kishigami, S. und Mishina, Y. 2005)). Zudem konnte durch weitere genetische

1. Einleitung

Deletionsstudien eine Beteiligung der BMPs an der Entwicklung einer Vielzahl von Organen aufgezeigt werden, darunter Herz, Lunge, Niere, Haut, Darm, Auge, Extremitäten sowie Geschlechtsorgane (für eine Übersicht: (Hogan, B.L. 1996a; Hogan, B.L. 1996b; Balemans, W. und Van Hul, W. 2002; Chang, H. et al. 2002)).

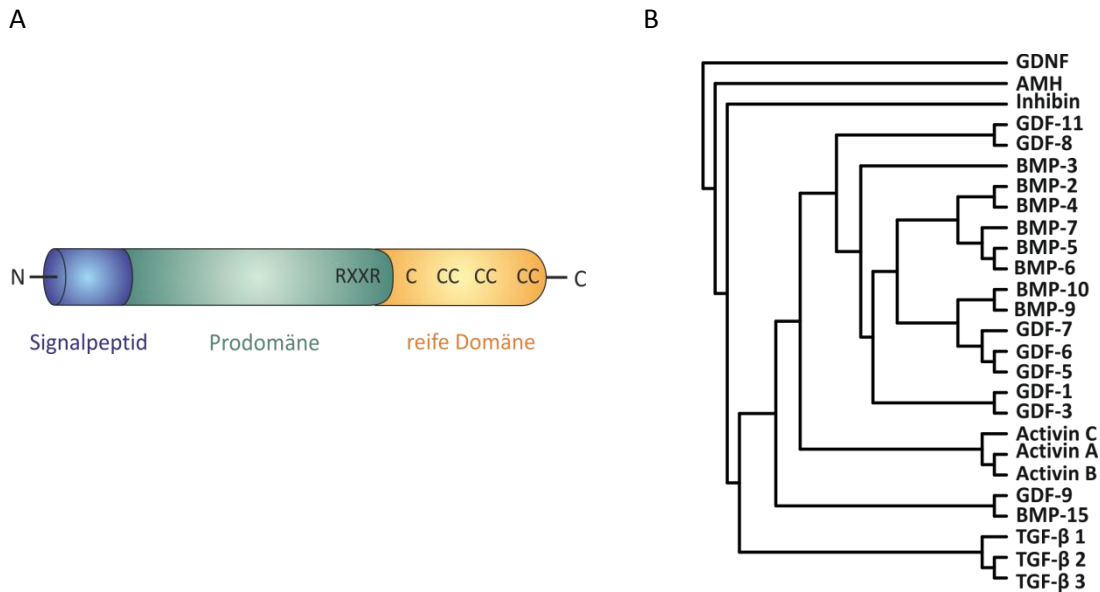


Abbildung 4: A) Schematische Darstellung eines Vorläuferproteins der TGF-β-Superfamilie. Der blaue Bereich kennzeichnet die N-terminale Signalpeptidsequenz, in grün ist die Pro-Domäne mit dem Proprotein-Konvertase-Spaltungsmotiv (RXXR) dargestellt, während die gelbe Box die C-terminale reife Domäne mit dem Cystinknoten-Motiv zeigt. B) Unterteilung der Mitglieder der TGF-β-Superfamilie von Wachstumsfaktoren in Subgruppen aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen. Der Sequenzvergleich der reifen Domänen erfolgte mit ClustalW2 (Software des EMBL Bioinformatik Instituts; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), die phylogenetische Darstellung mit TreeView (Version 1.6.6; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>).

Deletionen von BMPs sowie Mutationen innerhalb der Sequenzen dieser Wachstumsfaktoren werden mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter mit Nierenkrankheiten (beispielsweise: (Dudley, A.T. et al. 1995; Luo, G. et al. 1995); für Übersichtsartikel: (Klahr, S. 2003)), Knochen- und Knorpelfehlbildungen (für eine Übersicht: (Mundlos, S. und Olsen, B.R. 1997; Stricker, S. und Mundlos, S. 2011; Hellmann, T.V. et al. 2012)), Osteoporose (unter anderem (Styrkarsdottir, U. et al. 2003)), Arthritis (beispielsweise: (Chubinskaya, S. et al. 2000; Fukui, N. et al. 2006; Miyamoto, Y. et al. 2007; Egli, R.J. et al. 2009); für eine Übersicht: (Lories, R.J. und Luyten, F.P. 2009)), aber auch Krebs (für einen Überblick: (Thawani, J.P. et al. 2010)) und vaskulären Erkrankungen (beispielsweise: (Newman, J.H. et al. 2001; Frank, D.B. et al. 2005; de Jesus Perez, V.A. et al. 2009; Wang, D. et al. 2012)). Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen der Knochenwachstumsfaktoren, die sich über den gesamten Körper erstrecken, wurde postuliert,

die Bezeichnung BMP zu *Body Morphogenetic Proteins* abzuwandeln (Reddi, A.H. 2005; Wagner, D.O. et al. 2010).

Die Biosynthese der BMPs ebenso wie auch die aller übrigen Mitglieder der TGF- β Familie verläuft komplex, indem die Faktoren zunächst als große, inaktive Präproteine bestehend aus etwa 400 bis 500 Aminosäuren synthetisiert werden. Dabei setzt sich das Vorläuferprotein aus einer N-terminalen Signalpeptidsequenz, einer Prodomäne sowie der C-terminalen hochkonservierten Ligandendomäne zusammen, welche den bioaktiven Teil der BMPs enthält (siehe Abbildung 4) (für einen Übersichtsartikel: (Sebald, W. et al. 2004)). Die Aktivierung zum reifen Protein erfolgt nach der Dimerisierung des Präproteins im Endoplasmatischen Retikulum durch proteolytische Spaltung im Golgi Apparat an der Aminosäuresequenz Arg-X-X-Arg (R-X-X-R) mittels einer Protease aus der Familie der Subtilisin-ähnlichen Proproteinkonvertasen (*Subtilisin-like Proprotein Convertase, SPC*), zu denen unter anderem Furin gehört (Constam, D.B. und Robertson, E.J. 1999). Das Propeptid variiert in seiner Länge und seine funktionelle Relevanz könnte für jedes TGF- β -Mitglied individuell verschieden sein. Einige Propeptide fungieren als intramolekulare Chaperone, welche die Faltung der reifen Proteindomäne unterstützen (Inouye, M. 1991; Eder, J. et al. 1993; McIver, K.S. et al. 1995). Für BMP-2 konnte jedoch in vitro bisher keine essentielle Notwendigkeit der Prodomäne für die Faltung und Vermittlung der Aktivität gezeigt werden (Ruppert, R. et al. 1996; Hillger, F. et al. 2005). Einige Mitglieder der TGF- β Superfamilie werden im Anschluss an die posttranslationale Prozessierung als stabile, nicht kovalent verknüpfte Komplexe bestehend aus dem Propeptid sowie dem reifen dimeren Liganden sekretiert, wobei die Prodomäne unterschiedliche Funktionen ausüben kann (Wakefield, L.M. et al. 1989; Lee, S.J. und McPherron, A.C. 2001; Thies, R.S. et al. 2001; Brown, M.A. et al. 2005; Ge, G. et al. 2005; Gregory, K.E. et al. 2005). Im Falle der TGF- β Subgruppe konnte gezeigt werden, dass die Liganden durch die Assoziation mit ihren Propeptiden inaktiviert und an der extrazellulären Matrix immobilisiert werden, woraus die Bezeichnung *Latency Associated-Peptide* (LAP) für die TGF- β Prodomänen resultiert (Wakefield, L.M. et al. 1989; Gentry, L.E. und Nash, B.W. 1990; Annes, J.P. et al. 2003). Eine ähnliche inhibierende Funktion des nicht kovalent gebundenen Propeptids konnte auch für manche BMP Mitglieder wie GDF-8 gezeigt werden (Thies, R.S. et al. 2001; Jiang, M.S. et al. 2004), während beispielsweise die Aktivität von BMP-9 durch die Assoziation mit seiner Prodomäne unbeeinflusst bleibt (Brown, M.A. et al. 2005). BMP-4 wird durch die Interaktion mit seinem Propeptid stabilisiert und diese zeichnet zudem für den intrazellulären Transport sowie die Faltung im Endoplasmatischen Retikulum verantwortlich (Constam, D.B. und Robertson, E.J. 1999; Degnin, C. et al. 2004; Sopory, S. et al. 2006). Die Prodomäne von BMP-7 ist für die Lokalisierung des Wachstumsfaktors in der extrazellulären Matrix von Bedeutung (Gregory, K.E.

1. Einleitung

et al. 2005). Eine generelle Funktion der Propeptide für alle Mitglieder der TGF- β Superfamilie könnte die Erhöhung der Löslichkeit dieser Wachstumsfaktoren sein, indem sie hydrophobe Oberflächenbereiche maskieren und so möglicherweise die Transportreichweite der sekretierten Morphogene erweitern (Hillger, F. et al. 2005; Sengle, G. et al. 2008; Sengle, G. et al. 2011; Shi, M. et al. 2011).

Strukturell zeichnen sich die reifen C-terminalen Domänen aller Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, die aus etwa 100 bis 140 Aminosäuren bestehen, durch ein charakteristisches Cystinknoten-Faltungsmotiv aus (McDonald, N.Q. und Hendrickson, W.A. 1993). Diese Struktur setzt sich aus zwei Konsensussequenzen mit der Abfolge Cys₂-X-Gly-X-Cys₃ sowie Cys₅-X-Cys₆ zusammen, welche durch Ausbildung von zwei intramolekularen Disulfidbrücken zwischen dem zweiten und dem fünften sowie dem dritten und dem sechsten Cystein eine Ringstruktur bilden (siehe Abbildung 5 B). Eine dritte Disulfidbrücke zwischen dem ersten und dem vierten Cystein durchdringt die Ringstruktur und vervollständigt so die Knotenstruktur (McDonald, N.Q. und Hendrickson, W.A. 1993).

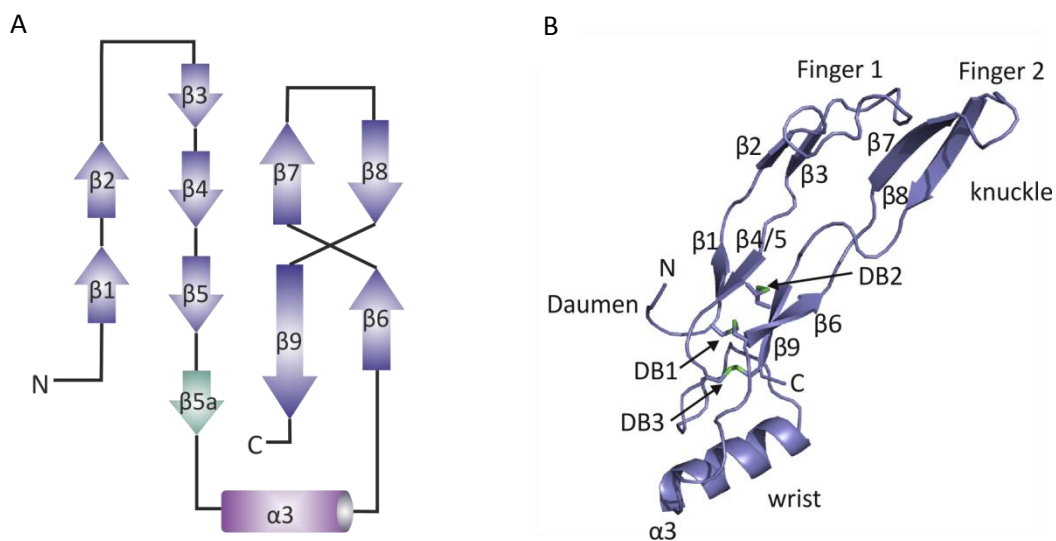


Abbildung 5: A) Topologiediagramm von BMP-2. Die α -Helices sind in Form von Zylindern, β -Faltblattstrukturen als Pfeile dargestellt. B) Bänderdarstellung eines BMP-2 Monomers. Die Faltungstopologie ähnelt einer geöffneten linken Hand (Daopin, S. et al. 1992). Der N-Terminus repräsentiert hierbei den Daumen, während die α -Helix das Handgelenk bildet. Zwei antiparallele β -Faltblattstrukturen formen die Finger 1 und 2. Die konvexe Seite der β -Faltblätter bildet das Bindeepitop für die Typ II Rezeptoren in allen TGF- β Mitgliedern ausser den TGF- β s und wird als *knuckle*-Epitop bezeichnet. Die α -Helix eines Monomers zusammen mit der konkaven Seite des β -Faltblatts des anderen Monomers bildet das Bindeepitop für die Typ I Rezeptoren und wird als *wrist* Epitop bezeichnet. Die intramolekularen Disulfidbrücken, welche den Cystinknoten bilden, sind hervorgehoben und mit DB gekennzeichnet (PDB Datei 3BMP, (Scheufler, C. et al. 1999)).

Das Vorkommen des Cystinknoten-Motivs ist dabei keinesfalls einzigartig für die TGF- β -Superfamilie, sondern findet sich auch in anderen Wachstumsfaktoren und Hormonen (Vitt, U.A. et al. 2001). Die Proteinstrukturen einiger Mitglieder der TGF- β -Familie wurden bisher erfolgreich entschlüsselt, darunter die NMR Struktur von TGF- β 1 (Hinck, A.P. et al. 1996) sowie die Kristallstrukturen von TGF- β 2 (Daopin, S. et al. 1992), TGF- β 3 (Mittl, P.R. et al. 1996), BMP-7 (Griffith, D.L. et al. 1996), GDNF (Eigenbrot, C. und Gerber, N. 1997), BMP-2 (Scheufler, C. et al. 1999), GDF-5 (Nickel, J. et al. 2005; Schreuder, H. et al. 2005), BMP-9 (Brown, M.A. et al. 2005), Activin A (Harrington, A.E. et al. 2006), BMP-3 (Allendorph, G.P. et al. 2007) und BMP-6 (Saremba, S. et al. 2008).

Die Grundstruktur eines TGF- β -Liganden lässt sich am Beispiel der BMP-2 Kristallstruktur (Scheufler, C. et al. 1999) mit der Form einer geöffneten linken Hand (Daopin, S. et al. 1992) vergleichen (siehe Abbildung 5 B): Zwei antiparallele β -Faltblattstrukturen bilden in diesem Modell den Zeigefinger (Finger 1) und den Mittelfinger (Finger 2), während die α -Helix das Handgelenk (*wrist*) darstellt. Die Handfläche wird durch den Cystinknoten repräsentiert (siehe Abbildung 5 B) (Scheufler, C. et al. 1999). Jeweils zwei Monomere bilden einen biologisch aktiven dimeren Liganden, welche mit Ausnahme der Faktoren GDF-9, BMP-15 sowie GDF-3 (für einen Übersichtsartikel: (Chang, H. et al. 2002)) über eine intermolekulare Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft sind (siehe Abbildung 6) (Scheufler, C. et al. 1999). Zudem werden bei der Dimerisierung hydrophobe intermolekulare Kontakte zwischen der zentralen α -Helix des einen Monomers mit dem konvexen Bereich der gekrümmten β -Faltblattstrukturen der zweiten Untereinheit ausgebildet, wodurch ein hydrophober Kernbereich generiert wird (Scheufler, C. et al. 1999).

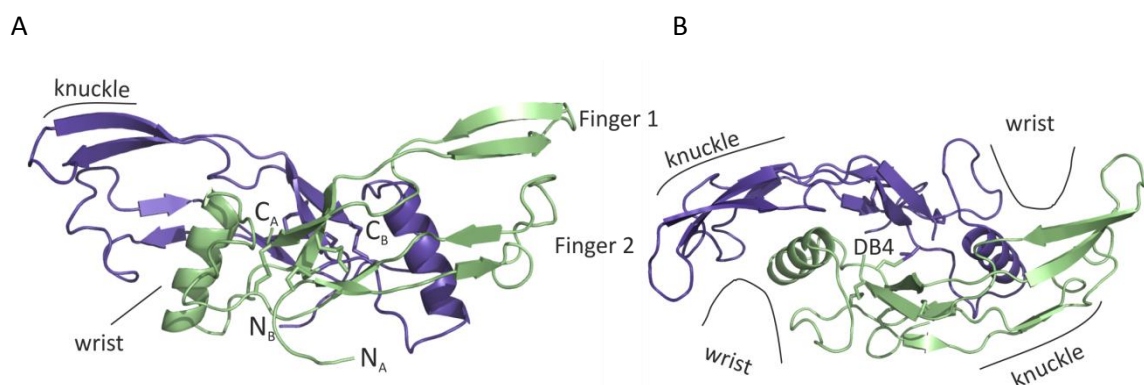


Abbildung 6: Bänderdarstellung der Struktur eines TGF- β -Liganden am Beispiel von BMP-2. A) Seitenansicht des dimeren BMP-2 Liganden. B) Aufsicht auf die dimere Struktur des Liganden. *Knuckle*- sowie *wrist*-Epitope sind markiert. Die intermolekulare Disulfidbrücke (DB4), welche die beiden Monomere kovalent verknüpft, ist in B) eingezeichnet. (PDB Datei 3BMP (Scheufler, C. et al. 1999)).

1.3. DIE REZEPTOREN DER TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-SUPERFAMILIE

Der dimere TGF- β -Ligand stellt die biologisch aktive Einheit dar und vermittelt sein Signal über die Interaktion mit zwei verschiedenen Untergruppen von transmembranären Serin-/Threonin-Rezeptorkinasen, welche als Typ I und Typ II Rezeptoren bezeichnet werden (als Übersichtsartikel: (Massague, J. 1998)). Strukturell setzen sich die Mitglieder beider Rezeptorklassen aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer extrazellulären Ligandenbindenden Domäne mit 10 bis 12 Cysteinresten, einem Transmembranbereich sowie einer intrazellulären Kinasedomäne zusammen (siehe Abbildung 7 A). Zur Kategorisierung der Rezeptoren in ihre Untergruppen wird eine intrazelluläre Glycin-Serin-reiche Domäne – die sogenannte GS-Box – herangezogen, welche ausschließlich in den Typ I Rezeptoren vorkommt und für die Aktivierung der Typ I Rezeptorkinasedomäne von entscheidender Bedeutung ist (Wrana, J.L. et al. 1994; Newfeld, S.J. et al. 1999).

Derzeit sind in Säugetieren sieben Typ I Rezeptoren sowie fünf Typ II Rezeptoren bekannt (für eine Übersicht: (Massague, J. 1998)). Die Klasse der Typ I Rezeptoren setzt sich aus den Mitgliedern ALK1 (*Activin Receptor-like Kinase 1*) und ALK7, den Activin Typ I Rezeptoren ActR-I (auch ALK2) und ActR-IB (auch ALK4), dem TGF- β Typ I Rezeptor T β RI (auch ALK5) sowie den BMP Typ I Rezeptoren BMPR-IA (auch ALK3) und BMPR-IB (auch ALK6) zusammen, während die Gruppe der Typ II Rezeptoren aus den Activin Typ II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB, dem BMP Typ II Rezeptor BMPR-II, dem TGF- β Typ II Rezeptor T β RII sowie dem Typ II Rezeptor des Anti-Müller'schen Hormons – AMHR-II – besteht (siehe Abbildung 7 B) (für eine Übersicht: (Massague, J. 1998)). Die erste Kristallstruktur einer Rezeptorektodomäne wurde 1999 für den Typ II Rezeptor ActR-II entschlüsselt (Greenwald, J. et al. 1999), ein Jahr später folgte die strukturelle Aufklärung der extrazellulären Domäne des Typ I Rezeptors BMPR-IA im Komplex gebunden an BMP-2 (Kirsch, T. et al. 2000c). Abbildung 7 C zeigt die Struktur einer Typ I Rezeptorektodomäne am Beispiel des BMP-Rezeptors BMPR-IA. Ein zentrales Strukturelement bildet das antiparallele β -Faltblatt, welches aus den Strängen β 3 bis β 5 gebildet wird. Eine Krümmung dieses β -Faltblattelementes lässt eine konvexe und eine konkave Oberfläche entstehen. Flankiert wird es einerseits von einem weiteren antiparallelen β -Faltblatt aus den Strängen β 1 und β 2 sowie andererseits von einer kurzen α -Helix. Ein zentraler Cystin-Kern aus fünf intramolekularen Disulfidbrücken stabilisiert die Sekundärstrukturelemente (Kirsch, T. et al. 2000c). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu einer Reihe von Neurotoxinen aus Schlangengiften wird diese Faltungstopologie auch als Drei-Finger-Toxin-Motiv (*Three Finger Toxin Fold*) bezeichnet (Rees, B. und Bilwes, A. 1993). Die Finger setzen sich hierbei aus den antiparallelen β -Faltblättern sowie der α -Helix zusammen (Abbildung 7 C).

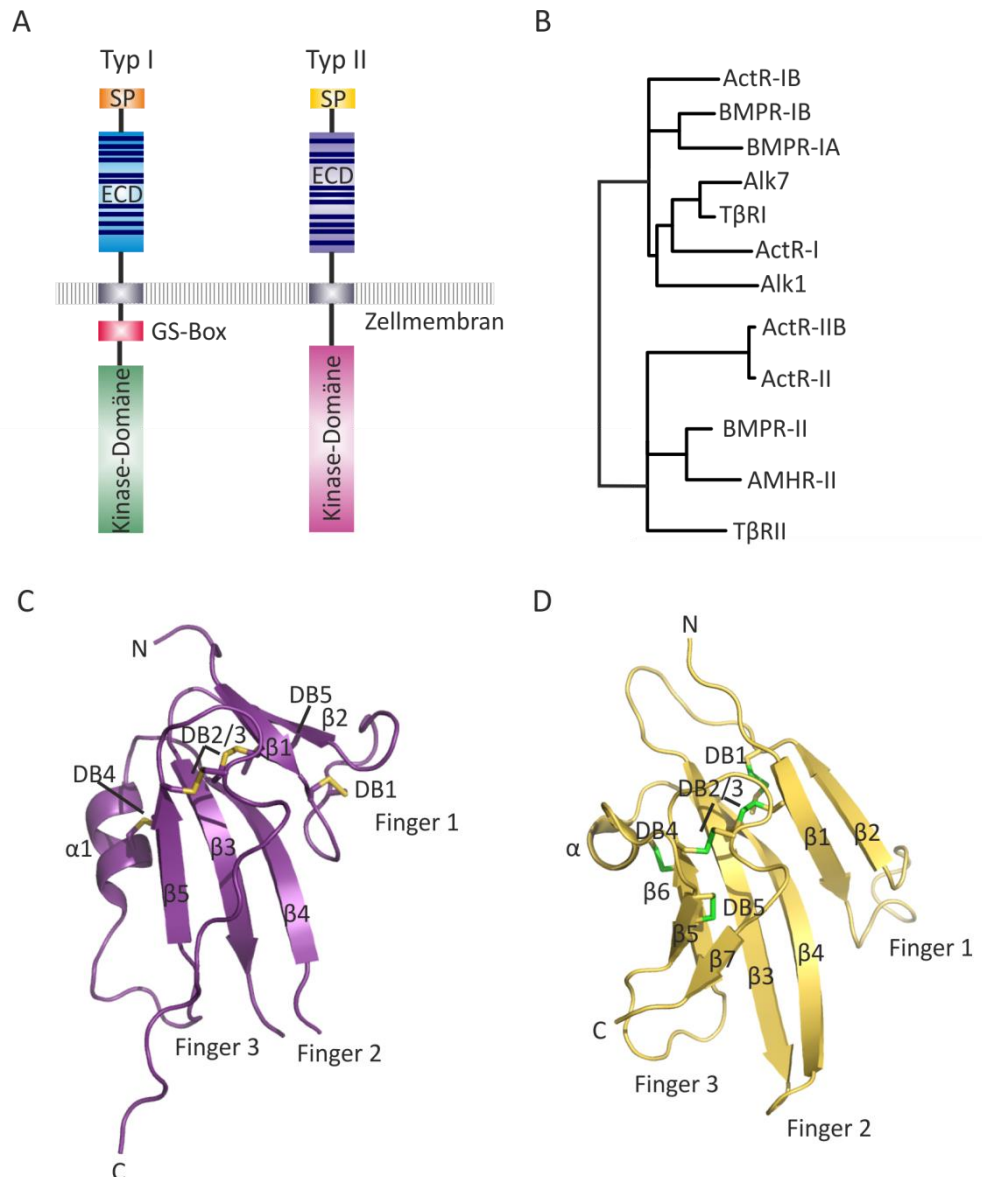


Abbildung 7: Charakterisierung der Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie. A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Typ I bzw. Typ II Rezeptoren. Die Verteilung der Cysteinreste in der extrazellulären Domäne ist durch dunkelblaue Querbalken symbolisiert. B) Phylogenetische Analyse der TGF- β -Rezeptoren basierend auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen ihrer Ektodomänen. Separate Analyse der Typ I und Typ II Rezeptorektodomänen mit ClustalW2 (Software des EMBL European Bioinformatik Instituts; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), Darstellung des phylogenetischen Baumes mittel TreeView (Version 1.6.6; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>). C) Übersicht der Struktur einer extrazellulären Domäne eines Typ I Rezeptors in Bänderdarstellung am Beispiel von BMPR-IA (PDB Datei 1ES7; Kirsch, T. et al. (2000c)) D) Bänderdarstellung der Struktur einer Ektodomäne eines Typ II Rezeptors am Beispiel von ActR-IIB (PDB Datei 2H64; Weber, D. et al. (2007)). SP = Signalpeptid, ECD = extrazelluläre Domäne, DB = Disulfidbrücke.

Trotz nur geringer Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen mit den Typ I Rezeptoren weisen auch die extrazellulären Domänen der Typ II Rezeptoren diesen konservierten Cystinkern auf und zeigen ein ähnliches Drei-Finger-Faltungsmotiv, welches in Abbildung 7 D am Beispiel von ActR-IIB dargestellt ist. Im Gegensatz zu BMPR-IA werden die drei Finger jedoch

1. Einleitung

durch drei antiparallele β -Faltblattstrukturen aus insgesamt sieben β -Strängen gebildet (Weber, D. et al. 2007).

Die Bindeepitope der BMP-Liganden für ihre Rezeptoren konnten 2000 durch T. Kirsch und Kollegen zunächst durch Mutagenesestudien eingegrenzt werden (Kirsch, T. et al. 2000a) und wurden später durch die Isolation und Kristallisation eines Ligand/Typ I Rezeptorkomplexes (Kirsch, T. et al. 2000c) sowie eines Ligand/Typ II Rezeptorkomplexes bestätigt (Greenwald, J. et al. 2003). Anhand der Kristallstruktur des ternären Komplexes aus dem dimeren BMP-2 Liganden sowie den Ektodomänen der Rezeptoren BMPR-IA und ActR-IIB (Weber, D. et al. 2007) sollen diese Epitope im Folgenden näher beschrieben werden. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, interagiert der Typ I Rezeptor mit einer Epitopfläche, die aus beiden Monomer-Untereinheiten des Liganden gebildet wird und in Anlehnung an das Handmodell als *wrist*-Epitop bezeichnet wird (siehe Abbildung 6). Die Kontaktfläche besteht überwiegend aus hydrophoben Wechselwirkungen und setzt sich auf der Seite des Liganden aus der Prä-Helix-Schleife sowie der α -Helix des einen Monomers und aus der konkaven Seite der Finger-Domäne der anderen Monomeruntereinheit zusammen. Die Schleife zwischen den β -Strängen β 1 und β 2 sowie die α -Helix beinhalten die Hauptbindedeterminanten auf der Seiten der Rezeptorektodomänen (siehe Abbildung 7 C, Abbildung 8) (siehe z. B.: (Kirsch, T. et al. 2000c; Weber, D. et al. 2007)).

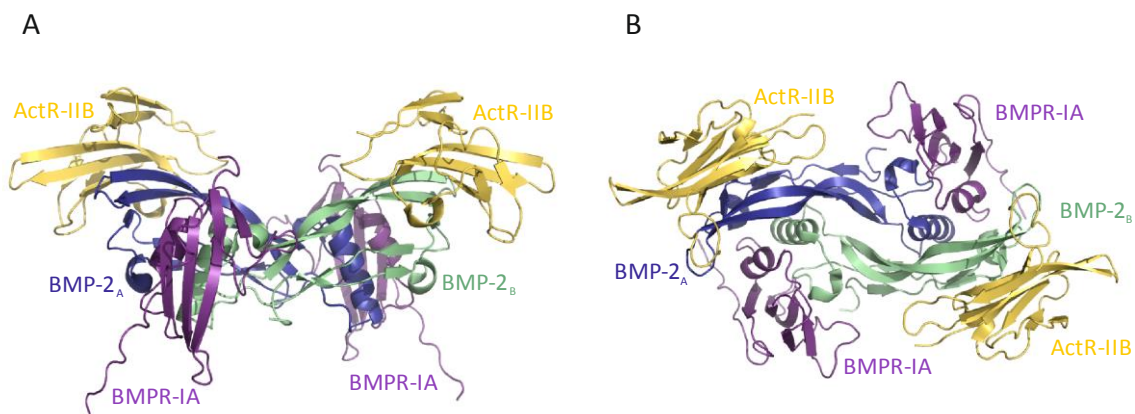


Abbildung 8: Struktur des ternären Komplexes aus einem BMP-2 Dimer und den Ektodomänen der Rezeptoren BMPR-IA sowie ActR-IIB in Bänderdarstellung. A) Seitenansicht des Komplexes. B) Aufsicht auf den ternären Signalkomplex (PDB Datei 2H64; Weber, D. et al. (2007)).

Für Liganden der TGF- β Superfamilie findet die Interaktion mit den Typ II Rezeptoren mit Ausnahme der TGF- β Faktoren selbst an der konvexen Fläche des Liganden statt, diese Bindestelle wird ebenfalls in Anlehnung an das Handmodell als *knuckle*-Epitop bezeichnet (siehe Abbildung 6, Abbildung 8) (siehe beispielsweise: (Greenwald, J. et al. 2003; Weber, D. et al. 2007)). Am Beispiel des ternären Komplexes zeigt sich, dass der konkave Bereich der

Rezeptorektodomäne an die konvexe Oberfläche der β -Faltblattstruktur des Liganden bindet. Die Interaktionen sind auch in diesem Fall überwiegend hydrophober Natur, jedoch bildet der Typ II Rezeptor ausschließlich Kontakte zu einem Liganden-Monomer aus und es bestehen keine intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den beiden Rezeptortypen (siehe Abbildung 8; (Weber, D. et al. 2007)).

1.4. SIGNALTRANSDUKTION UND REGULATION DER KNOCHENWACHSTUMSFAKTOREN

Mitglieder der TGF- β Superfamilie initiieren die Signaltransduktionskette, indem sie zunächst mit ihren hochaffinen Rezeptoren interagieren, welche anschließend die niederaffinen Rezeptoren in den membranständigen Komplex rekrutieren (für Übersichtsartikel: (ten Dijke, P. et al. 1996; Massague, J. 1998; Massague, J. und Chen, Y.G. 2000)). Neben diesem klassischen Modell der Liganden-induzierten Oligomerisierung (*BMP Induced Signaling Complex*, BISC) als Rezeptoraktivierungsmechanismus wird in der Literatur zudem ein weiterer Mechanismus diskutiert, bei welchem der Ligand durch die Interaktion mit bereits vorgeformten (oligomeren) Rezeptorkomplexen (*Preformed Complex*, PFC) ein Signal in die Zelle transduziert (Gilboa, L. et al. 2000). Beide Mechanismen initiieren dabei potentiell unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden (Gilboa, L. et al. 2000; Nohe, A. et al. 2002; Hassel, S. et al. 2003; Hartung, A. et al. 2006).

Aufgrund der dimeren Architektur des Liganden bildet dieser zusammen mit je zwei Molekülen der beiden Rezeptoruntergruppen einen aktiven heterohexameren Signalkomplex aus. Die Rezeptorheterooligomerisierung bringt die intrazellulären Kinasedomänen in räumliche Nähe zueinander, wodurch die konstitutiv aktive Serin-/Threonin-Kinase des Typ II Rezeptors den Typ I Rezeptor mittels Phosphorylierungen an dessen GS-Box aktivieren kann (als Übersichtsartikel siehe: (Shi, Y. und Massague, J. 2003)) (Abbildung 9). Anschließend überträgt der Typ I Rezeptor seinerseits das Signal auf intrazelluläre Mediatoren der sogenannten SMAD-Familie (*Small Mothers Against Decapentaplegic*) (Derynck, R. et al. 1996). Bisher sind in Säugetieren acht verschiedene SMAD-Moleküle bekannt, welche in drei Untergruppen unterteilt werden: die Rezeptor-regulierten SMADs (R-SMADs; SMAD-1, -2, -3, -5, -8), die inhibitorischen SMADs (I-SMADs; SMAD-6, -7) sowie den *common-mediator*-SMAD (Co-SMAD; SMAD-4) (für eine Übersicht siehe: (Massague, J. 1998)). Im Anschluss an die Phosphorylierung durch die Typ I Rezeptorkinase oligomerisieren die aktivierten R-SMAD-Mediatoren mit dem Co-SMAD, translozieren in den Zellkern und regulieren dort in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription der Zielgene (für Übersichtsartikel: (Heldin, C.H. et al. 1997; Massague, J. et al. 2005)).

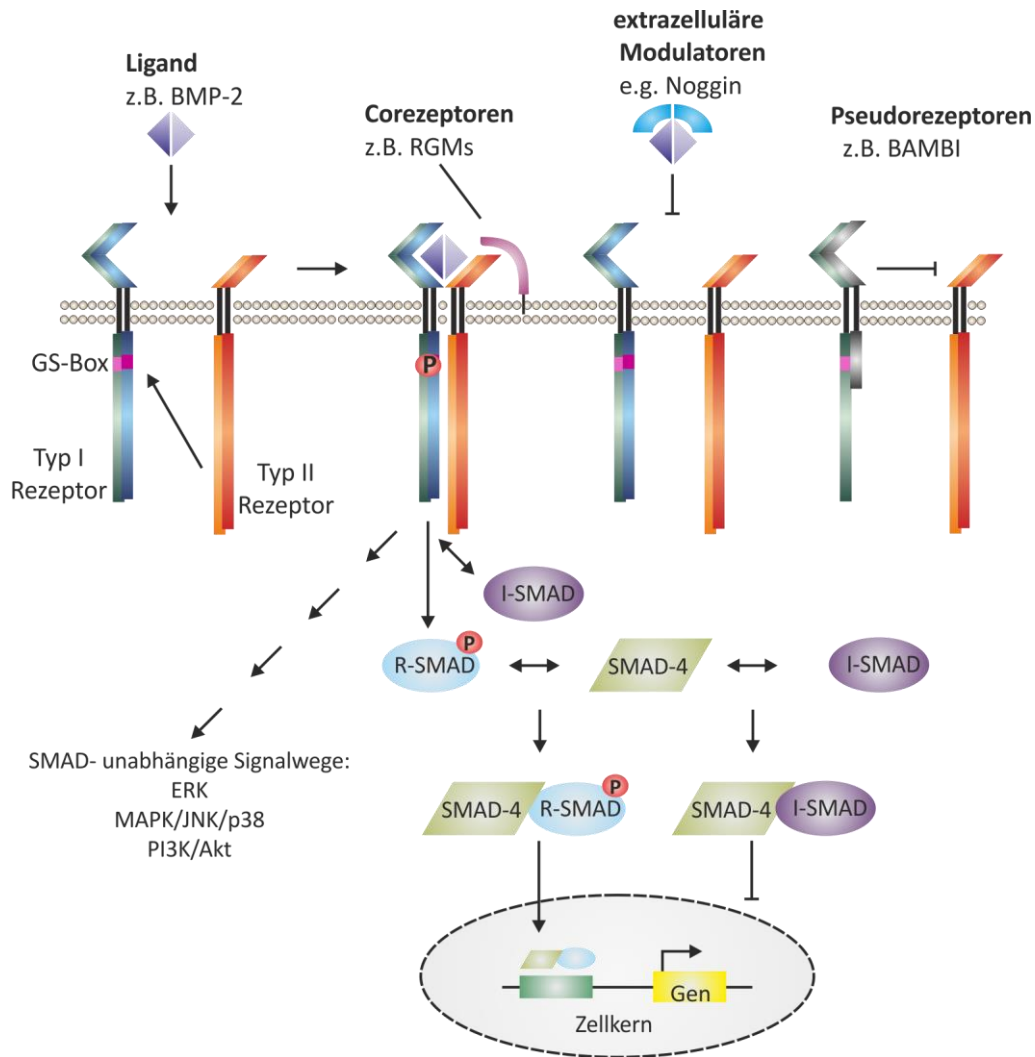


Abbildung 9: Signalkaskade der TGF- β -Superfamilie. Die Signalweiterleitung wird initiiert, indem der TGF- β -/BMP-Ligand an die extrazellulären Domänen der entsprechenden Transmembranrezeptoren bindet und dadurch auch die intrazellulären Kinsedomänen in räumliche Nähe zueinander bringt. Der konstitutiv aktive Typ II Rezeptor transphosphoryliert den Typ I Rezeptor an der membrannahen GS-Box und aktiviert somit dessen Kinsedomäne. Nachfolgend werden intrazelluläre Signalmoleküle, die R-SMADs, durch die Typ I Rezeptorkinase phosphoryliert und oligomerisieren mit dem Co-SMAD, SMAD-4. Dieser Komplex dient in Verbindung mit weiteren Proteinen als Transkriptionsregulator. Neben dem SMAD-Signalweg können auch SMAD-unabhängige Signaltransduktionsketten initiiert werden. Die Signaltransduktion kann auf mehreren Ebenen reguliert werden. So können extrazelluläre Modulatorproteine z. B. die Liganden binden und somit deren Interaktion mit den Rezeptordomänen unterbinden. Weiterhin können intrazellulär beispielsweise die inhibitorischen SMADs (I-SMADs) mit den R-SMADs um die Interaktion mit SMAD-4 konkurrieren. Auf der Ebene der Membran sind positive Regulationen durch Corezeptoren, sowie negative Beeinflussungen durch Pseudorezeptoren beschrieben. Für Referenzen siehe Haupttext. Mit der Erlaubnis von InTech verändert nach (Hellmann, T.V. et al. 2012).

Über welche SMAD-Mediatoren das Signal transduziert wird, obliegt dabei den aktivierten Typ I Rezeptoren. So werden durch die Typ I Rezeptoren Alk1 (Macias-Silva, M. et al. 1998; Chen, Y.G. und Massague, J. 1999), ActR-I (Alk2) (Chen, Y. et al. 1997; Macias-Silva, M. et al. 1998) sowie BMPR-IA (Alk3) und BMPR-IB (Alk6) (Hoodless, P.A. et al. 1996; Chen, Y. et al. 1997;

Kretzschmar, M. et al. 1997; Nishimura, R. et al. 1998) die SMAD Moleküle SMAD-1, -5 oder -8 aktiviert, während die Rezeptoren ActR-IB (Alk4), T β R-I (Alk5) (Macias-Silva, M. et al. 1996; Nakao, A. et al. 1997b; Persson, U. et al. 1997) und Alk7 (Watanabe, R. et al. 1999; Jornvall, H. et al. 2001) das Signal über SMAD-2 oder -3 vermitteln (für Übersichtsartikel: (Kretzschmar, M. und Massague, J. 1998; Moustakas, A. et al. 2001; Massague, J. et al. 2005; Schmierer, B. und Hill, C.S. 2007)). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Wachstumsfaktoren der BMP-2/4, der BMP-5/6/7 sowie der GDF-5/6/7 Subfamilien ihre Signale über SMAD-1, -5 oder -8 transduzieren, da diese Liganden die Typ I Rezeptoren ActR-I, BMPR-IA oder BMPR-IB aktivieren können (Übersichtsartikel: (Miyazono, K. et al. 2001; Miyazawa, K. et al. 2002; ten Dijke, P. und Hill, C.S. 2004; Feng, X.H. und Derynck, R. 2005)). Die Faktoren Activin A und Nodal vermitteln ihr Signal über ActR-IB und somit über die Mediatoren SMAD-2 oder -3, während die TGF- β Liganden sowohl den SMAD-2/3 Signalweg durch T β R-I, als auch den SMAD-1/5/8 Weg über Alk1 initiieren können (für eine Übersicht: (Miyazono, K. et al. 2001; Miyazawa, K. et al. 2002; ten Dijke, P. und Hill, C.S. 2004; Feng, X.H. und Derynck, R. 2005)).

Die inhibitorischen SMAD-Faktoren, SMAD-6 und -7, blockieren die Signalweiterleitung indem sie entweder mit der Rezeptor/R-SMAD- oder der R-SMAD/Co-SMAD-Interaktion konkurrieren (siehe Abbildung 9) ((Imamura, T. et al. 1997; Nakao, A. et al. 1997a); für eine Übersicht: (Massague, J. et al. 2005)). Neben dem SMAD-Signalweg können auch SMAD-unabhängige Signaltransduktionsketten, beispielsweise der MAPK- oder ERK-Weg, initiiert werden (Übersichtsartikel siehe: (Moustakas, A. und Heldin, C.H. 2005; Zhang, Y.E. 2009)).

Spezifität und Promiskuität der Ligand-Rezeptor Interaktionen

Da die TGF- β Superfamilie mehr als 30 Mitglieder umfasst, diese aber ihr Signal lediglich über sieben unterschiedliche Typ I sowie nur fünf verschiedene Typ II Rezeptoren generieren können, wechselwirkt ein Rezeptor gewöhnlich mit mehr als einem Liganden (siehe Tabelle 1; Übersichtsartikel siehe: (Nickel, J. et al. 2009)). Überdies interagieren aber die meisten Liganden der TGF- β Superfamilie auch mit mehr als nur einem Rezeptor aus beiden Rezeptorsubklassen (Übersichtsartikel siehe: (Nickel, J. et al. 2009)). Aufgrund dieser Besonderheit liegt ein besonderes Augenmerk auf der Aufklärung der molekularen Mechanismen, die einerseits die Promiskuität der Rezeptor-Ligand-Interaktionen ermöglichen sowie andererseits für deren Signalspezifität sorgen ((Kotzsch, A. et al. 2008; Kotzsch, A. et al. 2009; Harth, S. et al. 2010); für eine Übersicht siehe auch: (Mueller, T.D. und Nickel, J. 2012)).

1. Einleitung

Tabelle 1: Spezifität und Promiskuität der Rezeptor-Ligand-Interaktionen der TGF- β Superfamilie. Dargestellt sind die Interaktionspräferenzen von TGF- β Liganden mit den entsprechenden Typ I bzw. Typ II Rezeptoren (Übersichtsartikel: (Nickel, J. et al. 2009)).

Alk1 T β RI	niedrig ←	TGF- β 1, 2, 3	hoch →	T β RII
T β RI ActR-IB	niedrig ←	GDF-8, -11	hoch →	ActR-II ActR-IIB
ActR-IB	niedrig ←	Activin A Inhibin	hoch →	ActR-II ActR-IIB
ActR-I	niedrig ←	BMP-6, -7	hoch →	ActR-II ActR-IIB
BMPR-IA BMPR-IB	hoch ←	BMP-2, -4 GDF-5	niedrig →	ActR-II ActR-IIB BMPR-II

Neben dem Anti-Müller-Hormon Typ II Rezeptor (AMHR-II), welcher exklusiv mit AMH interagiert (Mishina, Y. et al. 1996), weist auch der T β RII eine eingeschränkte Promiskuität auf und wechselwirkt nach bisherigen Erkenntnissen lediglich mit den drei Mitgliedern der TGF- β -Ligandenfamilie ((Lin, H.Y. et al. 1992; Wrana, J.L. et al. 1992); für Übersichtsartikel: (Heldin, C.H. et al. 1997; Shi, Y. und Massague, J. 2003)). Hingegen verfügen die Activin Typ II Rezeptoren ActR-II sowie ActR-IIB über eine duale Wirkungsweise und interagieren sowohl mit Activin-Liganden, als auch mit Mitgliedern der BMP- und GDF-Familien (Nagaso, H. et al. 1999); für eine Übersicht: (Nickel, J. et al. 2009; Mueller, T.D. und Nickel, J. 2012)). Diese Eigenschaften der Activin Typ II Rezeptoren machte sie zu einem idealen Modell zur Untersuchung der molekularen Mechanismen, welche zu promisken sowie spezifischen Interaktionen führen (Greenwald, J. et al. 2003; Thompson, T.B. et al. 2003; Allendorph, G.P. et al. 2006; Weber, D. et al. 2007). Für eine Erklärung dieser molekularen Grundlagen wird basierend auf den vorhandenen Kristallstrukturen von Rezeptor-Ligand-Interaktionen der TGF- β Superfamilie aktuell das sogenannte Prinzip des *hot spot of binding* (Clackson, T. und Wells, J.A. 1995) herangezogen (für eine Übersicht: (Mueller, T.D. und Nickel, J. 2012)). Nach diesem Modell wird der Hauptteil der Bindungsenergie einer Protein-Protein-Interaktion durch einige wenige Aminosäurereste im Zentrum der Kontaktfläche erzeugt, während Wechselwirkungen durch Aminosäurereste in der Peripherie des Epitops hauptsächlich eine Abschirmung der Hauptbindedeterminanten gegen die Umgebung und das Lösungsmittel bewirken (Clackson, T. und Wells, J.A. 1995; Bogan, A.A. und Thorn, K.S. 1998). So trug beispielsweise die Strukturanalyse eines ternären Rezeptor-Ligandkomplexes zur Aufklärung der molekularen Eigenschaften bei, welche ursächlich für die spezifische hochaffine Interaktion der Activine mit ActR-IIB sind ((Weber, D. et al. 2007); für einen Übersichtsartikel: (Mueller, T.D. und Nickel, J.

2012)). D. Weber und Kollegen erreichten 2007 durch den gezielten Austausch von zwei Aminosäureresten innerhalb der ActR-IIB/BMP-2 Kontaktfläche gegen die entsprechenden Aminosäurereste von Activin A die energetische Aktivierung einer Wasserstoffbrückenbindung und somit eine Übertragung der hochaffinen ActR-II Bindungseigenschaften von Activin A auf BMP-2 (Weber, D. et al. 2007).

Weitere strukturelle Analysen deckten auch den *hot spot* der hochaffinen Interaktion von BMP-2 und BMPR-IA auf (Keller, S. et al. 2004). Hierfür zeichnet die Ausbildung einer zweizähligen Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Aminosäureresten Leu51 (BMP-2) und Gln86 (BMPR-IA) verantwortlich, welche durch zusätzliche Wasserstoffbrücken in der Peripherie stabilisiert und von dem umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt wird (Keller, S. et al. 2004). Während BMP-2 promisk und mit nahezu identischer Affinität sowohl mit BMPR-IA als auch mit BMPR-IB interagiert, zeigt GDF-5 eine Bindungspräferenz gegenüber BMPR-IB (Nickel, J. et al. 2005). Diese Spezifität beruht auf der Varianz eines einzelnen Aminosäurerestes (GDF-5: Arg57; BMP-2: Ala52) innerhalb des Ligand/Typ I Rezeptorbindeepitops (Nickel, J. et al. 2005). Während eine Schleifendomäne des BMPR-IB Rezeptors eine Konformation einnimmt, in welche die voluminöse Arginin-Seitenkette des TGF- β Liganden eingebettet werden kann, wird dieses in der GDF-5/BMPR-IA Interaktion verhindert, was eine sterische Hinderung zur Folge hat (Kotzsch, A. et al. 2009). Durch vergleichende strukturelle Analysen der löslichen BMPR-IA Ektodomäne (Klages, J. et al. 2008) sowie des Typ I Rezeptors gebunden an unterschiedliche Liganden oder Antikörper (Kirsch, T. et al. 2000c; Keller, S. et al. 2004; Allendorph, G.P. et al. 2006; Weber, D. et al. 2007; Harth, S. et al. 2010) konnte gezeigt werden, dass strukturelle Flexibilität für die promisk Interaktionen von BMPR-IA verantwortlich zeichnet (als Übersichtsartikel siehe: (Mueller, T.D. und Nickel, J. 2012)).

Diese Beispiele verdeutlichen, wie molekulare Mechanismen zu einer Ausbildung von Spezifität sowie Promiskuität in der TGF- β Superfamilie beitragen können. Darüber hinaus trägt auch die Generierung eines genau abgestimmten zeitlichen sowie räumlichen Expressionsmusters bestimmter Liganden und ihrer Rezeptoren während der Embryogenese zu einer spezifischen Signalweiterleitung bei. Dieses wurde bereits unter Punkt 1.1 bei der Betrachtung der Extremitätenentwicklung angesprochen. In diesem Zusammenhang konnten Dathe et al. (2009) mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen zeigen, dass beispielsweise GDF-5 spezifisch in Bereichen der Knorpelentwicklung sowie zukünftiger Gelenke hoch exprimiert wird und sich dieses Muster mit dem Rezeptor BMPR-IB überschneidet. Hingegen konnte BMP-2 in diesem Kontext zu allen analysierten Entwicklungsstadien überwiegend in mit GDF-5 nicht-überlappenden Bereichen nachgewiesen werden und der Rezeptor BMPR-IA zeigte ein gleichmäßig über die gesamte

Extremitätenknospe verteiltes Expressionsmuster (Dathe, K. et al. 2009). Obwohl bei gleichzeitiger Expression das GDF-5 Signal über beide Typ I Rezeptoren transduziert werden sollte, weisen BMPR-IB Deletionen in Mäusen Knochen- und Knorpelphänotypen auf, welche denen von GDF-5 Nullmutationen ähneln (Storm, E.E. und Kingsley, D.M. 1996; Yi, S.E. et al. 2000). Während BMPR-IA defiziente Mäuse sehr früh in der Entwicklung sterben, zeigen solche mit einer Gelenk-spezifischen konditionellen BMPR-IA Gendeletion eine normale Anlage der Gelenke, welche jedoch später in der Entwicklung einen Osteoarthritis-ähnlichen Phänotyp entwickeln (Rountree, R.B. et al. 2004). Weiterhin konnte eine zeitliche Komponente der Typ I Rezeptorexpression in gesundem humanen sowie in osteoarthritischem Knorpelgewebe aufgezeigt werden. So wird BMPR-IA nicht nur embryonal (Storm, E.E. und Kingsley, D.M. 1996; Dathe, K. et al. 2009) sondern auch in adultem normalen sowie arthritischen humanen Knorpelgewebe exprimiert (Chen, A.L. et al. 2004; Bobinac, D. et al. 2008). Hingegen zeigt BMPR-IB zwar eine Knorpel-spezifische Expression während der Gelenkentwicklung (Storm, E.E. und Kingsley, D.M. 1996; Dathe, K. et al. 2009), wird jedoch in gesundem adulten sowie Osteoarthritis-Knorpelgewebe nicht oder nur sehr niedrig exprimiert (Chen, A.L. et al. 2004; Bobinac, D. et al. 2008). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass GDF-5 im Kontext der Knorpel- und Gelenkentwicklung des Autopods sein Signal über den Rezeptor BMPR-IB vermittelt, während eine Signaltransduktion über BMPR-IA eine Rolle in der Reparatur sowie der Homöostase des adulten Knorpelgewebes spielt.

Regulation der Signalspezifität mittels extrazellulärer und intrazellulärer Modulatoren

Um die Promiskuität der Ligand-Rezeptor Interaktion in der TGF- β Superfamilie zu verringern oder aber dennoch Liganden-spezifische Signale im zellulären Kontext zu ermöglichen, wird die Signaltransduktion durch diverse extrazelluläre sowie intrazelluläre Modulatoren (fein-) reguliert.

Intrazellulär kann die Signalkaskade zum Beispiel durch die I-SMADs, SMAD-6 und -7, negativ reguliert werden. Diese konkurrieren mit den R-SMADS um die Bindung an die Rezeptoren sowie an den *common-mediator* SMAD-4 (siehe Abbildung 9) (für eine Übersicht: (Massague, J. 1998; Massague, J. et al. 2005)). Zudem rekrutieren die I-SMADs die E3-Ubiquitin-Ligasen Smurf 1 und 2, welche die aktivierten Typ I Rezeptoren sowie R-SMADS und Co-SMADS ubiquitinieren und somit deren Degradation initiieren (für Übersichtsartikel siehe: (Moustakas, A. et al. 2001; Attisano, L. und Wrana, J.L. 2002; Balemans, W. und Van Hul, W. 2002; Moustakas, A. und Heldin, C.H. 2008)). Die SMAD-Signalmoleküle werden außerdem durch negative Rückkopplungsmechanismen reguliert. Hierbei werden durch die Hochregulation der SMAD-Expression gleichzeitig transkriptionelle Corepressoren wie c-Ski und SnoN rekrutiert, die die

SMAD-Transkription inhibieren (für eine Übersicht: (ten Dijke, P. und Hill, C.S. 2004; Itoh, S. und ten Dijke, P. 2007)). Diese intrazelluläre Regulation der TGF- β Signaltransduktion ermöglicht jedoch keine Liganden-spezifische Modulation.

Innerhalb der TGF- β Liganden (TGF- β 1, 2, 3) übernimmt auch die Prodomäne eine wichtige regulatorische Rolle (für Details siehe Abschnitt 1.2). Kürzlich gelang die strukturelle Aufklärung des Komplexes aus TGF- β 1 inklusive seines Propeptids, was die molekulare Aufklärung dieses Regulationsprozesses ermöglicht: im gebundenen Zustand verdeckt die Prodomäne sowohl das Typ I, als auch das Typ II Rezeptorbindeepitop und unterbindet dadurch eine Interaktion des Liganden mit den Rezeptorkinasen (Shi, M. et al. 2011). Möglicherweise werden Löslichkeit und auch Diffusionsreichweite des Liganden durch die Komplexbildung mit seinem Propeptid erhöht und somit die biologische Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren reguliert (Hillger, F. et al. 2005; Sengle, G. et al. 2008; Sengle, G. et al. 2011; Shi, M. et al. 2011).

Die Spezifität des Signals von Liganden der TGF- β Familie wird zudem auch durch die Interaktion mit extrazellulären Modulatorproteinen beeinflusst. Hier zeichnet sich die TGF- β Superfamilie durch eine enorme Vielfalt unterschiedlicher Faktoren aus, welche die Aktivität der TGF- β Liganden in der Regel über die Erniedrigung der lokalen Konzentration negativ regulieren (Balemans, W. und Van Hul, W. 2002; Canalis, E. et al. 2003; Walsh, D.W. et al. 2010). Trotz fehlender struktureller Ähnlichkeiten der Antagonisten untereinander konnte die Strukturanalyse einiger dieser Modulatoren in Komplexen mit verschiedenen Liganden einen gleichartigen Mechanismus für die Inhibition mittels Maskierung beider Rezeptorbindeepitope aufzeigen (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10) (Groppe, J. et al. 2003; Thompson, T.B. et al. 2005; Harrington, A.E. et al. 2006; Zhang, J.L. et al. 2008; Cash, J.N. et al. 2009). Abbildung 10 zeigt beispielhaft die Struktur von Noggin gebunden an BMP-7 (Groppe, J. et al. 2003) sowie der von Willebrand Typ C Domäne (vWC1) aus Crossveinless 2 gebunden an BMP-2 (Zhang, J.L. et al. 2008). Beide Antagonisten blockieren sowohl das Typ I Rezeptorbindeepitop mittels eines N-terminalen Peptidsegmentes, welches als *clip* bezeichnet wird, als auch das Typ II Rezeptorbindeepitop mit Hilfe einer antiparallelen β -Faltblattstruktur (Noggin: C-terminale Fingerdomäne; vWC1: Subdomäne 1), die jedoch keine Ähnlichkeit mit der Typ II Rezeptorstruktur aufweist.

1. Einleitung

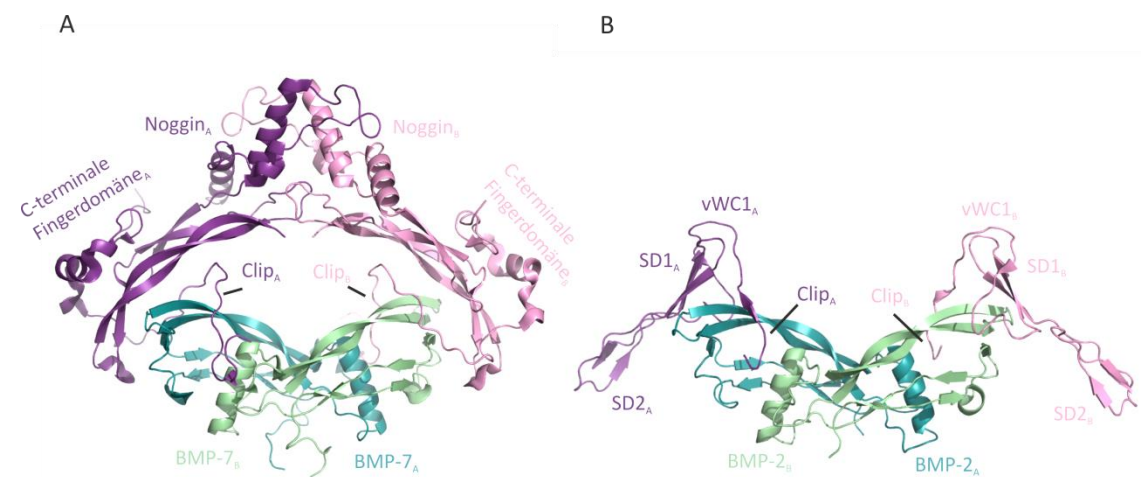


Abbildung 10: Strukturen beispielhafter BMP-Ligand/Antagonist Komplexe. A) Komplex des dimeren Antagonisten Noggin gebunden an BMP-7. Die C-terminalen Fingerdomänen interagieren mit dem *knuckle* Epitop von BMP-7 und blockieren so dessen Bindung an die Typ II Rezeptoren. Die *clip*-Domänen verhindern zusätzlich die Interaktion des Liganden mit Typ I Rezeptoren (PDB-Datei 1M4U) (Groppe, J. et al. 2003). B) Komplex aus zwei vWC1-Domänen von Crossveinless-2 gebunden an BMP-2 zeigt einen ähnlichen Blockademechanismus für die Ligand-Rezeptorinteraktion. Die β -Faltblattstrukturen der SD1-Domäne interagieren mit dem *knuckle* Epitop, während die *clip*-Domänen die Typ I Rezeptorbindung unterbinden (PDB Datei 3BK3) (Zhang, J.L. et al. 2008).

Die TGF- β Signaltransduktion kann auch auf Membranebene reguliert werden. BAMBI (*BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor*) ist ein transmembranäres Protein, dessen Aminosäuresequenz im extrazellulären Bereich der von TGF- β Typ I Rezeptoren ähnelt (Onichtchouk, D. et al. 1999). Literaturdaten haben gezeigt, dass BAMBI mit Typ I und Typ II TGF- β Rezeptoren einen Komplex bildet, aufgrund einer fehlenden intrazellulären Kinasedomäne fungiert BAMBI allerdings als inhibierender Pseudorezeptor. Interessanterweise gilt BAMBI als genereller Antagonist sowohl für BMP als auch Activin Liganden (Onichtchouk, D. et al. 1999). Die Expression dieses Inhibitors wird in einer Rückkopplungsschleife sowohl durch TGF- β -, BMP- als auch Wnt-Signale induziert (Grotewold, L. et al. 2001; Sekiya, T. et al. 2004a; Sekiya, T. et al. 2004b). Zusätzlich zu seiner Funktion als Pseudorezeptor konnten X. Yan et al. (2009) zeigen, dass BAMBI einen ternären Komplex mit dem Typ I Rezeptor ALK5 sowie SMAD-7 eingeht und dadurch eine Aktivierung des Rezeptor-regulierten SMAD-3 verhindert.

Obwohl die Mehrzahl der Regulationsmechanismen die TGF- β Signale negativ regulieren, gibt es auch aktivierende Wechselwirkungen durch membranständige Agonisten. Endoglin ist ein homodimeres Glykoprotein, mit einer großen Extrazellulärdomäne, einem einzelnen Transmembranbereich sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne und wird vor allem in vaskulären Endothelzellen exprimiert (Gougos, A. und Letarte, M. 1988; Gougos, A. und Letarte, M. 1990). Intrazellulär verfügt Endoglin über keine enzymatisch aktiven Domänen jedoch über zahlreiche Serin- sowie Threonin-Aminosäurereste, die durch die TGF- β Rezeptorkinasen ALK5

und T β RII phosphoryliert werden können (Guerrero-Esteo, M. et al. 2002). Für die Interaktion mit den Liganden muss der Corezeptor Endoglin mit T β RII assoziiert sein. Endoglin bindet zudem spezifisch an die TGF- β Liganden TGF- β 1 und 3, jedoch nicht an TGF- β 2 und kann auf diese Weise Isotyp-spezifische Signale vermitteln (Letamendia, A. et al. 1998; Barbara, N.P. et al. 1999). In Endothelzellen können TGF- β Liganden Signale einerseits über den Typ I Rezeptor ALK5 und dann intrazellulär über die R-SMADs-2 und -3 transduzieren oder aber über den Rezeptor ALK1, was zur Aktivierung der R-SMADs-1 und -5 führt (Goumans, M.J. et al. 2002). Während durch eine Signalweiterleitung über ALK1 sowohl Zellproliferation als auch -migration induziert werden, werden diese Mechanismen bei einer Aktivierung von ALK5 inhibiert (Goumans, M.J. et al. 2002). In diesem Kontext begünstigt Endoglin eine Transduktion des TGF- β Signals über den Rezeptor ALK1 und inhibiert gleichzeitig den ALK5 Signalweg, wodurch dieser Corezeptor bei der Regulation der Proliferation der Endothelzellen entscheidend mitwirkt (Lebrin, F. et al. 2004). Ein weiteres Beispiel eines Corezeptors für bestimmte Mitglieder der TGF- β Superfamilie stellt das extrazelluläre, GPI-verankerte Protein Cripto, ein Mitglied der EGF-CFC Proteinfamilie dar (Saloman, D.S. et al. 2000). Während der Embryogenese wirken diese Proteine bei der Regulation der Mesoderm- und Endoderminduktion sowie bei der Etablierung der Links-Rechts- und der Anterior-Posterior-Achse mit (Schier, A.F. 2003; Shen, M.M. 2007). Cripto reguliert dabei Mitglieder der TGF- β Superfamilie auf gegensätzliche Weise. Während es den Liganden Nodal, GDF-1, GDF-3 sowie Vg-1 als essentieller Corezeptor die Signaltransduktion über die Rezeptoren ALK4/ActR-IIb ermöglicht (Cheng, S.K. et al. 2003; Schier, A.F. 2003; Chen, C. et al. 2006), inhibiert die Bindung von Cripto an die Liganden TGF- β 1 und Activin deren Signalweiterleitung (Adkins, H.B. et al. 2003; Gray, P.C. et al. 2003). Die zuvor vorgestellten membranständigen Modulatoren regulieren vor allem SMAD-2/3 Signaltransduktionen (Ausnahme: Endoglin auch SMAD-1/5/8 über ALK1 (Goumans, M.J. et al. 2002)), indem sie mit Liganden der TGF- β -, der Activin-/Nodal- und auch der GDF-Subfamilie interagieren. Hingegen konnte die Arbeitsgruppe um T. A. Samad im Jahre 2005 den ersten Corezeptor charakterisieren, der exklusiv die SMAD-1/5/8-Signalkaskade über die Wechselwirkung mit Liganden der BMP-Unterfamilie moduliert (Samad, T.A. et al. 2005).

1.5. DIE COREZEPTOREN DER REPULSIVE GUIDANCE MOLECULE-FAMILIE

Die Familie der *Repulsive Guidance Molecules* (RGM) wurde zunächst aufgrund ihrer neuronalen Funktionen in einem nicht mit BMPs stehenden Zusammenhang identifiziert. Namensgebend war dabei die Entdeckung eines GPI-verankerten Glykoproteins im optischen System des Huhns, welches die Projektion von Axonen temporaler retinaler Ganglienzellen durch repulsive Signale zu spezifischen Bereichen des optischen Tectums leitet und demnach als RGM bezeichnet wurde

1. Einleitung

(Monnier, P.P. et al. 2002). Sequenzvergleiche führten daraufhin zu der Isolierung von drei orthologen Genen der Maus, welche folglich RGMa, RGMb (auch Dragon) und RGMc (auch Hemojuvelin oder Hfe2) benannt wurden (Niederkofler, V. et al. 2004; Oldekamp, J. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004). Murines RGMa (mRGMa) weist mit 80%iger Identität bei Vergleich der Aminosäuresequenzen die größte Ähnlichkeit zu RGM aus dem Huhn (cRGM) auf, während die Aminosäuresequenz von mRGMb zu 50% und von mRGMc zu 42% mit der von cRGM übereinstimmt (Niederkofler, V. et al. 2004). Die drei RGMs sind somit hochkonserviert und es konnten homologe Gene im Genom des Menschen sowie in den Modellorganismen Ratte (*R. norvegicus*), Zebrafisch (*D. rerio*) und Krallenfrosch (*X. laevis*) nachgewiesen werden, während im Fadenwurm (*C. elegans*) hingegen lediglich ein Vertreter gefunden wurde (Samad, T.A. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004).

Alle Mitglieder der RGM Familie teilen zudem mehrere strukturelle Merkmale (siehe Abbildung 11). So verfügen sie über eine N-terminale Signalpeptidsequenz, bioinformatische Analysen deuten zudem auf die Existenz einer partiellen von Willebrand Faktor D (vWF-Typ D) Domäne hin, welche eine konservierte säurelabile proteolytische Spaltstelle beinhaltet (Monnier, P.P. et al. 2002; Niederkofler, V. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004). Alle RGM Proteine sind zudem reich an Cysteinresten und werden durch eine C-terminale GPI-Ankerdomäne charakterisiert, die eine Verankerung der Corezeptoren in der Membran erlaubt (Monnier, P.P. et al. 2002; Niederkofler, V. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004).

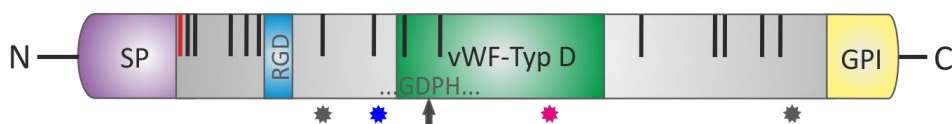


Abbildung 11: Schematische Darstellung der molekularen Architektur der RGMs. N-terminal ist das Signalpeptid (SP) lokalisiert, während sich am C-terminalen Ende die GPI-Ankerdomäne (GPI) anfügt. Für eine mögliche Interaktion mit Integrinen verfügen RGMa und RGMc über eine RGD-Sequenz. Alle RGMs weisen eine partielle vWF-Typ D-Domäne auf, die eine säurelabile Spaltstelle enthält (Pfeil). Die schwarzen Striche stellen die Positionen konservierter Cysteine dar, während die rote Linie ein zusätzliches Cystein des RGMb Moleküls kennzeichnet. Die Sterne geben die Positionen potentieller N-Glykosylierungsstellen innerhalb der RGMs an (grau: konserviert, blau: spezifisch für hRGMa, magenta: spezifisch für hRGMc).

Zudem verfügen RGMa und RGMc über ein sogenanntes RGD-Motiv, welches für Integrininteraktionen wichtig ist und möglicherweise eine Rolle in der Integrin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion spielt (Monnier, P.P. et al. 2002; Niederkofler, V. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004). Die Aminosäuresequenzen von humanem RGMa (hRGMa) sowie hRGMc

beinhalten jeweils drei potentielle N-Glykosylierungsstellen, während hRGMb nur zwei dieser Sequenzmotive besitzt (Niederkofler, V. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004).

Untersuchungen des Expressionsmusters für die drei RGM-Familienmitglieder wiesen für RGMA und RGMb zunächst auf ein weitgehend auf das zentrale Nervensystem begrenztes Expressionsmuster hin, wobei beide Faktoren zudem in überwiegend nicht überlappenden Bereichen gefunden wurden (Niederkofler, V. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004). Später konnte eine Expression von RGMA und RGMb auch außerhalb neuronaler Gewebe gezeigt werden. So wurde RGMA während der embryonalen Entwicklung der Maus in Bereichen der Cochlea, der Lunge, der Extremitätenknospen (Oldekamp, J. et al. 2004) und des Darms (Metzger, M. et al. 2005) nachgewiesen. In adulten Ratten zeigte sich dagegen eine RGMA Expression in Herz-, Gehirn-, Lunge-, Leber-, Haut-, Nieren-, Hoden- (Babitt, J.L. et al. 2005) sowie in adultem murinen Darmgewebe (Metzger, M. et al. 2005). RGMb konnte während der murinen embryonalen Entwicklung in Knorpelkondensationen von Extremitätenknospen, in Geweben des Pankreas, der Lunge und des Verdauungstraktes nachgewiesen werden (Oldekamp, J. et al. 2004). Adulte Mäuse zeigten RGMb Expressionen in Geweben des Fortpflanzungstrakts wie Hoden, Nebenhoden, Ovarien, Uterus und der Hypophyse (Xia, Y. et al. 2005), während dieser Corezeptor bei Untersuchungen postnataler Ratten zudem im Herzen sowie in Leber und Niere gefunden wurde (Babitt, J.L. et al. 2005). Im Gegensatz dazu konnte RGMc in unterschiedlichen Spezies in embryonalen sowie adulten Geweben der gestreiften Skelettmuskulatur, des Myokards und der Leber detektiert werden (Niederkofler, V. et al. 2004; Papanikolaou, G. et al. 2004; Samad, T.A. et al. 2004). Zusätzlich dazu wiesen Studien RGMc in der Lunge und in Geweben des Verdauungstraktes nach (Rodriguez Martinez, A. et al. 2004; Rodriguez, A. et al. 2007). Kürzlich konnte auch eine Expression aller RGM-Familienmitglieder in Chondrozyten in vivo und in Zellkultur nachgewiesen werden, was eventuell auf eine Funktion der RGMs während der endochondralen Knochenentwicklung hindeutet (Zhou, Z. et al. 2010).

Funktionelle Charakterisierung der RGMs

RGMA

Trotz der namensgebenden repulsiven Eigenschaften auf das Wachstum von Axonen temporärer retinaler Ganglienzellen durch cRGM in vitro, konnte die Analyse von RGMA-defizienten Mäusen zunächst keinen Hinweis auf eine gleichartige Funktion bei der Sehnerventwicklung in der Maus in vivo aufzeigen (Monnier, P.P. et al. 2002; Niederkofler, V. et al. 2004). Stattdessen wiesen etwa 50% der Deletionsstudien-Mäuse einen exenzephalen Phänotyp auf, was auf eine Rolle von RGMA während des Schließens des Neuralrohres hinweist (Niederkofler, V. et al. 2004).

Später wies eine *in vivo* Studie in Hühnerembryonen jedoch nach, dass eine verminderte RGMA Expression die Projektion der retinotektalen Axone stört und RGMA zudem die neuronale Differenzierung unterstützt (Matsunaga, E. et al. 2006). Die neuronalen Funktionen von RGMA könnten daher möglicherweise Spezies-spezifisch sein. Die Arbeitsgruppe um S. Rajagopalan zeigte weiterhin, dass Neogenin - ein mit DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) verwandtes Transmembranprotein - als Rezeptor für RGMA fungieren kann und die chemotaktische Funktion vermittelt (Rajagopalan, S. et al. 2004). Zudem unterbindet RGMA durch die Bindung an den sogenannten *dependence* Rezeptor Neogenin dessen pro-apoptotische Wirkung und reguliert so das Überleben neuronaler Zellen (Matsunaga, E. et al. 2004). Weiterhin wurde RGMA in Verbindung mit einer Regeneration von Axonen nach Verletzungen des Zentralnervensystems gebracht, da eine RGMA Expression im Bereich von Läsionen des Rückenmarks sowie nach Schlaganfällen induziert wird (Hata, K. et al. 2006). In der Tat verstärkt eine Inhibition der RGMA Funktion in diesen Bereichen mittels eines neutralisierenden Antikörpers die anatomische und funktionelle Regeneration der Axone des Rückenmarks (Hata, K. et al. 2006).

RGMc/Hemojuvelin/Hfe2

Unabhängig zur Identifizierung als Homolog zu RGMA und RGMb wurde das RGMc Gen als Locus für die autosomal-rezessive Krankheit Hämochromatose (OMIM #235200) ermittelt und sein Proteinprodukt entsprechend Hemojuvelin benannt (Niederkofler, V. et al. 2004; Oldekamp, J. et al. 2004; Papanikolaou, G. et al. 2004; Samad, T.A. et al. 2004). Hämochromatose ist eine Störung des Eisenstoffwechsels, die zu einer krankhaften Akkumulation von Eisen in Herz, Leber, Haut und in den Gelenken führt (für einen Übersichtsartikel: (Siddique, A. und Kowdley, K.V. 2012)). Der direkte Zusammenhang zwischen RGMc und der Störung der Eisenhomöostase wurde durch die Analyse von RGMc-Deletions-Mausmodellen unterstützt, in denen RGMc defiziente Mäuse ebensolche pathologischen Eisenanhäufungen aufwiesen (Huang, F.W. et al. 2005; Niederkofler, V. et al. 2005). So konnte zunächst mit Hilfe von siRNA-Studien gezeigt werden, dass RGMc die Expression von Heparin, dem Eisenstoffwechsel-Schlüsselregulatorhormon (Ganz, T. 2005), reguliert (Lin, L. et al. 2005). Heparin wird in der Leber synthetisiert und in den endokrinen Kreislauf sekretiert (Park, C.H. et al. 2001). Das Peptidhormon verstärkt die Internalisierung und anschließende Degradation des Eisenexporterproteins Ferroportin in eisenspeichernden Zellen, wodurch die Akkumulation von Eisen im Darm und die Freisetzung von Eisen aus Makrophagen inhibiert wird (Nemeth, E. et al. 2004). Während GPI-verankertes RGMc die Heparin-Transkription verstärkt, wird sie durch lösliches RGMc in Zellkulturen menschlicher Hepatozyten negativ beeinflusst (Lin, L. et al. 2005). BMP-Signale erhöhen dabei die Heparinexpression (Wang, R.H. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Truksa, J. et al. 2006; Babitt, J.L. et al. 2007; Verga Falzacappa, M.V. et al. 2008). Dies ist

wahrscheinlich dadurch bedingt, dass RGMc als endogener Rezeptor für BMP-6 wirken kann und somit eine wichtige regulative Rolle in der Eisenhomöostase in vivo einnimmt (Andriopoulos, B., Jr. et al. 2009).

RGMb/Dragon

Unabhängig von der Identifikation des RGMb-Gens als Homolog zu RGMa (Niederkofler, V. et al. 2004; Oldekamp, J. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004) untersuchte eine weitere Studie dieses Gen und zeigte, dass dessen Expression durch den Transkriptionsfaktor DRG11 induziert („angeschaltet“) wird, was zu dem alternativen Namen Dragon (von DRG und „on“) führte (Samad, T.A. et al. 2004). Im Gegensatz zu RGMa konnte für RGMb keine Rolle in der Chemotaxis von Axonen dorsaler Ganglienzellen nachgewiesen werden. Hingegen detektierten T. A. Samad und Kollegen eine verstärkte Adhäsion kultivierter dorsaler Ganglienzellen an RGMb-überexprimierende HEK-Zellen, was auf eine Rolle von RGMb in der Zell-Zell-Adhäsion hinweisen könnte (Samad, T.A. et al. 2004). Wie im Falle von RGMa wird auch die RGMb-Expression in den umgebenden nervalen Bereichen nach Verletzung des Rückenmarks hochreguliert und inhibiert die axonale Regeneration (Liu, X. et al. 2009). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass RGMb, zusätzlich zu RGMa, eine Rolle in der funktionellen nervalen Wiederherstellung nach Läsionen des Zentralnervensystems einnehmen könnte und dass diese Funktionen zusammen mit Neogenin über die Rho-Kinase-Signalkaskade transduziert wird (Liu, X. et al. 2009). Interaktionen zwischen RGMb (Liu, X. et al. 2009) sowie auch RGMa (Endo, M. und Yamashita, T. 2009) mit Neogenin führen in neuronalen Wachstumskegeln zu einer Aktivierung des Rho-Kinase Signalwegs und zur Inaktivierung von Ras-Signalen. Neben diesen potentiellen neuronalen Funktionen konnte die Untersuchung Neogenin-defizienter Mäuse kürzlich eine mögliche regulative Rolle dieses Rezeptors zusammen mit den RGMs sowie BMP-Wachstumsfaktoren in der Chondrogenese zeigen (Zhou, Z. et al. 2010). So wiesen diese Mäuse eine beeinträchtigte Extremitätenentwicklung sowie endochondrale Ossifikation auf (Zhou, Z. et al. 2010). Eine weitere aktuelle Studie gibt Hinweise auf eine mögliche Rolle von RGMb in der Immunantwort: So wird das Protein in Makrophagen sehr stark exprimiert und beeinflusst in den Makrophagen-Zelllinien RAW264.7 und J774 die Expression des Zytokins IL-6 negativ (Xia, Y. et al. 2011).

Den RGM-Faktoren kommt scheinbar eine duale Funktion zu, da sie sowohl als Liganden des Rezeptors Neogenin fungieren (siehe beispielsweise (Rajagopalan, S. et al. 2004; Wilson, N.H. und Key, B. 2006; Liu, X. et al. 2009; Zhou, Z. et al. 2010)), als auch möglicherweise die BMP-Signaltransduktion in Form von Corezeptoren regulieren können (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006). Dieses soll im folgenden Abschnitt betrachtet werden.

Repulsive guidance molecules – Corezeptoren der BMP-Signaltransduktion?

Den ersten Hinweis auf eine mögliche signalmodulatorische Funktion der RGMs im Zusammenspiel mit BMP-Liganden wurde durch die Arbeitsgruppe um T. A. Samad im Jahre 2005 nach Analyse der Expressionsmuster von RGMb innerhalb des Zentralnervensystems der Maus sowie von *X. laevis* beschrieben. Hierbei entdeckten sie, dass RGMb in überlappenden Bereichen mit den BMP Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB sowie BMPR-II exprimiert wird (Samad, T.A. et al. 2005). Bei gleichzeitiger Expression eines BMP-responsiven Luciferase-Reportergenkonstruktes sowie eines RGMb-Expressionskonstruktes konnte hier gezeigt werden, dass die Expression des Luciferase-Reportergens erhöht ist. Eine zusätzliche Stimulation der Reporterexpression mittels BMP-2 bewirkte eine gegenüber nicht mit RGMb transfizierten Zellen nochmals verstärkte Genexpression (Samad, T.A. et al. 2005). Zudem zeigten die Autoren, dass RGMb-exprimierende Zellen bereits auf geringere BMP-Konzentrationen reagieren als untransfizierte Zellen und führte so zu der Hypothese, dass RGMb Zellen für ein BMP-Signal sensitiviert (Samad, T.A. et al. 2005; Xia, Y. et al. 2005). T. A. Samad und Kollegen konnten 2005 in ihrer Studie außerdem zeigen, dass die Funktion von RGMb (im Gegensatz zu beispielsweise dem Corezeptor Endoglin) hochspezifisch für die BMP-Familie ist, da der Corezeptor bei Verwendung eines TGF- β /Activin spezifischen SMAD-2/3 responsiven Reportergenkonstruktes keinen Einfluss auf dessen Expression aufwies. Bei ihrer Analyse der Wirksamkeit zeigten sie, dass lösliches RGMb-Fc-Fusionsprotein in einem zellfreien System zwar direkt mit BMP-2 und BMP-4, jedoch nicht mit BMP-7, TGF- β 1, 2, 3 oder Activin A interagiert (Samad, T.A. et al. 2005). Mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationsversuchen konnten zudem Hinweise auf eine direkte Bindung von RGMb mit den Typ I Rezeptoren ALK2, -3 und -6 und den Typ II-Rezeptoren BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB erhalten werden (Samad, T.A. et al. 2005). Ein widersprüchlicher Mechanismus wurde bei dem Vergleich der Eigenschaften von membranständigem mit löslichem RGMb erhalten. So führt membranverankertes RGMb zu einer Verstärkung des BMP-induzierten Signals bei sehr niedrigen Ligandenkonzentrationen, während für lösliches RGMb-Fc-Fusionsprotein eine Hemmung der BMP Aktivität beschrieben wurde (Samad, T.A. et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse wurden in Studien beobachtet, die die Auswirkungen von RGMa und RGMc auf den BMP-Signalweg analysierten (siehe beispielsweise: (Babitt, J.L. et al. 2005; Lin, L. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Babitt, J.L. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2007; Andriopoulos, B., Jr. et al. 2009)). Dies deutet auf eine Rolle der RGM-Proteine als spezifische Corezeptoren der BMP-Liganden hin, deren Signalmodulation von ihrer Expression als lösliche Domäne oder als membranständiges Protein abhängt. Versuche mit dominant-negativen Typ I Rezeptorkonstrukten zeigten, dass das BMP-Signal in Gegenwart der RGMs über die Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB sowie intrazellulär über den SMAD-1/5/8 Weg vermittelt

wird (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006). Zudem wurde als Mechanismus für die Signalverstärkung vorgeschlagen, dass die BMP-Liganden vermittelt über die RGM Proteine zusätzlich zu der bevorzugten Nutzung des Typ II Rezeptors BMPRII auch über ActRII signalisieren können (Xia, Y. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2008; Xia, Y. et al. 2010).

Neben diesen BMP-aktivierenden Beeinflussungen finden sich in der Literatur auch Daten, welche RGMb eine antagonisierende Funktion in der BMP Signaltransduktion zuweisen (Kanomata, K. et al. 2009). So konnten K. Kanomata und Kollegen (2009) in der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 eine Inhibition der BMP Signalkaskade durch RGMb beobachten. Co-Transfektionen von RGMb zusammen mit konstitutiv aktiven Typ I Rezeptoren resultierten in einer im Vergleich zu Kontrollzellen verringerten Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP), eines Markerproteins für die Differenzierung zu Osteoblasten (Kanomata, K. et al. 2009). Dieser Effekt ist für RGMb spezifisch, da bei Co-Transfektionen mit RGMa oder RGMc der BMP-Signalweg nicht negativ beeinflusst wurde (Kanomata, K. et al. 2009). Diese Inhibition scheint eine direkte Auswirkung von RGMb auf die Ligand/Rezeptorwechselwirkung zu sein, da C2C12 Zellen, die mit einem Expressionsvektor für RGMb und einem BMP-responsiven Reportergenkonstrukt transfiziert wurden, nach Stimulation mit BMP-4 eine im Vergleich mit Kontrollzellen niedrigere Reporterexpression aufwiesen (Kanomata, K. et al. 2009). Im Gegensatz zu weiteren Studien konnten K. Kanomata und seine Kollegen (2009) mit Hilfe von RGMb Deletionsmutanten zeigen, dass die aktivierende oder inhibierende Funktion von RGMb nicht von seiner Expression als membranständiges oder lösliches (ohne GPI-Ankerdomäne) Protein abhängt. Die Autoren vermuten daher, dass RGMb in C2C12 Myoblasten einen Inhibitor des BMP-abhängigen Signals darstellen könnte und dass möglicherweise ein noch unbekannter Membranrezeptor für die Weiterleitung dieser RGMb-Funktion verantwortlich zeichnet (Kanomata, K. et al. 2009).

Diese kontroversen Studien verdeutlichen, dass der molekulare Mechanismus der RGM/BMP Interaktion noch weitestgehend unverstanden ist. Die verschiedenen RGM Formen generieren möglicherweise je nach dem vorherrschenden zellulären Kontext unterschiedliche Signale, die in BMP aktivierende oder auch inhibierende Prozesse übersetzt werden können.

1.6. ZIELE DER ARBEIT

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie, insbesondere die Unterfamilie der BMP-Liganden, zeichnen sich durch eine hohe Promiskuität der Ligand-Rezeptor-Interaktion aus. Dennoch müssen auch bei temporospatial überlappender Expression mehrerer Liganden in komplexen Geweben spezifische Signale generiert werden. Ein Hauptaugenmerk bei der Betrachtung dieser

Superfamilie liegt daher auf der Aufklärung der Mechanismen, die zu der Ausbildung von Spezifität führen.

Neben einer Vielzahl anderer Regulationsmöglichkeiten zeigen Literaturdaten, dass membranständige Corezeptoren (z. B. Endoglin, Cripto) in der TGF- β Familie bei der Ausbildung des Signalkomplexes mitwirken, dabei bestimmte Ligand/Rezeptor Kombinationen gegenüber anderen begünstigen und somit möglicherweise spezifische intrazelluläre Signalwege induzieren. Vor Beginn dieser Arbeit wurde mit den *Repulsive Guidance Molecules* (RGMs) bestehend aus den drei Mitgliedern RGMa, -b und -c die erste BMP-spezifische Corezeptorfamilie, beschrieben (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006). Eine Besonderheit dieser Corezeptorfamilie stellt insbesondere eine C-terminal vorhandene Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankerdomäne dar, durch die diese Modulatoren einerseits membrangebunden und zum anderen als lösliche Faktoren vorkommen können. So wurden anfänglich BMP-stimulierende Funktionen der membrangebundenen Corezeptoren sowie inhibierende Effekte der löslichen Corezeptoren beschrieben (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006). Eine weitere Studie zeigte zudem eine den BMP-Signalweg hemmende Wirkung sowohl für die membrangebundene als auch die lösliche Form des RGMb-Proteins und steht somit im Widerspruch zu den oben genannten Untersuchungen (Kanomata, K. et al. 2009).

Durch umfassende funktionelle und biophysikalische Charakterisierung des BMP-Corezeptors RGMb sollte diese Arbeit maßgeblich dazu beitragen, die Interaktionen dieser neuen Modulatorfamilie mit dem BMP-Signalweg auf molekularem Niveau zu analysieren, um so diese Widersprüche aufklären zu können. Die Etablierung eines proteinchemischen Verfahrens zur rekombinanten Herstellung hochreinen löslichen RGMb-Proteins sollte die Analyse der molekularen Mechanismen der Interaktion dieses Corezeptors mit den BMP-Signalkomponenten ermöglichen. Hierfür sollten vor allem proteinchemische und biophysikalische Methoden Anwendung finden, wobei ein Hauptaugenmerk auf der in vitro Analyse der direkten Wechselwirkungen des Corezeptors mit TGF- β Liganden sowie deren Rezeptoren lag. Die Etablierung zellbasierter Nachweismethoden sollte darüber hinaus dazu beitragen, die möglicherweise dualen Eigenschaften der löslichen sowie der membrangebundenen RGMb-Variante auf den BMP-Signalweg zu charakterisieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN

2.1.1. CHEMIKALIEN

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der jeweils höchsten Qualität und Reinheit von den Firmen Applichem, BioWest, Calbiochem, Carl Roth, Fermentas, Fluka, Gibco, ImmunoTools, Invitrogen, Lonza, Merck, NEB Biolabs, Novagen, PeproTech, Pierce, 5Prime, Promega, Qiagen, R&D, Roche, Serva, Sigma Aldrich, Sino Biological oder Thermo Fisher Scientific bezogen.

Lösungen und Puffer wurden stets mit Wasser angesetzt, welches mittels eines Ionenaustauschersystems gereinigt wurde (TKA X-Cad, Thermo Fisher Scientific).

Bei Ribonukleinsäure-Analysen (RNA) wurden die Lösungen und Reaktionsansätze mit DEPC-behandeltem H₂O (Carl Roth) angesetzt.

2.1.2. KITS

Tabelle 2: Liste verwendeter Kits.

Verwendungszweck	Bezeichnung und Hersteller
Plasmid-DNA-Mini-Präparationen	<i>QIAPrep® Spin Miniprep Kit</i> (Qiagen)
Plasmid-DNA-Midi-Präparationen	<i>Plasmid Plus Midi Kit</i> (Qiagen)
Plasmid-DNA-Maxi-Präparationen	<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i> (Qiagen)
Viren-DNA-Isolation	<i>High Pure Viral Nucleic Acid Kit</i> (Roche)
RNA Extraktion	<i>PerfectPure RNA Tissue Kit</i> (5Prime)
PCR-Reinigung/Agarose-Gel-Extraktion	<i>HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit</i> (Südlaborbedarf)
ECL-Lösung	<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate</i> (Thermo Fisher Scientific)
Penta-His-HRP	<i>Penta-His-HRP Conjugate Kit</i> (5Prime)
PCR-Klonierungskit	<i>CloneJET™ PCR Cloning Kit</i> (Thermo Fisher Scientific)
Kit zur Herstellung rekombinanter Baculoviren	<i>BacVector®-3000 Transfection Kit</i> (Merck)
Phosphatase-Substrat	<i>Phosphatase Substrate Kit</i> (Thermo Fisher Scientific)
Luciferase-Substat	<i>Luciferase assay system</i> (Promega)

2. Material und Methoden

2.1.3. ANTIBIOTIKA

Antibiotika wurden von der Firma Carl Roth bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika.

Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin (100 mg/ml) in ddH_2O	100 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin (50 mg/ml) ddH_2O	30 $\mu\text{g/ml}$

2.1.4. ENZYME UND PUFFER

Tabelle 4: Verwendete Enzyme und Puffer.

Enzym-/ Pufferbezeichnung	Hersteller
<i>RevertAid™ M-MuLV</i> Reverse Transkriptase	Promega
<i>ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Phusion™</i> DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
5 x <i>Phusion™</i> -Puffer	Thermo Fisher Scientific
<i>Truестart</i> HS Taq-DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
10 x <i>Truестart</i> HS Taq-Puffer	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
10 x T4 DNA Ligation Buffer	Thermo Fisher Scientific
<i>FastAP™</i> Alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific

2.1.5. ANTIKÖRPER

Tabelle 5: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
Penta-HIS-HRP	5Prime	1:2000
rabbit anti-SNAP-tag®, # P9310S	NEB Biolabs	1:1000
sheep anti-mouse RGMb, #AF3597 (0.1 mg/ml)	R&D	WB: 1:250 bis 1:500 FC: 1:20
anti-V5-Tag, # R960-25	Invitrogen	1:3000 bis 1:5000
goat anti-mouse IgG-HRP, #7076	Cell Signaling	1:2000
goat anti-rabbit IgG-HRP, #7074	Cell Signaling	1:2000
donkey anti-sheep-PE, # F0126	R&D	1:20
donkey anti-sheep IgG-HRP, # HAF016	R&D	1:1000
anti-V5-Tag-IgG1-FITC, # MCA2894F	AbD Serotec	1:40
Isotypkontrolle IgG1 mouse-FITC, #11471481	eBioscience	1:100
Isotypkontrolle rabbit anti-human TRAF2 IgG, # SC7187	Santa Cruz Biotechnologies	1:50

2.1.6. WACHSTUMSFAKTOREN UND REZEPTOREKTODOMÄNEN

Tabelle 6: Verwendete Wachstumsfaktoren und Rezeptorektodomänen.

Bezeichnung	Bezugsquelle
rhBMP-2	eigene Herstellung
rhBMP-3	PeptoTech
rhBMP-4	Prof. Dr. Walter Sebald, Würzburg
rmBMP-6	Prof. Dr. Slobodan Vukičević, Zagreb
rmBMP-7	Prof. Dr. Slobodan Vukičević, Zagreb
rhBMP-15	Prof. Dr. David G. Mottershead, Adelaide
hGDF-2	PeptoTech
rhGDF-5	eigene Herstellung
rhGDF-6 (BMP-13)	PeptoTech
rhGDF-7	PeptoTech
rhGDF-8 (Myostatin)	ImmunoTools
rhGDF-9	Prof. Dr. David G. Mottershead, Adelaide
rhActivin A	Prof. Dr. Walter Sebald, Würzburg
rhTGF- β 2	Dr. Joachim Nickel, Würzburg
rhTGF- β 3	ImmunoTools
rhNoggin	ImmunoTools
rhAMH	R&D Systems
rhBMPR-IA (ALK-3)	eigene Herstellung
rhBMPR-IB (ALK-6)	Dr. Joachim Nickel, Würzburg
rhActR-IB (Alk-4), Fc Chimera	R&D Systems
rmTGF β R-I (ALK-5), Fc Chimera	R&D Systems
rrALK-7, Fc Chimera	R&D Systems
rhBMPR-II	eigene Herstellung
rhActR-II	eigene Herstellung
rhActR-IIB	eigene Herstellung

2.1.7. LABORGERÄTE

Tabelle 7: Verwendete Laborgeräte.

Bezeichnung	Hersteller
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Tischzentrifuge 5418	Eppendorf
Tischzentrifuge 5804 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti JE	Beckman Coulter
UV/VIS Spektrophotometer Evolution 300	Thermo Fisher Scientific
UV/VIS Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	PEQLAB Biotechnologie

2. Material und Methoden

Thermocycler Biometra TGradient	Biometra
Inkubator D06062	Memmert
CO ₂ -Inkubatoren Labotect C200	Labotect Labor-Technik
Sterilbank Sterilcard III Advance	The Baker Company
Schüttelinkubator Multitron II	Infors AG
Gefriertrocknung Alpha 1-2	Martin Christ
Drehschieber-Vakuumpumpe RZ 2	Vacuubrand
Rotationsvakuumkonzentrator RVC2-18	Martin Christ
Membranvakuumpumpe MZ 2C	Vacuubrand
ELISA-Reader Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific
Flow-Zytometer FACSCalibur	BD Bioscience
Luminometer Luminoskan Ascent	Thermo Fisher Scientific
Reinstwasseranlage TKA X-Cad	Thermo Fisher Scientific
FPLC Äkta Prime	GE Healthcare
FPLC Äkta Purifier	GE Healthcare
FPLC BioLogic Duoflow	Bio-Rad Laboratories
SPR-Gerät Proteon XPR36	Bio-Rad Laboratories
Transilluminator Dark Reader	Clare ChemicalResearch
Autoklav VX-150	Systec
pH-Elektrode pH 330	WTW
Trockenschranke	Binder
Slimline Kühlschrank LR1400	Labotect Labor-Technik
Mini Protean SDS-Gelapparatur	Bio-Rad Laboratories
Rotiphorese® MINI Tank-Blotting-System	Carl Roth
Mini-Protean Tetra Cell Protein-Gelkammer	Bio-Rad Laboratories
Waage ABS220-4	Kern& Sohn
Feinwaage PLJ4000-2M	Kern & Sohn
Thermoblock TDB-120	BioSan

2.1.8. BAKTERIENSTÄMME

<i>E. coli</i> NovaBlue™ (Novagen):	endA1 hsdR17 ($r_{k12}^- m_{k12}^+$) supE44 thi-1 recA1 gyrA96relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ΔM15::Tn10(Tc ^R)]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Invitrogen):	F ⁻ ompT hsdS _B ($r_B^- m_B^-$) gal dcm (DE3)
<i>E. coli</i> AD494(DE3) (Novagen):	Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvull phoR ΔmalF3 F'[lac ⁺ (lacI ^q) pro] trxB::kan (DE3)
<i>E. coli</i> OrigamiB (DE3) (Novagen):	F ⁻ ompT hsdS _B ($r_B^- m_B^-$) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 (Tc ^R) trxB::kan (DE3)

2.1.9. KULTURMEDIEN

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl; mit 2 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt
LB-Agar-Platten	40 g/l LB-Agar-Pulver (AppliChem), 0.2% (v/v) NaOH
TB-Medium	13.3 g/l Bacto-Trypton, 26.6 g/l Bacto-Hefeextrakt, 4.4 ml/l Glycerin; 720 ml steriles TB-Medium werden mit 80 ml 10 x Phosphatlösung versetzt
10 x Phosphatlösung	0.17 M KH_2PO_4 ; 0.72 M K_2HPO_4
SOC-Medium	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe Extrakt, 0.5 g/l NaCl; nach dem Autoklavieren werden noch 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 und 20 mM Glucose in Form von sterilen Stammlösungen zugegeben
IPL41-Medium (HighFive™)	27.2 g/l IPL41-Pulver (HyClone), 0.35 g/l NaHCO_3 , 2.6 g/l NaCl, 4 g/l Hefe-Extrakt; mit 2 M NaOH auf pH 6.2 einstellen; Medium sterilfiltrieren, danach Zugabe von 1% (v/v) 100xLipid-Mix (Sigma); vor Gebrauch werden noch 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin zugegeben
Insect-Xpress (SF9/Triex™)	Insect-Xpress (Lonza) + 5% (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin zugegeben
Insect-Xpress (Triex™ SFM)	Insect-Xpress (Lonza) + 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin zugegeben
1.3 x Medium	SF-900 (Gibco)
DMEM	DMEM Medium + Glutamax (Gibco)
DMEM/Ham's F12 (1:1)	DMEM/Ham's F12 (1:1) (Biochrom)
OptiMEM I	Opti-MEM® I (Gibco)
AD-293-Kulturmedium	DMEM Medium, 10% (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin
ATDC5-Kulturmedium	DMEM/F-12 Medium, 5% (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin
C2C12-BRE-Luc-Kulturmedium	DMEM Medium, 10% (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin, 0.2 mg/ml G418 Sulfat (Sigma)
C2C12-Kulturmedium	DMEM Medium, 10% (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin
C3H10T1/2-BRE-Luc Kulturmedium	DMEM Medium, 10% (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin, 0.2 mg/ml G418 Sulfat (Sigma)
ALP-Hungermedium	DMEM Medium, 2% (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin
C3H10-Hungermedium	DMEM Medium, 0.1% (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin-G, 100 µg/ml Streptomycin, 0.2 mg/ml G418 Sulfat (Sigma)

2.1.10. STANDARD-PUFFERLÖSUNGEN

Pufferlösungen für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden in der Regel in zehnfacher Konzentration (10 x) angesetzt. Soweit möglich, wurden sämtliche Puffer und Lösungsmittelgemische autoklaviert (30 min 121°C, 2 bar) oder sterilfiltriert. Die jeweiligen pH-Werte wurden entweder mit HCl, HOAc, KOH oder NaOH eingestellt.

2. Material und Methoden

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Standard-Pufferlösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
5 x TBE	446 mM Tris/HCl pH 8.0, 445 mM H ₃ BO ₃ , 1 mM EDTA
50 x TAE	2 M Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaOAc, 50 mM EDTA
6 x DNA-Probenpuffer	0.25% Bromphenolblau, 0.025% Xylen-CyanolFF, 30% Glycerin
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
6 x Protein-Probenpuffer	375 mM Tris/HCl pH 6.8, 30% (v/v) Glycerin, 12% (w/v) SDS, 6% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.03% (w/v) Bromphenolblau
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris/HCl, 1.9 M Glycin, 35 mM SDS
HBSE ₁₅₀	10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA
HBSE ₅₀₀	10 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA
HBSE ₁₄₀₀	20 mM HEPES pH 7.4, 1400 mM NaCl, 4 mM EDTA
HBSET ₁₅₀	10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.005% Tween 20
HBSET ₅₀₀	10 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.005% Tween 20
TBS ₁₅₀	20 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl
TBS ₅₀₀	20 mM Tris/HCl pH 7.4, 500 mM NaCl
TBSE	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% (v/v) β -Mercaptoethanol
TBSET	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.1% (v/v) Triton X-100
Tfbl	30 mM Kalium-Acetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin; mit 0.1 M Essigsäure auf pH 5.8 einstellen
Tfbll	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin; mit 0.1 M NaOH-Lösung auf pH 6.5 einstellen
Rückfaltungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M L-Arginin, 5 mM EDTA, 5 mM Glutathion ox., 2 mM Glutathion red.
Heparin-Puffer A	100 mM Tris/HCl pH 5.5, 125 mM Essigsäure, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff
Heparin-Puffer B	100 mM Tris/HCl pH 5.5, 125 mM Essigsäure, 800 mM NaCl, 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff
20 x PBS	175 mM Na ₂ HPO ₄ , 60 mM KH ₂ PO ₄ , 2.4 M NaCl, 40 mM KCl
PBST	8.75 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM KH ₂ PO ₄ , 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.05% Tween 20
4 x Upper Tris	504 mM Tris/HCl pH 6.0, 14 mM SDS

4 x Lower Tris	1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 14 mM SDS
Blot-Puffer	24 mM Tris/HCl, 193 mM Glycin, 20% (v/v) MeOH
Ni-NTA Auftragspuffer	45 mM Na ₂ HPO ₄ , 5 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.3, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Ni-NTA Elutionspuffer	45 mM Na ₂ HPO ₄ , 5 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.3, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol
Ni-NTA Dialysepuffer I	20 mM Tris/HCl pH 7.5, 35 mM NaCl, 2 mM EDTA
Ni-NTA Dialysepuffer II	20 mM Tris/HCl pH 8.0, 35 mM NaCl, 2 mM EDTA
QXL Laufpuffer	20 mM Tris/HCl pH 8.0, 35 mM NaCl
QXL Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM NaCl
Umkehrphase-HPLC-Laufpuffer	0.1% (v/v) TFA in _{dd} H ₂ O
Umkehrphase-HPLC-Elutionspuffer	0.1% (v/v) TFA in Acetonitril <i>gradient grade</i>
Messpuffer LSM	10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂
ALP-Lysepuffer	0.1 M Glycin, pH 9.6, 1% NP-40, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM ZnCl ₂

2.1.11. KONSTRUKTE FÜR PROKARYOTISCHE EXPRESSIONEN

Tabelle 10: Verwendete prokaryotische Expressionskonstrukte.

Vektor	Eigenschaften
pN25_BMP-2	BMP-2 Expressionskonstrukt basierend auf dem Vektor pDS56_RBSII_N25x/O; Phagen-T5-Promotor P _{N25} unter der Kontrolle des Lac-Operons; Ampicillinresistenz, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. W. Sebald, Würzburg
pN25_GDF-5	GDF-5 Expressionskonstrukt basierend auf dem Vektor pDS56_RBSII_N25x/O; Phagen-T5-Promotor P _{N25} unter der Kontrolle des Lac-Operons; Ampicillinresistenz (Stueber, D. et al. 1984), zur Verfügung gestellt von Dr. J. Nickel, Würzburg
pET32a_Trx-BMP-IA	Plasmid zur Expression der BMP-IA Ektodomäne als Thioredoxin-Fusionsprotein basierend auf dem Vektor pET32a, T7-Promotor unter Kontrolle des Lac-Operons, Ampicillinresistenz (Kirsch, T. et al. 2000b; Kotsch, A. 2008)
pET32a_Trx-ActR-IIB	Plasmid zur Expression der ActR-IIB Ektodomäne als Thioredoxin-Fusionsprotein basierend auf dem Vektor pET32a, T7-Promotor unter Kontrolle des Lac-Operons, Ampicillinresistenz (Studier, F.W. et al. 1990; Kotsch, A. 2008)

2.1.12. VEKTOREN FÜR EUKARYOTISCHE EXPRESSIONEN

Tabelle 11: Verwendete Vektoren für die eukaryotische Expression.

Vektor	Eigenschaften
pcDNA3.1 (Invitrogen)	Expressionsvektor zur Expression in Säugerzelllinien; CMV-Promotor; Ampicillin- und Geneticinresistenzgen; C-terminale V5-Tag Sequenz sowie Hexa-Histidin-Peptidsequenz
pBAC-3 (Novagen)	Baculoviraler Transfervektor zur Expression in SF9 Insektenzellen (Novagen); Polyhedrinpromotor; gp64-Signalpeptidsequenz zur Sekretion der rekombinanten Proteine ins Medium; Ampicillinresistenz; N- und C-terminale Hexa-Histidin-Peptidsequenz
pMK1 (modifizierter pBAC-3) (Novagen)	Baculoviraler Transfervektor zur Expression in SF9 Insektenzellen beruhend auf pBAC-3 (Novagen); Polyhedrinpromotor; gp64-Signalpeptidsequenz zur Sekretion der rekombinanten Proteine ins Medium; Ampicillinresistenz; N-terminale Hexa-Histidin-Peptidsequenz durch Thrombin abspaltbar; ursprüngliche BamHI Schnittstelle entfernt, neue BamHI Schnittstelle innerhalb der Thrombin-Erkennungssequenz angefügt
pSV β -Gal (Promega)	β -Galaktosidase Expressionsvektor; Ampicillinresistenz; Kontrollvektor zur Normierung auf die Transfektionseffizienz
pGL3-(BRE) ₂ -Luc	Luciferase-Reporterkonstrukt beruhend auf dem pGL3-Basic Vektor (Promega), welches in 5'-Richtung zu dem minimalen Promotor MLP ein spezifisches BMP-responsives Element (BRE) enthält (Korchynskyi, O. und ten Dijke, P. 2002)
pCLIP-tag® (m) (NEB Biolabs)	Expressionsvektor zur Expression eines CLIP-tag® Fusionsproteins in Säugerzelllinien; CMV-Promotor; Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen
pSNAP-tag® (m) (NEB Biolabs)	Expressionsvektor zur Expression eines SNAP-tag® Fusionsproteins in Säugerzelllinien; CMV-Promotor; Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen

2.1.13. OLIGONUKLEOTIDE

Tabelle 12: Oligonukleotide für die Klonierung.

Name	Nukleinsäuresequenz (je 5' → 3')
hrgmb_sma_s	CTG CTC CAC CCG GGG GAC TGC CAA CAG CCA GCC
hrgmb_xho_as	TGTCCC TTA GCT CGA GCT GGG GAA AAT GTG CCA
hrgmb_wob_s	GTG GTC CCT GGT TCC AGT GCT AC

hrgmb_wob_s	GTG GTC CCT GGT TCC AGT GCT AC
hrgmb_wob_as	GTA GCA CTG GAA CCA GGG ACC AC
hrgmb_bam_s	NNN GGA TCC CAA CAG CCA GCC CAA TGT
hrgmb_xho2_s	NNN CTC GAG TTA GCC ACT GCT GGG GAA AAT C
Rb_Kpn_3.1_s	AAT GGT ACC GCC ACC ATG GGC TTG AGA GCA G
RGMb_Clip_s	AAT GGC GCG CCG GGT GAC TGC CAA CAG
RGMb_NotI_as	NNN GCG GCC GCC TAC AAA AAC ACG ATA AG
BRIA_SN_Bam_s	NNN GGA TCC CAG AAT CTG GAT AGT ATG C
BRIA_SN_Not_as	NNN GCG GCC GCT CAG ATT TTT ACA TCT TG
BRII_CL_Bam_s	NNN GGA TCC TCG CAG AAT CAA GAA CGG
BRII_CL_Not_as	NNN GCG GCC GCT CAC AGA CAG TTC ATT C

2.1.14. EUKARYOTISCHE ZELLINIEN

Tabelle 13: Verwendete eukaryotische Zelllinien.

Zelllinie	Typ	Quelle
AD-293	humane embryonale Nieren-Zelllinie, HEK293 Derivat	Prof. Dr. Martin J. Lohse, Würzburg
ATDC5	murine Chondrozyten-Zellen, No. RCB0565	RIKEN
C2C12	murine Myoblasten-Zelllinie, # CRL-1772	ATCC
C2C12-BRA	murine Myoblasten-Zelllinie, stabil mit dem BMP responsiven Reporterengenkonstrukt BRE-Luc transfiziert (Zilberberg, L. et al. 2007)	Prof. Dr. Peter ten Dijke, Leiden
C3H10T1/2-BRE-Luc	murine Mesenchymzelllinie, stabil mit dem BMP responsiven Reporterengenkonstrukt BRE-Luc transfiziert (Logeart-Avramoglou, D. et al. 2006)	Prof. Dr. Peter ten Dijke, Leiden
SF9 Zellen	Zelllinie aus Puppenovariengewebe von <i>Spodoptera fungiperda</i>	Pharmingen
Triex™ Sf9-Zellen	Zelllinie aus Puppenovariengewebe von <i>Spodoptera fungiperda</i> , SF9 Derivat	Merck
Triex™ _(SFM) -Zellen	an serumfreies Medium adaptierte Triex™ Sf9-Zellen	
High Five™-Zellen	<i>Trichopulsia ni</i> Derivat	Invitrogen

2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1. STERILES ARBEITEN

Glasgeräte (z. B. Glasflaschen und Glaskolben) werden für 2 h bei 180 °C im Trockenschrank sterilisiert. Hitzestabile Puffer, Medien und Kunststoffgefäße wurden für 20 min bei 120 °C und 1.2 bar autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden mittels steriler Spritzenfilter (\varnothing 0.22 μ M) sterilfiltriert. Dialyseschläuche (Zellutrans, 3.5 kDa Ausschlussgröße, Carl Roth) wurden vor Verwendung für eine Stunde bei 60 °C in Pufferlösung (20 g/l NaHCO₃, 0.4 g/l EDTA) inkubiert, anschließend gründlich mit dH₂O gewaschen und in 20%igem Ethanol bei 4 °C gelagert.

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Organismen wurden an einer Sterilbank unter laminarem Luftstrom durchgeführt.

2.2.2. QUANTIFIZIERUNG VON DNA BZW. RNA

Durch photometrische Messung bei 260 nm kann die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung bestimmt werden. Dabei entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 μ g/ml einzelsträngiger RNA. Die Quantifizierung von Plasmid-DNA oder Gesamt-RNA wurde an einem UV/VIS Spektrophotometer durchgeführt.

2.2.3. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Für Standard-PCR Reaktionen (Saiki, R.K. et al. 1988) wurden die Komponenten wie unter Tabelle 14 angegeben pipettiert.

Tabelle 14: Pipettierschema einer PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen
DNA-Matrize	x μ l
5 x <i>Phusion</i> TM -Puffer	10 μ l
dNTP`s (2.5 mM)	5 μ l
Oligonukleotid 1 (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Oligonukleotid 2 (10 pmol/ μ l)	2 μ l
<i>Phusion</i> TM DNA-Polymerase (2U/ μ l)	0.3 μ l
dH ₂ O	30.7 μ l – x μ l

Für die Ausführung der DNA-Amplifikation wurde der Thermocycler TGradient sowie ein Standard-Programm verwendet (siehe Tabelle 15). Die Temperatur des Oligonukleotid-anlagerungsschrittes ist variabel und richtet sich nach der Sequenz der Oligonukleotide. Die

Synthesezeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Die *Phusion™* DNA-Polymerase verfügt über eine Syntheserate von etwa 15-30 s/kb.

Tabelle 15: Standardprogramm einer PCR-Reaktion.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
initiale Denaturierung	3 min	98 °C	1
Denaturierung	30 s	98 °C	
Oligonukleotidanlagerung	30 s	55 °C	30
DNA-Synthese	90 s	72 °C	
abschließende Synthese	10 min	72 °C	1

2.2.4. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Nicht-denaturierende Agarosegele zur Auftrennung von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe wurden 1%ige Agarosegele in 1 x TAE-Puffer oder 0.5 x TBE-Puffer (siehe 2.1.10) verwendet. Um die DNA später im Gel unter UV-Licht (364 nm) oder auf einem Transilluminator detektieren zu können, wurde 0.5 x GelGreen (Biotium) zu dem Gel hinzugegeben. Sollte lediglich die Größe der durch PCR oder Restriktionsanalyse erhaltenen DNA-Fragmente überprüft werden, wurde ein 1%iges Gel in 0.5 x TBE Puffer verwendet. Wenn jedoch die DNA-Fragmente im Anschluss aus dem Agarosegel extrahiert werden sollten, erfolgte die Auftrennung in einem 1%iges TAE-Gel.

Zur Erhöhung der Dichte der Proben und zur Markierung der Lauffront wurden die DNA-Proben mit 1/6 Volumen 6 x DNA-Probenpuffer (siehe 2.1.10) versehen und in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Als Größenstandard wurde soweit nicht anders angegeben 6 µl verdünnter Größenstandard (1 µl *MassRuler™* (Thermo Fisher Scientific), 1 µl 6 x DNA-Probenpuffer, 4 µl d₂O) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V in 1 x TAE-Puffer bzw. 120 V in 0.5 x TBE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert. Für eine Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurden die DNA-Banden auf einem Transilluminator visualisiert und mittels Skalpell exzidiert. Die Extraktion der DNA-Fragmente erfolgte mittels des Agarose-Gel-Extraktionskits nach Herstellerangaben (siehe 2.1.2).

2.2.5. KLONIERUNG DER PCR-FRAGMENTE IN EINEN KLONIERVEKTOR

PCR-Fragmente wurden gegebenenfalls mittels PCR-Klonierungskit (siehe 2.1.2) nach Herstellerangaben in einen linearisierten Kloniervektor ligiert, um eine Amplifikation des Fragmentes zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine Transformation des Konstruktes in *E. coli* (2.2.8) sowie

die darauf folgende Plasmid-DNA-Isolierung (2.2.11). Durch Schneiden an den entsprechenden, durch vorherige PCR-Amplifikation (2.2.3) angefügte, Restriktionsenzym-Schnittstellen (2.2.6) konnte das Fragment aus dem Kloniervektor herausgeschnitten, isoliert, gereinigt und in den gewünschten linearisierten Zielvektor ligiert (2.2.7) werden.

2.2.6. RESTRIKTIONSANALYSE

Restriktionsendonukleasen wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen. Reaktionen mit einzelnen oder zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, nach Vorgaben des Herstellers unter den empfohlenen Puffer-Bedingungen durchgeführt. Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte durch Zugabe von 1 U Alkalischer Phosphatase (*FastAP™*, Thermo Fisher Scientific) pro µg Vektor-DNA für 10 Minuten bei 37 °C direkt im Anschluss an die Restriktionsreaktion. Inaktiviert wurde anschließend für 5 min bei 75 °C. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels eines 1%igen (w/v) TAE-Agarosegels aufgetrennt (2.2.4), an einem Transilluminator aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend aus der Agarose-Matrix (*HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit*, siehe 2.1.2) extrahiert.

2.2.7. LIGATIONSREAKTION

Die Ligationsreaktion wurde nach dem aufgeführten Schema (Tabelle 16) pipettiert. Dabei wurde entweder ein molares Verhältnis des geschnittenen DNA-Fragmentes zu Vektor-DNA von 3:1 verwendet oder durch ein 1%iges TBE-Agarosegel (2.2.4) zunächst die Bandenintensität der gereinigten DNA-Fragmente analysiert.

Tabelle 16: Pipettierschema einer Ligationsreaktion.

Komponente	Volumen
geschnittenes DNA-Fragment	x µl
linearisierter Vektor	y µl
10 x T4-DNA-Ligationspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	17 µl – (x + y µl)

Anschließend wurde das optimale Volumen der geschnittenen DNA ($V_{(\text{Ligation, DNA-Fragment})}$) für die Ligationsreaktion nach folgender Formel bestimmt:

$$V_{(\text{Ligation, DNA-Fragment})} = V_{(\text{Ligation, Vektor})} \times (\text{Länge}_v / \text{Länge}_i) \times (3 \times \text{Intensität}_v / \text{Intensität}_i) \times (V_{(\text{Gel, v})} / V_{(\text{Gel, i})})$$

Das eingesetzte Volumen des geschnittenen Vektors ($V_{(\text{Ligation Vektor})}$) wurde in dieser Formel auf einen bestimmten Wert festgesetzt. Weiterhin wurden die Längen des DNA-Fragments (Länge_i) sowie des geschnittenen Vektors (Länge_v) in Basenpaaren angegeben. Die Intensität des DNA-Fragmentes (Intensität_i) wurde auf den Wert 1 festgelegt und die Fluoreszenzstärke der linearisierten Vektorbande (Intensität_v) relativ zu dieser bestimmt. Durch Multiplikation der Vektorintensität mit dem Faktor drei wurde das 3:1 Verhältnis erzielt. Anschließend wurde noch das auf das Analysegegel aufgetragene Volumen der Vektor- ($V_{(\text{Gel; v})}$) bzw. DNA-Fragmente ($V_{(\text{Gel; i})}$) in die Formel mit einbezogen. Die Ligationsansätze wurden eine Stunde oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 µl in *E. coli* NovaBlue™ transformiert (2.2.8).

2.2.8. TRANSFORMATION

Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien erfolgte nach der Rubidium Chlorid-Methode (Hanahan, D. 1983). Dazu wurden 100 ml LB-Medium (2.1.9) mit den notwendigen Antibiotika versetzt und 1:100 (v/v) mit einer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Bakterienstammes inokuliert und bei 37 °C und 130 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 angezogen. Anschließend wurde die Zellsuspension sedimentiert (5 min, 3000 x g, 4 °C, Eppendorf 5804R), der Medienüberstand verworfen, das Bakterien-Pellet in 40 ml eiskalten TfbI-Puffer (2.1.10) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine erneute Sedimentation (5 min, 3000 x g, 4 °C, Eppendorf 5804R) wurden die Bakterien in 4 ml eiskalten TfbII Puffer (2.1.10) aufgenommen und umgehend zu 100 µl Aliquots in 1.5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien

Ein Aliquot des entsprechenden chemisch-kompetenten *E. coli*-Bakterienstammes wurde auf Eis aufgetaut, mit 10 – 20 ng der gewünschten Plasmid-DNA inokuliert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (90 s, 42 °C) sowie einer 5-minütigen Lagerung auf Eis, wurde den Bakterien 300 µl SOC-Medium (2.1.9) zugefügt und die Zellsuspension für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Selektion transformierter *E. coli* Bakterien erfolgte durch ein Ausplattieren auf LB-Agar Platten (2.1.9), welche mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurden. Diese wurden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.9. KOLONIE-PCR

Tabelle 17: Pipettierschema einer Kolonie-PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen
DNA-Matrize	3 µl
10 x Taq-Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP`s (2.5 mM)	5 µl
Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)	2 µl
Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)	2 µl
Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)	0.5 µl
dH ₂ O	28.5 µl

Zur Detektion der mittels Ligation (2.2.7) in einen Vektor eingefügten DNA-Fragmente wurde die Kolonie-PCR verwendet. Dabei wurde 1 ml LB-Medium (2.1.9) mit einer transformierten *E. coli*-Kolonie (siehe 2.2.8) inokuliert und für 4 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran wurden 800 µl der Suspension zentrifugiert (5 min, 16000 x g, RT, Eppendorf 5415D), der Medienüberstand verworfen, das Bakterien-Sediment in 50 µl dH₂O resuspendiert und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 16000 x g, RT, Eppendorf 5415D) wurden 3 µl des Überstandes als DNA-Matrize für die anschließende PCR-Reaktion (2.2.3) eingesetzt. Als Oligonukleotide dienten die entsprechenden 5´ sowie 3´ Klonierungs-oligonukleotide (2.1.13). Die PCR-Produkte wurden mittels eines 1%igen Agarosegels (2.2.4) auf Anwesenheit des entsprechenden Amplifikates überprüft (2.2.4). Von korrekten Klonen wurden die verbliebenen 200 µl Bakterienkultur zum Animpfen einer Übernachtskultur zur Isolation der Plasmid-DNA (2.2.11) verwendet.

Tabelle 18: PCR-Programm der Kolonie-PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
initiale Denaturierung	3 min	95 °C	1
Denaturierung	30 s	95 °C	
Oligonukleotidanlagerung	30 s	53 °C	30
DNA-Synthese	90 s	72 °C	
abschließende Synthese	10 min	72 °C	1

2.2.10. ANALYTISCHE RESTRIKTIONSANALYSE

Eine weitere Methode zur Detektion der amplifizierten Sequenz in einem Vektor stellt die analytische Restriktionsreaktion dar. Dazu wurden zunächst Übernachtskulturen einzelner Kolonien transformierter *E. coli* Bakterien nach einer Ligationsreaktion (2.2.7) angelegt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA (2.2.11) isoliert und mit dieser (200 ng pro Ansatz) eine Restriktionsanalyse mit den entsprechenden, für die Klonierung verwendeten Enzymen angesetzt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels eines 1%igen Agarosegels (2.2.4) auf ihre korrekte Größe überprüft.

2.2.11. PLASMID-DNA-ISOLIERUNG

Für eine Isolierung im kleinen Maßstab wurden je fünf Milliliter Übernachtskulturen angesetzt und die Plasmid-DNA mittels des *QIAPrep® Spin Miniprep Kits* (2.1.2) nach Herstellervorgaben gewonnen. Zur Gewinnung größerer DNA Mengen wurde die Plasmid-DNA entweder aus 50 ml Übernachtskultur mittels des *Plasmid Plus Midi Kits* (2.1.2) oder aus 200 ml Übernachtskultur mit Hilfe des *EndoFree Plasmid Maxi Kits* (2.1.2) isoliert. Die Konstrukte wurden im institutseigenen Sequenzierlabor oder durch einen externen Sequenzierservice (GATC) auf ihre Richtigkeit überprüft und anschließend bei -20 °C oder -80 °C gelagert.

2.2.12. KONSTRUKTE FÜR DIE PROTEINEXPRESSION IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN

Die cDNA-Sequenzen der klonierten Konstrukte (Tabelle 19) sind im Anhang (6.1) enthalten.

Tabelle 19: Konstrukte für die Proteinexpression in eukaryotischen Zelllinien.

Konstruktbezeichnung	Eigenschaften
pBac3_hRGMb	pMK1 Vektor, Schnittstellen <i>SmaI</i> und <i>XhoI</i> , N-terminaler His ₆ -Tag
pMK1_hRGMb _{ΔNCys}	pMK1 Vektor, Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>XhoI</i> , Thrombinschnittstelle, N-terminaler His ₆ -Tag
pcDNA3.1_hRGMb_GPI	pcDNA3.1 Vektor, Schnittstellen Signalpeptid <i>KpnI</i> und <i>EcoRI</i> , N-terminaler V5-Tag, Schnittstellen volle Länge RGMB-cDNA <i>EcoRI</i> und <i>NotI</i>
pCLIP_hRGMb	pCLIP-tag® (m) Vektor, Schnittstellen Signalpeptid <i>Clal</i> und <i>EcoRI</i> , N-terminaler CLIP-tag®, Schnittstellen RGMB-cDNA <i>Ascl</i> und <i>NotI</i>
pCLIP_BMPRII	pCLIP-tag® (m) Vektor, Schnittstellen Signalpeptid <i>Clal</i> und <i>EcoRI</i> , N-terminaler CLIP-tag®, Schnittstellen BMPRII-cDNA <i>BamHI</i> und <i>NotI</i>

2. Material und Methoden

pSNAP_BMPRII	pSNAP-tag® (m) Vektor, Schnittstellen Signalpeptid <i>Clal</i> und <i>EcoRI</i> , N-terminaler SNAP-tag®, Schnittstellen BMPRII-cDNA <i>BamHI</i> und <i>NotI</i>
pCLIP_BMPRII-IA	pCLIP-tag® (m) Vektor, Schnittstellen Signalpeptid <i>Clal</i> und <i>EcoRI</i> , N-terminaler CLIP-tag®, Schnittstellen BMPRII-IA-cDNA <i>BamHI</i> und <i>NotI</i>
pSNAP-BMPRII-IA	pSNAP-tag® (m) Vektor, Schnittstellen Signalpeptid <i>Clal</i> und <i>EcoRI</i> , N-terminaler SNAP-tag®, Schnittstellen BMPRII-IA-cDNA <i>BamHI</i> und <i>NotI</i>

2.3. EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN *ESCHERICHIA COLI* BAKTERIEN

Expression der rekombinanten BMP-Liganden BMP-2 sowie GDF-5

Nach der Transformation (2.2.8) des entsprechenden Expressionsplasmides in den *E. coli*-Bakterienstamm BL21(DE3) wurde eine Übernachtskultur (LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika, 2.1.9) mit einer Einzelbakterienkolonie inokuliert und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Für eine präparative Proteinexpression wurden 4.8 l LB-Medium (BMP-2) oder TB-Medium (GDF-5) mit den notwendigen Selektionsantibiotika im Verhältnis 1:50 mit der Übernachtskultur inokuliert. Je 800 ml dieser Bakteriensuspension wurden in 2 l Schikanekolben überführt und bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei Erreichen einer optischen Dichte von 0.5 bis 0.7 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach einer Expressionsdauer von vier bis fünf Stunden wurden die Bakterienzellen mittels Zentrifugation (20 min, 6000 rpm, 4 °C, JA-10, Beckman Coulter *Avanti® JE*) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Nassgewicht des Bakteriensediments bestimmt. Die Bakterien wurden in TBSE-Puffer (2.1.10) resuspendiert, sedimentiert (20 min, 6000 rpm, 4 °C, JA-10, Beckman Coulter *Avanti® JE*), in dem zehnfachen Volumen (w/v) bezogen auf das Bakteriennassgewicht in TBSE-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Expression der rekombinanten Rezeptortodomänen BMPR-IA und ActR-IIB

Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden zunächst in die *E. coli* Bakterienstämme Ad494(DE3) (BMPR-IA) sowie OrigamiB(DE3) (ActR-IIB) transformiert (2.2.8) und anschließend eine Übernachtskultur in LB-Medium (2.1.9) inklusive der erforderlichen Selektionsantibiotika mit einer Einzelkolonie inokuliert und inkubiert (37 °C und 130 rpm). Die Proteinexpression erfolgte in sechs 2 l Schikanekolben, welche jeweils mit 800 ml Expressionsansatz (LB-Medium mit Selektionsantibiotika sowie Übernachtskultur im Verhältnis 1:50) versehen und bei 37 °C und 130 rpm inkubiert wurden. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0.5 (OD_{600nm}) wurden die Kulturen auf eine Kulturtemperatur von etwa 23 °C abgekühlt und anschließend die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach der Proteinexpression über Nacht bei 18 °C und 130 rpm wurden die Bakterienzellen mittels Zentrifugation (20 min, 6000 rpm, 4 °C, JA-10, Beckman Coulter *Avanti® JE*) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Nassgewicht des Bakteriensediments bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Bakterienzellen bei -20 °C gelagert.

2.4. EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN INSEKTENZELLKULTUR

2.4.1. KULTURHALTUNG VON SF9-, TRIEX™- UND HIGHFIVE™-ZELLEN

Die baculoviral-transduzierte Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen bietet die Möglichkeit aktive lösliche sowie posttranslational modifizierte Proteine in relativ großem Maßstab zu gewinnen ((Smith, G.E. et al. 1983) für Übersichtsartikel: (Miller, L.K. 1993; Ikonomou, L. et al. 2003)). Die immortalisierte SF9-Zelllinie (2.1.14) wurde aus dem Ovargewebe des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* isoliert (Vaughn, J.L. et al. 1977). Eine Weiterentwicklung stellt die Triex™-Zelllinie ((2.1.14), Novagen) dar, welche durch klonale Selektion aus einem hoch-ertragreichen SF9 Klon entstand. Die HighFive™-Zelllinie (2.1.14) wurde aus einer weiteren Nachtfalterart (*Trichopulsia ni*) isoliert (Wickham, T.J. et al. 1992) und am *Boyce Thompson Institute for Plant Research* (Ithaca, USA) entwickelt. Diese Zelllinie ist an serumfreie Bedingungen adaptiert und ermöglicht gegebenenfalls einen höheren Ertrag an rekombinantes Protein.

Kulturhaltung von SF9-, Triex™-, Triex™_(SFM)- und HighFive™-Zellen als Monolayer-Kulturen

SF9- und Triex™-Zellen wurden in Insect-Xpress-Medium (siehe 2.1.9), Triex™_(SFM) Zellen hingegen in serum-depletiertem Insect-Xpress-Medium (2.1.9) in 175 cm²-Zellkulturflaschen bei 27 °C kultiviert. HighFive™-Zellen wurden in IPL41-Medium (2.1.9) bei 27 °C angezogen. Unter den gegebenen Bedingungen zeigten diese Zellkulturen eine Verdopplungsrate von 24 Stunden. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Zellkulturmedium abgenommen und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen durch abschlagen gelöst und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde auf zwei bis fünf neue 175 cm²-Zellkulturflasche überführt und mit frischem Zellkulturmedium (25 ml) aufgefüllt.

Kulturhaltung von Triex™-, Triex™_(SFM)- und HighFive™-Zellen als Suspensions-Kulturen

Für Virusamplifikationen in größeren Volumina sowie für die Proteinexpression wurden die entsprechenden Insektenzellkulturen entweder in Rollerflaschen oder in Erlenmeyer-Kolben kultiviert. Dazu wurde die Zellen aus vier bis fünf konfluenten 175 cm²-Zellkulturflaschen gelöst, in eine 2 l Rollerflasche oder einen 2 l Erlenmeyer-Kolben überführt, mit dem entsprechenden Medium (2.1.9) auf 200 ml aufgefüllt und anschließend unter Invertieren (80 rpm) bzw. Schütteln (80 rpm) bei 27 °C inkubiert. Bei Erreichen einer Zelldichte (2.4.2) von 4 – 6 x 10⁶ Zellen/ml wurde die Zellsuspension durch Verdünnen mit Medium auf 0.5 - 1 x 10⁶ Zellen/ml

eingestellt. Bei ausreichendem Zellvolumen konnte direkt mit der Virusamplifikation (2.4.5) oder Proteinexpression (2.4.6) fortgefahren werden.

2.4.2. VITALITÄTSFÄRBUNG UND ZELLZAHLBESTIMMUNG

Färbelösung: 0.5% (w/v) Trypanblau in PBS

Die Vitalität der Kulturzellen wurde mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau bestimmt. Dazu wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 (v/v) mit Farbstoff-Lösung versetzt. Trypanblau durchdringt spezifisch beschädigte Zellmembranen und färbt somit abgestorbene Zellen blau an. Dies ermöglicht eine Unterscheidung von vitalen und toten Zellen. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer an einem inversen Mikroskop bestimmt.

2.4.3. CO-TRANSFEKTION DER SF-9 ZELLEN MIT DEM BACVECTOR™-3000 DNA-SYSTEM

Die Proteinexpression in Insektenzellen beruht auf einer Infektion dieser Zelllinien mit rekombinanten *Autographa californica* Viren. Dafür wurde die gewünschte Proteinsequenz zunächst in den pBac3- oder den modifizierten pMK1-Transfektor (2.1.12) kloniert. Anschließend erfolgte die homologe Rekombination mit der viralen *Bac-Vector-3000 Triple cut DNA* mittels des *BacVector*-Systems (2.1.2). Die virale DNA wurde um sieben nicht-essentielle Viren-Gene reduziert, um eine höhere Expression sowie eine reduzierte Proteolyse und Degradation des rekombinanten Proteins zu erzielen (für Details siehe Novagen *User Protocol* TB216).

Für die Co-Transfektion wurden 1.25×10^6 Sf9-Zellen in einem Volumen von 5 ml SF9-Medium (2.1.9) in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und bei 27 °C bis zum Absetzen der Zellen inkubiert. Der Transfektionsansatz bestand aus 250 ng des rekombinanten Transfektors sowie 50 ng der *BacVector-3000 Triple Cut Virus DNA* (*BacVector*-System, siehe 2.1.2), welche in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 12.5 µl serumfreiem Insect-Xpress-Medium (ohne Antibiotika, 2.1.9) aufgefüllt wurden. In ein zweites Reaktionsgefäß wurden 2.5 µl des Transfektionsreagenzes (*Insect Gene Juice™*, *BacVector*-System; 2.1.2) sowie 12.5 µl steriles Wasser pipettiert. Anschließend wurde der DNA-Ansatz zu dem Transfektionsreagenz gegeben, durch Pipettieren gemischt und bei RT für 15 Minuten inkubiert. Nun wurde der Medienüberstand von den Sf9-Zellen abgenommen, das Monolayer zweimal mit je 2 ml serumfreiem Insect-Xpress-Medium (2.1.9) gewaschen und die Zellen mit 1 ml serumfreiem Medium überschichtet. Der Transfektionsansatz wurde mit 475 µl serumfreiem Medium aufgefüllt und vollständig zu den Sf9-Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationsdauer von einer

Stunde bei Raumtemperatur wurden 6 ml Insect-Xpress-Medium (2.1.9) zu den Zellen gegeben und diese für fünf Tage bei 27 °C kultiviert.

2.4.4. PLAQUE-ASSAY

Agarose-Lösung: 2.7% (w/v) *SeaPlaque Agarose* (BioZym) in d_4H_2O , autoklavieren

MTT-Lösung: 1 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich) in d_4H_2O lösen, sterilfiltrieren
(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Um einzelne rekombinante Viren zu isolieren oder um die Infektionspotenz (in pfu/ml) einer Virusamplifikation (2.4.5) zu ermitteln, wurde der sogenannte Plaque-Assay verwendet.

Für diesen Assay wurden je Kulturareal einer sechsfach Zellkulturschale 1.5×10^6 SF9 Zellen in einem Medienvolumen von 2 ml ausgesät und bei 27 °C bis zum Absetzen der Zellen am Schalenboden inkubiert. Währenddessen wurde eine Verdünnungsreihe der Virensuspension in SF-9 Medium (2.1.9) hergestellt. Für die Isolation einzelner Virenklone nach der Co-Transfektion (2.4.3) wurden Verdünnungen von 1:10, 1:10², 1:10³ und 1:10⁴ benötigt, während für eine Bestimmung der Infektionspotenz einer Virusamplifikation (2.4.5) Verdünnungen von 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ und 1:10⁸ angesetzt wurden. Sobald sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde der Medienüberstand entfernt, durch 1 ml der entsprechenden Virusverdünnung ersetzt und die Zellen für eine Stunde bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden die Virenlösungen abgenommen und die Zellen mit 1.5 ml Agaroselösung (6.6 ml 2.7%ige Agaroselösung, 3.3 ml 1.3 x Medium, 0.7 ml FCS) überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren der Agarose wurde die Zellkulturplatte mit Parafilm abgedichtet und unter Lichtausschluss bei 27 °C für vier Tage inkubiert. Die Auswertung der Plaque-Entwicklung erfolgt durch Zugabe von 1 ml MTT-Lösung zu jedem Kulturareal der sechsfach Zellkulturschale. Die Platte wurde bei 27 °C bis zum Eintritt der Farbreaktion inkubiert und anschließend die Farbstofflösung entfernt. Lebende Zellen setzen den Farbstoff MTT zu einem violetten Produkt um, hingegen verbleiben durch Virusinfektion lysierte Zellareale durchsichtig und bilden sogenannte Plaques. Durch Auszählen der Plaques unter Einbeziehung der zuvor eingesetzten Virus-Verdünnung konnte so der Virentiter einer Virusamplifikation bestimmt werden. Zum Vermehren einzelner Viren-Klone wurden entsprechende Plaques durch die Agaroseschicht hindurch mittels steriler 100 µl Pipettenspitzen aufgenommen, in je einem ml frischem Medium resuspendiert und für eine Stunde bei 27 °C inkubiert. Nach dem Sedimentieren der Agarosereste durch Zentrifugation (5 min, 400 x g, RT, Eppendorf 5418) wurden die Virenüberstände für eine erste Virusamplifikation (2.4.5) verwendet.

2.4.5. VIRUSAMPLIFIKATION

Virusamplifikation in Monolayerkulturen

Für die erste sowie für die zweite Virusamplifikation wurden je Kulturareal einer sechsfach Zellkulturschale 1.5×10^6 SF9 oder Triex™ Zellen in 2 ml des entsprechenden Kulturmediums (2.1.9) ausgesät und bei 27 °C bis zum Absetzen der Zellen am Schalenboden inkubiert. Im Rahmen der ersten Virusamplifikation wurde anschließend das Medium von den Zellen abgenommen und durch je einen Virenüberstand nach der Isolierung sechs verschiedener Plaques (2.4.4) ersetzt. Die Zellkulturplatte wurde mit Parafilm abgedichtet und für vier Tage bei 27 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Für die zweite Virusamplifikation wurden die Medienüberstände der ersten Amplifikationsrunde jeweils durch Zentrifugation (5 min, 400 x g, RT, Eppendorf 5804R) von Zelldebris getrennt, auf die Zellen je eines Areales einer sechsfach Zellkulturplatte gegeben und mit 1 ml Medium aufgefüllt (2.1.9). Nach dem Abdichten der Schale durch Parafilm wurde diese unter Lichtausschluss bei 27 °C für vier Tage inkubiert. Anschließend wurden die Virenüberstände zentrifugiert (5 min, 400 x g, RT, Eppendorf 5804R) und in sterilen 1.5 ml Reaktionsgefäßen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Mittels eines Western Blots (2.5.4) wurde im Anschluss an die zweite Virusamplifikation der Virusklon mit der höchsten Expressionsleistung des rekombinanten Proteins ermittelt. Dieser wurde dann für die danach folgende Virusamplifikation verwendet. Hierfür wurden SF9 oder Triex™ Zellen in einer 175 cm²-Zellkulturflasche einer 70%igen Konfluenz entsprechend ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen wurde der Medienüberstand entfernt, durch 30 ml frisches Medium ersetzt und mit 1.5 ml des Virenüberstandes aus der zweiten Virusamplifikation mit der höchsten Proteinexpression versetzt. Nach einer viertägigen Inkubation bei 27 °C wurde der Virenüberstand mittels Zentrifugation (5 min, 400 x g, RT, Eppendorf 5804R) von Zellbestandteilen getrennt und bei 4 °C in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Virusamplifikation in Suspensionskulturen

Die vierte Virusamplifikationen wurde mit Triex™-, alle folgenden mit HighFive™- oder Triex™_(SFM)-Suspensionskulturen durchgeführt (Medien siehe 2.1.9). Für die vierte Amplifikationsrunde wurde ein Volumen von 200 ml einer Zelldichte von 1.5×10^6 Triex™-Zellen pro Milliliter in einem zwei Liter Erlenmeyerkolbenangesetzt und mit 15 – 20 ml des Virenüberstandes aus der dritten Virusamplifikation versetzt. Nach einer Inkubation bei 27 °C und 90 rpm für vier Tage wurde der Virenüberstand durch Zentrifugation (5 min, 400 x g, RT, Eppendorf 5804R) von Zelldebris getrennt und anschließend unter Lichtausschluss in sterilen 50

ml Reaktionsgefäßen bei 4 °C gelagert. Im Anschluss an eine Bestimmung des Virentiters (2.4.4) stand dieser Virenüberstand für die Vermehrung der Viren unter serumfreien Bedingungen zur Verfügung. Das benötigte Zellvolumen an HighFive™- oder Triex™_(SFM)-Zellen wurde dafür mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Milliliter in Rollerflaschen oder sterilen Erlenmeyerkolben angesetzt und anschließend mit einem Verhältnis Viren zu Zellen (*Multiplicity Of Infection*, MOI) von 1 mit der vorherigen Virusamplifikation versetzt. Nach einer Inkubation bei 27 °C über vier Tage unter Schütteln bei 90 rpm wurde der Virusüberstand mittels Zentrifugation (5 min, 400 x g, RT, Eppendorf 5804R) von Zellbestandteilen getrennt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Im Anschluss an eine Bestimmung des Virentiters (2.4.4) stand dieser Virenüberstand für Proteinexpressionen (2.4.6) zur Verfügung.

2.4.6. EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN TRIEX™- ODER HIGHFIVE™- SUSPENSIONSZELLKULTUREN

Kifunensin: 0.5 mg/ml in d_4H_2O

Für die Expression rekombinanter Proteine in einer Triex™- oder HighFive™-Suspensionszellkultur wurde das gewünschte Zellvolumen mit einer Dichte von 1.5×10^6 Zellen pro Milliliter (Triex™) oder 5×10^5 Zellen pro Milliliter (HighFive™) in Rollerflaschen oder sterilen Erlenmeyerkolben mit dem entsprechenden Medium (2.1.9) angesetzt. Anschließend wurde der Ansatz mit einer MOI von 5 mit der Virusamplifikation (2.4.5; serumfreie Virusamplifikation im Falle einer HighFive™-Expression) versetzt. Anschließend wurden die Zellen vier bis sechs Tage bei 27 °C unter Invertieren bzw. Schütteln inkubiert und mittels Zentrifugation (20 min, 6000 rpm, 4 °C; JA-10, Beckman Coulter *Avanti® JE*) von Zellbestandteilen getrennt. Der Proteinüberstand wurde dann in Vorbereitung für weitere Reinigungsschritte gegen den entsprechenden Puffer dialysiert (Visking, 14kDa, Typ 32/36; Carl Roth).

Sekretierte rekombinante Proteine werden durch Insektenzellen zumeist sehr komplex und heterogen glykosyliert. Eine derartige Heterogenität kann jedoch den Erfolg einer Proteinkristallisation beeinträchtigen. Daher wurde der Corezeptor RGMb in einigen Expressionsansätzen mit dem α -Mannosidase I-Inhibitor Kifunensin behandelt, wodurch Glykosylierungen angefügt werden, welche mit der Glykosidase EndoH abspaltbar sind (Chang, V.T. et al. 2007; Nettleship, J.E. et al. 2009). Dem Expressionsansatz wurde dabei Kifunensin in einer Konzentration von 1 mg/l zugesetzt und ansonsten wie oben beschrieben verfahren.

2.5. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.5.1. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Tabelle 20: Pipettierschema für zwei 4%ige Sammel- sowie zwei 12%ige Trenngele.

Komponente	Sammelgel	Trenngel
<i>Rotiphorese Gel 40</i> (29:1) (Carl Roth)	0.5 ml	3 ml
4 x Upper Tris	1.25 ml	-
4 x Lower Tris	-	2.5 ml
ddH ₂ O	3.2 ml	2.5 ml
Glycerin (87%)	-	2 ml
TEMED	18 µl	20 µl
40% APS (w/v)	18 µl	20 µl

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamid-Gelen in Anlehnung an Laemmli (Laemmli, U.K. 1970).

Tabelle 21: Protein-Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE (#SM0431, Fermentas).

Proteinbezeichnung	Molekulargewicht (kDa)
β-Galaktosidase	116.0
Bovines Serumalbumin	66.2
Ovalbumin	45.0
Lactat-Dehydrogenase	35.0
REase Bsp98I	25.0
β-Lactoglobulin	18.4
Lysozym	14.4

Standardmäßig wurde für eine SDS-PAGE ein Gel bestehend aus einem 12%igen Trenn- sowie einem 4%igen Sammelgel mit einer Dicke von 0.75 mm hergestellt. Dazu wurden zunächst die Komponenten für das Trenngel, wie in Tabelle 20 angegeben, pipettiert, zwischen die Glasplatten eines Gelgießstandes gefüllt und die Geloberfläche anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel pipettiert und das Trenngel mit diesem überschichtet. Zur Formung der Beladungstaschen wurde in das Sammelgel ein Probenkamm eingesetzt. Das Gel wurde nach erfolgter Polymerisierung in die Gelkammer (*Mini Protean Electrophoresis System*, Bio-Rad) gegeben und diese mit 1 x SDS-Laufpuffer (siehe 2.1.10) befüllt.

2. Material und Methoden

Die Proteinproben wurden 1:6 mit 6 x Proteinprobenpuffer (2.1.10) versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden diese in die Taschen des SDS-Gels pipettiert und die Proteine bei einer Spannung von 280 V aufgetrennt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetragenen Proben wurde ein Größenstandard bestehend aus Proteinen definierter molekularer Masse (siehe Tabelle 21) in jedem Gel mit aufgetrennt.

2.5.2. FÄRBUNG VON PROTEINGELEN

Coomassie-Färbung

Färbelösung: 3 g *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 3 g *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 1 l Ethanol, 0.25 l Eisessig, 1.25 l $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$

Entfärbelösung: Eisessig, 2-Propanol, $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ im Verhältnis 1:1:8

Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.5.1) wurden Proteingele für mindestens 30 min in einer Kunststoffschale in Färbelösung unter Schwenken inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde das vollständig gefärbte Gel zunächst kurz mit Wasser gewaschen und danach solange in Entfärbelösung geschwenkt, bis nur noch die blau-gefärbten Proteinbanden sichtbar waren. Die untere Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei etwa 100 - 500 ng Protein pro Bande.

Silberfärbung

Lösung 1: 30 ml 50% (v/v) Aceton in H_2O , 0.75 ml 50% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) in $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, 12.5 μl 37% Formaldehyd

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

Lösung 3: 50 μl 10% (w/v) Natriumthiosulfat-pentahydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) in 30 ml $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$

Lösung 4: 0.4 ml 20% (w/v) Silbernitrat (AgNO_3), 0.3 ml 37% Formaldehyd, in 60 ml $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$

Lösung 5: 0.6 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3), 12.5 μl 37% Formaldehyd, 12.5 μl 10% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, in 60 ml $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$

Die Silberfärbung erfolgte in Anlehnung an (Wray, W. et al. 1981). Nach erfolgter SDS-PAGE (2.5.1) wurde das Gel zunächst kurz unter fließendem Wasser in einer Glasschale gespült und 5 min unter Schwenken in Lösung 1 inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal kurz mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ gewaschen und dann für 5 Minuten in $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ geschwenkt. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, woraufhin das Gel 5 min in Lösung 2 inkubiert wurde. Nach 1 min in Puffer 3 wurde das

Gel erneut dreimal mit d_2H_2O gewaschen und anschließend für 10 min in Lösung 4 inkubiert. Nach intensivem Spülen mit d_2H_2O erfolgte die Entwicklung durch Inkubation des Gels in Lösung 5, welche durch Zugabe von 2%iger Essigsäure gestoppt wurde. Im Vergleich zur Coomassie-Färbung ist die Silberfärbemethode etwa 100 – 1000fach sensitiver.

Nachweis von N-Glykosylierungen mittels Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS)

Perjodsäure-Schiff-Färbung: *Glyco-Pro; Glycoprotein Detection Kit* (Sigma-Aldrich)

Jeweils 5 μ g RGMb wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mittels einer SDS-PAGE (2.5.1) separiert. Als Positivkontrolle diente die im Kit enthaltene Meerrettich-Peroxidase (Auftrag: 2 μ g). Das Polyacrylamidgel wurde anschließend nach Herstellerangaben gefärbt.

2.5.3. PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN

Die Konzentration von homogenen Proteinlösungen wurde mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt:

$$A_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} \times c \times d = \frac{\epsilon_{280\text{ nm}} \times c_m \times d}{M_w} \quad (1)$$

Dabei wurde die Absorption bei 280 nm ($A_{280\text{ nm}}$) der Proteinlösung durch die Aufnahme eines UV-Spektrums von 250 – 320 nm (*Evolution 300 UV Visible Spectrophotometer*, Thermo) bestimmt. Weiterhin wurden die molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{280\text{ nm}}$ in $M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) sowie die Molekulargewichte (M_w in $\text{g} \times \text{mol}^{-1}$) der verwendeten Proteine mittels ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>; (Gasteiger, E. et al. 2005)) berechnet. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 22 aufgeführt. Die Schichtdicke (d) entsprach 1 cm und die Einheiten für die molare (c) sowie die Massenkonzentration (c_m) waren $\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ bzw. $\text{g} \times \text{l}^{-1}$.

Tabelle 22: Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der verwendeten rekombinanten Proteine.

Proteinbezeichnung	Molekulargewicht ($\text{g} \times \text{mol}^{-1}$)	molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)
RGMb	46118	35255
RGMb $_{\Delta\text{NCys}}$	41945	35255
BMP-2	25952	37162
BMP-3	25055	45795
BMP-4	26258	40630
BMP-6	31135	43735
BMP-7	31201	43735

2. Material und Methoden

BMP-15	27864	40630
GDF-2	24350	37775
GDF-5	26775	31690
GDF-6	27111	37775
GDF-7	28012	37775
GDF-8	24796	41005
GDF-9	30959	46590
TGF- β 2	25438	54860
TGF- β 3	25427	46965
ActivinA	26240	37416
AMH	23155	20815
Noggin	46340	82025
BMPR-IA	14660	5075
BMPR-IB	13194	1880
ActR-I	11487	10595
ALK-7, Fc Chimera	35700	-
ActR-IB, Fc Chimera	37500	-
TGF β R-I, Fc Chimera	37500	-
ActR-II _{SP9}	14869	23085
ActR-IIB	12810	25350
BMPR-II _{SP9}	15457	17585

2.5.4. WESTERN BLOT

Größenstandard:	<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i> (Thermo Fisher Scientific)
Blot-Membran:	<i>Immobilon-P</i> Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore)
Blot-Apparatur:	<i>Rotiphorese® MINI Tank-Blotting-System</i> (Carl Roth)
Penta-His-HRP:	<i>Penta-His-HRP-Kit</i> (5 Prime)
V5-Antikörper:	Anti-V5-Tag (# R960-25, Invitrogen)
SNAP-Antikörper:	Anti-SNAP-tag® Antikörper (# P9310S; NEB Biolabs)
sekundärer Antikörper (SNAP):	Anti-Rabbit-HRP Antikörper (# 7074; Cell Signaling)
sekundärer Antikörper (V5):	Anti-Mouse-HRP Antikörper (# 7076; Cell Signaling)
Blocklösung.:	5% Milchpulver in TBST
ECL-Lösung:	<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate</i> (Thermo Fisher Scientific)

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.5.1) aufgetrennt, wobei ein gefärbter Protein-Größenstandard zur anschließenden Detektion auf dem Western Blot verwendet wurde. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe einer Nass-Blot-Apparatur bei 90 V über 60 min auf die PVDF-Membran transferiert. Western-Blots zum Nachweis von Proteinen, die über eine Hexa-Histidin-Sequenz verfügen, wurden mit dem Penta-His-HRP-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. CLIP-/SNAP- bzw. V5-Fusionsproteine wurden wie im Folgenden dargestellt detektiert. Freie Bindungsstellen auf der Membran werden nach dem Proteintransfer mit der Blocklösung für 1 h bei RT abgesättigt. Der SNAP-tag®-Antikörper wurde 1:1000, der V5-Tag Antikörper 1:3000 in Blockpuffer verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit der Blot-Membran inkubiert. Überschüssiger primärer Antikörper wurde daraufhin durch dreimaliges Waschen mit PBST (2.1.10) über 10 min bei RT und einem Waschschrift in PBS (2.1.10) (10 min) entfernt. Anschließend wurde die sekundären Antikörper (Nachweis Snap-/CLIP-Fusionsproteine: sekundärer Antikörper (SNAP); Detektion V5-Fusionsproteine: sekundärer Antikörper (V5)) 1:1000 in Blockpuffer verdünnt, für 1 h bei RT zu der Blotmembran gegeben, die Membran wie zuvor beschrieben gewaschen und nach Herstellerangaben mit Hilfe des ECL-Reagenzes entwickelt.

2.6. ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON REKOMBINANTEN BMP-LIGANDEN AUS *E. COLI* ZELLEN

Die Extraktion, Rückfaltung sowie die Reinigung von GDF-5 erfolgte nach (Mueller, T.D. et al. 2005). Auch die Extraktion von BMP-2 aus den Einschlusskörpern sowie die Trennung des Proteins von Nukleinsäuren mittels denaturierender Gelfiltration fand nach einem bereits beschriebenen Verfahren statt (Ruppert, R. et al. 1996).

Renaturierung von BMP-2 nach (Hillger, F. et al. 2005)

Im Anschluss an die denaturierende Gelfiltration wurden die vereinigten Eluate mittels Ultrafiltration auf eine Absorption bei 280 nm (Abs_{280nm}) von etwa 15 – 20 konzentriert und auf 10 °C gekühlt. Durch langsames Eintropfen in den zuvor entgasten sowie gekühlten (10 °C) Rückfaltungspuffer (2.1.10) wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt und für acht Tage bei 10 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Abschluss des Faltungsprozesses wurde die Proteinlösung mittels Ultrafiltration konzentriert, mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5.5 eingestellt und bei 4 °C gegen das 100fache Volumen Heparin-Puffer A (2.1.10) dialysiert.

Denaturierende Ionenaustauschchromatographie an Heparin-Sepharose mit BMP-2

Säule: *HiTrap Heparin HP*, 5 ml, # 17-0407-03 (GE Healthcare)
FPLC: *Äkta Prime* (GE Healthcare)

Die Abtrennung des verbliebenen BMP-2 Monomers wurde in Anlehnung an (Hillger, F. et al. 2005) mittels denaturierender Ionenaustauschchromatographie an Heparin-Sepharose durchgeführt. Pro Reinigungslauf am *Äkta Prime* System wurden maximal 30 mg Protein bei einer Flussrate von 4 ml/min auf die zuvor mit Heparin-Puffer A (2.1.10) äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Heparin Puffer A gewaschen bis die Absorption bei 280 nm konstant war. Während der Elution entlang eines linearen Salzgradienten über 8 Säulenvolumen von 0% auf 100% Heparin-Puffer B (2.1.10) bei 2 ml/min wurden Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen wurde photometrisch bestimmt und proteinhaltige Fraktionen mittels SDS-PAGE (2.5.1) unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Dimer-enhaltende Fraktionen wurden vereinigt, gegen 0.1 % TFA dialysiert, zu Probengrößen von je 1 mg gefriergetrocknet und bei -80 °C verwahrt.

2.7. ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON REKOMBINANTEN BMP-REZEPTOREN AUS *E. COLI* ZELLEN

Die Isolation sowie die Reinigung der Rezeptortodomänen von BMPR-IA (Kirsch, T. et al. 2000b; Keller, S. et al. 2004) sowie ActR-IIB (Weber, D. et al. 2007) als Thioredoxin-Fusionsproteine fand in Anlehnung an bereits etablierte Protokolle statt und werden detailliert in den Dissertationen von Dr. Alexander Kotzsch sowie Dr. Dionys Weber beschrieben (Weber, D. 2006; Kotzsch, A. 2008).

2.8. ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON BMP REZEPTOREN AUS INSEKTENZELLKULTURÜBERSTAND (ACTR-II/BMPR-II)

2.8.1. METALLAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die Expressionsüberstände der Insektenzellkultur wurden zunächst gegen das 100fache Volumen Ni-NTA Auftragspuffer (2.1.10) bei 4 °C dialysiert. Im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt (20 min, 6000 rpm, 4 °C; JA-10, Beckman Coulter *Avanti® JE*) wurde der Medienüberstand je nach erwartetem Proteingehalt mit etwa 3-5 ml Ni-NTA (*His Buster Nickel Affinity Gel*, # TD1NI-S200-200, Amocol) Säulenmaterial versetzt und bei 4 °C unter Invertieren für mindestens zwei Stunden oder über Nacht inkubiert. Die Suspension wurde in eine Glas-

Econosäule (Bio-Rad Laboratories) überführt und anschließend das Säulenmaterial mit dem 20fachen Säulenvolumen an Ni-NTA Auftragspuffer (2.1.10) gewaschen. Der Durchlauf wurde separat gesammelt. Durch mehrfaches Auftragen von je 5 ml Ni-NTA Elutionspuffer (2.1.10) wurde gebundenes Protein von der Säulenmatrix eluiert und in Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Mittels SDS-PAGE (2.5.1) wurden der Durchlauf sowie die Elutionsfraktionen auf Proteingehalt und Reinheitsgrad überprüft. Proteinhaltige Fraktionen wurden anschließend vereinigt und gegen fünf Liter Ni-NTA Dialysepuffer I (2.1.10) dialysiert.

2.8.2. UMKEHRPHASE-HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Säule: präparative Umkehrphase C4 Säule (*Jupiter*[®] 10 µm C4 300 Å, 250 x 10 mm, # 00G-4168-N0; Phenomenex)
 FPLC: *BioLogic DuoFlow* (Bio-Rad Laboratories)

Vor dem Auftrag auf die Säule wurde die Proteinlösung mit 10%iger TFA-Lösung auf eine Endkonzentration von 0.1 % TFA eingestellt und zentrifugiert (15 min, 4500 x g, 4 °C, Eppendorf 5804R). Anschließend wurden je Reinigung etwa 3 mg Protein über eine 10 ml Probenschleife mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die zuvor äquilibrierte Säule aufgetragen (Umkehrphase-HPLC-Laufpuffer, siehe 2.1.10). Ungebundenes Material wurde in einem Waschschrift mit Puffer (Umkehrphase-HPLC-Laufpuffer, siehe 2.1.10) von der Säule entfernt, während gebundenes Protein in dem darauffolgenden Stufengradienten (Umkehrphase-HPLC-Elutionspuffer, 2.1.10; Gradient siehe Tabelle 23) eluiert wurde. Es wurden Fraktionen zu 1.5 ml gesammelt.

Tabelle 23: Stufengradient für die präparative Umkehrphase-HPLC der Rezeptoren.

Stufen des Gradienten (in % Acetonitril)	Länge des Gradienten (in ml)	Volumen der Elutionsfraktion (in ml)
0 - 30%	45	1.5
30 - 50%	70	1.5
50 - 100%	15	-
100%	15	-

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde photometrisch (2.5.3) überprüft und proteinhaltige Eluate mittels SDS-PAGE (2.5.1) auf ihre Reinheit überprüft. Anschließend wurden entsprechende Fraktionen vereinigt, gegebenenfalls konzentriert, aliquotiert und gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.9. ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON RGMb AUS INSEKTENZELLKULTURÜBERSTAND

2.9.1. METALLAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie wurde wie unter 2.8.1 beschrieben durchgeführt. Mittels SDS-PAGE (2.5.1) wurden der Durchlauf sowie die Elutionsfraktionen auf Proteingehalt und Reinheitsgrad überprüft. Proteinhaltige Fraktionen wurden anschließend vereinigt und gegen fünf Liter Ni-NTA Dialysepuffer II (2.1.10) dialysiert.

2.9.2. ANIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE

Säule: *HiTrap™ QXL*, 5 ml (GE Healthcare)
FPLC: *Äkta Purifier* (GE Healthcare)

Die Dialysate wurden im Anschluss an die Metallaffinitätschromatographie (2.9.1) mittels Zentrifugation (10 min, 4500 x g, 4 °C, Eppendorf 5804R) von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Die Säule wurde am *Äkta Purifier* System mit zwei Leergradienten gereinigt und mit QXL-Laufpuffer (2.1.10) äquilibriert. Der pH-Wert der Proteinlösung wurde mit Indikatorpapier überprüft und gegebenenfalls auf pH 8.0 korrigiert. Der Auftrag der Proteinlösung erfolgte manuell mittels Probenpumpe bei einer Flussrate von 1 ml/min, wobei der Durchlauf gesammelt wurde. Anschließend wurde die Säule über vier Säulenvolumen mit QXL-Laufpuffer gespült und diese Waschfraktion separat gesammelt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte entlang des in Tabelle 24 angegebenen Gradienten mit QXL-Elutionspuffer (siehe 2.1.10) und einer Flussrate von 4 ml/min.

Tabelle 24: Stufengradient zur Elution von RGMb während der QXL-Anionenaustauschchromatographie.

Stufen des Gradienten (in % QXL Elutionspuffer)	Länge des Gradienten (in SV)	Volumen der Elutionsfraktion (in ml)
0 - 40%	15	1.5
40 - 60%	5	1.5
60 - 100%	2	3

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde photometrisch (2.5.3) überprüft und proteinhaltige Eluate mittels SDS-PAGE (2.5.1) auf ihre Reinheit überprüft. Anschließend wurden entsprechende Fraktionen vereinigt, gegebenenfalls konzentriert und aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.9.3. UMKEHRPHASE-HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Säule:	analytische Umkehrphase C4-Säule (<i>Jupiter</i> [®] C4 (00G-4167-E0), 300 Å, 5 µm, 4.6 mm x 250 mm; Phenomenex)
FPLC:	<i>BioLogic DuoFlow</i> (Bio-Rad Laboratories)

Die Reinigung mittels Umkehrphase-HPLC erfolgte zur Überprüfung der Reinheit der RGMb Präparationen oder zur Entsalzung der Proben in Vorbereitung auf nachfolgende massenspektrometrische Untersuchungen. Vor dem Auftrag auf die Säule wurde die Proteinlösung auf 0.1 % TFA angesäuert und zentrifugiert (10 min, 16000 x g, 4 °C, Eppendorf 5418). Anschließend wurden pro Lauf maximal 0.5 mg Protein über eine Probenschleife mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die zuvor äquilibrierte Säule (Umkehrphase-HPLC Laufpuffer, 2.1.10) aufgetragen. Ungebundenes Material wurde in einem Waschschrift mit Puffer von der Säule entfernt, während gebundenes Protein in dem darauffolgenden linearen Gradienten (Umkehrphase-HPLC-Elutionspuffer (2.1.10); Gradient (Tabelle 25)) eluiert wurde. Es wurden Fraktionen zu 0.5 ml gesammelt.

Tabelle 25: Linearer Gradient der analytischen Umkehrphase-HPLC.

Stufen des Gradienten (in % Acetonitril)	Länge des Gradienten (in ml)	Volumen der Elutionsfraktion (in ml)
0 - 100%	40	0.5
100%	5	-

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde photometrisch überprüft (2.5.3) und proteinhaltige Eluate mittels SDS-PAGE (2.5.1) auf ihre Reinheit überprüft. Anschließend wurden entsprechende Fraktionen vereinigt, gegebenenfalls konzentriert, aliquotiert und gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte dann bei -20 °C.

2.10. BIOTINYLIERUNG VON PROTEINEN

Biotin-Lösung: 2 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (#21327; Thermo Fisher Scientific)

Die gereinigten Proteine wurden mit PBS (2.1.10) auf eine Konzentration von 0.5 bis 1 mg/ml eingestellt und anschließend etwa 100 µl dieser Lösung mit dergleichen molaren Menge an Sulfo-NHS-LC-Biotin versetzt. Nach einer zweistündigen Inkubation auf Eis wurde überschüssiges Biotin mittels Ultrafiltration (Vivaspin 4, 5 kDa, PES; Sartorius AG) abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt (2.5.3) und in Aliquots von ca. 10 bis 20 µl bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.11. OBERFLÄCHEN-PLASMONRESONANZ ANALYSE

Die Oberflächen-Plasmonresonanz Analyse (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) ist eine Methode zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten von Biomolekülen in Echtzeit, ohne dass eine Markierung der Bindungspartner erforderlich ist. Dazu wird einer der Interaktionspartner auf einer funktionalisierten Oberfläche immobilisiert (Ligand), während das zweite Molekül (Analyt) löslich in verschiedenen Konzentrationen in einem Pufferstrom darüber geleitet wird. Dabei werden die Massenzu- bzw. -abnahmen während der Assoziation und der Dissoziation in sogenannten Resonanzeinheiten (*Resonance Units*, RUs) in einem Sensogramm dargestellt (Flanagan, M.T. 1984; Jonsson, U. et al. 1991; Karlsson, R. et al. 1991; Karlsson, R. et al. 1993). Physikalisch beruht diese Methode auf der Totalreflektion von einfallendem Licht an der Grenzfläche zwischen einem Glasprisma und dem umgebenden optisch dünnerem Medium, wobei eine evaneszente Welle mit einer Eindringtiefe von etwa 300 nm entsteht. Bei der Oberflächen-Plasmonresonanz ist die Oberfläche des Prismas mit einer dünnen Goldschicht überzogen, wodurch die evaneszente Welle unter Resonanzbedingungen mit freien Elektronen der Goldschicht interagieren kann. Die Resonanzbedingungen sind dabei abhängig von dem Einfallswinkel des Lichtes, den vorherrschenden Brechungsindizes sowie von der Wellenlänge des Lichtes. Da während der Messung die Wellenlänge konstant gehalten wird und die Bindung von Molekülen an die Metall-Oberfläche eine Änderung des Brechungsindex hervorruft, ändert sich der Resonanzwinkel in Abhängigkeit mit der Bindung von Molekülen an die Oberfläche. Diese Winkeländerung ist von der Anzahl der gebundenen Moleküle abhängig und wird in RUs dargestellt, die in einem Sensogramm gegen die Zeit (t) aufgetragen werden. Dabei entspricht eine RU der Bindung von 1 pg an eine Oberfläche mit der Fläche von 1 mm² (RU = [pg/mm²]). Dies ermöglicht eine zeitaufgelöste, quantitative Messung und Darstellung der Interaktion von Biomolekülen.

Alle Messungen wurden an einem ProteON XPR36 System (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Als Laufpuffer wurden HBSET₅₀₀ oder HBSET₁₅₀ (2.1.10) verwendet. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Immobilisierung der Liganden angewendet. Bei der kovalenten Amin-Kopplungsmethode wurde die Alginat-Oberfläche des GLC-Chips (Bio-Rad Laboratories) mit einem Gemisch aus 100 mM 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und 25 mM N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) aktiviert, wodurch ein NHS-Ester generiert wird, der im Anschluss leicht mit primären Aminogruppen des Proteinliganden reagiert. Anschließend wurden die zu immobilisierenden Liganden in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4.0 oder 4.5) in Konzentrationen von meist 50 bis 200 nM über die aktivierte Oberfläche perfundiert bis die gewünschte Beladungsdichte erreicht war. Nicht abreagierte NHS-Ester wurden dann durch eine Injektion von Ethanolamin (1 M) in d₄H₂O abgesättigt. Die zweite

Kopplungsmethode beruht auf der Interaktion von Biotin mit Neutravidin. Dabei wurde die Oberfläche eines GLC-Chips wie zuvor beschrieben mit Hilfe einer NHS/EDC-Mischung aktiviert und anschließend mit Neutravidin (0.1 mg/ml in 10 mM Natrium-Acetat pH 4.0) bis zur Sättigung beladen. Verbleibende reaktive NHS-Ester wurden mit Ethanolamin inaktiviert. Anschließend wurden die biotinylierten Liganden (2.10) in Laufpuffer verdünnt und bis zum Erreichen der gewünschten Beladungsdichte über die Chip-Oberfläche perfundiert.

Ein Messdurchlauf eines Experiments setzt sich aus drei Phasen zusammen: Der Assoziationsphase (Ausbildung des Analyt/Ligand-Komplexes), der Plateau-Phase (Assoziation und Dissoziation des Komplexes sind im Gleichgewicht) sowie der Dissoziationsphase (Trennung des Analyt/Ligand-Komplexes). Aus den gemessenen kinetischen Daten kann dann anhand der Beziehung

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (2)$$

die apparente Gleichgewichtsbindungs-Dissoziationskonstante (K_D), die Affinität, der betrachteten Interaktion bestimmt werden. Dabei steht k_a für die Assoziationskonstante und beschreibt die Rate der Komplexbildung pro Sekunde in einer einmolaren Lösung der Edukte. Die Einheit ist daher $M^{-1} \times s^{-1}$ und Werte für k_a bewegen sich in biologischen Systemen zumeist zwischen 10^3 bis $10^7 M^{-1} \times s^{-1}$. Die Dissoziationskonstante k_d beschreibt den Zerfall pro Sekunde und damit die Stabilität des Komplexes (Einheit [s^{-1}]). In biologischen Systemen findet man typischerweise Größen von k_d zwischen $10^{-1} s^{-1}$ und $10^{-6} s^{-1}$. Bei sehr großen Werten für k_a ($> 5 \times 10^6 M^{-1} \times s^{-1}$) und k_d ($> 10^{-2} s^{-1}$), kann die K_{Deq} durch die konzentrationsabhängige Gleichgewichtskonstante R_{eq} bei Annahme einer 1:1 Interaktion nach Langmuir durch folgende Beziehung bestimmt werden:

$$R_{eq} = \frac{C_A \times R_{max}}{C_A + K_{Deq}} \quad (3)$$

R_{max} bezeichnet in dieser Gleichung den Wert in RUs bei Erreichen der maximalen Bindekapazität der Chipoberfläche, während C_A der Konzentration des Analyten entspricht.

Bei einem typischen Oberflächen-Plasmonresonanz Experiment wurden bei kovalenter Kopplung des Liganden etwa 300 bis 500 RU der BMP- bzw. TGF- β -Liganden auf der Chip-Oberfläche immobilisiert. Bei indirekter Bindung an die Chip-Oberfläche über eine Biotin–Neutravidin-Interaktion wurde der Chip bis zu einer Dichte von ca. 250 bis 300 RU beladen. Üblicherweise wurde die Chip-Oberfläche während der Assoziationsphase mit sechs verschiedenen Analytkonzentrationen (1:2 Verdünnungsschritte) bei einer Flussrate von 200 μ l/s über einen Zeitraum von 160 s perfundiert. Anschließend erfolgte die Dissoziation des Komplexes in einem

Pufferstrom über 300 s bei gleicher Flussrate. Die Chip-Oberfläche wurde durch Perfusionen bei 30 $\mu\text{l/s}$ über je 60 s mit 4 M MgCl_2 und 10 mM Glycin pH 1.5 regeneriert. Abweichungen von diesem Schema werden im Ergebnisteil angegeben.

Um unspezifische Wechselwirkungen der Analyten mit der Chip-Matrix zu berücksichtigen, wurden jeweils die Werte eines Kontrollkanals (Leerkanal) von den Messwerten subtrahiert. Die Interaktionsdaten wurden anschließend mit der ProteON Manager 2.1.2.05 Software (Bio-Rad Laboratories) evaluiert.

2.12. ZIRKULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE

Zirkulardichroismus (*Circular Dichroism*, CD) tritt dadurch in Erscheinung, dass optisch aktive (chirale) Substanzen links und rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Die Differenzen der unterschiedlichen Absorption von links bzw. rechts polarisiertem Licht ($\Delta A = A_R - A_L$) wird als Elliptizität (θ_λ) bezeichnet. Die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge wird Zirkulardichroismus genannt. CD-Spektrometer bestimmen die Differenz der Absorption bei Durchtritt zirkular polarisiertem Lichts durch optisch aktive Substanzen bei verschiedenen Wellenlängen, wobei die Elliptizität aus der Beziehung

$$\theta_\lambda = 32.98^\circ \times \Delta A [\text{deg}] \quad (4)$$

folgt (Holtzhauer, M. und Behlke, J. 1996). Da die Sekundärstrukturelemente von Proteinen chiral sind, werden CD-Spektren im fernen UV-Bereich (190 bis 260 nm) dazu verwendet, Rückschlüsse auf die prozentuale Zusammensetzung eines Proteins aus diesen Strukturelementen zu ziehen sowie eine korrekte Faltung rekombinanter Proteine zu überprüfen. Weiterhin kann auch die thermische Stabilität eines Proteins in spezifischen Puffern untersucht werden.

Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgte an einem JASCO J-810 Spektrometer mit einer Hellma-Quartzglasküvette (Schichtdicke $d = 1$ mm) in Kooperation mit der AG Schindelin des Rudolf-Virchow-Zentrums (RVZ) in Würzburg. Rekombinantes RGMb wurde gegen Natriumphosphatpuffer (200 mM NaPO_4 pH 7.4) dialysiert und auf eine Konzentration von 54 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. Es wurde ein Spektrum bei 20 °C in den Wellenlängenbereichen zwischen 260 nm und 190 nm aufgenommen. Dabei wurden fünf Messungen mit einer Bandweite von 1 nm und einer Geschwindigkeit von 20 nm/min von 260 nm bis 190 nm akkumuliert und jeweils die Mittelwerte bestimmt. Während der Aufnahme des thermischen Denaturierungsspektrums wurde die Proteinlösung ($c = 54$ $\mu\text{g/ml}$) von 20 °C auf 90 °C erhitzt. Dabei fanden

Einzelmessungen mit einer Bandweite von 1 nm und einer Geschwindigkeit von 20 nm/min von 260 nm bis 190 nm statt. Die Temperatur wurde in Schritten von je 10 °C erhöht.

Die detektierte Elliptizität θ_λ in Winkelgraden (mdeg) muss in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest im Protein umgewandelt werden:

$$[\theta]_\lambda = \frac{100 \times \theta_\lambda}{n \times d \times c} [\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}] \quad (5)$$

(mit n = Anzahl der Aminosäurereste, d = Schichtdicke der Küvette in cm, c = Konzentration in mol/l).

2.13. MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSEN

Umsetzen von RGMb mit 5-Iodoacetamidofluorescein (5-IAF) und Proteolyse durch Trypsin

Puffer A:	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 6 M Harnstoff
Puffer B:	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 6 M Harnstoff, 10 mM TCEP, 20 mM Iodacetamid
Puffer C:	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 6 M Harnstoff, 1 mM TCEP
5-IAF:	5-Iodoacetamidofluorescein (#62246; Thermo Fisher Scientific)
Fixierung:	12% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)
Kolloidales Coomassie:	2% (v/v) H ₃ PO ₄ (85%ig), 10% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20% (v/v) Methanol, 0.1% (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
Waschlösung:	25% (v/v) Methanol
Entfärbelösung:	20% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄
Trypsin-Lösung:	20 ng/μl Trypsin (#90057; Thermo Fisher Scientific) in 45 mM NH ₄ HCO ₃ , 10% (v/v) Acetonitril

100 μg RGMb wurden gegen Puffer A dialysiert, auf ein Volumen von etwa 200 μl mittels Ultrafiltration (Vivaspin 4, 5 kDa, PES; Vivaspin 500, 3 kDa, PES; Sartorius AG) konzentriert und mit 30 mM 5-IAF (in DMF) versetzt. Nach einer Inkubation für 1.5 h bei RT unter Lichtausschluss wurde RGMb gegen Puffer A dialysiert, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Ultrafiltration (Vivaspin 500, 3 kDa, PES; Sartorius AG) konzentriert, in 500 μl Puffer B aufgenommen und unter Lichtausschluss bei RT für 1 h invertierend inkubiert. Nach der Dialyse des Ansatzes gegen Puffer C wurde eine Metallaffinitätschromatographie mit Nickel-Chelat Material im Batch Verfahren durchgeführt. Der Durchlauf wurde auf 50 μl konzentriert (Vivaspin 500, 3 kDa, PES; Sartorius AG) und mit reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem 6 x Protein-Probenpuffer (6 x PPP; 2.1.10) versetzt.

2. Material und Methoden

Das Nickel-Chelat Material wurde mit reduzierendem 6 x PPP versetzt, aufgeköcht und anschließend sedimentiert (5 min, 16000 x g, RT, Eppendorf 5415D) und der Überstand sowie auch das Sediment auf das SDS-Gel aufgetragen.

Nach dreimaligem Waschen in H₂O wurde das Gel in TCA-Lösung für 1 Stunde fixiert und dann bis zu einem blassen Anfärben der Proteinbanden in kolloidaler Coomassie-Lösung inkubiert. Die entsprechenden Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, zunächst 10 min in Waschlösung und dann in Entfärbelösung unter Schütteln inkubiert. Für die anschließende Proteolyse mit Trypsin wurden die Gelfragmente bis zum Eintreten einer weißlichen Trübung in 100 µl Acetonitril geschwenkt. Der Überstand wurde abgenommen und das Gelfragment in einem Rotationsvakuumkonzentrator getrocknet. Anschließend erfolgten die Rehydrierung sowie die Proteolyse mit 20 µl Trypsin-Lösung für eine Stunde bei 37 °C. Nach Zugabe von 50 µl 45 mM NH₄HCO₃, 10% (v/v) Acetonitril erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Für die Extraktion der Peptide wurde zunächst der Überstand abgenommen und das Gelstück in 50 µl 0.1% (v/v) TFA für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Überstände wurden anschließend vereinigt und mit Hilfe des Rotationsvakuumkonzentrators auf ein Volumen von 5 bis 10 µl konzentriert. Die Peptide wurden dann mittels C18 ZipTip-Spitzen (Millipore) nach Herstellerangaben entsalzt, in 50% Methanol, 1% Essigsäure eluiert und dann mittels ESI-FTICR-Massenspektrometrie (2.13.1) analysiert.

Deglykosylierung

Die Abspaltung der Glykosylierungen wurde durch Inkubation von rekombinantem RGMb mit der Glykosidase EndoH_f (#P0703, NEB Biolabs) (2.5 U Enzym/µg RGMb) erzielt. Rekombinant hergestelltes RGMb wurde zunächst mittels Umkehrphase-Chromatographie gereinigt (2.9.3) sowie gefriergetrocknet und der Deglykosylierungsansatz anschließend wie in Tabelle 26 angegeben pipettiert:

Tabelle 26: Pipettierschema eines Deglykosylierungsansatzes mit EndoH.

Komponente	Menge
RGMb in HBSE ₁₅₀	200 µg ad 150 µl
EndoH (1000 U/µl)	0.5 µl
10 x EndoH Puffer	15 µl

Der Ansatz wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert, anschließend mittels SDS-PAGE (2.5.1) analysiert und vor der entsprechenden massenspektrometrischen Detektion (2.13.1 oder 2.13.2) zunächst mittels Umkehrphase-HPLC (2.9.3) entsalzt und gefriergetrocknet.

2.13.1. ELEKTROSPRAY-IONISATION-(ESI)-FOURIERTRANSFORMATION-IONEN-ZYKLOTRONRESONANZ-(FTICR)-MASSENSPEKTROMETRIE

Die mittels Umkehrphase-HPLC (2.9.3) gereinigten und entsalzten Proteinproben wurden gefriergetrocknet, anschließend zu etwa 1 μ M (50% Methanol, 1% Ameisensäure) gelöst und mittels ESI-FTICR-Massenspektrometrie analysiert (Mann, M. und Wilm, M. 1995). Alle Messungen wurden von Dr. Werner Schmitz am Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg an einem Bruker *APEX II* Fouriertransformation-Ionen-Zyklotronresonanz-Massenspektrometer (Bruker Daltonics), ausgestattet mit einem 7.5T Magneten und gekoppelt an eine Apollo Elektrospray Ionenquelle, durchgeführt. Die Messungen wurden im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen.

2.13.2. MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION (MALDI) MASSENSPEKTROMETRIE

Die mittels Umkehrphase-HPLC (2.9.3) entsalzten und gefriergetrockneten Proben wurden in Kooperation mit der AG Deutzmann am Lehrstuhl für Biochemie I des Instituts für Biochemie, Mikrobiologie und Genetik an der Universität Regensburg durchgeführt.

Die Messungen wurden an einem *4700 Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems) im Linearmodus aufgenommen. Als MALDI-Matrix wurde Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet.

2.14. PROTEINKRISTALLISATION

Tabelle 27: Verwendete Kristallisationsscreens.

Kristallisationsscreen	Hersteller
Crystal Screen I & II	Hampton Research
The pH Clear Suite	Qiagen
The Nucleix Suite	Qiagen
The Protein Complex Suite	Qiagen
Optimix 3	Fluidigm
Wizard I & II	Emerald Bio
Index	Hampton Research

Die Kristallisationen wurden unter Zuhilfenahme eines NanoDrop Pipettierroboters (*HoneyBEE 963*; Digilab Genomic Solutions) am Rudolf-Virchow Zentrum der Universität Würzburg durchgeführt, da dieser die Verwendung kleiner Probenvolumina von etwa 300 nl ermöglicht.

Für eine initiale Suche nach adäquaten Kristallisationsbedingungen wurde die *sitting-drop*-Dampfdiffusionsmethode gewählt (für eine Übersicht: (Rhodes, G. 2006)).

Es wurden insgesamt sieben kommerziell erhältliche Kristallisationsscreens getestet (Tabelle 27). Die Kristallisationstropfen enthielten jeweils 300 nl der entsprechenden Kristallisationslösung sowie 300 nl Proteinlösung und wurden gegen 40 µl Reservoirlösung äquilibriert. Die Konzentration des RGMb-Proteins betrug dabei 7.2 mg/ml (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 35 mM NaCl).

2.15. METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER STÖCHIOMETRIE DER KOMPLEXBILDUNG

2.15.1. ANALYTISCHE GELFILTRATION

Kalibrierung der Gelfiltrationssäule

Säule: *Superose*[®] 6 GL 10/300 (GE Healthcare)

FPLC: *Äkta Purifier* (GE Healthcare)

Die Gelfiltrationssäule wurde mit Laufpuffer (HBSE₅₀₀, 2.1.10) äquilibriert und zunächst das Ausschlussvolumen (V_0 ; 7.773 ml) durch Injektion von 200 µl Dextranblau (1 mg/ml) über eine 200 µl Probenschleife bestimmt. Das absolute Säulenvolumen (V_t ; 23.562 ml) wurde den Herstellerangaben entnommen. Die Kalibrierung der Säule erfolgte durch die Injektion eines Proteingemischs bestehend aus vier Standardproteinen definierten Molekulargewichts (Conalbumin, 75 kDa; Carboanhydrase, 29 kDa; RNase A, 13.7 kDa; Aprotinin, 6.5 kDa). Es wurden jeweils 30 µg jedes Proteins ($c = 3$ mg/ml) vereinigt, mit Laufpuffer auf 200 µl aufgefüllt und anschließend über die 200 µl Injektionsschleife auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen, um die Elutionsvolumina der Einzelproteine (V_P) zu ermitteln. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min. Die relativen Elutionsvolumina (K_{av}) der einzelnen Proteinspezies konnten aufgrund des folgenden Zusammenhangs bestimmt werden:

$$K_{av} = \frac{V_P - V_0}{V_t - V_0} \quad (6)$$

Die relativen Elutionsvolumina stehen dabei mit dem dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte der Proteine in einem linearen Zusammenhang, wodurch mit Hilfe der Standardproteine eine Regressionsgerade (Abbildung 12) ermittelt werden konnte. Die dieser Regressionsgeraden zugrundeliegende Geradengleichung wurde anschließend zur Ermittlung der apparenten Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine verwendet (Abbildung 12).

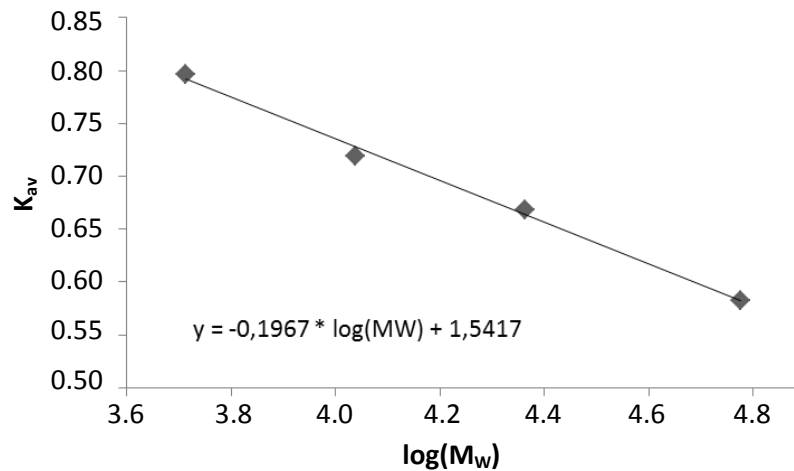


Abbildung 12: Regressionsgerade zur Ermittlung der apparenten Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine.

Präparation sowie Isolierung des Komplexes aus GDF-5 und RGMb

Säule: *Superose*[®] 6 GL 10/300 (GE Healthcare)

FPLC: *Äkta Purifier* (GE Healthcare)

Für die Herstellung des Komplexes aus dem Liganden GDF-5 sowie dem Corezeptor RGMb wurden 15 nmol RGMb in HBSE₁₄₀₀ (2.1.10) in einem Gesamtvolumen von 1500 µl vorgelegt. Hingegen wurden 5 nmol GDF-5 in einem Gesamtvolumen von 1500 µl _dH₂O und 0.2% CHAPS (w/v) angesetzt. Anschließend wurde die RGMb-Lösung unter leichtem Vortexen zu der Ligandenlösung gegeben, wodurch eine finale Salz-Konzentration von 700 mM NaCl erzielt wurde. Der Komplex wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend mittels Ultrafiltration (Vivaspin 4, 5 kDa, PES; Vivaspin 500, 3 kDa, PES; Sartorius AG) auf ein Volumen von 200 µl konzentriert. Die Komplexlösung wurde durch Zentrifugation von Präzipitat getrennt (10 min, 16000 x g, 4 °C, Eppendorf 5418) und anschließend mittels einer 200 µl Probenschleife auf die zuvor mit Puffer (HBSE₇₀₀ + 0.05% CHAPS (w/v), 2.1.10) äquilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min und es wurden Fraktionen zu 200 µl gesammelt. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (2.5.1) analysiert und Komplex enthaltende Eluate im Anschluss mittels einer analytischen Umkehrphase-HPLC (2.15.2) auf die Komplexstöchiometrie hin untersucht.

2.15.2. AUFTRENNUNG DES PROTEINKOMPLEXES MITTELS UMKEHRPHASE-HPLC

Säule: analytische Umkehrphase C4-Säule (*Jupiter*[®] C4 (00G-4167-E0), 300 Å, 5 µm, 4.6 mm x 250 mm; Phenomenex)

FPLC: *BioLogic DuoFlow* (Bio-Rad Laboratories)

Kalibrierung der Umkehrphase-HPLC Analyse zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie

Um die vorliegende Stöchiometrie des Komplexes aus RGMb Corezeptor und GDF-5 Liganden bestimmen zu können, wurden Ligand und Corezeptor zunächst in definierten stöchiometrischen Mengenverhältnissen vereinigt und anschließend mittels Umkehrphase-HPLC analysiert.

Für eine 1:1 Stöchiometrie wurden 2 nmol GDF-5 in 250 µl H₂O mit 0.1% CHAPS (w/v) sowie 2 nmol RGMb in 250 µl HBSE₁₄₀₀ (2.1.10) vorgelegt. Danach wurde die Corezeptor-Lösung zum Liganden pipettiert, der Komplex dann auf 0.1% TFA (v/v) eingestellt und auf ein Volumen von 1 ml mit Umkehrphase-HPLC Laufpuffer (2.1.10) aufgefüllt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 16000 x g, 4 °C, Eppendorf 5418) wurde die Proteinlösung über eine 1 ml Probenschleife auf die Umkehrphase-Säule aufgetragen.

Eine 1:2 Stöchiometrie (2 nmol GDF-5 zu 4 nmol RGMb) wurde analog angesetzt und anschließend über die Umkehrphase-HPLC analysiert. Hingegen wurde die 1:4 Stöchiometrie (2 nmol GDF-5 zu 8 nmol RGMb) in einem Gesamtvolumen von 2 ml (final: HBST₇₀₀ + 0.05% CHAPS (w/v)) pipettiert und auf 0.1% TFA (v/v) eingestellt. Der Auftrag auf die Umkehrphase-HPLC Säule erfolgte im Anschluss an die Zentrifugation (10 min, 16000 x g, 4 °C, Eppendorf 5418) mittels einer 2 ml Probenschleife.

Die Elution erfolgte mit Umkehrphase-HPLC Elutionspuffer (2.1.10) jeweils entlang des in Tabelle 28 aufgeführten Stufengradienten bei einer Flussrate von 1 ml/min.

Tabelle 28: Stufengradient zur Komplexauftrennung mittels Umkehrphase-HPLC.

Stufen des Gradienten (in % Acetonitril)	Länge des Gradienten (in ml)	Volumen der Elutionsfraktion (in ml)
0 - 25%	4	4
25 - 55%	35	0.25
55 - 100%	4	0.25

Analytische Umkehrphase-HPLC zur Auftrennung des Proteinkomplexes

Nach der Abtrennung des Proteinkomplexes mittels Gelfiltration (siehe 2.15.1) wurden Protein-enthaltende Elutionsfraktionen vereinigt und mit 10%iger TFA-Lösung (v/v) auf eine finale Konzentration von 0.1% TFA eingestellt. Nach der Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen (10 min, 16000 x g, 4 °C, Eppendorf 5418) wurde die Proteinlösung mittels einer 1 ml Probenschleife auf die Umkehrphase-HPLC-Säule aufgetragen und mit Hilfe des in Tabelle 28 aufgeführten Gradienten in Umkehrphase-HPLC Elutionspuffer (2.1.10) eluiert. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Bestimmung der Komplexstöchiometrie mittels Umkehrphase-HPLC-Impulsintegration

Durch die Umkehrphase-HPLC wurden die Komponenten des isolierten Proteinkomplexes aus GDF-5 und RGMb voneinander getrennt. Anschließend wurden die dadurch erhaltenen Flächen unterhalb der entsprechenden Proteinelutionsbereiche (Impulse) mit Hilfe des Grafikprogramms OriginPro8.6G (OriginLab) integriert. Durch Korrelation mit den Kalibrierungsanalysen von Ligand/Corezeptor-Mischungen exakter molarer Zusammensetzung konnte dann auf die zugrundeliegende Stöchiometrie beider Proteine im isolierten Komplex geschlossen werden.

2.16. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.16.1. KULTIVIERUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLINIEN

Kultivierung von AD-293 Zellen

Die Zelllinie AD-293 ist ein Derivat der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293 und zeichnet sich durch verbesserte Zelladhärenz aus. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in DMEM-Zellkulturmedium (2.1.9) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden sie im Verhältnis 1:10 passagiert.

Kultivierung von ATDC5-, C2C12-, C2C12-BRA und C3H10T1/2-BRE-Luc Zellen

Die murine Chondrozyten-Zelllinie ATDC5 wurde in DMEM/F12-Medium mit 5% (v/v) fötalem Kälberserum (2.1.9) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz von 60 bis 70% wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert. Die murine Myoblasten-Zelllinie C2C12 bzw. C2C12-BRA sowie die murine Mesenchym-Zelllinie C3H10T1/2-BRE-Luc wurden in DMEM-Medium mit 10% (v/v) FCS bei 37 °C und 5% CO₂ angezogen und bei Erreichen einer Dichte von 60 – 70% im Verhältnis 1:10 (C3H10T1/2) oder 1:10 bis 1:20 (C2C12) vereinzelt.

Einfrieren von Zellkulturzellen

Zur Lagerung wurden 0.5 bis 1.5 x 10⁶ Zellen der jeweiligen Zelllinie bei 400 x g sedimentiert, der Medienüberstand abgenommen, die Zellen in DMEM-Medium (2.1.9) mit 10% (v/v) FCS sowie 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in zwei Milliliter Cryoröhrchen mit Außengewinde (Greiner) überführt. Durch das Einfrieren in einer Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C wurde eine Kühlrate von -1 °C pro Minute sichergestellt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.16.2. ALKALISCHE PHOSPHATASE-NACHWEISVERFAHREN MIT LÖSLICHEM RGMB

Phosphatase-Substrat: *Phosphatase Substrate Kit* (Thermo Fisher Scientific)

Während der embryonalen Entwicklung von Knochen- und Knorpelzellen differenzieren chondrogene Vorläuferzellen in einem mehrstufigen Prozess zu reifen Chondrozyten. Die prä-Chondrozyten Zelllinie ATDC5 zeigt diese Transition auch in vitro durch Stimulation mit BMP-Wachstumsfaktoren (Shukunami, C. et al. 1996; Shukunami, C. et al. 1998; Nakamura, K. et al. 1999). Die murine Myoblasten Zelllinie C2C12 differenziert in vitro in kontraktile Myotuben, eine Stimulation mit BMP-Wachstumsfaktoren resultiert hingegen in einem Wechsel in die

Osteoblasten-Linie (Katagiri, T. et al. 1994). Ein Markerprotein dieses Differenzierungsprozesses stellt unter anderem die Alkalische Phosphatase dar (Shukunami, C. et al. 1998).

Die Zelldichte der Zelllinien wurde zunächst im Falle der ATDC5-Zellen auf eine Zellzahl von 1.2×10^5 Zellen/ml, im Falle der C2C12 Zellen auf 7×10^4 Zellen/ml mit dem jeweils benötigten Zellkulturmedium (2.1.9) eingestellt. Anschließend wurden jeweils pro Kulturareal einer 96er Zellkulturplatte 100 μ l der entsprechenden Zellsuspension zugegeben und die Zellen anschließend für max. 16 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Das verbrauchte Zellkulturmedium wurde entfernt und durch jeweils 100 μ l ALP-Hungermedium (2.1.9) ersetzt. Die Kulturareale, von denen anschließend die Verdünnungsreihen der Wachstumsfaktoren ausgingen, wurden mit 150 μ l ALP-Hungermedium inklusive der gewünschten Anfangskonzentrationen an Wachstumsfaktoren bestückt. Anschließend wurden diese Wachstumsfaktoren in einer Verdünnungsreihe in jedem Schritt auf ein Drittel der Ausgangskonzentration verdünnt. Die Auswertung der Nachweisverfahren erfolgte nach einer Inkubation für 72 h bei 37 °C und 5% CO₂. Dabei wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und anschließend jedes Kulturareal mit jeweils 100 μ l sterilem PBS (2.1.10) gewaschen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von jeweils 100 μ l ALP-Lysepuffer (2.1.10) lysiert und für 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Substratlösung der Alkalischen Phosphatase (para-Nitrophenylphosphat (PNPP)-Lösung) nach Herstellerangaben angesetzt und jeweils 100 μ l dieser Lösung zu jedem Ansatz gegeben. Bei Eintreten der Farbreaktion wurde die Zellkulturplatte am ELISA-Reader bei 405 nm und 630 nm vermessen. Die Hintergrundwerte (630 nm) werden anschließend von den Messwerten abgezogen. Die Berechnung der halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC₅₀) sowie inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) erfolgte mit dem Grafikprogramm OriginPro8.6G (OriginLab) mittels des Analyse-Werkzeugs *Sigmoider Fit* und der Funktion *Logistic Fit*.

2.16.3. LUCIFERASE-REPORTERGEN-NACHWEISVERFAHREN MIT LÖSLICHEM RGMB

Luciferase-Substrat: *Luciferase Assay System* (Promega)

Lyse-Puffer: *5 x Reporter lysis buffer* (Promega)

Die mesenchymale Stammzelllinie C3H10T1/2 differenziert nach einer Stimulation mit BMP-2 oder BMP-7 zunächst in die chondroblastäre und anschließend in die osteoblastäre Linie (Shea, C.M. et al. 2003). Diese Zelllinie wurde stabil mit einem BMP-responsiven Luciferase-Reportergenkonstrukt transfiziert, wodurch eine sensitive Nachweismethode zur Quantifizierung aktiver BMP-Wachstumsfaktoren generiert wurde (Logeart-Avramoglou, D. et al. 2006).

Die Zelldichte der C3H10T1/2-Zellen wurde zunächst auf 7×10^4 Zellen/ml mit Zellkulturmedium (2.1.9) eingestellt. Anschließend wurden jeweils pro Kulturareal einer 96er Zellkulturplatte 100 μ l der entsprechenden Zellsuspension zugegeben und die Zellen anschließend für max. 16 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurde das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und durch jeweils 100 μ l C3H10-Hungermedium (2.1.9) ersetzt. Die Kulturareale, von denen anschließend die Verdünnungsreihen der Wachstumsfaktoren ausgingen, wurden mit 150 μ l C3H10-Hungermedium inklusive der gewünschten Anfangskonzentrationen an Wachstumsfaktoren bestückt. Anschließend wurden diese Wachstumsfaktoren in einer Verdünnungsreihe in jedem Schritt auf ein Drittel der Ausgangskonzentration verdünnt. Die Auswertung der Nachweisverfahren erfolgte nach einer Inkubation für 72 h bei 37 °C und 5% CO₂. Dabei wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und anschließend jedes Kulturareal mit jeweils 100 μ l sterilem PBS (2.1.10) gewaschen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von jeweils 50 μ l Reporter-Lysepuffer (Promega, nach Herstellerangaben angesetzt) lysiert und für mindestens 30 min bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Zelllysate bei 37 °C aufgetaut, jeweils 30 μ l jedes Ansatzes in eine 96er Luminometerplatte überführt und am Luminometer ausgewertet. Dabei wurde jedem Ansatz automatisiert durch das Gerät jeweils 50 μ l des Substrates zupipettiert und die entsprechende Lumineszenz nach einer Latenzzeit von 10 s detektiert. Je Ansatz wurden nacheinander zehn Messwerte aufgenommen, die im Anschluss gemittelt wurden. Die Berechnung der halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC₅₀) sowie inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) erfolgte mittels des Grafikprogramms OriginPro8.6G (OriginLab) unter Verwendung des Analyse-Werkzeugs *Sigmoider Fit* und der Funktion *Logistic Fit*.

2.16.4. LUCIFERASE-REPORTERGEN-NACHWEISVERFAHREN MIT MEMBRANSTÄNDIGEM RGMb

Transfektion

Transfektionsreagenz : *Xfect Transfection Reagent* (Clontech)

Je 10 cm Kulturschale wurden 1×10^6 AD-293-Zellen, 5×10^5 C2C12-, ATDC5- oder C3H10T1/2-BRE-Luc Zellen in den spezifischen Wachstumsmedien (2.1.9) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Medienüberstände entfernt und durch je 10 ml frisches Wachstumsmedium (2.1.9) ersetzt. Die Transfektionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Pro Ansatz:	A)	20 µg	pcDNA3.1_RGMb oder pcDNA3.1_leer
		2 µg	pGL3_BRE-Luc (außer C3H10T1/2-BRE-luc)
		1 µg	pSV_β-Gal
		ad 600 µl Optimem Zellkulturmedium (2.1.9)	
	B)	6.45 µl	Xfect
		ad 600 µl Optimem Zellkulturmedium	

Anschließend wurde jeweils Ansatz B zu Ansatz A pipettiert, durch vorsichtiges Vortexen gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden schließlich tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellkulturplatten dann für 5 h bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert. Der Transfektionsüberstand wurde entfernt und durch 10 ml des entsprechenden Zellkulturmediums (2.1.9) ersetzt. Eine Inkubation über Nacht erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung von der Kulturschale abgelöst und auf eine Zelldichte von 7 x 10⁴ Zellen/ml (ATDC5, C2C12) bzw. 2 x 10⁵ Zellen/ml (AD-293) eingestellt. Anschließend wurden pro Areal einer 96er Zellkulturplatte jeweils 100 µl der entsprechenden Zellsuspension ausgesät, wobei die AD-293 Zellen in Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturplatten (Greiner) kultiviert wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂.

Das verbrauchte Zellkulturmedium wurde entfernt und durch jeweils 100 µl ALP-Hungermedium (2.1.9) ersetzt. Die Verdünnungsreihen wurden für die Zelllinien ATDC5 sowie C2C12 direkt in den Zellkulturplatten angesetzt, während diese im Falle der AD-293 Zellen in einer extra Platte pipettiert wurde. Die Kulturareale, von denen anschließend die Verdünnungsreihen der Wachstumsfaktoren ausgingen, wurden mit 150 µl Hungermedium inklusive der gewünschten Anfangskonzentrationen an Wachstumsfaktoren beschickt. Anschließend wurden die Wachstumsfaktoren in einer Verdünnungsreihe in jedem Schritt auf ein Drittel der Ausgangskonzentration verdünnt. Die Auswertung der Nachweisverfahren erfolgte nach einer Inkubation für 72 h bei 37 °C und 5% CO₂.

Normierung der Ansätze auf die relativen Mengen aktiv proliferierender Zellen (Zellzahl-Normierung)

Reagenz: WST-1 (*Colorimetric Cell-Proliferation Assay*; Roche)

Je Kulturareal der 96er-Zellkulturplatten wurden 5 µl WST-1 Reagenz hinzupipettiert und die Platten anschließend bis zum Einsetzen der Farbreaktion bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert (ca. 1 bis

2 h). Anschließend wurden jeweils 80 µl des Überstandes in eine neue 96er Zellkulturplatte überführt und am ELISA Reader bei 420 nm bis 630 nm ausgelesen. Zur Korrektur unspezifischer Hintergrundabsorptionen wurden die Hintergrundwerte (630 nm) von den Messwerten (420 nm) abgezogen.

Auswertung des Luciferase-Reportergen-Nachweisverfahrens

Luciferase-Substrat: *Luciferase Assay System* (Promega)

Lyse-Puffer: *5 x Reporter lysis buffer* (Promega)

Im Anschluss an die Zellzahlnormierung wurden die Zellen mit je 100 µl PBS (2.1.10) gewaschen und dann in jeweils 60 µl Lyse-Puffer lysiert. Nach einem Einfrier-Auftau-Zyklus (-80 °C, 37 °C) wurden je 50 µl Lysat in eine 96er Luminometerplatte überführt und am Luminometer ausgewertet. Dabei wurde jedem Ansatz automatisiert durch das Gerät jeweils 50 µl des Luciferase Substrates zupipettiert und die entsprechende Lumineszenz nach einer Latenzzeit von 10 s detektiert. Je Ansatz wurden nacheinander zehn Messwerte aufgenommen, die im Anschluss gemittelt wurden. Die Berechnung der halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC₅₀) sowie inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) erfolgte mittels des Grafikprogramms OriginPro8.6G (OriginLab) unter Verwendung des Analyse-Werkzeugs *Sigmoider Fit* und der Funktion *Logistic Fit*.

2.17. DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde durchgeführt um Transfektionseffizienzen bei eukaryotischen Zelllinien zu überprüfen. Die Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation (4 min, 400 x g, 4 °C) von Medium getrennt, dreimal mit PBS (2.1.10) gewaschen (4 min, 400 x g, 4 °C) und anschließend in je 200 µl PBS resuspendiert. Die Inkubation mit den Fluoreszenzmarkierten Antikörpern (anti-V5-Tag-IgG1-FITC (1:40) und Isotypkontrolle IgG1 mouse-FITC (1:100); 2.1.5) erfolgte bei 4 °C für 30 min unter Lichtausschluss. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (4 min, 400 x g, 4 °C), in je 200 µl PBS resuspendiert und am Zytometer analysiert. Bei der sequentiellen Antikörperbehandlung wurden zunächst die primären Antikörper zu den Zellen gegeben (sheep anti-mouse RGMb IgG sowie Isotypkontrolle rabbit anti-human TRAF2 IgG; 2.1.5) und die Zellen für 30 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (4 min, 400 x g, 4 °C), in je 200 µl PBS resuspendiert und mit dem sekundären Fluoreszenzmarkierten Antikörper (donkey anti-sheep-PE; 2.1.5) für 30 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (4 min, 400 x g, 4 °C) wurden die Zellen in je 200 µl PBS resuspendiert und am Zytometer

analysiert. Die Messungen wurden in Kooperation mit der AG Wajant der Abteilung für molekulare innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg an einem BD FACSCalibur (BD Bioscience) durchgeführt.

2.18. FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE METHODEN

2.18.1. BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSCHEN

Poly-L-Lysin: MW: 150000 bis 300000, 0.1% (w/v) in d_4H_2O (#P8920; Sigma-Aldrich)

Die Deckgläser mit einem Durchmesser von 24 mm wurden unter der Sterilbank in einer Petrischale zunächst in 70% Ethanol für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Ethanol abgesaugt und die Deckgläser dreimal mit sterilem H_2O gewaschen. Jedes Deckglas wurde nun mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in H_2O) überschichtet und für mindestens zwei Stunden bei RT oder über Nacht unter der Sterilbank inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Deckgläser dreimal mit sterilem H_2O gewaschen. Anschließend erfolgte eine Sterilisation für 30 min unter UV-Licht.

2.18.2. FÄRBUNG DER SNAP- UND CLIP-ENZYM-FUSIONS-PROTEINE

Transfektion

Transfektionsreagenz : *Xfect Transfection Reagent* (Clontech)

Es wurden zunächst 2.5×10^5 AD-293 Zellen in je 2 ml Zellkulturmedium (2.1.9) pro Kulturareal einer sechsfach Zellkulturschale ausgesät. Zuvor waren alle sechs Kulturflächen mit jeweils einem Poly-L-Lysin beschichteten Deckglas versehen worden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5% CO_2 wurden die Zellen mit den entsprechenden SNAP- und CLIP-Fusionskonstrukten transfiziert. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Kulturmedium entfernt und durch je 1 ml frisches AD-293 Medium (2.1.9) ersetzt. Die Transfektionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Einzelansätze:	A)	2.5 μg	SNAP- oder CLIP-Konstrukt
			ad 100 μl Optimem Zellkulturmedium (siehe 2)
	B)	0.75 μl	Xfect
			ad 100 μl Optimem Zellkulturmedium

Doppelansätze:	A)	2.5 µg	SNAP- und CLIP-Konstrukt
			ad 100 µl Optimem Zellkulturmedium
	B)	1.5 µl	Xfect
			ad 100 µl Optimem Zellkulturmedium

Anschließend wurde jeweils Ansatz B zu Ansatz A pipettiert, durch vorsichtiges Vortexen gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden schließlich tropfenweise zu den Zellen des entsprechenden Kulturareals gegeben und die Zellkulturplatte dann für 5 h bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert. Der Transfektionsüberstand wurde entfernt und durch 3 ml AD-293 Zellkulturmedium (2.1.9) ersetzt. Eine Inkubation über Nacht erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂.

Anfärben der Zellen

SNAP-Surface 549®:	5 mM in DMSO (NEB Biolabs)
CLIP-Surface 647®:	5 mM in DMSO (NEB Biolabs)

Die Zellkulturüberstände wurden abgesaugt und die Zellen für eine Einzelfärbung mit jeweils 1 ml Zellkulturmedium (2.1.9) mit entsprechend entweder 1 µM SNAP- oder CLIP-Surface® Farbstoff überschichtet und für 10 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Für eine Doppelfärbung wurden beide Farbstoffe mit einer finalen Konzentration von 1 µM in Wachstumsmedium verdünnt, zu den Zellen gegeben und für 10 min bei 37 °C und 5% CO₂ (oder bei RT, „kalte“ Färbung) inkubiert. Anschließend wurde das Farbstoffmedium entfernt und die Zellen zweimal auf Eis mit jeweils 3 ml kaltem Messpuffer LSM (2.1.10) vorsichtig gespült. Dann wurden je Kulturareal 2 ml Zellkulturmedium zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Zellen anschließend mit je 2 ml Medium überschichtet und bis zur Messung auf Eis gelagert.

2.18.3. KONFOKALE MIKROSKOPIE

Colokalisationsstudien

Konfokales LSM:	inverses Mikroskop, TCS SP5 <i>Laser scanning microscope</i> (Leica)
Objektiv:	HCX PLAPO lambda blue 63x 1.4 Oil UV

Die Colokalisationsstudien fanden in Kooperation mit der AG Hoffmann des Lehrstuhls für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg statt. Bilder wurden mit einem Öl-92

Immersionsobjektiv (Vergrößerung 63x) aufgenommen. Zellen, welche mit SNAP- bzw. CLIP-tag®-Fusionskonstrukten transfiziert worden waren, wurden zunächst mit den entsprechenden spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen behandelt (2.18.2). Die SNAP-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Fusionsproteine wurden mit einem 561 nm DPSS Laser (18% Laserleistung) angeregt und die Fluoreszenzintensitäten mit dem Leica Cy3 Filter in den Wellenlängenbereichen zwischen 580 und 620 nm detektiert. CLIP-Fluoreszenzfarbstoff-markierte Oberflächenproteine wurden hingegen mit einem 633 nm HeNe Laser (25% Laserleistung) exzitert und die Fluoreszenzemissionen in Wellenlängenbereichen zwischen 650 und 700 nm nach Filterung mittels eines Leica Cy5 Filters aufgenommen. Durchlichtaufnahmen wurden mittels Belichtung mit einer LED-Diode (20% Leistung) mit Licht der Wellenlänge 405 nm erzeugt.

Sequentielle Aufnahmen

Sequentielle Aufnahmen beider Fluoreszenzkanäle sowie der Durchlichtaufnahmen wurden mit einer Geschwindigkeit von 400 Hz aufgenommen. Jede Aufnahme wurde dabei aus jeweils vier Messungen gemittelt (*line average: 4*).

Aufnahme von Zeitreihen

Für eine zeitliche Darstellung beider Fluoreszenzen sowie der Durchlichtdarstellung, wurden in Zeitabständen von 3 min jeweils Einzelbilder über einen Zeitraum von 30 min aufgenommen.



3. ERGEBNISSE

3.1. EXPRESSION UND REINIGUNG REKOMBINANTER HUMANER RGMb PROTEINE AUS INSEKTENZELLKULTUR

3.1.1. REKOMBINANTE HERSTELLUNG VON HUMANEM RGMb

Klonierung und Herstellung der Baculoviren

RGMb ist ein 437 Aminosäuren langes, sekretiertes und über eine Modifikation mit einem Glykosylphosphatidylinositolrest (GPI-Ankerdomäne) in der Membran verankertes Protein (Monnier, P.P. et al. 2002; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004). Es wird als Vorläuferprotein synthetisiert, welches aus einem N-terminalen 45 Aminosäuren langen Signalpeptid, einer reifen Domäne mit einer Länge von 368 Aminosäuren sowie aus einer C-terminalen GPI-Anker-Prodome einer Länge von 24 Aminosäuren besteht (Samad, T.A. et al. 2004). Zudem verfügt die RGMb-Sequenz über zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, eine putativ säurelabile Spaltstelle sowie eine partielle von Willebrand Faktor Typ D-(vWF-Typ D)-Domäne (Niederkofler, V. et al. 2004; Samad, T.A. et al. 2005). Die reife Domäne weist weiterhin 15 Cysteinreste auf, die aufgrund der extrazellulären Lokalisation des Proteins auf ein komplexes Disulfidverbrückungsmuster hinweisen (Monnier, P.P. et al. 2002; Niederkofler, V. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004) (siehe auch Abbildung 13).

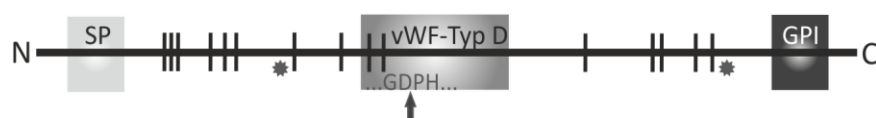


Abbildung 13: Schematische Darstellung der molekularen Architektur von humanem RGMb. N-terminal ist das Signalpeptid (SP) lokalisiert, während sich am C-terminalen Ende die GPI-Ankerdomäne (GPI) anfügt. RGMb weist eine partielle vWF-Typ D-Domäne auf, die eine putative säurelabile Spaltstelle enthält (Pfeil). Die schwarzen Striche stellen die Positionen der 15 Cysteine dar. Die Sterne geben die Positionen der beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen an.

In dieser Arbeit sollte für weiterführende Analysen humanes RGMb Protein im Milligramm-Maßstab rekombinant hergestellt werden. Um zu gewährleisten, dass das Protein in biologisch aktiver Form synthetisiert und mit allen im nativen Protein eventuell vorkommenden posttranslationalen Modifikationen versehen ist, wurde die Proteinexpression in dem

3. Ergebnisse

Säugerzell-ähnlichen System der Baculoviren-transfizierte Insektenzellkultur durchgeführt. Dazu wurde zunächst die für RGMB codierende cDNA Sequenz ohne die C-terminale GPI-Ankerdomäne zwischen die Restriktionsschnittstellen *SmaI* und *XhoI* (verwendete Oligonukleotide: hrgmb_sma_s & hrgmb_xho_as, 2.1.13) des baculoviralen Transfervektors pBac-3 (siehe 2.1.12) eingefügt (2.2.5 - 2.2.11). Die cDNA codiert für die am N-Terminus der Proteinsequenz angefügte Signalpeptidsequenz des *major envelope* Glykoproteins gp64, um Modifikationen durch den sekretorischen Signalweg der Insektenzellen zu ermöglichen. Darüber hinaus codiert das cDNA-Konstrukt zudem für die Modifikation der RGMB-Proteinsequenz durch ein N-terminales Hexa-Histidin-Peptidmotiv (Abbildung 14 A). Die vollständigen DNA- sowie Proteinsequenzen der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte finden sich im Anhang (siehe 6.1).

Anschließend wurde der oben beschriebene Transfervektor mit der enzymatisch linearisierten genomischen Viren-DNA *BacVector-3000 Triple Cut Virus DNA* wie unter 2.4.3 beschrieben in Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) Insektenzellen transfiziert. Durch homologe Rekombination entsteht dabei ein rekombinanter Virus mit einer Expressionskassette für das humane RGMB, dem zudem fünf nicht essentielle virale Proteine fehlen, was die Expression des Zielgens in der Regel erhöht. Zusätzlich ist bei diesem Virengenom zur Verminderung einer möglichen proteolytischen Degradation des Zielproteins das Gen, welches für die virale Cathepsin Protease (v-Cath) codiert, deletiert.

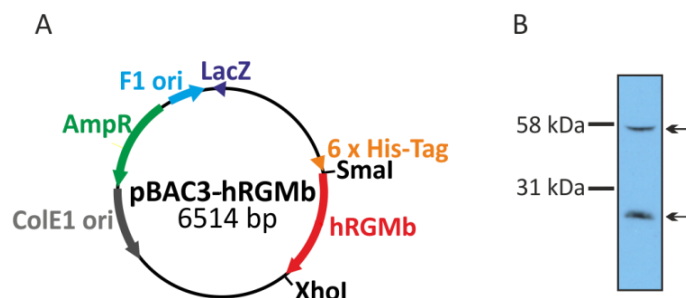


Abbildung 14: A) Schematische Darstellung des pBac-3_hRGMB Expressionskonstruktes. B) Anti-Hexa-Histidin Western Blot zur Analyse der Expression sowie Sekretion des rekombinanten RGMB-Proteins durch die SF9-Zellen. Der Überstand der Virusamplifikation wurde in reduzierenden Proteinprobenpuffer aufgenommen. Die Pfeile kennzeichnen die Detektion des vollständigen RGMB-Proteins (ca. 56 kDa) sowie des N-terminalen Spaltproduktes (ca. 20 kDa).

Klone rekombinanter Baculoviren wurden mittels eines Plaque-Assays (2.4.4) isoliert und die Viren anschließend wie unter 2.4.5 beschrieben durch Infektion von Insektenzellen amplifiziert. Die Expression sowie die Sekretion des Zielproteins wurden anschließend mittels eines gegen den Hexa-Histidin-Marker gerichteten Western Blots (2.5.4) überprüft und konnten, wie in

Abbildung 14 B dargestellt, bestätigt werden. Der Überstand der Zellkultur wurde für die Separation der Proteine mittels einer SDS-PAGE (2.5.1) in reduzierendem Proteinprobenpuffer aufgenommen. Durch den Western Blot mit Hilfe des anti-Histidin-Tag Antikörpers konnten zwei Proteinspezies (siehe Abbildung 14 B) im Kulturüberstand detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass das RGMb Protein während der Expressionsphase teilweise prozessiert wurde, wodurch zwei über Disulfidbrücken verknüpfte Fragmente entstanden sind. Dabei entspricht die Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 56 kDa dem vollständigen, nicht proteolytisch prozessiertem RGMb Protein, während die zweite Proteinspezies (ca. 20 kDa) ein N-terminales verkürztes RGMb-Fragment repräsentiert. Das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des RGMb Gesamtproteins beträgt etwa 46 kDa (siehe 2.5.3, Tabelle 22). Die beobachtete geringere Mobilität im Polyacrylamidgel könnte durch eine Veränderung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses beispielsweise durch eine verringerte Anlagerung von SDS-Molekülen hervorgerufen werden. Darüber hinaus beinhaltet die RGMb Aminosäuresequenz zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Abbildung 13). So könnten die Abweichungen vom theoretischen Molekulargewicht auch durch posttranslationales Anfügen von Glykanketten erklärt werden, was aufgrund der Erhöhung der molekularen Masse ebenfalls zu einer abweichenden Mobilität im Polyacrylamidgel führen kann.

Expression und Reinigung des rekombinanten humanen RGMb Proteins

Die präparative Proteinexpression in der Insektenzellkultur unter Verwendung der Insektenzelllinie Triex™ erfolgte wie unter 2.4.6 angegeben. Die Zellzahl wurde dazu auf eine Dichte von 1.5×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt und rekombinanter Virus aus der vierten oder höheren Virusamplifikationsrunde in einer MOI (*Multiplicity Of Infection*) von 5 zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von vier bis fünf Tagen wurde der Expressionsüberstand dialysiert (2.1.10) und rekombinantes RGMb-Protein mittels Metallaffinitätschromatographie an Nickel-Chelat-Material (2.9.1) isoliert. Eine anschließende Analyse der Elutionsfraktionen mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.5.1) belegte die erfolgreiche Isolierung und Reinigung von rekombinantem RGMb-Protein (Abbildung 15). Nach diesem Reinigungsschritt konnte eine Ausbeute an Gesamtprotein von etwa 16 - 18 mg pro Liter Expressionskultur erzielt werden.

Eine SDS-PAGE Analyse (2.5.1) unter reduzierenden Bedingungen zeigt zwei RGMb Fragmente mit verschiedenen apparenten Molekulargewichten, eines mit einer Größe von etwa 35 kDa und das andere mit etwa 20 kDa. Diese Spaltprodukte finden sich in geringen Mengen auch bei einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung 15). Eine ähnliche posttranslationale Prozessierung wurde auch für RGMc gezeigt. Hierbei wurde eine proteolytische Spaltung des RGMc Proteins an einer potentiell säurelabilen Peptidsequenz mit

3. Ergebnisse

der Aminosäureabfolge Gly-Asp↓Pro-His (GD↓PH) diskutiert, die in den beiden anderen Familienmitgliedern RGMa und RGMb konserviert ist (Kuninger, D. et al. 2006).

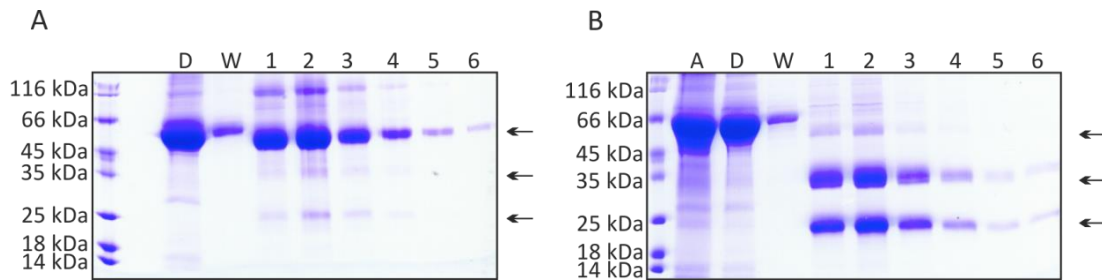


Abbildung 15: SDS-PAGE Analyse der Metallaffinitätschromatographie an Nickel-Chelat-Säulenmaterial. A) unter nicht-reduzierenden, B) unter reduzierenden Bedingungen. A = Auftrag, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 1 - 6 = Elutionsfraktionen. Die Pfeile kennzeichnen das vollständige rekombinante RGMb Protein (ca. 55 kDa), sowie die beiden Proteolyseprodukte (ca. 35 kDa und ca. 20 kDa).

Wie bereits erwähnt, weist die bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz von humanem RGMb auf die Existenz zweier putativer N-Glykosylierungsstellen hin. Bei einer wie oben vermuteten proteolytischen Prozessierung an der angeführten GDPH-Aminosäureabfolge verfügen beide RGMb-Fragmente über je eine dieser Glykosylierungsstellen (siehe Abbildung 13). Um zu überprüfen, ob beide Stellen in RGMb glykosyliert vorliegen, wurde eine Perjodsäure-Schiff-Färbung zum Nachweis der Glykosylierung durchgeführt (2.5.2).

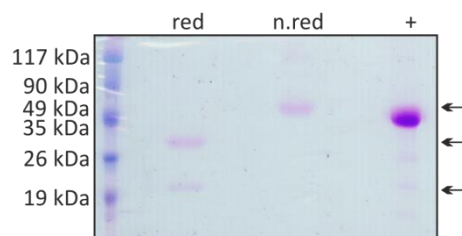


Abbildung 16: SDS-PAGE Analyse von gereinigtem RGMb Protein und einer anschließenden Perjodsäure-Schiff-Färbung. Die Pfeile kennzeichnen angefärbtes RGMb Protein (ca. 55 kDa) unter nicht-reduzierenden (n.red) Bedingungen sowie die beiden RGMb Fragmente (ca. 35 bzw. 20 kDa) unter reduzierenden Bedingungen (red). Als Positivkontrolle diente Meerrettich-Peroxidase (+).

Abbildung 16 dokumentiert das Ergebnis dieses Nachweises. Zunächst wurde RGMb Protein unter reduzierenden sowie unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE (2.5.1) aufgetrennt und das Gel anschließend wie unter 2.5.2 beschrieben gefärbt. Das vollständige rekombinante RGMb-Protein (Abbildung 16, mit n.red bezeichnete Spur) sowie auch die beiden Proteolysefragmente (Abbildung 16, mit red bezeichnete Spur) konnten durch einen Perjodsäure-Schiff-Nachweis angefärbt werden. Dieser Nachweis deutet darauf hin, dass beide

N-Glykosylierungsstellen bei einer Expression von RGMb in Insektenzellkultur mit Glykanstrukturen modifiziert werden.

Zur Abtrennung weiterer Proteinverunreinigungen wurde das mittels Metallaffinitätschromatographie isolierte RGMb Protein anschließend einer Anionenaustauschchromatographie (2.9.2) unterzogen. Die verbesserte Reinheit der Elutionsfraktionen wurde mittels SDS-PAGE (2.5.1) überprüft (siehe Abbildung 17). Zusätzlich zu monomerem RGMb (ca. 55 kDa) konnte in der SDS-PAGE Analyse jedoch eine weitere hochmolekulare Proteinspezies mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 110 kDa beobachtet werden. Auch nach einem weiteren Reinigungsschritt unter Verwendung einer Umkehrphase-HPLC (2.9.3) konnte diese Proteinverunreinigung nicht abgetrennt werden (Abbildung 18). Interessanterweise wurde diese hochmolekulare Proteinspezies unter reduzierenden Bedingungen nicht mehr im Polyacrylamid-Gel beobachtet.

Um daher zu überprüfen, ob es sich bei der hochmolekularen Proteinspezies um ein disulfidverbrücktes RGMb-Dimer handelt, wurde eine Western Blot-Analyse (2.5.4) gegen die an RGMb angefügte Hexa-Histidin-Peptidsequenz durchgeführt. Das Ergebnis dieses Nachweises ist in Abbildung 19 dargestellt. Da beide Proteinbanden durch den anti-Histidin-Tag Antikörper detektiert werden, handelt es sich bei der hochmolekularen Proteinspezies um ein RGMb-Dimer.

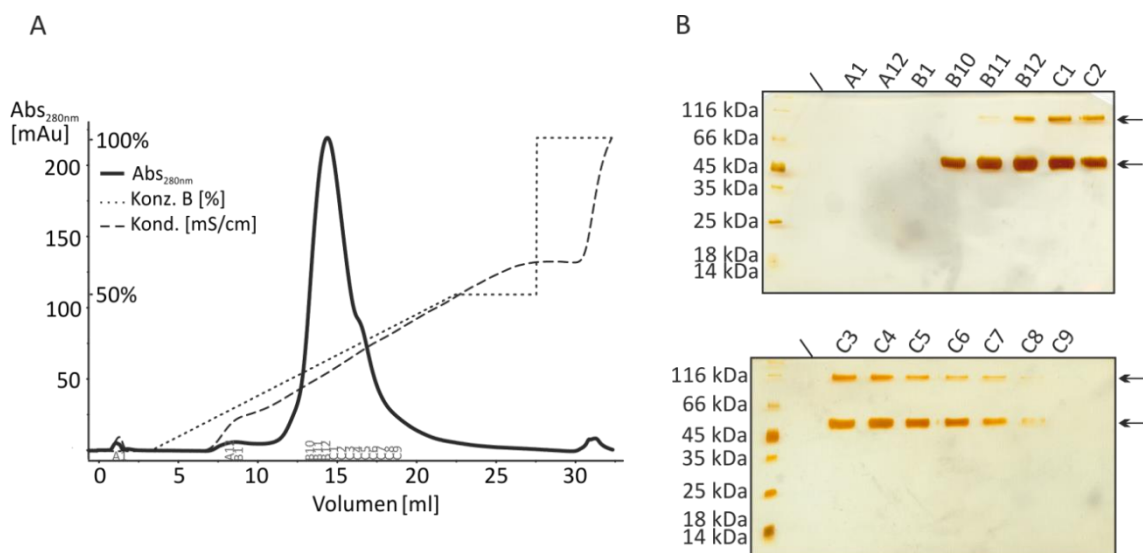


Abbildung 17: A) Profil der Anionenaustauschchromatographie von RGMb an der *HiTrap Sepharose QXL*-Säule. RGMb eluiert bei einer Salzkonzentration von etwa 140 mM von der Säule. B) SDS-PAGE Analyse der Elutionsfraktionen der Anionenaustauschchromatographie unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Färbung des SDS-Gels mittels Silberfärbung (2.5.2). Die Pfeile markieren RGMb Protein (ca. 55 kDa) sowie die hochmolekulare Proteinspezies mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 110 kDa.

3. Ergebnisse

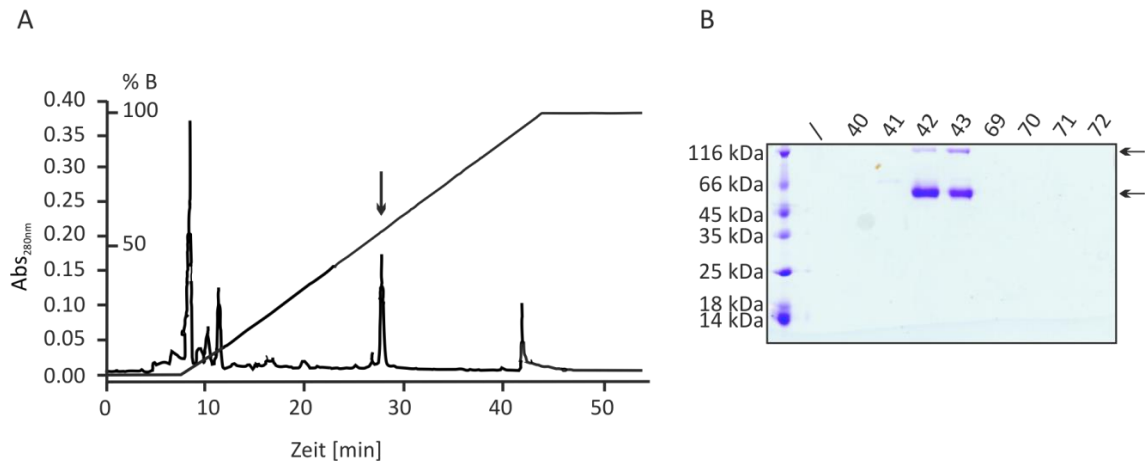


Abbildung 18: A) Chromatographie-Profil der Umkehrphase-HPLC von RGMB unter Verwendung einer C4-Umkehrphase Säule. Der Pfeil markiert die Elution von RGMB von der Säule bei etwa 40% Acetonitril/0.1% TFA. B) SDS-PAGE Analyse der Umkehrphase-HPLC von RGMB. Die Elutionsfraktionen 42 und 43 enthalten RGMB Protein. Die Pfeile markieren RGMB Protein (ca. 55 kDa) sowie die hochmolekulare Proteinspezies mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 110 kDa.

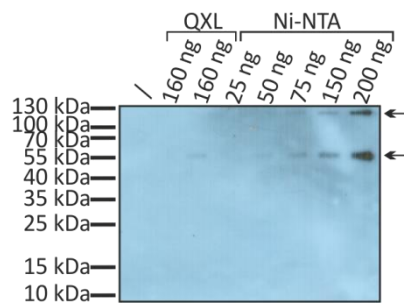


Abbildung 19: Western Blot Analyse von RGMB Eluaten nach der Anionenaustausch- (QXL) sowie nach der Metallaffinitätschromatographie (Ni-NTA) unter nicht-reduzierenden Bedingungen und unter Verwendung eines gegen die Hexa-Histidin-Peptidsequenz gerichteten Antikörpers. Die Pfeile markieren RGMB Protein (ca. 55 kDa) sowie die hochmolekulare Proteinspezies mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 110 kDa.

Analyse der Primärstruktur von rekombinantem humanen RGMB

Die RGM-Proteine verfügen über eine potentielle säurelabile Spaltstelle (siehe Abbildung 13). Die Arbeitsgruppe um Philippe P. Monnier konnte 2002 mit Hilfe eines Edman-Abbaus belegen, dass diese Proteolyse von RGMa (*G. gallus*) offenbar an der Aminosäuresequenz Gly-Asp↓Pro-His stattfindet. Auch für rekombinantes murines RGMc konnte diese Spaltstelle nachgewiesen werden (Kuninger, D. et al. 2006). Hingegen konnte diese Prozessierungssequenz bisher noch nicht für RGMB direkt bestätigt werden. Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit synthetisierte rekombinante RGMB-Protein eine Tendenz zur Dimerisierung aufweist (siehe Abbildung 19). Da die reife Domäne von RGMB mit insgesamt 15 Cysteinen im Gegensatz zu RGMa und RGMc eine ungerade Anzahl von Cysteinresten aufweist, verfügt RGMB

verglichen mit den übrigen Familienmitgliedern über einen zusätzlichen Cysteinrest. Aufgrund fehlender Strukturinformationen für die Corezeptoren ist sowohl die Anzahl der Disulfidbrücken, als auch das Disulfidverbrückungsmuster noch vollständig unbekannt. Als Konsequenz der ungeraden Anzahl an Cysteinresten muss jedoch in der reifen Domäne des RGMb-Protein mindestens ein Cysteinrest ungepaart und somit mit freier Thiolgruppe vorliegen. Dieser freie Cysteinrest könnte somit für die in Abbildung 19 beobachtete Dimerbildung verantwortlich sein.

Um sowohl die potentielle Prozessierungssequenz an der Aminosäuresequenz Gly-Asp-Pro-His, als auch möglicherweise den ungepaarten Cysteinrest in rekombinant hergestelltem RGMb zu identifizieren, wurde zunächst ein proteomischer Ansatz angewendet. Zur Markierung des freien Thiols wurde gereinigtes, rekombinantes RGMb in denaturierendem Harnstoff-Puffer mit dem Thiol-reaktiven, fluoreszierenden Reagenz 5-Iodoacetamidofluorescein (5-IAF) umgesetzt (2.13). Überschüssiger Farbstoff wurde durch Dialyse abgetrennt, anschließend die verbliebenen Disulfidbrücken von RGMb reduziert und mit Iodacetamid umgesetzt (2.13). Eine Separation der beiden Proteolysefragmente wurde durch eine anschließende Metallaffinitätschromatographie erzielt, bei welcher das N-terminale Fragment aufgrund der N-terminal angefügten Hexa-Histidin-Peptidsequenz zurückgehalten wurde, während sich das C-terminale Proteinfragment im Durchlauf anreicherte (2.13). Eine Analyse der mittels SDS-PAGE (2.5.1) aufgetrennten RGMb-Fragmente ergab, dass nur das größere, etwa 35 kDa Proteinfragment mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden konnte. Dieses wurde aus dem SDS-Gel extrahiert und mittels der Endopeptidase Trypsin proteolytisch prozessiert (2.13). Die entstandenen Peptide wurden mittels C18 Umkehrphasen-Reinigung (C18 ZipTip, Millipore) isoliert und anschließend per ESI-FTICR-MS (2.13.1) analysiert.

Diese massenspektrometrische Analyse des größeren RGMb Fragmentes konnte die Proteolyse an der Sequenz Gly-Asp↓Pro-His bestätigen (Abbildung 20). So konnten zahlreiche Peptide im Sequenzbereich zwischen Aminosäure 177 und 423 identifiziert werden, während für den Sequenzbereich zwischen der N-terminalen Aminosäure 1 bis 176 keine Übereinstimmungen detektiert wurden. Die Sequenzabdeckung für die Messung des größeren RGMb Fragmentes betrug 66% (Abbildung 20 A). Die Messergebnisse implizieren, dass eine Spaltung des vollständigen RGMb-Proteins vor der Aminosäure 177 erfolgen muss, da keine Peptide N-terminal zu dieser Sequenz detektiert werden konnten. Da die auf Homologiebasis postulierte säurelabile Prozessierungsstelle somit in unmittelbarer Nähe liegt, weisen die proteomischen Ergebnisse tatsächlich auf eine Hydrolyse der Peptidbindung des rekombinant hergestellten RGMb an der Sequenz Gly-Asp-Pro-His hin, welche bereits für die Prozessierung von RGMa (Monnier, P.P. et al. 2002) sowie für RGMc gezeigt wurde (Kuninger, D. et al. 2006).

3. Ergebnisse

A

```

1          11          21          31          41          51          61
AMVHHHHHHS AGLVPRGSGK  ETAAAKFERQ  HMDSASGGGD  DDDKHPGDCQ  QPAQCRIQKC  TTDFVSLTSH
71         81         91         101        111        121        131
LNSAVDGFDS  EFCKALRAYA  GCTQRTSKAC  RGNLVYHSAV  LGISDLMSQR  NCSKDGPTSS  TNPEVTHDPC
141        151        161        171        181        191        201
NYHSHAGARE  HRRGDQNPPS  YLFCGLFGDP  HLRTFKDNFQ  TCKVEGAWPL  IDNNYLSVQV  TNVPVVPGSS
211        221        231        241        251        261        271
ATATNKITI   FKAHHGCTDQ  KVVYQAVTDDL  PAAFVDGTTT  GGSDAKSLR   IVERESGHYV  EMHARYIGTT
281        291        301        311        321        331        341
VFRVQVGRYL  TLAIRMPEDL  AMSYEEQDL  QLCVNGCPLS  ERIDDGQGQV  SAILGHSLPR  TSLVQAWPGY
351        361        371        381        391        401        411
TLETANTQCH  EKMPVKDIYF  QSCVFDLLT  GDANFTAAAH  SALEDVEALH  PRKERWHIFP  SSSTTTTTTN
421
LGS

```

B

monoisotopische Masse + 1H ⁺		Massendifferenz		Sequenzabdeckung			Modifikation
ist [Da]	soll [Da]	absolut [Da]	relativ [ppm]	von AS	bis AS	Anzahl [AS]	
912,391	912,388	0,003	3,3	177	183	7	Cam
3440,783	3440,770	0,013	3,8	184	216	33	--
734,483	734,481	0,002	2,7	217	222	6	--
1053,456	1053,453	0,003	2,8	223	231	9	--
2600,205	2600,200	0,005	1,9	232	257	26	--
516,316	516,314	0,002	3,9	261	264	4	--
1315,588	1315,585	0,003	2,3	265	275	11	--
1331,582	1331,580	0,002	1,5	265	275	0	Ox
849,521	849,519	0,002	2,4	289	295	7	--
1862,978	1862,972	0,006	3,2	323	340	18	--
2534,205	2534,198	0,007	2,8	341	362	22	Cam
2864,258	2864,251	0,007	2,4	341	362	0	5-IAF
2351,179	2351,163	0,016	6,8	403	423	21	--
1937,936	1937,924	0,012	6,2	406	423	0	--

Annotierte Aminosäuren (AS)	164
Gesamtanzahl Aminosäuren	249
entspricht Abdeckung [%]	65,9

Abbildung 20: A) Aminosäuresequenz des rekombinanten humanen RGMb-Proteins. Striche unterhalb der Sequenz kennzeichnen die Trypsinspaltstellen. Die Aminosäureabfolge GDPH (blau) hebt die mögliche säurelabile Prozessierungssequenz hervor. Rot gekennzeichnet ist der Cysteinrest an Stelle 358, welcher mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5-IAF markiert vorlag. Die grün unterlegten Peptide konnten mittels der massenspektrometrischen Analyse annotiert werden. B) Zusammenfassung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse. Dargestellt sind die tatsächlichen molekularen Massen aller detektierten Peptide (ist [Da]), die entsprechenden theoretischen Massen (soll [Da]) sowie die Abweichungen der experimentellen von den theoretischen Werten (absolut [Da]; relativ [ppm]). Ebenfalls aufgeführt sind unter der Kategorie Sequenzabdeckung die Positionen und Größen der Peptide in der Anzahl der Aminosäurereste (AS) sowie mögliche Modifikationen.

Die Analyse des ungepaarten Cysteinrestes ergab nur ein einzelnes 5-IAF-markiertes Peptid (Aminosäure 341 – 362, Abbildung 20). Dieser in RGMb laut proteomischer Analyse ungepaart

3. Ergebnisse

Der Sequenzvergleich verdeutlicht, dass der zuvor als ungepaart angenommene Cysteinrest Cys358 in allen drei RGM-Familienmitgliedern konserviert ist, jedoch in der RGMb Sequenz das N-terminale Cystein an Position Cys3 (in Abbildung 21 rot markiert) ausschliesslich in diesem Corezeptor vorkommt. Um zu überprüfen, ob dieser N-terminale Cysteinrest für die Dimerisierung des rekombinanten RGMb-Proteins verantwortlich zeichnet, wurden die ersten drei Aminosäuren der RGMb-Sequenz mittels gerichteter Mutagenese entfernt. Die verkürzte Sequenz wurde daraufhin über die Restriktionsenzymststellen *Bam*HI und *Xho*I (Oligonukleotide: hrgmb_bam_s & hrgmb_xho2_s, 2.1.13) in den baculoviralen Transfervektor pMK1 (2.1.12) kloniert (2.2.5 - 2.2.11, Abbildung 22 A).

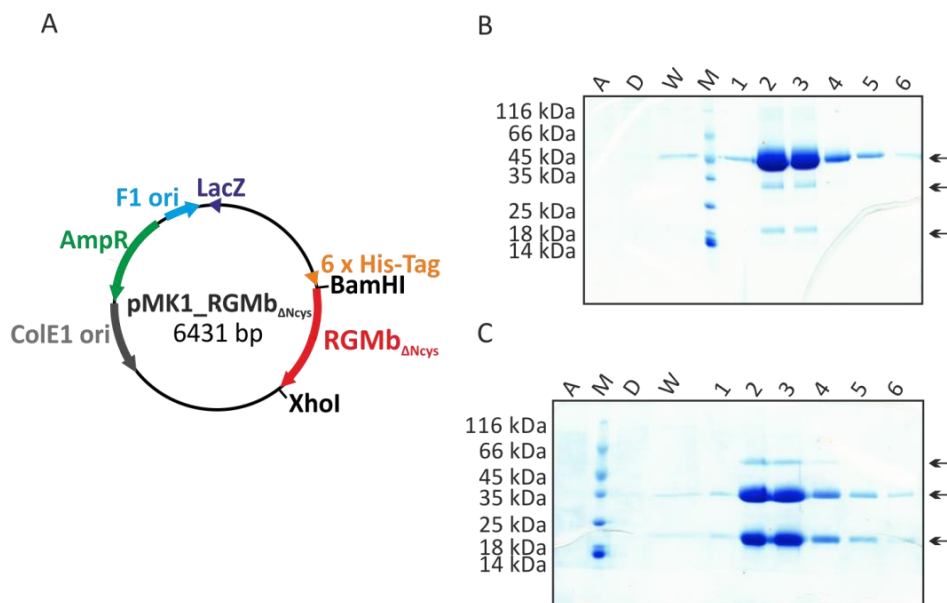


Abbildung 22: A) Schematische Darstellung des pMK1_RGMb Δ Ncys Expressionskonstruktes. B) und C) SDS-PAGE Analyse von RGMb Δ Ncys Protein nach Reinigung mittels Metallaffinitätschromatographie. B) Nicht-reduzierende SDS-PAGE Analyse. C) Reduzierende SDS-PAGE Analyse. A: Auftrag, M: Protein-Größenstandard, D: Durchlauf durch die Säule, W: Fraktionen der Waschschritte, 1-6: Fraktionen der Elution 1-6. Die Pfeile kennzeichnen das vollständige rekombinante RGMb Δ Ncys Protein (apparentes Molekulargewicht ca. 45 - 50 kDa), sowie die beiden Spaltprodukte (apparentes Molekulargewicht ca. 35 kDa und ca. 20 kDa).

Im Anschluss an die Co-Transfektion (2.4.3) des Transfervektorkonstruktes pMK1_RGMb Δ Ncys mit der linearisierten genomischen Viren-DNA *BacVector-3000 Triple Cut Virus DNA* wurden rekombinante Viren isoliert und vermehrt (2.4.5). RGMb Δ Ncys Protein wurde anschließend unter serumfreien Bedingungen und unter Verwendung von HighFive™ Insektenzellen exprimiert (2.4.6). Rekombinantes RGMb Δ Ncys Protein wurde mittels einer Metallaffinitätschromatographie (2.9.1) aus dem Expressionsüberstand isoliert und die Reinheit des Proteins in den Elutionsfraktionen anhand einer SDS-PAGE Analyse (2.5.1) überprüft (Abbildung 22 B-C). Das apparente Molekulargewicht des RGMb Δ Ncys Gesamtproteins beträgt hier etwa 45 - 50 kDa,

während die beiden proteolytischen Fragmente ein apparentes Molekulargewicht von ca. 35 kDa sowie 20 kDa aufweisen. Das theoretische Molekulargewicht des vollständigen rekombinanten Proteins auf Basis der Aminosäuresequenz beträgt 41.9 kDa (siehe 2.5.3, Tabelle 22). Die Abweichungen in der SDS-PAGE Analyse könnten entweder auf einem unüblichen Masse-zu-Ladung-Verhältnis aufgrund einer stark von der Normalverteilung abweichenden Aminosäuresequenz beruhen. Vermutlich ist das höhere apparente Molekulargewicht aber auf posttranslationale Modifikationen durch N-Glykosylierungen zurückzuführen.

Das unter serumfreien Kultivierungsbedingungen in Insektenzellen exprimierte rekombinante $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein wies bereits nach der Reinigung mittels Metallaffinitätschromatographie eine hohe Reinheit auf (> 90%), die Proteinausbeute variierte zwischen 18 bis 21 mg Protein pro Liter Insektenzellkultur. Weiterhin konnte für die RGMb Variante im Gegensatz zu wildtypischem RGMb in der SDS-PAGE Analyse keine hochmolekulare Proteinbande detektiert werden. Auch ein gegen die N-terminal an RGMb angefügte Hexa-Histidin-Peptidsequenz gerichteter Western Blot (2.5.4) konnte keine für multimere Aggregate typische(n) Bande(n) nachweisen (Abbildung 23). Durch die Deletion des N-terminalen Cysteins konnte somit eine Disulfid-vermittelte Dimerisierung des rekombinanten $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Proteins verhindert werden.

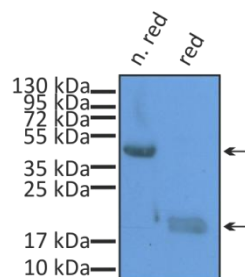


Abbildung 23: Western Blot Analyse von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ nach der Metallaffinitätschromatographie unter Verwendung eines gegen eine Hexa-Histidin-Peptidsequenz gerichteten Antikörpers. Die Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte unter nicht-reduzierenden (n. red) und reduzierenden (red) Bedingungen. Die Pfeile markieren das vollständige $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein (apparentes Molekulargewicht ca. 45 - 50 kDa) sowie das kleine N-terminale Proteolysefragment mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Eine Proteinbande die auf eine dimere oder oligomere RGMb Spezies hinweist, konnte nicht nachgewiesen werden.

Um verbliebene Verunreinigungen zu entfernen, wurde eine Anionenaustauschchromatographie (2.9.2) durchgeführt und Protein-enhaltende Fraktionen anschließend mittels einer SDS-PAGE (2.5.1) analysiert (Abbildung 24). Nach diesem Reinigungsschritt konnten durchschnittlich etwa 67% - 73% des eingesetzten $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Proteins mit einem Reinheitsgrad von mehr als 95% gewonnen werden. Zur Überprüfung der molekularen Masse wurde $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ mittels Reinigung durch eine C4-Umkehrphase-Chromatographie (2.9.3) entsalzt, anschließend gefriergetrocknet

3. Ergebnisse

und durch Elektrospray-Ionisations-(ESI)-Fouriertransformation-Ionen-Zyklotronresonanz-(FTICR)-Massenspektrometrie (2.13.1) analysiert (Abbildung 25).

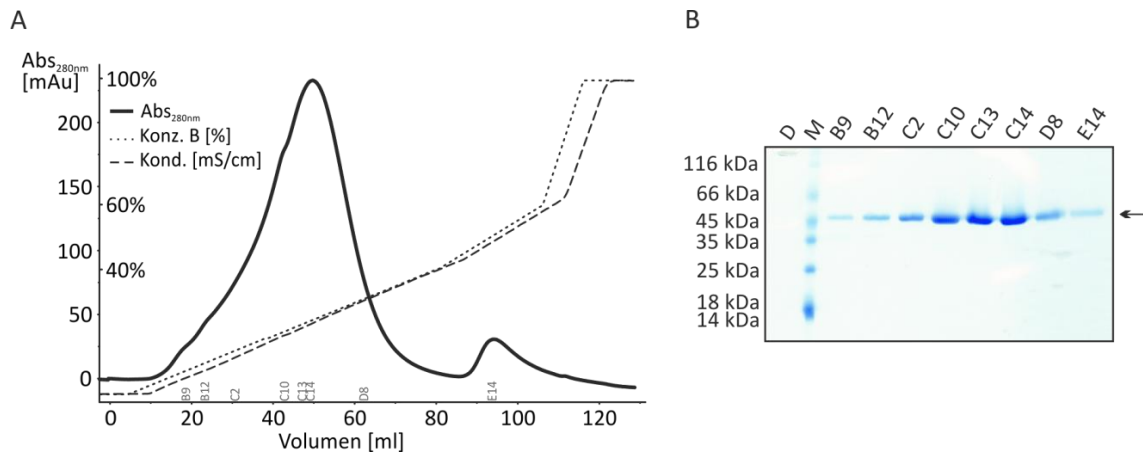


Abbildung 24: A) Profil der Anionenaustauschchromatographie von RGMb $_{\Delta Ncys}$ unter Verwendung einer *HiTrap Sepharose QXL* (5 ml Säule). Rekombinantes Protein wird bei einer Salzkonzentration von ca. 150 mM von der Säule eluiert. B) SDS-PAGE Analyse der Protein-enthaltenden Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Der Pfeil kennzeichnet RGMb $_{\Delta Ncys}$ -Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 45 bis 50 kDa.

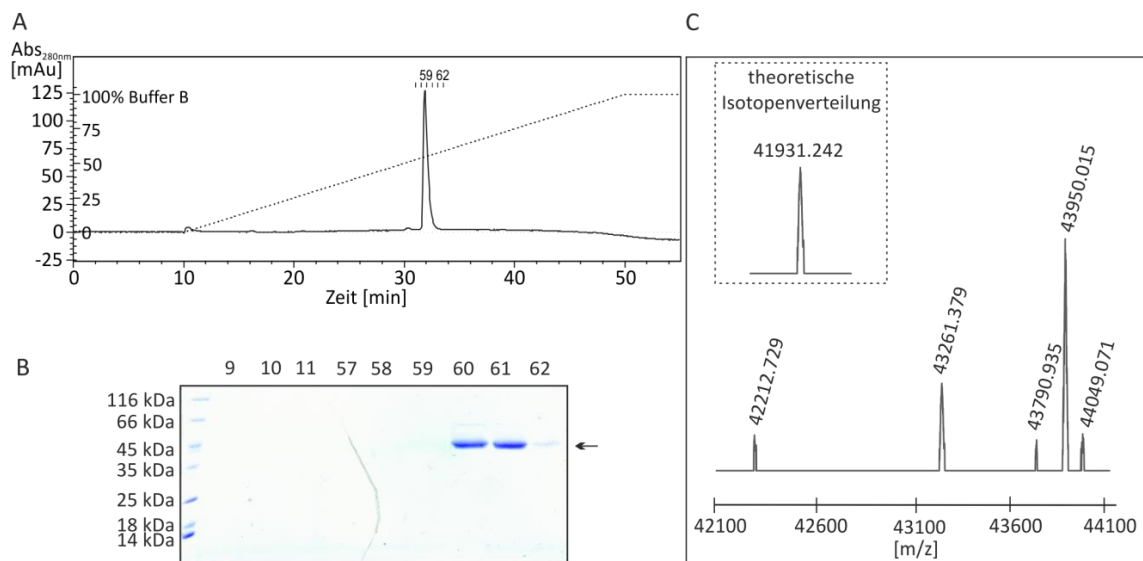


Abbildung 25: A) Profil der Umkehrphase-Chromatographie mit RGMb $_{\Delta Ncys}$. Rekombinantes Protein wurde bei einer Konzentration von etwa 50% Acetonitril von der C4-Umkehrphasesäule eluiert. B) SDS-PAGE Analyse der Fraktionen der Elution unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Der Pfeil kennzeichnet RGMb $_{\Delta Ncys}$ -Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 45 bis 50 kDa. C) Massenspektrometrische Analyse des RGMb $_{\Delta Ncys}$ Protein. Die zu erwartende molekulare Masse mit einer theoretischen Isotopenverteilung ist für RGMb $_{\Delta Ncys}$ mit sieben Disulfidbrücken und ohne angefügte Glykanketten an die beiden N-Glykosylierungsstellen angegeben.

Die molekulare Masse der detektierten Proteinspezies zeigte eine deutliche Abweichung von dem auf Basis der Aminosäuresequenz ermittelten Wert. Dabei wurden für die Berechnung des

Molekulargewichts für $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ eine vollständige Oxidation aller Cysteinreste zu Cystinen (also sieben geschlossene Disulfidbrücken) sowie ein Fehlen posttranslationaler Modifikationen durch Glykanketten angenommen. Das Auftreten mehrerer RGMb -Spezies mit unterschiedlicher molekularer Masse in der massenspektrometrischen Analyse deutet entweder auf heterogene Glykanstrukturen oder aber auf wechselnde Glykosylierung der beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen hin. Für weiterführende strukturelle Untersuchungen durch Kristallisation und eine anschließende Röntgenbeugungsanalyse ist es jedoch notwendig Heterogenität im zu untersuchenden bzw. zu kristallisierenden Protein zu vermeiden.

Um eine homogene N-Glykosylierung zu erhalten, wurde daher der α -Mannosidase I-Inhibitor Kifunensin (Elbein, A.D. et al. 1990) während der Expression von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ in HighFive™-Insektenzellen hinzugefügt. Typ I α -Mannosidasen regulieren frühe Schritte der Prozessierung von N-Glykanketten im Endoplasmatischen Retikulum von Eukaryoten (Lipari, F. et al. 1995; Gonzalez, D.S. et al. 1999). Eine Inhibition dieser Enzyme durch das Alkaloid Kifunensin führt zu einer Akkumulation von Mannose-reichen, jedoch einheitlich aufgebauten Glykoproteinen, deren Kohlenhydratketten dann sehr effizient durch die Glykosidase EndoH nach dem ersten am Asparaginrest befindlichen N-Acetylglucosamin hydrolysiert werden können (Yu, C. et al. 2011). Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass das entstehende Protein einheitlich an jedem entsprechenden Asparaginrest noch mit dem ersten Kohlenhydratrest verbunden ist, der längere, strukturell flexible Anteil der sonst vorhandenen Glykankette aber entfernt wurde. Weiterhin können die trunkierten Glykanketten dennoch einen oft erwünschten Löslichkeits-erhöhenden Effekt ausbilden. Eine alternative Möglichkeit zur vollständigen Abspaltung der Glykanketten bietet eine Behandlung der rekombinanten Proteine mit der Amidase PNGase F. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse der posttranslational angefügten Zuckerketten direkt zwischen dem Asparaginrest und dem ersten N-Acetylglucosamin. Hierdurch werden alle Glykanreste vollständig abgetrennt, allerdings führt dies auch zur Desamidierung von Asparagin zu Aspartat und somit zu einer Erhöhung der negativen Ladungen eines Proteins (Maley, F. et al. 1989). Da gezeigt werden konnte, dass Glykanketten einen Einfluss auf die Stabilität und Löslichkeit rekombinanter Proteine haben können, ist eine vollständige Deglykosylierung oft nur für analytische Zwecke erstrebenswert (siehe beispielsweise (Lawson, E.Q. et al. 1983; Wang, C. et al. 1996; Tams, J.W. et al. 1999)). Weiterhin können Glykanketten Bestandteil von Interaktionsepitopen und für die Wechselwirkung mit Bindungspartnern essentiell sein (beispielsweise: (Saremba, S. et al. 2008)). Daher ist auch für strukturelle Analysen eine partielle Deglykosylierung mittels der Glykosidase EndoH, wie sie hier mittels des Typ I α -Mannosidase-Inhibitors Kifunensin etabliert wurde, einer vollständigen Abspaltung der Glykanketten zu bevorzugen.

3. Ergebnisse

Die rekombinante Herstellung von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ in HighFive™ fand unter Zusatz von Kifunensin in einer Konzentration von 1 mg pro Liter Expressionsmedium wie unter 2.4.6 beschrieben statt. Die Reinigung aus dem Expressionsüberstand erfolgte durch eine Metallaffinitätschromatographie (2.9.1). Im Anschluss wurde die Reinheit des Proteins in den Elutionsfraktionen anhand einer SDS-PAGE Analyse (2.5.1) unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen ermittelt (Abbildung 26). In diesem Isolationsschritt konnten etwa 18 bis 22 mg homogen glykosyliertes $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein pro Liter Insektenzellkultur gewonnen werden.

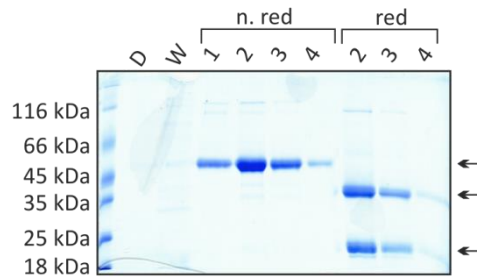


Abbildung 26: SDS-PAGE Analyse von gereinigtem $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein, das aus Insektenzellen nach Zugabe von Kifunensin isoliert werden konnte. Nicht-reduzierende (n. red) und reduzierende Bedingungen (red) sind für die Proben angegeben. D: Analyse der Durchlaufraction, W: Fraction des Waschschritts, 1-4: Elutionsfraktionen 1-4. Die Pfeile kennzeichnen das vollständige rekombinante $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein (apparentes Molekulargewicht ca. 45 bis 50 kDa), sowie die beiden Proteolyseprodukte (apparentes Molekulargewicht ca. 35 kDa und ca. 20 kDa).

Noch vorhandene Verunreinigungen wurden mittels eines zweiten Reinigungsschritts unter Anwendung einer Anionenaustauschchromatographie (2.9.2) abgetrennt und die Reinigungseffizienz in einer Polyacrylamidgelelektrophorese (2.5.1) analysiert (Abbildung 27).

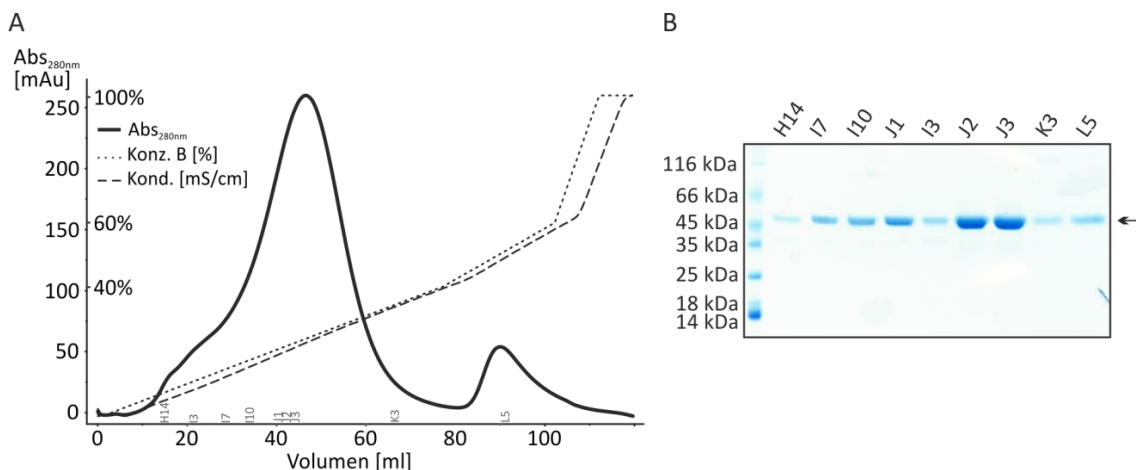


Abbildung 27: A) Profil der Anionenaustauschchromatographie von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$. Die Expression erfolgte unter Zusatz von 1 mg/L Kifunensin. Rekombinantes Protein eluiert bei einer Salzkonzentration von etwa 120 mM. B) SDS-PAGE Analyse der Protein-enthaltenden Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Der Pfeil kennzeichnet $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ -Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 45 kDa.

Durch die Ionenaustauschchromatographie konnten durchschnittlich etwa 68% - 74% des eingesetzten $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Proteins wiedergewonnen werden und der Reinheitsgrad des $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Proteins auf mehr als 95% gesteigert werden.

Zur Überprüfung der Reaktivität gegenüber der Glykosidase EndoH wurde in Anwesenheit von Kifunensin exprimiertes $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein mit verschiedenen Konzentrationen des Enzyms gemessen in enzymatischen Einheiten (*enzymatic unit*, U; Hersteller-spezifische Definition) inkubiert (2.13) und das Proteinprodukt anschließend unter nicht-reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel (2.5.1) analysiert. Zum Vergleich erfolgte eine enzymatische Deglykosylierung von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ mit der Glykosidase PNGase F, welche eine vollständige Hydrolyse der N-Glykankette bewirkt (Abbildung 28). Die in Abbildung 28 gezeigte SDS-PAGE Analyse verdeutlicht, dass mit EndoH behandeltes Protein für alle eingesetzten Enzymmengen ein geringeres apparentes Molekulargewicht im Vergleich zu unbehandeltem $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein aufweist. Durch Hydrolyse der Glykankette mittels PNGase F wurde das apparente Molekulargewicht weiter verringert. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Expression von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ in Anwesenheit des α -Mannosidase I-Hemmers Kifunensin, verglichen mit Inhibitor-freien Bedingungen, veränderte N-Glykanketten an das Protein angefügt wurden, welche mit der Glykosidase EndoH enzymatisch effizient entfernt werden konnten.

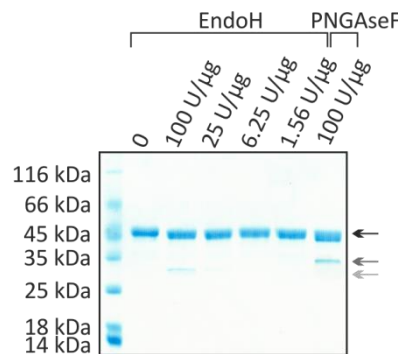


Abbildung 28: In Anwesenheit des α -Mannosidase I-Inhibitors Kifunensin exprimiertes rekombinantes $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein ist sensitiv gegenüber Deglykosylierungen durch die Glykosidasen EndoH und PNGase F. SDS-PAGE Analyse der Deglykosylierung von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ mit den Glykosidasen EndoH und PNGase F. Das rekombinante Protein wurde mit verschiedenen Enzymmengen, angegeben in enzymatischen Einheiten (*enzymatic unit*, U), von EndoH behandelt. Vergleichend wurde rekombinantes $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ mit der Glykosidase PNGase F inkubiert. Der schwarze Pfeil markiert $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ -Protein, während der dunkelgraue PNGase F- und der hellgraue EndoH-Enzym kennzeichnen.

Um die Vollständigkeit der partiellen Deglykosylierung von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ nach EndoH-Behandlung zu überprüfen, wurde $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ zunächst durch Reinigung an einer C4-Umkehrphasesäule (2.9.3) entsalzt, Protein-enthaltende Fraktionen mittels SDS-PAGE (2.5.1) analysiert, das Protein anschließend gefriergetrocknet und durch ESI-FTICR-Massenspektrometrie (2.13.1) untersucht.

3. Ergebnisse

Abbildung 29 A und B stellen die Ergebnisse der Umkehrphase-Chromatographie dar. $\text{RGMb}_{\Delta\text{NCys}}$ wird im Gradienten in einem einzelnen Elutionsimpuls bei einer Acetonitril-Konzentration von etwa 50% eluiert. Die SDS-PAGE Analyse zeigt unter reduzierenden Bedingungen das Auftreten von Doppelbanden (gekennzeichnet durch die Pfeile in Abbildung 29 B) für beide Proteinfragmente, was auf eine unvollständige Abspaltung/enzymatische Prozessierung beider N-Glykanketten hindeutet. Dies wird durch die massenspektrometrische Analyse (Abbildung 29 C) bestätigt, da hier ebenfalls mehrere Proteinspezies mit unterschiedlichem Molekulargewicht detektiert werden konnten. Das Signal mit der höchsten Amplitude ergibt eine Masse von 42430.066 Da, welche mit der berechneten molekularen Masse für ein theoretisch angenommenes $\text{RGMb}_{\Delta\text{NCys}}$ -Protein übereinstimmt, das über fünf Disulfidbrücken sowie ein angefügtes Glucosaminoglycan mit zwei Fucose-Resten verfügt. Die zweite potentielle N-Glykosylierungsstelle läge unter diesen Voraussetzungen nicht glykosyliert vor.

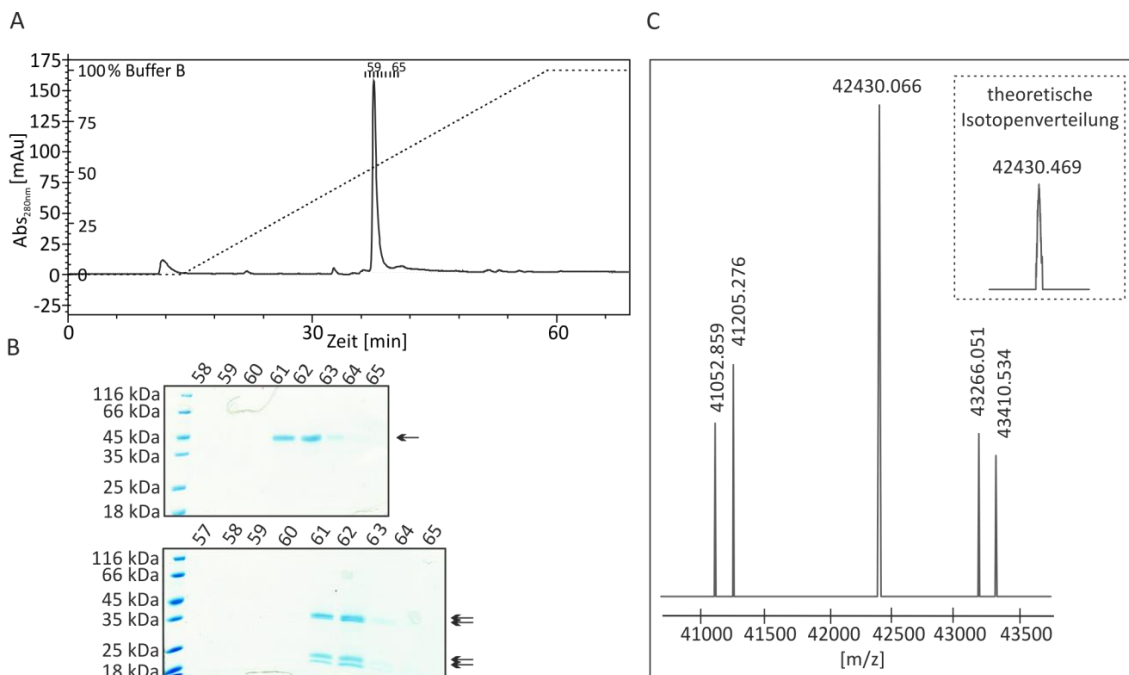


Abbildung 29: A) Profil der Umkehrphase Chromatographie von $\text{RGMb}_{\Delta\text{NCys}}$ welches unter Zusatz von Kifunensin hergestellt wurde. Rekombinantes Protein wird bei einer Konzentration von etwa 50% Acetonitril von der Umkehrphase eluiert. B) SDS-PAGE Analyse der Elutionsfraktionen unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen. Die Pfeile kennzeichnen vollständiges $\text{RGMb}_{\Delta\text{NCys}}$ -Protein (obere SDS-PAGE, n. red.; apparentes Molekulargewicht von 45 kDa) bzw. $\text{RGMb}_{\Delta\text{NCys}}$ Fragmente, die aufgrund unvollständiger Deglykosylierung jeweils zwei Spezies mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten aufweisen (Doppelbanden) (untere SDS-PAGE, red.; 35 kDa und 20 (bzw. 18) kDa). C) Massenspektrometrische Analyse des $\text{RGMb}_{\Delta\text{NCys}}$ Proteins, welches in Anwesenheit des Alkaloids Kifunensin exprimiert wurde. Die zu erwartende molekulare Masse unter Annahme einer definierten theoretischen Isotopenverteilung ist für RGMb mit fünf Disulfidbrücken inklusive einem N-Acetylglucosamin sowie zwei Fucose-Resten oben rechts repräsentiert. Die Masse der detektierten Hauptproteinspezies (42430.066 Da) stimmt mit diesem theoretischen Wert in großer Näherung überein.

Im Gegensatz zu unbehandeltem $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ (ohne Kifunsensin/EndoH; Abbildung 25 C) weist die massenspektrometrische Analyse von Kifunsensin- und EndoH-behandeltem $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ (Abbildung 29 C) Spezies mit diversen, kleineren molekularen Massen auf. Dies zeigt, dass durch die Glykosidase Glykanketten abgespalten wurden, wobei diese enzymatische Reaktion jedoch nicht vollständig ablief. Für eine detaillierte Analyse der Glykanketten müssten diese erneut abgespalten und ihre genaue Zusammensetzung massenspektrometrisch ermittelt werden.

In einem weiteren Ansatz wurde in Gegenwart und in Abwesenheit von Kifunsensin exprimiertes $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ zunächst mit der Glykosidase EndoH behandelt, mittels Umkehrphase-Chromatographie (2.9.3) entsalzt und schließlich das Gesamtprotein durch MALDI-TOF Massenspektrometrie (2.13.2) analysiert. Vergleichend wurden jeweils Messungen mit nicht deglykosyliertem Protein durchgeführt (Abbildung 30).

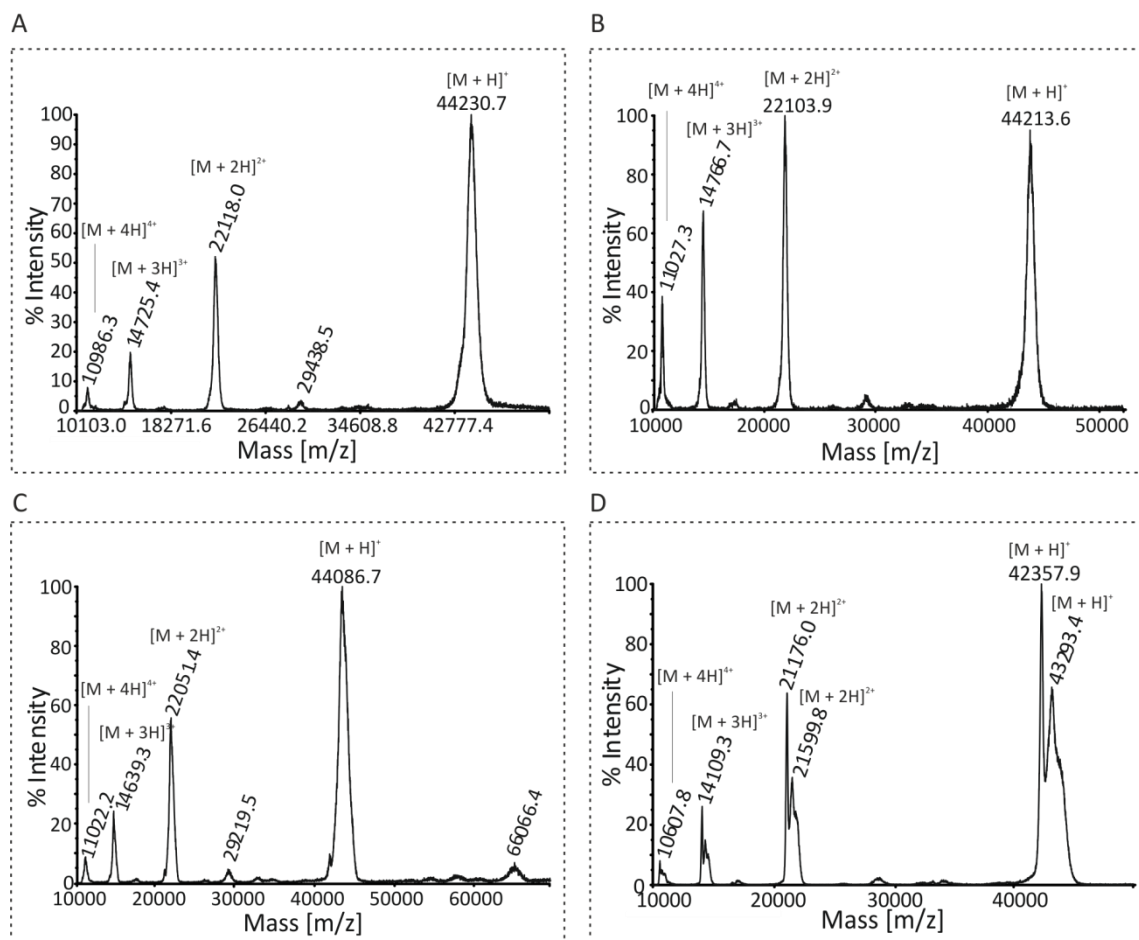


Abbildung 30: MALDI-TOF basierte massenspektrometrische Analyse von $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ -Protein, welches in Gegenwart von Kifunsensin oder in Normalmedium exprimiert wurde, vor bzw. nach Deglykosylierung mittels der Glykosidase EndoH. A) $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ aus Expression unter Verwendung von Normalmedium, vor EndoH-Behandlung. B) $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ aus Expression unter Verwendung von Normalmedium nach Deglykosylierung. C) $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ unter Verwendung von Medium mit Zusatz von Kifunsensin, vor EndoH-Behandlung. D) $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ unter Verwendung von Medium mit Zusatz von Kifunsensin, nach Deglykosylierung.

3. Ergebnisse

Abbildung 30 A zeigt die massenspektrometrische Analyse des nativen $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Proteins. Hingegen stellt Abbildung 30 B das MS-Ergebnis des $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Proteins, welches unter Verwendung von regulärem Insektenzellmedium produziert wurde, nach enzymatischer Deglykosylierung mit der Endoglykosidase EndoH dar. Zur einfacheren Darstellung sind jeweils die molekularen Massen des einfach geladenen Proteins ($[\text{M}+\text{H}]^+$) sowie der mehrfach geladenen Proteinspezies ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+} - [\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$) gezeigt. Die beobachteten Massenunterschiede zwischen enzymatisch deglykosyliertem und unbehandeltem $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein sind marginal und beruhen möglicherweise auf Hydrolyse- oder Desaminierungsreaktionen. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein, welches ohne Zusatz des α -Mannosidase I-Inhibitors exprimiert wurde, insensitiv für eine partielle Deglykosylierung durch EndoH ist.

Abbildung 30 C zeigt das $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ Protein, welches in Gegenwart des Alkaloids Kifunensin exprimiert wurde, vor der enzymatischen Deglykosylierung, Abbildung 30 D hingegen das Protein nach Umsetzung mit der Endoglykosidase EndoH. Im Massenspektrum für das deglykosylierte $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ -Protein können zwei einfach geladene Proteinspezies ($[\text{M}+\text{H}]^+$) detektiert werden, die im Vergleich zu dem nicht enzymatisch behandelten Protein jeweils geringere molekulare Massen aufweisen. Dabei stimmt die niedrigere Masse (42357.9 Da) unter der Voraussetzung einer vierfachen Hydrolysereaktion (entspricht dem Verlust von 72.04 Da) mit dem Molekulargewicht der vorangegangenen ESI-FTICR-Massenspektrometrie Analyse (42430.066 Da) überein (siehe Abbildung 29 C). Die Proteinspezies mit dem höheren Molekulargewicht von 43293.4 Da könnte hingegen unvollständig deglykosyliertes $\text{RGMb}_{\Delta\text{Ncys}}$ repräsentieren. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die unabhängigen RGMb -Präparationen in Anwesenheit des Alkaloids Kifunensin gleichermaßen sensitiv für anschließende Deglykosylierungen mit Hilfe der Endoglykosidase EndoH sind. Aufgrund der Detektion übereinstimmender RGMb -Massen durch zwei unterschiedliche massenspektrometrische Analysen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die enzymatische Abspaltung der Glykanketten homogene RGMb -Spezies erzeugen kann.

Zusammenfassend konnte mittels der Expression in Insektenzellkultur und des in dieser Arbeit etablierten Reinigungsverfahrens die extrazelluläre Domäne von RGMb als hochreines Protein in ausreichenden Mengen für anschließende biophysikalische und strukturelle Charakterisierungen hergestellt werden. Zunächst zeigte sich, dass rekombinant hergestelltes RGMb -Protein, welches insgesamt über 15 Cysteinreste verfügt, eine Dimerisierungstendenz aufweist (siehe 3.1.1, Abbildung 19). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei RGM -Familienmitglieder RGMa , RGMb und RGMc ergab, dass 14 dieser Cysteine innerhalb der Proteinfamilie konserviert sind, während das N-terminale Cystein für RGMb einzigartig ist. RGMb kann daher maximal sieben intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, wobei als

Konsequenz mindestens ein Cystein ungepaart verbleiben muss. Es wurde daher angenommen, dass das nicht-konservierte N-terminale Cystein frei vorliegen und die Dimerisierung über die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke verursachen könnte. Die Verkürzung der RGMb-Sequenz um die ersten drei Aminosäuren inklusive des N-terminalen Cysteins (Cys3) durch gerichtete Mutagenese verhinderte die bis dato beobachtete Dimerisierung des rekombinanten RGMb_{ΔNcys}-Proteins und belegt somit, dass es sich hierbei um das aufgrund der ungeraden Anzahl von Cysteinresten vermutete ungepaarte Cystein handelt (siehe 3.1.2, Abbildung 23).

Durch die Expression von RGMb in Insektenzellen in Gegenwart des Alkaloids und α -Mannosidase I Hemmers Kifunensin konnte die posttranslationale Modifikation des sekretierten Proteins in den Zellen hinsichtlich des N-Glykosylierungsmusters so verändert werden, dass die Glykanketten hierdurch, wie postuliert, durch die Glykosidase EndoH abspaltbar waren. Dieses konnte durch vergleichende Analysen mittels ESI-FTICR- und MALDI-TOF-basierter Massenspektrometrie belegt werden. In beiden Methoden konnte jeweils eine Hauptspezies für das Protein nach EndoH-Behandlung nachgewiesen werden, die einem RGMb-Protein mit fünf geschlossenen Disulfidbrücken inklusive eines N-Acetylglucosamins sowie zwei damit verbundenen Fucose-Resten entsprechen könnte (siehe 3.1.2, Abbildung 29 und Abbildung 30). Die zunächst unerwartete potentielle Verknüpfung von Fucoseresten an das erste mit Asparagin verbundene N-Acetylglucosamin (und somit die Existenz einer verzweigtkettigen N-Glykanstruktur) stellt allerdings eine typische Prozessierung innerhalb des N-Glykosylierungssignalweges von Insektenzellen dar (Harrison, R.L. und Jarvis, D.L. 2006; Rendic, D. et al. 2008).

Darüber hinaus zeigten die massenspektrometrischen Analysen, dass auch nach Zusatz des Alkaloids Kifunensin und der damit einhergehenden Optimierung der N-Glykanstrukturen für eine nachgeschaltete enzymatische Abspaltung dennoch keine vollständige Deglykosylierung erzielt werden konnte. Für die zunächst durchgeführten biophysikalischen Analysen war jedoch eine homogene Prozessierung der N-Glykanketten des rekombinanten RGMb_{ΔNcys}-Proteins nicht essentiell, sodass auf weitere Reinigungsverfahren zur Abtrennung der unterschiedlich glykosylierten Proteinspezies verzichtet werden konnte. Allerdings stellt diese Heterogenität für zukünftige Strukturanalysen mittels Proteinkristallisation eventuell ein Problem dar, so dass hierfür eine Abtrennung des RGMb_{ΔNcys}-Proteins mit definierter und verkürzter N-Glykanstruktur (N-Acetylglucosamin inklusive der zwei potentiellen Fucosereste) von nicht umgesetztem, heterogen glykosyliertem Protein durch eine Affinitätschromatographie unter Verwendung von Lektin-Säulenmatrizes notwendig werden könnte.

3.2. STRUKTUR- UND FUNKTIONSANALYSEN VON HUMANEM RGMb PROTEIN

3.2.1. SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE UND UNTERSUCHUNG DER FALTUNGSSTABILITÄT VON REKOMBINANTEM RGMb

Das rekombinant erzeugte RGMb Protein (siehe 3.1.1) wurde zur Analyse der vorliegenden Sekundärstrukturanteile sowie auch der thermischen Faltungsstabilität mit Hilfe der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (*Circular Dichroism*, CD) (2.12) untersucht. Für letzteres wurde jeweils im Abstand von 10 °C Schritten ein CD-Spektrum für das Protein aufgenommen und zur Analyse die Änderung der Elliptizität bei einer ausgewählten Wellenlänge gegen die Temperatur aufgetragen.

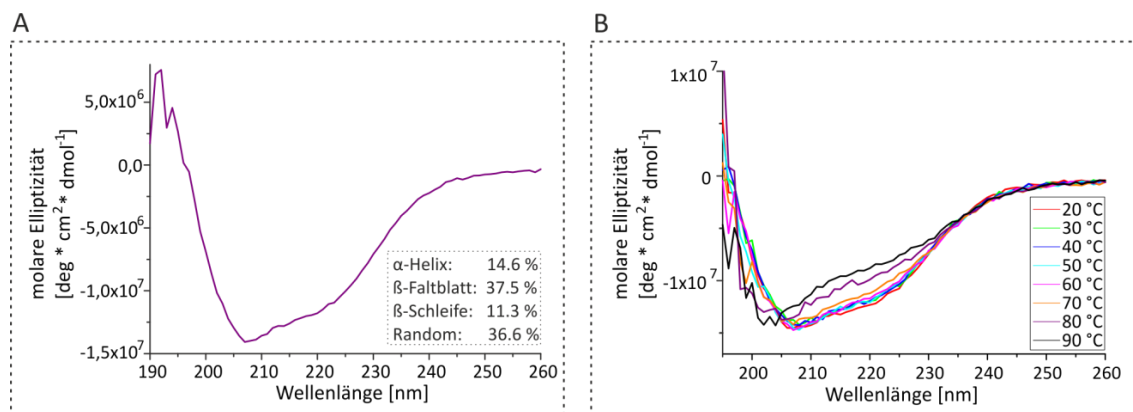


Abbildung 31: A) CD-Spektrum für lösliches RGMb Protein bei 20 °C im UV-Bereich von 190 bis 260 nm (*far UV*). Die Kurve wurde aus fünf Akkumulationen gemittelt. Die aus der Analyse ermittelten Sekundärstrukturanteile von RGMb sind in der Tabelle gezeigt. B) Darstellung der CD-Spektren bei verschiedenen Messtemperaturen. Bis zu einer Temperatur von 70 °C wird keine Änderung des CD-Spektrums im Vergleich zu einer Messung bei 20 °C beobachtet, oberhalb dieser Temperatur findet eine Denaturierung von RGMb statt, wie aus der Änderung der Elliptizität bei 220 nm ersichtlich wird.

Abbildung 31 A zeigt ein CD-Spektrum der Ektodomäne von RGMb im *far UV*-Bereich. Aus der Analyse zeigt sich, dass RGMb überwiegend aus β -Faltblatt-Sekundärstrukturen (ca. 38%) sowie ungeordneten Schleifenstrukturen (ca. 37%) aufgebaut ist, der Anteil α -helikaler Bereiche (ca. 15%) und β -Schleifen (ca. 11%) ist deutlich geringer. Allerdings weist die Analyse mittels Zirkulardichroismus große Fehlerbreiten auf, weshalb für detailliertere Aussagen eine experimentelle Strukturaufklärung notwendig ist.

Die Messung der thermischen Denaturierung mittels Zirkulardichroismus ergab, dass der BMP-Corezeptor über eine hohe Stabilität verfügt und erst bei sehr hohen Temperaturen oberhalb von 70 °C entfaltet. Wie in Abbildung 31 B dargestellt ist, veränderte sich die Elliptizität von RGMb erst bei Temperaturen von 80 °C (Magenta gefärbte Linie) bzw. 90 °C (schwarze Linie). Verantwortlich für diese hohe thermische Stabilität von RGMb ist vermutlich ein relativ dichtes

Disulfidbrückenmuster. Da die reife Domäne über 15, beziehungsweise in dem hier rekombinant hergestellten RGMb_{ΔNcys} Protein über 14, Cysteinreste (siehe auch Abschnitt 3.1.2 und Abbildung 21) verfügt, könnten demzufolge bis zu sieben intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet werden. Insgesamt verfügt das rekombinante RGMb_{ΔNcys} Protein über 381 Aminosäuren, so dass eine siebenfache Disulfidverbrückung eine hohe Stabilität verleihen würde. Eine röntgenkristallografische Aufklärung der RGMb-Struktur oder eine umfangreiche massenspektrometrische Analyse könnten zukünftig Aufschluss über das exakte Disulfidverbrückungsmuster geben.

3.2.2. INTERAKTIONSANALYSEN VON RGMb MIT LIGANDEN DER TGF-β SUPERFAMILIE

Zu Beginn dieser Arbeit lagen für die Mitglieder der RGM-Familie nur wenige funktionelle Daten vor (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Xia, Y. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2008). Auf der Grundlage von Co-Immunopräzipitationsstudien, Reportergen-nachweisverfahren sowie Protein-Interaktionsstudien unter Verwendung eines zellfreien Systems wurde mit RGMb 2005 der erste Vertreter der RGM-Familie als BMP-spezifischer Corezeptor beschrieben (Samad, T.A. et al. 2005).

Um detaillierte Einblicke in die Wirksamkeit des Corezeptors RGMb mit der Vielzahl vorhandener BMP und TGF-β Liganden und deren Rezeptoren zu erhalten, wurden in dieser Arbeit *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien basierend auf der Oberflächen-Plasmonresonanz (*Surface Plasmon Resonance, SPR*) (2.11) etabliert. Dieses Verfahren ermöglicht die Analyse von Wechselwirkungen über die Messung der Bindungskinetik und erlaubt so auch Aussagen über den Mechanismus der Interaktion zu treffen. Hierbei wird ein Interaktionspartner auf einer (in der Regel) mit einer dünnen Goldschicht beschichteten Prismaoberfläche kovalent immobilisiert. Durch dieses Prisma wird von der gegenüberliegenden Seite polarisiertes Licht geleitet, welches an der Metall-Biofilm Grenzfläche ein elektrisches Wechselwirkungsfeld erzeugt. Dieses Feld wird von der Massenabsorption an der Prismaoberfläche durch den über die Sensoroberfläche perfundierten Interaktionspartner beeinflusst und sorgt auf diese Weise für eine Änderung des Brechungswinkels des eingestrahnten Lichtstrahls. Die durch die definierte Perfusion massen- und zeitabhängige Änderung des Lichtstrahls (das Verfahren kann somit als Mikrofeinwaage aufgefasst werden) wird durch eine CCD-Kamera erfasst und erlaubt so direkt die Visualisierung und Analyse der Interaktionskinetik.

Repräsentative Messungen der Wechselwirkung von RGMb_{ΔNcys} mit verschiedenen Liganden der BMP- und der GDF-Unterfamilie sind in Abbildung 32 gezeigt. Bei allen SPR-Messungen wurden

die TGF- β Liganden durch eine direkte kovalente Kopplung ihrer primären Aminogruppen (überwiegend die ϵ -Aminogruppe in Lysinseitenketten) (2.11) an den mit N-Hydroxysuccinimid aktivierten Carboxylgruppen der Sensoroberfläche immobilisiert. Es wurden zumeist etwa 500 RU (1 RU = 1 pg/mm²) (BMP-6: etwa 300 RU) Ligandenprotein immobilisiert. Die rekombinant hergestellte lösliche RGMb Corezeptordomäne wurde als Analyt in sechs verschiedenen Konzentrationen in einem Pufferstrom über den Biosensor perfundiert. Die Bindungsaktivitäten der Liganden wurden nach der Immobilisierung durch Referenzmessungen mit den entsprechenden hochaffinen Rezeptoren BMPR-IA sowie ActR-IIb überprüft. Um mögliche unspezifische Wechselwirkungen (sogenannte *bulk-face* Effekte) des RGMb Corezeptorproteins mit der auf dem Sensor vorhandenen aus Alginat bestehenden Oberflächenmatrix auszugleichen, wurden die Interaktionen von RGMb mit der unmodifizierten Sensoroberfläche eines Referenzkanals von den Rohdaten subtrahiert. Die so erhaltenen Sensogramme wurden mit der ProteON Manager Software (Version 2.1.2.05) ausgewertet. Für die Protein-Protein Interaktion von RGMb mit den immobilisierten TGF- β Faktoren wurde zur Auswertung der Daten ein Modell für heterogene Liganden herangezogen, da eine Analyse unter Verwendung eines klassischen Langmuir 1:1 Interaktionsmodells nur eine teilweise Übereinstimmung zwischen den berechneten und den experimentellen Kinetikdaten ergab. Der Grund hierfür ist vor allem in dem biphasischen Kurvenverlauf der SPR-Sensogramme zu sehen, wobei hier sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsphasen auf zwei unterschiedlich schnelle Interaktionen hinweisen. Eine mögliche molekulare Erklärung könnte in der Tatsache liegen, dass durch die direkte Amin-Kopplung des Liganden an die Chip-Oberfläche heterogen ausgerichtete Proteinspezies entstehen könnten.

Die so erhaltenen Kinetikdaten sind in Tabelle 29 gelistet. Für alle Interaktionen des rekombinant hergestellten löslichen Corezeptors RGMb mit den hier untersuchten BMP-/GDF-Liganden konnten aus den Geschwindigkeitsratenkonstanten Gleichgewichtsbindungskonstanten im niedrig-nanomolaren Bereich ermittelt werden. Bei genauerer Betrachtung der Interaktion zeigte sich, dass die Wechselwirkungen von RGMb mit den BMP-Liganden BMP-2, -4, -6 sowie -7 sowohl schnelle Assoziations- (k_a) als auch Dissoziationsgeschwindigkeiten (k_d) aufwiesen, während sich die Interaktionen von RGMb und den GDF-Liganden (insbesondere für GDF-5 und GDF-7) hiervon signifikant unterschieden. Zwar wurden auch für diese Wechselwirkungen schnelle Assoziationsratenkonstanten beobachtet, jedoch verläuft die Dissoziation dieser Corezeptor/Ligand-Komplexe deutlich langsamer, wodurch auch die hohen Bindungsaffinitäten (GDF-5: 0.7 nM, GDF-7: 0.9 nM) dieser Interaktionen zu erklären sind.

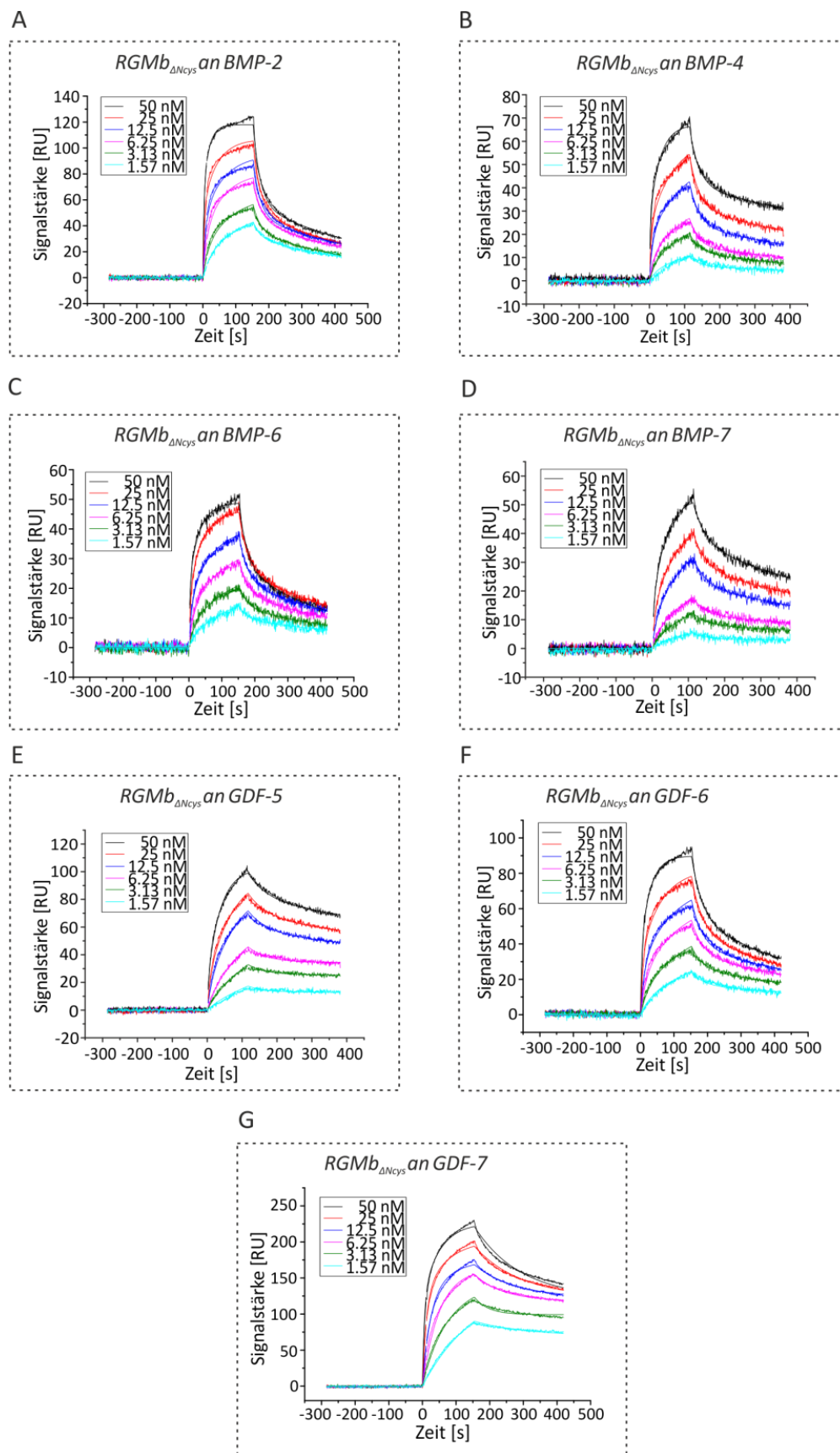


Abbildung 32: Analyse der Interaktion von RGmb mit verschiedenen BMP- und GDF-Liganden unter Verwendung der Oberflächen-Plasmonresonanz. Die verschiedenen Analyt-Konzentrationen für RGmb_{ΔNcys} sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Die Daten wurden mit der ProteON Manager Software (Version 2.1.2.05) mit Hilfe eines Modells für die Interaktion mit einem heterogenen Liganden ermittelt.

3. Ergebnisse

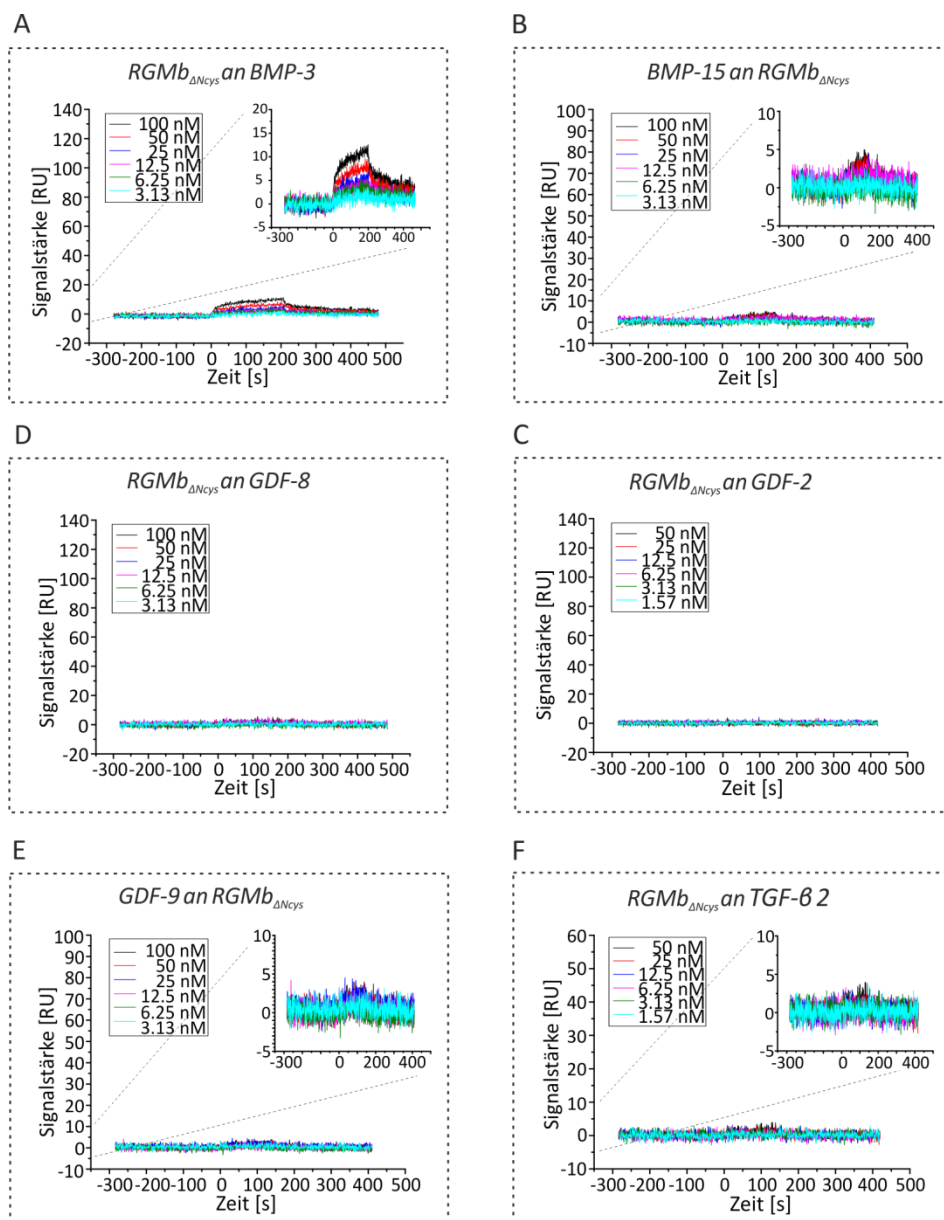
Tabelle 29: Auflistung der ermittelten Bindungskinetik Parameter für die Interaktionen von RGMB_{ΔNcys} mit den immobilisierten BMP- und GDF-Liganden.

	$k_a \times 10^6 [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d \times 10^{-3} [s^{-1}]$	$K_D(kin) [nM]$
BMP-2	2.0 +/- 1.1	2.5 +/- 0.2	1.6 +/- 0.8
BMP-4	0.9 +/- 0.3	1.4 +/- 0.3	1.8 +/- 0.6
BMP-6	1.2 +/- 0.4	2.3 +/- 0.4	2.4 +/- 1.4
BMP-7	0.6 +/- 0.1	1.2 +/- 0.4	2.0 +/- 0.9
GDF-5	0.7 +/- 0.2	0.4 +/- 0.3	0.7 +/- 0.4
GDF-6	1.0 +/- 0.4	1.5 +/- 0.3	1.9 +/- 1.0
GDF-7	1.2 +/- 0.4	0.9 +/- 0.2	0.9 +/- 0.4

Wie in Abbildung 33 dargestellt, weist das rekombinante RGMB_{ΔNcys} Protein jedoch eine hohe Liganden-Spezifität auf und interagiert nicht mit allen in dieser Arbeit untersuchten Liganden der TGF-β Superfamilie. Hierfür wurden die TGF-β Liganden wie bereits zuvor beschrieben durch direkte Amin-Kopplung (2.11) an der Sensoroberfläche immobilisiert und diese anschließend mit dem löslichen Corezeptor perfundiert. Die Flusszellen wurden in diesen Messungen in einer Beladungsdichte von etwa 400 RUs der Liganden AMH und GDF-8 sowie 300 RUs BMP-3 und Activin A beladen, während für die Liganden TGF-β 2 und TGF-β 3, möglicherweise aufgrund partiell unzugänglicher Lysin-Seitenketten, nur eine Kopplungsdichte von 200 bzw. 100 RU erzielt werden konnten. Für die Charakterisierung der Interaktionen von RGMB_{ΔNcys} mit den Liganden GDF-9 sowie BMP-15 war eine andere Messstrategie notwendig. Da beiden Liganden die intermolekulare Disulfidbrücke fehlt, welche zu einer Stabilisierung der Wachstumsfaktoren durch kovalente Dimerisierung führt, war eine direkte Kopplung dieser TGF-β Liganden nicht möglich. Da die Immobilisierungsstrategie auf eine „einmalige“ Verknüpfung des Ligandendimers auf der Sensoroberfläche abzielt, hätte die Absättigung der aktivierten Oberfläche mit Ethanolamin oder eine nachfolgende Regeneration des Biosensors möglicherweise ein Abdissoziieren der nicht immobilisierten Monomerhälfte und damit die Inaktivierung der TGF-β Liganden zur Folge. Daher wurde für diese Messungen der Corezeptor RGMB auf der Sensoroberfläche immobilisiert (Dichte etwa 450 RU) und mit Konzentrationsreihen von BMP-15 und GDF-9 perfundiert.

Die Bindungsaktivität der Liganden wurde nach der Immobilisierung, wenn möglich, durch Referenzmessungen mit entsprechenden hochaffinen Rezeptoren überprüft. Die Liganden GDF-8, GDF-2 und Activin A wurden auf ihre Interaktion mit dem Rezeptor ActR-IIB getestet, während hingegen die kommerziell erworbenen Liganden AMH und TGF-β 3 bereits durch Aktivitätsassays bei dem jeweiligen Hersteller evaluiert worden waren. Die Bindungsaktivität von TGF-β 2 wurde durch Dr. J. Nickel (pers. Mitteilung) in SPR-Messungen mit dem Rezeptor TβRII überprüft. Für BMP-3, welches gemäß Herstellerangaben in einem funktionellen Assay

getestet wurde, konnte keine Bindung an den Typ II Rezeptor ActR-IIB beobachtet werden. Allerdings weisen Literaturdaten auf eine Wechselwirkung von BMP-3 mit ActR-IIB hin, wobei jedoch bei diesen Messungen der Rezeptor auf der Sensoroberfläche immobilisiert vorlag ((Allendorph, G.P. et al. 2007), SPR Messungen mit immobilisiertem ActR-IIB: $K_D = 56$ nM). Die Bindungsaktivität der Liganden BMP-15 sowie GDF-9 wurden an einem Sensorchip mit immobilisierten BMP-Rezeptoren bestätigt. Von den SPR-Daten der Interaktionen der TGF- β Faktoren mit $RGMb_{\Delta Ncys}$ wurden die unspezifischen Wechselwirkungen des Analyten mit der Sensoroberfläche subtrahiert und das für den Biosensor erwartete maximale SPR-Signal mit Hilfe von Referenzmessungen entsprechend skaliert. Hierzu wurde auf allen verwendeten Biosensoren BMP-2 als Referenzbindepartner immobilisiert und dessen SPR-Signalstärke bei der höchsten $RGMb_{\Delta Ncys}$ Analytkonzentration jeweils für die Skalierung der Ordinate herangezogen.



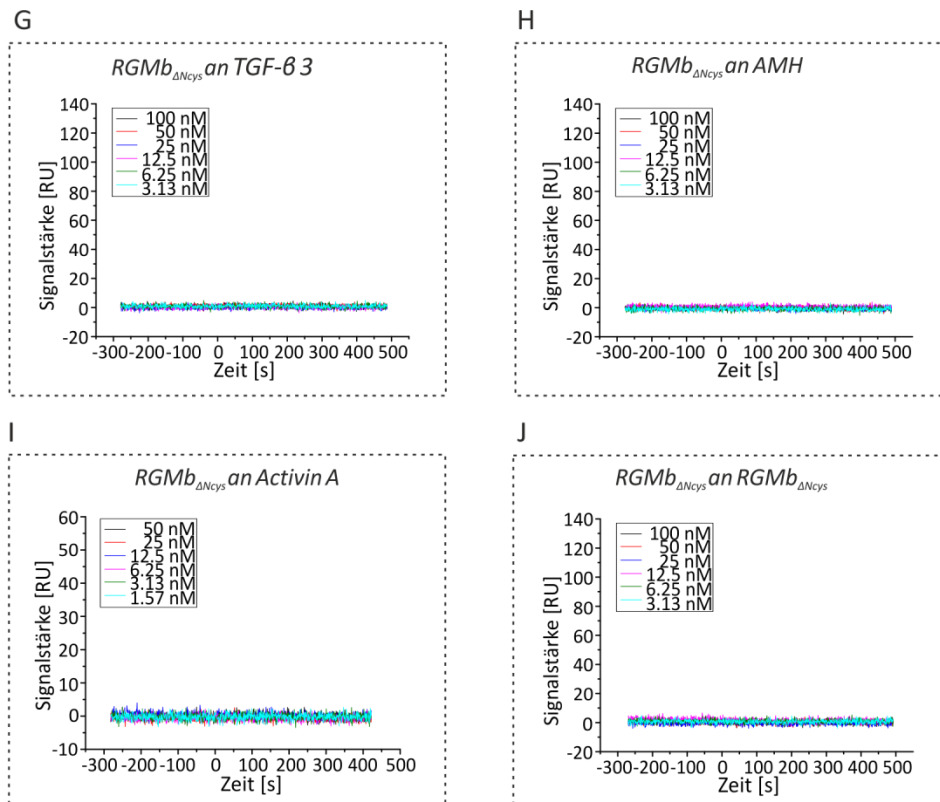


Abbildung 33: Oberflächen-Plasmonresonanz Messungen für die Interaktionen von $RGMB_{\Delta Ncys}$ mit Liganden der TGF- β Superfamilie. Die Analytkonzentrationen sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen angegeben. Die Ordinatenachsen wurden auf Basis entsprechender Referenzmessungen mit BMP-2 skaliert. Hierzu wurden Messungen an Chips mit immobilisierten Liganden auf das maximale SPR-Signal der Interaktion der jeweils höchsten Konzentration von $RGMB_{\Delta Ncys}$ mit ebenfalls auf dem Chip immobilisiertem BMP-2 skaliert, während bei einer Kopplung des Corezeptors die Bindung von 100 nM BMP-2 als Skalierungsreferenz diente. Die Ausschnitte in A, B, E und F repräsentieren vergrößerte Darstellungen der jeweiligen SPR-Messungen.

Für die Interaktionsstudien mit immobilisiertem $RGMB$ Protein wurde eine SPR-Messung mit BMP-2 als Analyt und einer Konzentration von 100 nM für die Skalierung der Daten verwendet. Für alle in Abbildung 33 aufgeführten Liganden konnte für $RGMB$ mittels SPR-Messungen keine oder nur eine sehr schwache Wechselwirkung beobachtet werden.

Die Vergrößerungen in den Teilabbildungen 33 A, B, E und F unterstreichen, dass es sich bei diesen Messungen um keine auswertbaren und wahrscheinlich, aufgrund der sehr geringen Bindung, um keine physiologisch relevanten Wechselwirkungen zwischen dem Corezeptor und den Liganden handelt. Somit konnte für eine Reihe von TGF- β Liganden bzw. verschiedenen TGF- β Unterfamilien keine (direkte) Interaktion mit $RGMB$ in vitro nachgewiesen werden. Zudem zeigte eine Messung der potentiellen Interaktion von $RGMB$ mit $RGMB$ als Analyt keine homophilen Interaktionen (Abbildung 33 J), obwohl für $RGMB$ Funktionen in der Zell-Zell Adhäsion beschrieben wurden (Samad, T.A. et al. 2004).

Die Analyse der *in vitro* Bindungseigenschaften von RGMB weist auf ein ausgeprägtes Spezifitätsprofil für die Liganden bestimmter BMP- und GDF-Unterfamilien hin. Auch wenn nicht alle bekannten TGF- β Liganden getestet werden konnten, so konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Bindung von RGMB an die Wachstumsfaktoren nur dann beobachtet wird, wenn der TGF- β Faktor auch in der Lage ist mit den Typ I Rezeptoren BMPRI-A und/oder BMPRI-B zu interagieren. Ob die Bindung von RGMB an TGF- β Liganden auch mit deren Bindungsprofil für die TGF- β Typ II Rezeptoren korreliert, kann auf der Basis der Daten nicht abschließend beantwortet werden.

3.2.3. INTERAKTIONEN VON RGMB MIT MODULATOREN DER TGF- β SUPERFAMILIE

Auf Grund ihrer pleiotropen Funktionen während der Embryonalentwicklung wie auch im adulten Organismus (siehe Abschnitt 1.2 sowie Referenzen darin) werden die Wachstumsfaktoren der BMP-Familie stringent reguliert (siehe Kapitel 1.4 sowie Referenzen darin). In diesem Zusammenhang wurden bereits eine Vielzahl an sekretierten extrazellulären Modulatorproteinen beschrieben, welche die Signaltransduktion dieser Wachstumsfaktoren beeinflussen können (für Details siehe Ausführungen in 1.4 sowie Referenzen darin). Für die BMP-Regulatoren Chordin und Tsg (*Twisted gastrulation*) konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese während der *Xenopus* Entwicklung in einem ternären Komplex gebunden an BMP-2 diesen Wachstumsfaktor regulieren und an der Ausbildung eines BMP-2-Konzentrationsgradienten beteiligt sind (für eine Übersicht: (Zakin, L. und De Robertis, E.M. 2010)). Um daher zu analysieren, ob der Corezeptor RGMB ebenfalls direkt mit BMP-Modulatoren interagieren und neben der direkten Interaktion mit den BMP-/GDF-Liganden diese auch in einem übergeordneten Mechanismus regulieren kann, wurden in dieser Arbeit entsprechende *in vitro* Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz etabliert.

Dazu wurden der BMP-Antagonist Noggin (ca. 400 RU) sowie der Corezeptor RGMB (ca. 450 RU) direkt über primäre Aminogruppen auf der Biosensor-Oberfläche (siehe 2.11) kovalent immobilisiert. Die Bindungsaktivität der immobilisierten Proteine Noggin und RGMB wurden jeweils durch Messung der Interaktion mit BMP-2 bestätigt. Anschließend wurde das lösliche rekombinante RGMB Protein als Analyt in verschiedenen Konzentrationen im Pufferstrom über die mit dem Antagonisten Noggin beladene Flusszelle geleitet. Das so erhaltene Sensogramm wurde durch Subtraktion der Interaktion von RGMB mit einer unmodifizierten Sensoroberfläche korrigiert (Abbildung 34). Hierbei konnte keine direkte Wechselwirkung zwischen RGMB und Noggin nachgewiesen werden. Eine direkte synergistische oder anders geartete direkte Interaktion zwischen Noggin und RGMB kann somit ausgeschlossen werden.

3. Ergebnisse

Eine eventuelle Wechselwirkung von RGMB mit anderen bekannten BMP Modulatorproteinen wurde durch Perfusion der mit RGMB beladenen Flusszelle mit den Modulatorproteinen BAMBI (*BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor*; von Dipl.-Biol M. Kottmair zur Verfügung gestellt) und xTsg1 (von Dipl.-Biochem. J. E. Fiebig zur Verfügung gestellt) untersucht. Die Bindeaktivität beider Modulatorproteine wurde zuvor durch Zellassays oder in vitro SPR-Messungen mit BMP-2 bestätigt (persönl. Mitteilung von Dipl.-Biol. M. Kottmair und Dipl.-Biochem. J. E. Fiebig). Abbildung 34 B und C zeigen die Ergebnisse der SPR Interaktionsstudie mit RGMB. Die Ordinatenachsen wurden jeweils auf Referenzmessungen mit 100 nM (Abbildung 34 A) oder 200 nM BMP-2 (Abbildung 34 B/C) skaliert. Auch hier konnten mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonresonanz keine direkten Interaktionen zwischen den BMP-bindenden Modulatorproteinen und der löslichen Domäne des Corezeptors RGMB nachgewiesen werden.

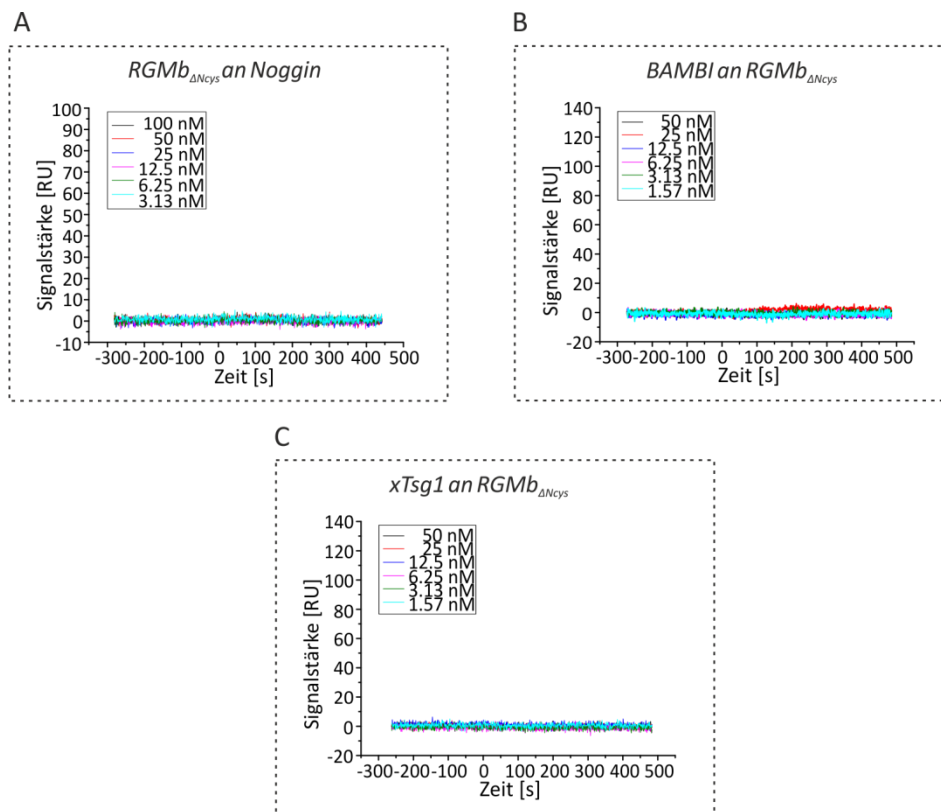


Abbildung 34: Oberflächen-Plasmonresonanz Messungen für die Interaktionen von RGMB_{ΔNcys} mit verschiedenen BMP-Modulatoren. Die verschiedenen Analytkonzentrationen sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen angegeben. Die Ordinatenachsen wurden auf Basis entsprechender Referenzmessungen mit BMP-2 skaliert. Hierzu wurden die Messungen in Abbildung 34 A auf das maximale SPR-Signal der Interaktion mit 100 nM BMP-2 angepasst, während die Messungen in Abbildungen 34 B/C auf 200 nM BMP-2 skaliert wurden.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass lösliches rekombinantes RGMB Protein in vitro nicht mit den in dieser Arbeit getesteten BMP-Modulatoren in Wechselwirkung tritt. Dieses spricht gegen

eine übergeordnete Regulation der BMP-Signaltransduktion durch synergistische oder antagonistische Effekte zwischen diesen Modulatoren.

3.2.4. INTERAKTIONEN VON RGMb MIT REZEPTOREN DER TGF- β SUPERFAMILIE

Erste Charakterisierungen von RGMb als BMP Corezeptor anhand von Co-Immunopräzipitationsstudien beziehungsweise auf der Basis zellbasierter Experimente unter Verwendung dominant-negativ wirkender Rezeptorvarianten deuteten auf eine direkte Interaktion von RGM-Proteinen mit BMP Typ I und Typ II Rezeptoren hin (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Xia, Y. et al. 2008). Somit hätten RGM Proteine sowohl eine Bindungseigenschaft an die TGF- β Liganden als auch an deren Rezeptoren und würden sich somit grundlegend von allen bisherigen Modulatoren der TGF- β Superfamilie unterscheiden. Diese binden in der Regel an die Liganden und neutralisieren damit deren Rezeptorbindung. Allerdings könnten die mittels zellbasierender Methoden nachgewiesenen Wechselwirkungen auch auf indirekten Interaktionen beruhen, da hier isolierte Reaktionsbedingungen aufgrund der Präsenz bekannter und unbekannter Interaktionspartner nicht hergestellt werden können.

Um diese unerwarteten Befunde zu überprüfen, wurden in vitro Bindungsstudien zwischen den isolierten potentiellen Interaktionspartnern basierend auf der Oberflächen-Plasmonresonanz (2.11) durchgeführt. Dazu wurden die mit Biotin markierten Ektodomänen (extrazelluläre Domänen) der BMP Typ I und Typ II Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB mit einer Dichte von jeweils etwa 300 RU auf einem mit Neutravidin beladenen Biosensor immobilisiert (2.10). Andere, kommerziell erhältliche Rezeptorektodomänen wurden mit einer Beladungsdichte von etwa 400 RU durch kovalente Verknüpfung primärer Aminogruppen der Rezeptorproteine (2.11) an die aktivierten Carboxylgruppen eines GLC-Biosensors verknüpft. Die Bindeaktivitäten der immobilisierten Rezeptoren wurden durch Messungen der Interaktionen mit bekannten Bindepartnern überprüft. Die Ordinatenachsen der Ergebnisse an funktionalisierten Neutravidin-Biosensoren wurden auf die maximale Signalstärke der Interaktion der gekoppelten Rezeptoren mit 50 nM BMP-2 skaliert. Als Skalierungsgrundlage für den Typ I Rezeptor ActR-IB diente hingegen die Interaktion mit 200 nM Activin A, während für die Rezeptoren T β RI sowie Alk7 keine Referenzliganden zur Verfügung standen. Die Interaktionen wurden durch Perfusion des mit den Rezeptoren funktionalisierten Biosensors mit verschiedenen Analytkonzentration von RGMb gemessen und die Interaktionsdaten mittels Subtraktion der unspezifischen Interaktion von RGMb mit nicht funktionalisierten Sensoroberflächen normiert.

3. Ergebnisse

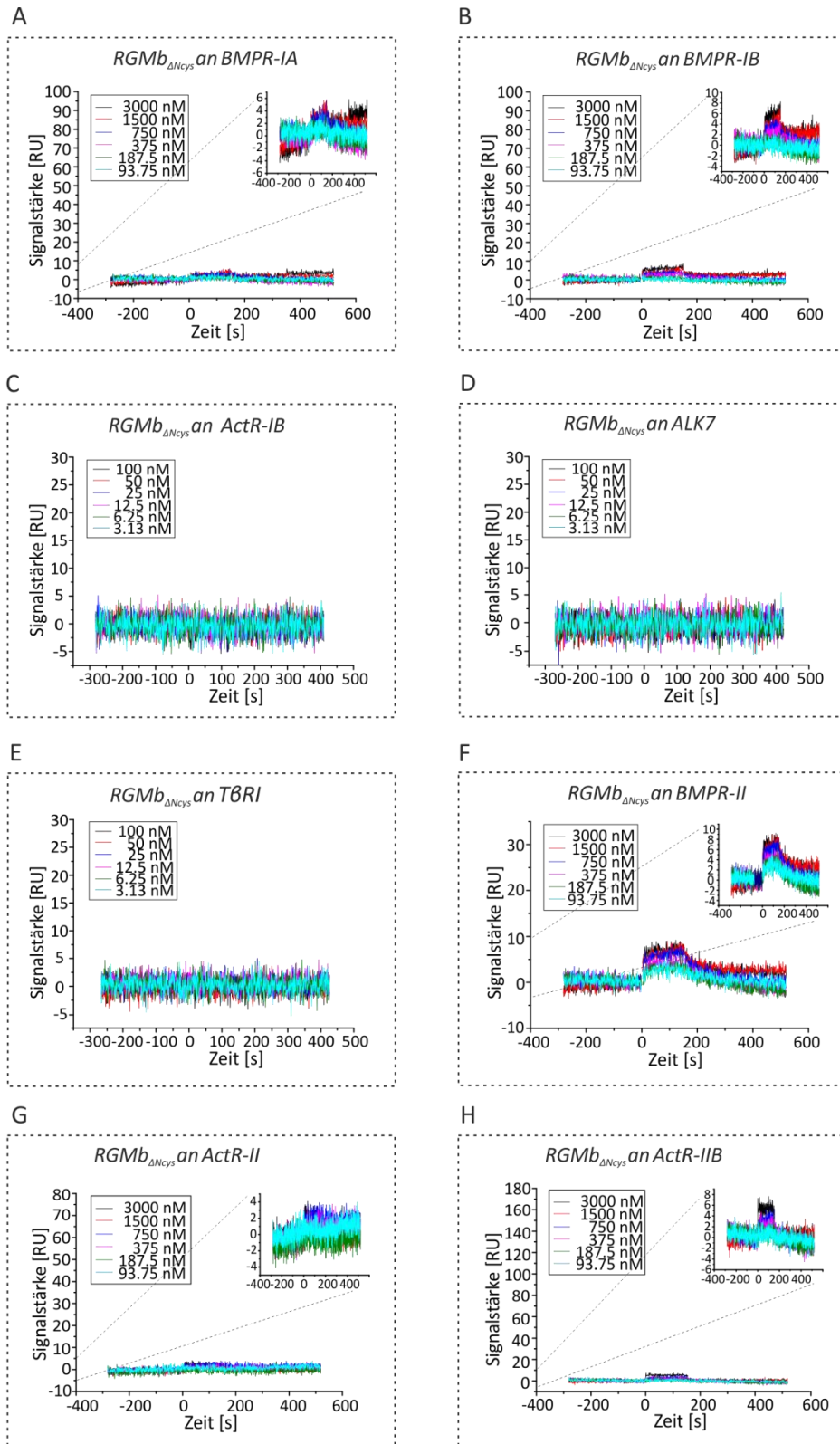


Abbildung 35: Oberflächen-Plasmonresonanz Messungen für die Interaktion von $RGMB_{\Delta Ncys}$ mit verschiedenen Typ I und Typ II BMP-/TGF- β -Rezeptoren. Die $RGMB_{\Delta Ncys}$ Analytkonzentrationen sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Die maximalen SPR-Signale wurden an Referenzmessungen angepasst: Dazu wurden die Ordinatenachsen der Bindungsstudien am Neutravidinchip auf die maximale Signalamplitude der Interaktion der gekoppelten Rezeptoren mit je 50 nM BMP-2 normiert. Als Skalierungsreferenz für ActR-IB diente die Interaktion mit 200 nM Activin A, während für $T\beta RI$ sowie Alk7 keine entsprechenden Liganden zur Verfügung standen. Die Ausschnitte in A, B, F und G repräsentieren vergrößerte Darstellungen der jeweiligen SPR-Messungen.

Abbildung 35 zeigt die Messdaten für eine mögliche Bindung des Corezeptor RGMb mit einer Vielzahl verschiedener BMP/TGF- β Typ I und Typ II Rezeptoren. Trotz der Verwendung sehr hoher RGMb Analyt-Konzentrationen (bis 3 μ M) konnte keine Bindung von RGMb sowohl an die Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB als auch an die Typ II Rezeptoren BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB nachgewiesen werden. Auch in den Ausschnittsvergrößerungen der Messungen der entsprechenden Teilabbildungen A, B, F, G und H kann keine nennenswerte Bindung von RGMb an die genannten Rezeptorektodomänen beobachtet werden. Darüber hinaus konnten für die hier untersuchten Typ I Rezeptoren für Activine und TGF- β s, ActR-IB, Alk7 und T β RI ebenfalls keine direkten Interaktionen ermittelt werden.

Die hier repräsentierten Ergebnisse werfen daher ein interessantes neues Bild auf die Wechselwirkungen des BMP-Modulators RGMb mit den Rezeptoren der TGF- β Superfamilie. So konnte zum einen eine hohe Spezifität des Corezeptorproteins für die Liganden der BMP/GDF-Subfamilie gezeigt werden, welche über den Typ I Rezeptor BMPR-IA signalisieren können (siehe Abschnitt 3.2.2). Darüber hinaus widerlegen die in dieser Arbeit erhaltenen *in vitro* Bindungsstudien die Existenz direkter Interaktionen zwischen den untersuchten Typ I sowie Typ II Rezeptorektodomänen und dem löslichen rekombinanten RGMb (siehe 3.2.4). Möglicherweise zeichnen endogen exprimierte BMP-Liganden oder noch unbekannte Modulatorproteine für die positiven Interaktionen zwischen dem Corezeptor und den BMP-Rezeptoren in den publizierten Daten (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Xia, Y. et al. 2008) verantwortlich. RGMb weist zudem Ähnlichkeiten zu den bekannten sekretierten BMP-Antagonisten auf, welche ebenfalls spezifische Liganden hochaffin binden, jedoch keine Interaktion mit den Rezeptoren zeigen (für einen Übersichtsartikel: (Gazzerro, E. und Canalis, E. 2006)). Die Modulatoren blockieren dabei die Bindeepitope beider Rezeptorsubtypen und unterbinden so die Interaktion der Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren (siehe auch 1.5, für eine Übersicht: (Gazzerro, E. und Canalis, E. 2006)).

Da die RGM Proteine sekretiert und über eine GPI-Domäne in der Plasmamembran verankert werden, können sie durch endogen vorhandene Phospholipasen oder auch spezifische Pro-Protein Konvertasen von der Membranverankerung gelöst werden. *In vitro* konnten so bereits lösliche Formen der RGM-Corezeptoren erzeugt werden (Brinks, H. et al. 2004; Kuninger, D. et al. 2006; Abarca-Buis, R.F. et al. 2011; Tassew, N.G. et al. 2012) und die Existenz von löslichem RGMc wurde darüber hinaus bereits in humanem Serum nachgewiesen (Brasse-Lagnel, C. et al. 2010; Finkenstedt, A. et al. 2012; Rumjon, A. et al. 2012; Shalev, H. et al. 2013). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Modulatoren der RGM-Familie *in vivo* sowohl membrangebunden als auch als lösliche Proteine vorkommen und so den BMP-Signalweg auf möglicherweise

unterschiedliche Weise beeinflussen könnten. Diese duale Wirkweise wird in der Literatur diskutiert und es wurden zum Teil widersprüchliche Funktionen und Auswirkungen der RGM-Proteine auf die Signaltransduktion der BMP-Wachstumsfaktoren beschrieben (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Xia, Y. et al. 2008; Kanomata, K. et al. 2009). Um die Wirkung von membranverankertem sowie löslichem RGMb-Protein auf den BMP-Signalweg funktionell zu charakterisieren, wurden daher in dieser Arbeit zellbasierte Nachweisverfahren etabliert.

3.3. FUNKTIONELLE ANALYSEN DER RGMB SIGNALMECHANISMEN IN ZELLEN

3.3.1. MODULATION DES BMP-SIGNALWEGES DURCH LÖSLICHES RGMB PROTEIN IN ZELLEN

RGMB induzierte Effekte auf die Expression der Alkalischen Phosphatase in C2C12- und ATDC5-Zellen

Die Identifizierung von RGMB als neuartiger BMP-spezifischer Corezeptor beruhte unter anderem auf der Analyse von BMP-induzierten Reporterproteinen in BMP-responsiven Zelllinien (Samad, T.A. et al. 2005). Während hier die Coexpression des membranständigen, GPI-verankerten RGMB-Konstruktes die BMP-induzierte Expression des Reporter-codierten Luciferase-Enzyms verstärkte, wurde die BMP-abhängig produzierte Enzymmenge durch Transfektion eines für lösliches RGMB codierenden Konstrukts im Vergleich zu untransfizierten Zellen erniedrigt (Samad, T.A. et al. 2005). Diese Beobachtung wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert, da eine zweite, 2009 veröffentlichte Studie zeigt, dass in C2C12 Zellen sowohl lösliches als auch membranverankertes RGMB die BMP-induzierte Expression der Alkalischen Phosphatase und auch die Expression eines wie oben beschriebenen Reportergens inhibiert (Kanomata, K. et al. 2009).

Bei C2C12-Zellen handelt es sich um eine murine Myoblastenzelllinie (Yaffe, D. und Saxel, O. 1977), welche - wie auch die Osteoblasten - aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehen (siehe z. B. (Dennis, J.E. et al. 1999)). Eine Behandlung mit BMP-Faktoren inhibiert den myogenen Differenzierungsweg der C2C12 Zellen und induziert stattdessen die Transition in die Osteoblasten-Linie (Katagiri, T. et al. 1994). Dabei wird die Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP), eines frühen Markergens der Osteoblasten-Differenzierung, durch die BMP-Wachstumsfaktoren dosisabhängig induziert (Katagiri, T. et al. 1994). Weitere BMP-responsive Zelllinien sind ATDC5 sowie C3H10T1/2. Ähnlich den Prozessen während der endochondralen Knochenbildung zeigen die murinen chondrogenen ATDC5 Zellen nach Behandlung mit BMP-Faktoren eine sequentielle Transition von undifferenzierten, über proliferative bis hin zu mineralisierenden Chondrozyten (Shukunami, C. et al. 1998; Ito, H. et al. 1999). Die murine mesenchymale Stammzelllinie C3H10T1/2 kann unter Einfluss von BMPs sowohl in die osteogene als auch in die chondrogene Linie differenzieren (Katagiri, T. et al. 1990; Asahina, I. et al. 1996; Ducy, P. et al. 1997; Shea, C.M. et al. 2003). Analog zu den C2C12 Zellen exprimieren auch ATDC5 und C3H10T1/2 Zellen nach Stimulation mit BMP-Faktoren die Alkalische Phosphatase (Katagiri, T. et al. 1990; Shukunami, C. et al. 1998). Daher können diese Zelllinien wertvolle Hinweise in der funktionellen Analyse des BMP-Signalweges liefern.

Um die zuvor beschriebenen, zunächst konträr erscheinenden Ergebnisse aufklären zu können, wurden eigene zellbasierende Experimente mit den genannten Zelllinien etabliert. Hierfür wurden Nachweisverfahren angewendet, in denen eine potentielle Konkurrenz der BMP-induzierten ALP-Expression durch die Titration des löslichen rekombinanten RGMb-Proteins analysiert wurde (2.16.2). Für diese Hemmstudien fanden die Zelllinien C2C12 und ATDC5 Verwendung. Um eine direkte Auswirkung auf die Aktivierung des SMAD-Signalwegs zu untersuchen, wurde hingegen auf ein BMP-induziertes Luciferase-Reportergen-Verfahren (2.16.3) in C3H10T1/2-BRE-Luc Zellen (siehe 2.1.14) zurückgegriffen.

Zur Analyse der biologischen Aktivität aller verwendeten BMP-/GDF-Liganden wurden zunächst die halbmaximalen effektiven Ligandenkonzentrationen (EC_{50} -Werte) zur Expression der Alkalischen Phosphatase in C2C12 sowie ATDC5 Zellen bestimmt (siehe 2.16.2). Dazu wurden die Zellen wie beschrieben vermehrt und mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen BMP-Liganden behandelt. Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Expression der Alkalischen Phosphatase durch ein enzymatisches Nachweisverfahren quantitativ erfasst. Repräsentative Ergebnisse dieser Bestimmungen unter Verwendung von C2C12 Zellen sind in Abbildung 36 A – D für die Liganden BMP-2_{E.coli} (A), BMP-4_{E.coli} (B), BMP-6_{CHO} (C) und BMP-7_{CHO} (D) aufgeführt. Die EC_{50} -Werte für BMP-2 entsprechen Literaturdaten (etwa 10 bis 15 nM in (Weber, D. et al. 2007), oder 19 nM in (Harth, S. et al. 2010)). Ebenso stimmen die halbmaximalen effektiven Konzentrationen für BMP-6_{CHO} (vgl. dazu BMP-6_{NSO}: etwa 5 nM in (Harth, S. 2010)) sowie für BMP-7_{CHO} (~10 nM (Harth, S. 2010)) mit publizierten Werten anderer Studien überein. Die biologische Aktivität des verwendeten BMP-4_{E.coli} scheint verglichen mit Literaturdaten etwas niedriger zu sein (vgl. BMP-4_{NSO}: etwa 10 nM in (Nakayama, N. et al. 2004)).

Die Ermittlungen der halbmaximalen effektiven Ligandenkonzentrationen bei Verwendung von ATDC5 Zellen und den TGF- β Faktoren Liganden BMP-2_{E.coli} (A), BMP-4_{E.coli} (B), BMP-6_{CHO} (C), BMP-7_{CHO} (D) und GDF-5 (E) sind in der Abbildung 37 A bis E gezeigt. Auch hier stimmen die EC_{50} -Werte dieser Studie mit Literaturdaten überein und belegen die biologische Aktivität der verwendeten TGF- β Faktoren (vgl. (Harth, S. 2010) sowie (Kotzsch, A. 2008)). Lediglich der EC_{50} -Wert für BMP-6 konnte nicht eindeutig bestimmt werden, da in diesem Fall keine Basislinie erreicht werden konnte. Möglicherweise war hier die anfänglich eingesetzte BMP-6 Konzentration höher als durch die UV/Vis-spektroskopische Konzentrationsbestimmung (2.5.3) berechnet wurde. Daher wurde die halbmaximale BMP-6 Konzentration in den nachfolgenden Berechnungen des K_i -Wertes der Literatur (2.3 nM, (Harth, S. 2010)) entnommen.

Anschließend wurde der Effekt des löslichen RGMB Proteins auf das BMP-induzierte ALP-Signal mittels Inhibitionsstudien (siehe 2.16.2) sowohl unter Verwendung von C2C12 (Abbildung 36 E - H) als auch von ATDC5 Zellen (Abbildung 37 F - J) untersucht. Dazu wurden die Zellen mit steigender Konzentration des RGMB-Proteins behandelt, dem Kulturmedium war der jeweilige BMP-Ligand in einer, dem zuvor ermittelten EC_{50} -Wert entsprechenden Konzentration zugesetzt worden. Zur Bestimmung des in diesem Experiment maximal möglichen Antwortsignals wurden Zellen in einem Kontrollansatz mit BMP-Liganden ohne RGMB-Zugabe stimuliert, die Detektion der Hintergrundexpression erfolgte durch Behandlung der Zellen ohne weitere Zugabe von BMP-Wachstumsfaktoren bzw. RGMB-Protein. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Konzentration der Alkalischen Phosphatase durch ein enzymatisches Nachweisverfahren (2.16.2) kolorimetrisch bestimmt. Als Kontrolle der biologischen Aktivität der verwendeten Liganden in dem jeweiligen Versuchsansatz wurden von jedem Liganden EC_{50} Doppelbestimmungen durchgeführt. Dabei fanden die Qualitätskontrollen auf denselben Zellkulturplatten statt, auf denen auch die Experimente zur Konkurrenz durch RGMB angesetzt wurden.

Die Abbildung 36 E - H zeigt, dass die lösliche Form von RGMB die Expression der Alkalischen Phosphatase in C2C12 Zellen und somit die Aktivierung des Signalwegs durch die entsprechenden BMP-Liganden konzentrationsabhängig hemmt. Die jeweilige halbmaximale effektive inhibitorische Konzentration ist in den Abbildungen angegeben. Auch in ATDC5 Zellen zeigt die lösliche Form von RGMB eine dosisabhängige Hemmung der BMP-induzierten Expression der Alkalischen Phosphatase (Abbildung 37 F-J). Allerdings wurde hier im Vergleich mit C2C12-Zellen (Abbildung 36) eine Hemmung erst bei höheren RGMB Konzentrationen beobachtet, für manche TGF- β Faktoren wie BMP-4 konnte im verwendeten Konzentrationsbereich kaum eine Reduktion des induzierten BMP-Signals erzielt werden. Die in ATDC5-Zellen erhaltenen IC_{50} -Werte liegen zudem alle deutlich über denen, welche in C2C12-Zellen ermittelt wurden. Um eine Spezifität zwischen den einzelnen BMP-Faktoren abschätzen zu können, müssen die IC_{50} -Werte aufgrund der unterschiedlichen Konzentration der verwendeten BMPs in besser vergleichbare Inhibitorkonstanten (K_i) umgerechnet werden. Die entsprechenden Inhibitorkonstanten (K_i) wurden aus den experimentell bestimmten EC_{50} -Werten der Liganden sowie den IC_{50} -Konzentrationen unter der Annahme eines kompetitiven Hemm-Mechanismus nach der Cheng-Prusoff-Formel (Cheng, Y.-C. und Prusoff, W.H. 1973) berechnet:

$$\text{Inhibitorkonstante: } K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{EC_{50}}} \quad (7)$$

3. Ergebnisse

Hierbei kennzeichnet die Substratkonzentration [S] die jeweils eingesetzte Menge des entsprechenden BMP-Liganden. Die K_i -Werte erlauben den direkten Vergleich der inhibitorischen Wirkung des löslichen RGMb Proteins auf die Stimulation durch verschiedene BMP-Faktoren auch bei Verwendung unterschiedlicher Zelllinien.

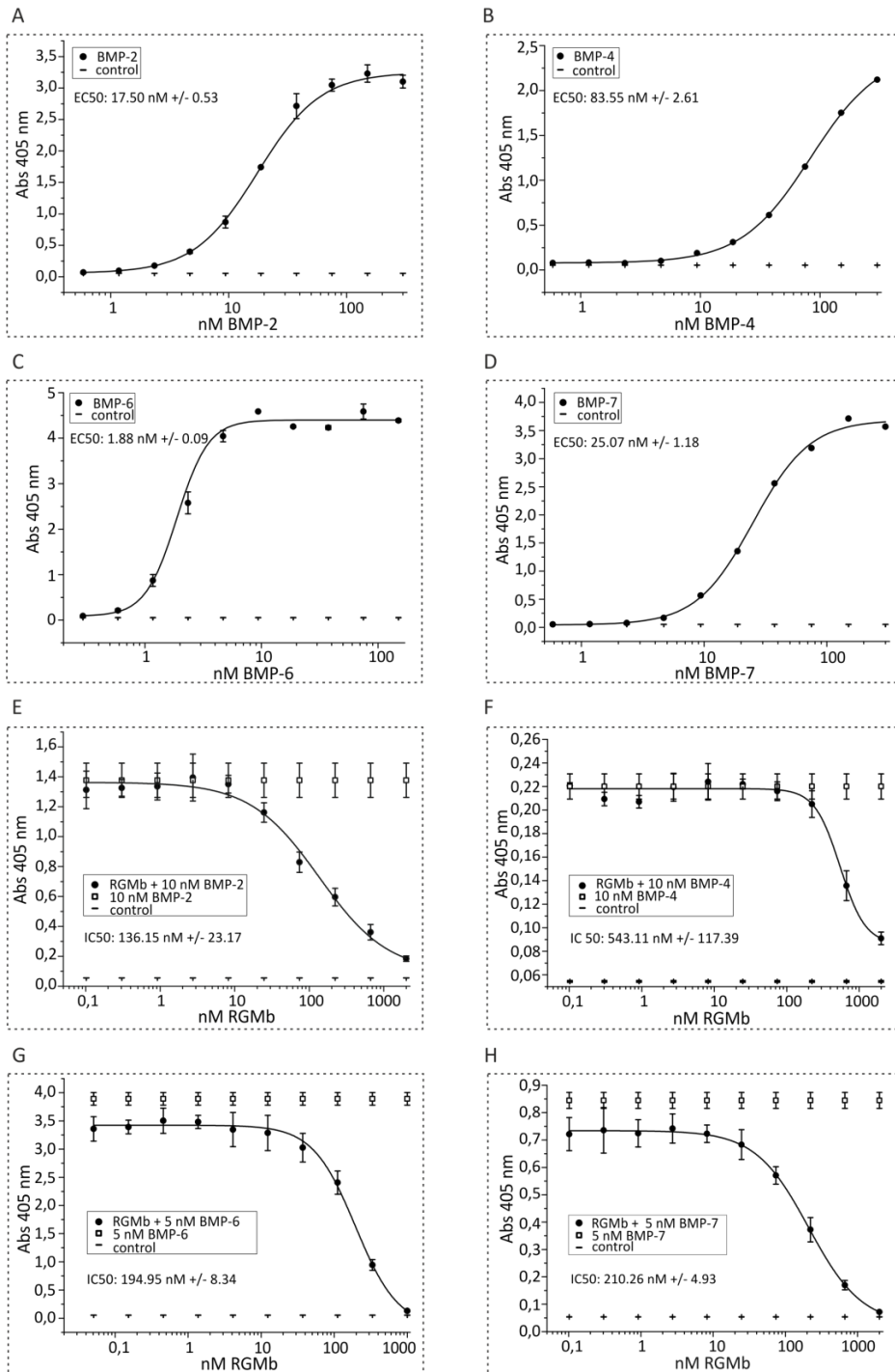


Abbildung 36: BMP-abhängige Expression der Alkalischen Phosphatase in C2C12 Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von löslichem RGMb Protein. A - D) Bestimmung der halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC₅₀) für die TGF- β Liganden BMP-2, BMP-4, BMP-6 und BMP-7. E - F) Dosisabhängige Inhibition (IC₅₀) der BMP-induzierten ALP-Expression in Gegenwart des löslichen RGMb-Proteins. Die IC₅₀ Werte (Konzentration der halbmaximalen Inhibition) sind jeweils angegeben.

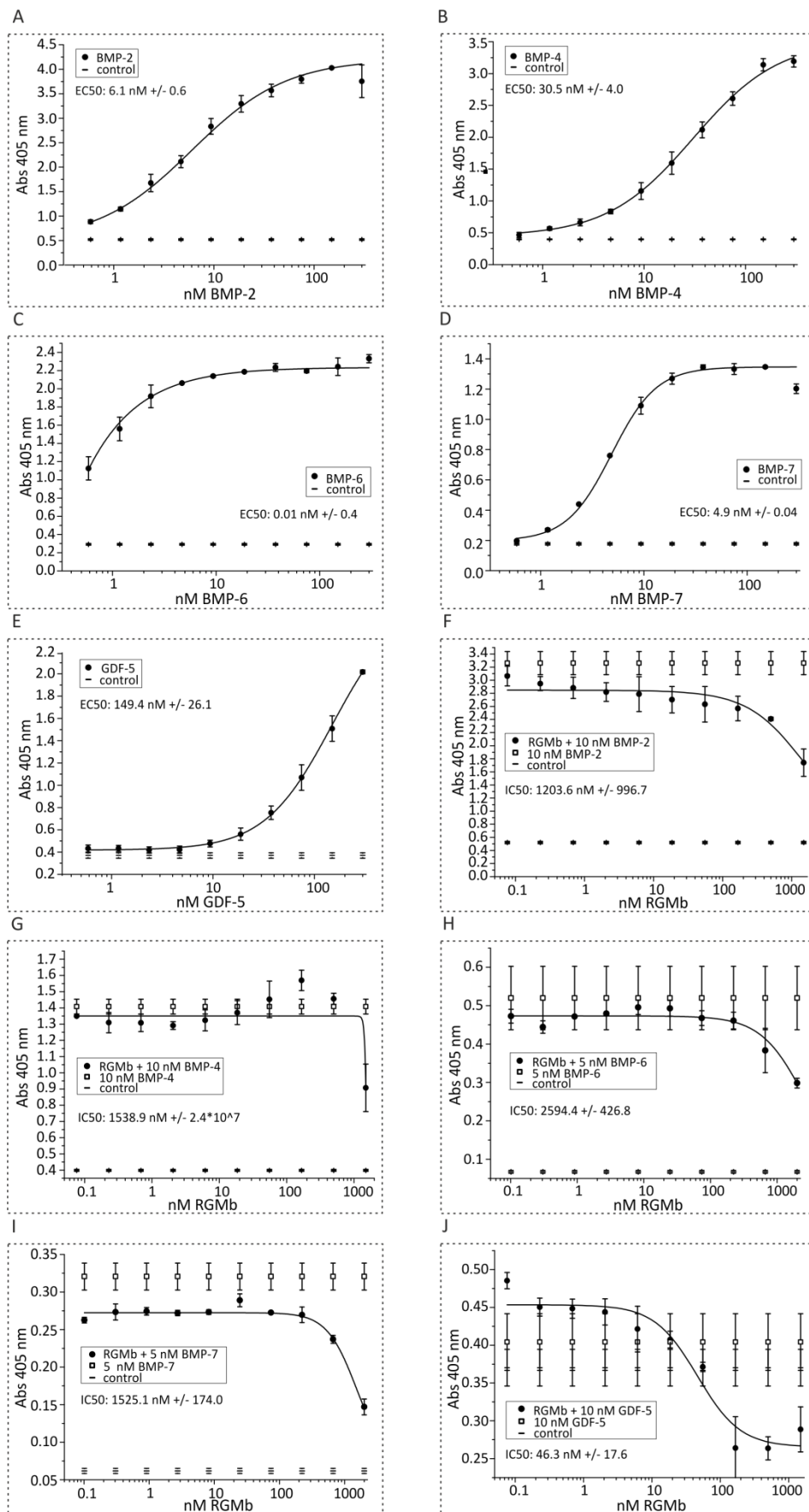


Abbildung 37: BMP-abhängige Expression der Alkalischen Phosphatase in ATDC5 Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von löslichem RGMB Protein. A - E) Bestimmung der halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC₅₀) für die TGF- β Liganden BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 und GDF-5. F - J) Dosisabhängige Inhibition (IC₅₀) der BMP-

3. Ergebnisse

induzierten ALP-Expression in Gegenwart des löslichen RGMB-Proteins. Die IC_{50} Werte (Konzentration der halbmaximalen Inhibition) sind jeweils angegeben.

In der Tabelle 30 sind die K_i -Werte aus den ALP-Kompetitionsstudien unter Verwendung von ATDC5 und C2C12-Zellen zusammengefasst. Der Vergleich der Inhibitorkonstanten verdeutlicht, dass die Hemmung der BMP-abhängigen ALP-Expression in C2C12 Zellen effektiver (d.h. bei niedrigeren RGMB Konzentrationen) als in ATDC5 Zellen verläuft. So wurde das durch BMP-2 und BMP-4 in C2C12-Zellen induzierte Signal durch lösliches RGMB etwa 5- bzw. 2fach stärker gehemmt als in ATDC5 Zellen. Nach unseren Beobachtungen sind die K_i -Werte für RGMB auf die BMP-6 und BMP-7 induzierte ALP-Expression in C2C12-Zellen 15- bzw. 4fach niedriger als in ATDC5 Zellen. Für den TGF- β Liganden GDF-5 konnte ein derartiger Vergleich nicht durchgeführt werden, da GDF-5 in C2C12 Zellen keine Expression der Alkalischen Phosphatase induziert (Nickel, J. et al. 2005).

Tabelle 30: Ermittlung der Inhibitorkonstanten K_i für die Hemmung der BMP-induzierten ALP-Expression in C2C12- und ATDC5 Zellen. Die im Assay vorgelegte Konzentration der BMP-Liganden (Substratkonzentration) ist in Spalte S angegeben. Die halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC_{50}) der BMP-Liganden sind der Abbildung 36 A - D sowie Abbildung 37 A - E entnommen. Der EC_{50} -Wert für BMP-6 bei Verwendung von ATDC5 Zellen wurde aus (Harth, S. 2010) entnommen. Die IC_{50} -Werte sind in Abbildung 36 E - H und Abbildung 37 F - J angegeben.

	C2C12				ATDC5			
	S [nM]	EC₅₀ [nM]	IC₅₀ [nM]	K_i [nM]	S [nM]	EC₅₀ [nM]	IC₅₀ [nM]	K_i [nM]
BMP-2	10	18	136	87	10	6.1	1204	456
BMP-4	10	84	543	485	10	31	1539	1164
BMP-6	5	1.9	195	54	5	2.3	2594	817
BMP-7	5	25	210	175	5	4.9	1525	755
GDF-5	-	-	-	-	20	21	111	57

Die Analyse der Hemmeffizienz bei Verwendung der C2C12 Zellen zeigt, dass BMP-2 und BMP-6 am stärksten durch die lösliche Form von RGMB inhibiert wurden. Für BMP-4 und BMP-7 ergeben sich aus der K_i -Analyse im Vergleich zu BMP-6 9fach bzw. 3.3fach geringere Hemmungen der ALP-Expression. In ATDC5 Zellen wurde GDF-5 am stärksten durch RGMB gehemmt, während die BMP-2, BMP-4, BMP-6 und BMP-7 induzierte ALP-Expression etwa 8fach, 20fach, 14fach bzw. 13fach schwächer im Vergleich zu GDF-5 inhibiert wurde.

Bei der Betrachtung der IC_{50} -Werte unter Verwendung von ATDC5 Zellen ist jedoch zu beachten, dass die Bestimmungen mit Ausnahme der GDF-5 Competition nur mathematischen Berechnungen obliegen, da die Konkurrenzkurven auch bei Zugabe der höchsten RGMB

Konzentration keinen basalen Minimalwert erreicht hatten. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die tatsächlichen halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen weitaus höhere Werte annehmen, woraus auch größere Inhibitorkonstanten resultierten. Daher ist es möglich, dass die Konkurrenz der Wachstumsfaktorsignale durch lösliches RGMB unter Verwendung von ATDC5 Zellen verglichen mit C2C12 Zellen größere Unterschiede als hier dargestellt aufweisen könnten.

Hemmung des SMAD Signalwegs durch die lösliche Form des BMP Corezeptors

BMP-Faktoren induzieren mindestens zwei Signalkaskaden, den p38/MAP-Kinase- sowie den SMAD-abhängigen Signalweg (für Übersichtsartikel siehe (Moustakas, A. et al. 2001; Moustakas, A. und Heldin, C.H. 2005)). Dabei gibt es Hinweise darauf, dass in der Membran vorgeformte Rezeptorkomplexe (*Preformed Complex*, PFC) bestehend aus Typ I und Typ II BMP-Rezeptoren SMAD-Signale transduzieren, während BMP-formierte Signalkomplexe (*BMP Induced Signaling Complex*, BISC) den p38/MAPK-Signalweg aktivieren (Hassel, S. et al. 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die BMP-induzierte Expression der Alkalischen Phosphatase eine permanente Aktivierung des p38/MAPK- und auch des SMAD-Signalweges benötigt (Heinecke, K. et al. 2009). Die ALP-Expression wird jedoch durch diese beiden Signalkaskaden wahrscheinlich nicht direkt aktiviert, hingegen zeichnet hierfür eine BMP-induzierte autokrine Regulation des Wnt-Signalweges verantwortlich (Rawadi, G. et al. 2003).

Um daher auch den direkten Einfluss des löslichen RGMB-Proteins auf die SMAD-Signalkaskade analysieren zu können, wurde zusätzlich zu den ALP-Nachweisen ein Verfahren basierend auf einem BMP-responsiven SMAD-1/5/8-Reportergen-System in der Zelllinie C3H10T1/2-BRE-Luc etabliert (2.16.3). Die Zellen wurden zunächst zur Bestimmung der jeweiligen halbmaximalen effektiven Ligandenkonzentration (EC_{50}) mit steigenden Konzentrationen der verschiedenen BMP-Liganden behandelt. Nach einer Inkubation für 72 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Konzentration der BMP-abhängig exprimierten Luciferase mittels Luminometer bestimmt. Die Abbildung 38 zeigt die Auswertung mit den entsprechenden EC_{50} -Werten für die Liganden BMP-2 (A) sowie GDF-5 (B).

Mit Hilfe von Inhibitionsexperimenten wurde die Wirkung von löslichem RGMB auf den BMP-induzierten SMAD-Signalweg analysiert. Zur Messung des RGMB Einflusses wurden die Zellen mit 10 nM Ligand stimuliert und RGMB in steigenden Konzentrationen zugegeben. Als Positivkontrolle und zur Bestimmung des maximalen SMAD-Signals wurden Zellen ausschließlich mit Ligand ohne RGMB-Zugabe stimuliert, die Hintergrundaktivität wurde durch Auswertung der SMAD-Aktivität ohne BMP- bzw. RGMB-Stimulation analysiert. Nach einer Inkubation für 72 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Menge der in Abhängigkeit der BMP-Aktivität

3. Ergebnisse

exprimierten Luciferase mittels Luminometer bestimmt. Die Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse eines derartigen Hemmexperiments unter Verwendung von BMP-2 (B) und GDF-5 (D). Die lösliche Form von RGMB konnte in beiden Fällen die BMP-induzierte SMAD-Signaltransduktion dosisabhängig inhibieren. Die halbmaximale effektive Inhibitionskonzentration für RGMB liegt in C3H10T1/2 Zellen zwischen 40 und 50 nM für BMP-2 bzw. GDF-5 als Stimulanz. Neben der Inhibition der SMAD-Aktivierung durch die exogen zugegebenen BMP-Faktoren zeigt die alleinige Zugabe von löslichem RGMB Protein auch eine dosisabhängige Reduktion der Basalaktivität. Dieses weist darauf hin, dass in den Zellen endogen exprimierte TGF- β Faktoren in ihrer Aktivität ebenfalls durch das exogen zugeführte RGMB neutralisiert werden (Δ -Kurve in Abbildung 38 B und D). Die zugehörigen IC₅₀-Werte (die jeweils unteren Werte in den Grafiken) sind in den Abbildungen angegeben.

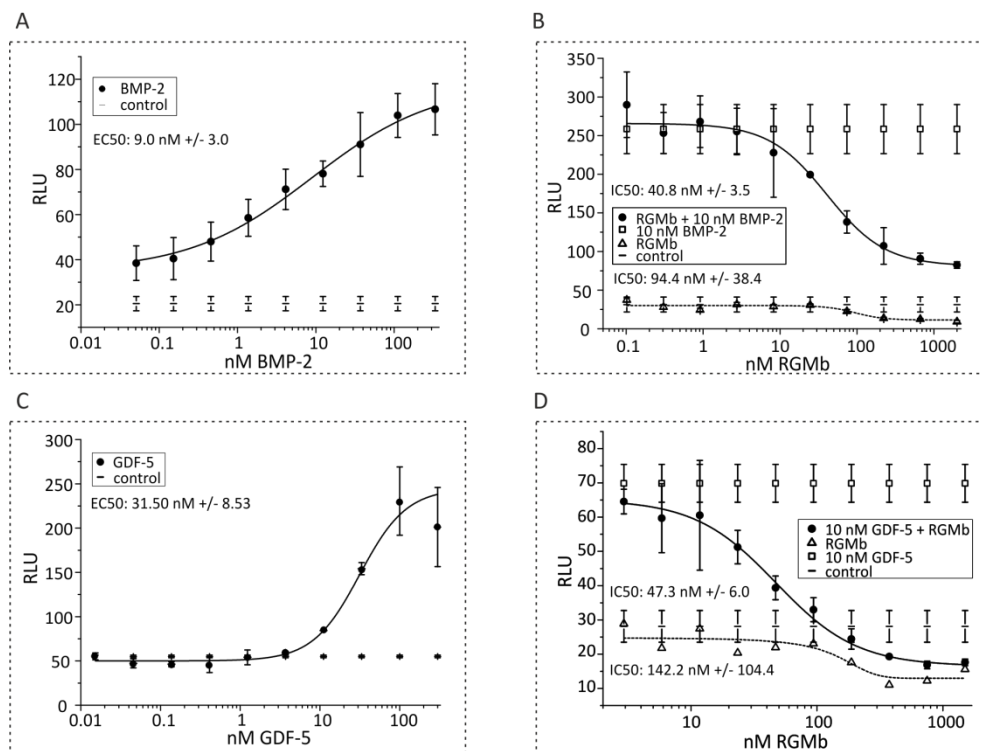


Abbildung 38: Lösliches RGMB inhibiert den BMP-induzierten SMAD-Signalweg in C3H10T1/2 Zellen. Zur Bestimmung der halbmaximalen effektiven Ligandenkonzentration (EC₅₀) wurde zunächst die dosisabhängige Expression des Luciferase Reportergens mittels des BMP/SMAD-1/5/8-spezifischen Reportergenkonstrukts BRE-Luc in C3H10T1/2 Zellen analysiert. A) Messung der EC₅₀-Werte für BMP-2, bzw. C) für GDF-5. Aufgrund der niedrigen Löslichkeit beider TGF- β Faktoren im Kulturmedium konnten keine Ligandenkonzentrationen oberhalb 300 nM eingesetzt werden. Für die Messung der Inhibition der SMAD-Aktivierung wurden die Expression des Luciferase Reportergens mit 10 nM BMP-2 bzw. GDF-5 induziert und die Aktivierung durch steigende Konzentrationen von löslichem RGMB gehemmt. B) Repräsentative Messung der RGMB Hemmung des BMP-2 induzierten SMAD Signalwegs, D) analog zu B) aber unter Verwendung von GDF-5 als Stimulanz. Die inhibitorischen Konzentrationen sind jeweils angegeben. Die oberen IC₅₀-Werte kennzeichnen die Hemmung der exogen zugegebenen Liganden, während die jeweils unteren die Inhibition endogen exprimierter Faktoren beschreiben.

Um einen von den eingesetzten Konzentrationen der Wachstumsfaktoren unabhängigen Vergleich der inhibitorischen Eigenschaften von RGMb zu ermöglichen, wurden die Inhibitorkonstanten nach Formel (7) bestimmt und die Werte in Tabelle 31 zusammengefasst. Im Gegensatz zu den stark unterschiedlichen Inhibitorkonstanten für die durch BMP-2 und GDF-5 induzierte ALP-Expression in ATDC5 Zellen (siehe Abbildung 37 und Tabelle 30) sind die Inhibitorkonstanten für die Hemmung der SMAD-Aktivierung durch beide Faktoren im Rahmen der Messgenauigkeit sehr ähnlich. In den hier präsentierten Daten wurde jedoch zum einen ein einzelner Signalweg adressiert und zum anderen fand auch eine andere Zelllinie verglichen mit den Studien der ALP-Expression Verwendung. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Unterschiede in der inhibitorischen Wirkung von RGMb durch die verschiedenen Zelllinien hervorgerufen werden oder ob diese Signalweg-spezifisch sind. Um dieses zukünftig zu untersuchen, könnten Inhibitionsstudien mit löslichem RGMb-Protein basierend auf der Expression der Alkalischen Phosphatase in C3H10T1/2 Zellen durchgeführt werden. Weiterhin könnten auch Reportergen-Nachweisverfahren unter Verwendung des BMP-spezifischen BRE-Luc Konstruktes in ATDC5 bzw. in C2C12 Zelllinien etabliert werden.

Tabelle 31: Inhibitorkonstanten K_i für die Hemmung der SMAD Signalaktivität in C3H10T1/2 Zellen. Die eingesetzten Konzentrationen für BMP-2 bzw. GDF-5 (Substratkonzentrationen) zur Stimulation der SMAD-Signalkaskade sind in Spalte S angegeben. Die halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC_{50}) der beiden BMP-Liganden sind aus Abbildung 38 A & C entnommen, während die IC_{50} -Werte in Abbildung 38 B & D angegeben sind.

	<i>C3H10T1/2-BRE-Luc</i>			
	S [nM]	EC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	K_i [nM]
BMP-2	10	9.0	42	20
GDF-5	10	32	47	36

Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten zellbasierten Nachweisverfahren, dass das lösliche rekombinante RGMb Protein konzentrationsabhängig sowohl die BMP-induzierte ALP-Expression als auch die SMAD-Antwort hemmen kann. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen aktuellen Studien, welche ebenfalls inhibierende Eigenschaften der löslichen RGM-Proteine auf den BMP-Signalweg nachweisen konnten. So hemmen rekombinant hergestellte RGMb- und RGMc-FC Fusionsproteine die BMP-induzierte Expression von Heparin in vitro und lösliches RGMc kompetitiert die BMP-2 bzw. BMP-6 induzierte SMAD-Signaltransduktion (Nili, M. et al. 2010). Transfektionen eines RGMb-Konstrukt ohne die GPI-Ankerdomäne zeigten ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Expression der Alkalischen Phosphatase und somit den BMP-Signalweg (Kanomata, K. et al. 2009). Die hier

gezeigten Daten erweitern die inhibitorische Wirkung von löslichem RGMb zudem auf BMP-4, BMP-7 und GDF-5 induzierte Signale.

3.3.2. EINFLUSS DER GLYKOSYLIERUNG AUF DIE AKTIVITÄT VON RGMb

Vergleichende in vitro Interaktionsanalyse für N-glykosyliertes sowie partiell deglykosyliertes RGMb

Bei den RGM Corezeptoren handelt es sich um Glykoproteine, deren N-Glykosylierungsstellen in allen drei Isoformen partiell konserviert sind (siehe dazu Abbildung 11). Humanes RGMb verfügt demnach über zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, wobei sich eine nahe des N-Terminus und die zweite im C-terminalen Bereich nach der säurelabilen Proteolysestelle befindet (siehe Abbildung 13). Diese Konsensussequenzen für die posttranslationale Modifikation mit Glykanketten sind auch in hRGMa sowie in hRGMc konserviert, im Gegensatz zu RGMb verfügen diese RGM-Familienmitglieder jedoch noch über eine dritte nur in diesen Mitgliedern konservierte N-Glykosylierungssequenz (siehe dazu Abbildung 11).

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass aus Insektenzellkultur gewonnenes rekombinantes RGMb Protein glykosyliert vorliegt. Dabei deutete ein Nachweis mittels Perjodsäure-Schiff-Färbung darauf hin, dass beide potentielle Prozessierungsstellen mit Glykanketten prozessiert sind (siehe Abbildung 16), während massenspektrometrische Analysen hingegen auf eine Modifikation durch nur eine Glykankette hinwiesen (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30). Durch die Expression in Anwesenheit des α -Mannosidase I-Inhibitors Kifunensin konnte das Anfügen EndoH-sensitiver Glykosylierungen erreicht werden, wodurch partiell deglykosyliertes rekombinantes RGMb Protein gewonnen werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.2). Die massenspektrometrischen Analysen weisen darauf hin, dass RGMb im Anschluss an die enzymatische Deglykosylierung über ein N-Acetylglucosamin mit zwei Fucoseresten verfügt (Abschnitt 3.1.2).

In vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte sowohl für Ligand-Rezeptor (Saremba, S. et al. 2008) als auch für Modulatorprotein-Ligand Interaktionen (Billington, C.J., Jr. et al. 2011) gezeigt werden, dass der Glykosylierungsstatus die Spezifität bzw. Affinität nachhaltig beeinflussen kann und für die korrekte Funktion und Erkennung des BMP-Interaktionspartners möglicherweise von großer Bedeutung ist. Daher wurde auch für RGMb die Bedeutung der N-Glykosylierung für die Interaktion des Corezeptors mit BMP-Liganden mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (2.11) analysiert. Dazu wurde das rekombinant in Insektenzellkultur hergestellte RGMb-Protein (2.4.6) zunächst mittels der Glykosidase EndoH partiell deglykosyliert (2.13) und via Umkehrphase-HPLC (2.9.3) gereinigt. Zur Messung der Bindungsaffinitäten

zwischen RGMB und verschiedenen BMP-Liganden wurden BMP-2, -4, -7 sowie GDF-5 durch Kopplung primärer Aminogruppen (2.11) kovalent auf der Sensoroberfläche in einer Dichte von 500 RU (BMP-2 200 RU) immobilisiert. Die Bindungseigenschaften der Liganden wurden durch Messung der Interaktion mit dem Typ I Rezeptor BMPR-IA überprüft. Anschließend wurden nacheinander vergleichend identische Konzentrationen des nativen (RGMB_{wt}) bzw. des EndoH Glykosidase behandelten RGMB Proteins (RGMB_{EndoH}) über den Biosensor perfundiert. Unspezifische Interaktionen von RGMB mit der Sensormatrix wurden durch Subtraktion der Interaktion mit einem unbeschichteten Leerkanal korrigiert. Die Sensogramme wurden mit der ProteON Manager Software (Version 2.1.2.05) ausgewertet. Eine Regressionsanalyse der Kurven konnte aufgrund des biphasischen Kurvenverlaufs (siehe dazu auch 3.2.2) nur unter Einbeziehung eines komplexen Modells für heterogene Liganden erfolgen. Für einen direkten Vergleich der Messungen, wurden die SPR-Signale hinsichtlich ihrer Amplitude normiert. Eine Normierung der Signale war notwendig, da sich die jeweils maximalen SPR-Signale der Interaktionen von RGMB_{wt} und RGMB_{EndoH} mit den BMP-Faktoren trotz der Verwendung gleicher Konzentrationen etwas voneinander unterschieden. Die Konzentrationen der Analyten wurden vor Akquisition der Oberflächen-Plasmonresonanzdaten mittels UV/Vis-Spektroskopie (2.5.3) bestimmt.

Abbildung 39 zeigt die Ergebnisse dieses Vergleichs. Die Wechselwirkung von partiell deglykosyliertem RGMB_{EndoH} mit BMP-2 (A) bzw. BMP-4 (B) zeigt im Vergleich mit RGMB_{wt} deutliche Unterschiede in Bezug auf die Bindungskinetik. Während die Kinetik für die Bindung des unbehandelten Corezeptorproteins durch BMP-2/-4 einen deutlich biphasischen Kurvenverlauf zeigt, ist im Falle des EndoH behandelten RGMB Proteins der biphasische Verlauf erheblich schwächer ausgeprägt. Die Assoziationsgeschwindigkeit ist für das partiell deglykosylierte RGMB Protein geringer. Noch deutlicher wird der Effekt für die Dissoziationsphase, in der die Dissoziation von EndoH-behandeltem RGMB von BMP-2 und BMP-4 ebenfalls deutlich langsamer erfolgt und in ihrem Verlauf wie erwartet einer Reaktion nullter Ordnung ähnelt. Diese sichtbaren Unterschiede im Kurvenverlauf spiegeln sich auch in den Berechnungen der kinetischen Ratenkonstanten k_a und k_d wider. Die Erniedrigung beider kinetischen Parameter führt schließlich zu unterschiedlichen Beeinflussungen hinsichtlich der Bindungsaffinitäten von unhandeltem und partiell deglykosyliertem RGMB (Tabelle 32). Während die Wechselwirkung mit BMP-2 bzw. BMP-4 klar durch den N-Glykosylierungsstatus von RGMB beeinflusst wird, trifft dies auf die Interaktion von RGMB mit BMP-7 und GDF-5 nicht in dem Maße zu. So zeigt die Wechselwirkung von nativem RGMB_{wt} und RGMB_{EndoH} mit BMP-7 (Abbildung 39 C) bezüglich der Assoziationsgeschwindigkeit kaum Unterschiede, dagegen

3. Ergebnisse

verläuft die Dissoziation des $\text{RGMb}_{\text{EndoH}}$ /BMP-7 Komplexes im Vergleich mit vollständig N-glykosyliertem RGMb langsamer.

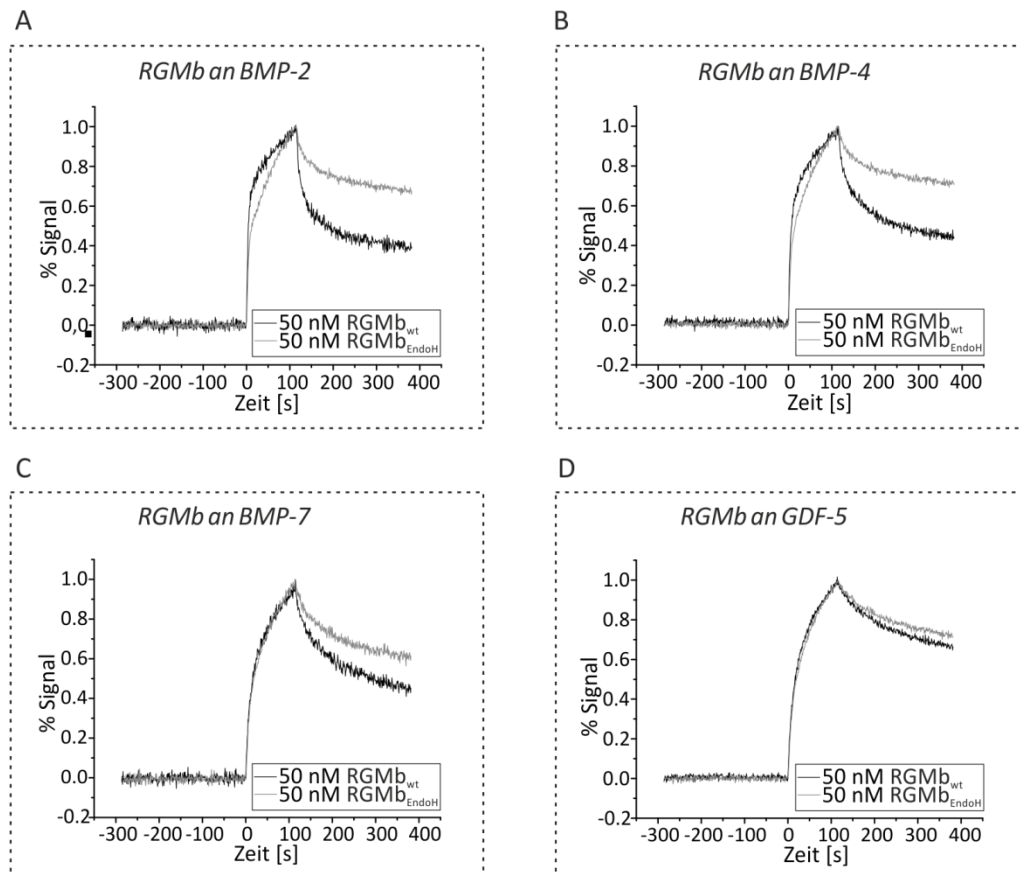


Abbildung 39: SPR-Analyse für die Interaktion von RGMb_{wt} bzw. mit Endoglykosidase behandeltem $\text{RGMb}_{\text{EndoH}}$ mit verschiedenen BMP-Faktoren. Die Konzentrationen der Analyten RGMb_{wt} bzw. $\text{RGMb}_{\text{EndoH}}$ sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen angegeben. Für eine Überlagerung der Sensogramme wurden die Amplituden der SPR-Signale für jede Interaktion normiert.

Tabelle 32: Bindungskinetiken der Interaktionen von RGMb_{wt} bzw. $\text{RGMb}_{\text{EndoH}}$ mit verschiedenen BMP- und GDF-Faktoren.

RGMb_{wt}	$k_a \times 10^6 \text{ [M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{]}$	$k_d \times 10^{-3} \text{ [s}^{-1}\text{]}$	$K_{\text{D(kin)}} \text{ [nM]}$
BMP-2	2.6 +/- 2.5	2.1 +/- 0.7	1.2 +/- 0.5
BMP-4	1.6 +/- 1.3	1.6 +/- 0.3	1.4 +/- 0.5
BMP-7	1.1 +/- 0.7	1.5 +/- 0.1	2.0 +/- 1.0
GDF-5	0.9 +/- 0.4	0.6 +/- 0.1	0.8 +/- 0.4
$\text{RGMb}_{\text{EndoH}}$	$k_a \times 10^6 \text{ [M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{]}$	$k_d \times 10^{-3} \text{ [s}^{-1}\text{]}$	$K_{\text{D(kin)}} \text{ [nM]}$
BMP-2	0.9 +/- 0.3	0.5 +/- 0.2	0.6 +/- 0.3
BMP-4	1.0 +/- 0.4	0.2 +/- 0.1	0.2 +/- 0.1
BMP-7	0.8 +/- 0.3	1.0 +/- 0.2	1.4 +/- 0.5
GDF-5	0.9 +/- 0.4	0.4 +/- 0.1	0.6 +/- 0.4

Dies wird durch die Auswertung der Sensogramme zur Berechnung der kinetischen Konstanten bestätigt (Tabelle 32). Die stärkste Veränderung ist hier in der Interaktion zwischen RGMB und BMP-4 zu verzeichnen: Hier ergibt sich aus den veränderten kinetischen Parametern eine deutliche, siebenfache Erniedrigung der Dissoziationsbindungskonstanten bei Verwendung der partiell deglykosylierten RGMB-Variante (RGMB_{EndoH}). Hingegen weisen die Bindungen von RGMB_{EndoH} an BMP-2 und BMP-7 trotz der unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften verglichen mit RGMB_{wt} keine prägnanten Unterschiede in den ermittelten Bindungsaffinitäten auf. Die Interaktion von RGMB und GDF-5 scheint hingegen völlig unabhängig vom Glykosylierungsstatus des Corezeptors zu sein (Abbildung 39, Tabelle 32). Die hier repräsentierten Ergebnisse basierend auf einer *in vitro* SPR-Analyse zeigen, dass der Glykosylierungsstatus von RGMB die Interaktion mit TGF- β Faktoren BMP-spezifisch beeinflusst, ähnlich wie dies für die BMP-6 Typ I Rezeptorinteraktion beobachtet wurde (Saremba, S. et al. 2008). Auch dort war die Bindung nur eines von drei Typ I Rezeptoren von der N-Glykosylierung des BMP-6 Liganden beeinflusst. Somit könnte sich das BMP-Spezifitätsprofil von RGMB durch gewebespezifische Modifikation der N-Glykosylierung ändern. Auf molekularer Ebene kann der Faktor-spezifische Einfluss der Glykosylierung durch die mögliche Verwendung verschiedener Epitope oder unterschiedlicher Hauptbindeterminanten innerhalb eines überlappenden Bindeepitops erklärt werden.

Zellbasierte Analyse des Einflusses des Glykosylierungszustandes von RGMB auf dessen BMP-2 inhibierende Eigenschaften

In den Oberflächen-Plasmonresonanzstudien der Interaktionen von glykosyliertem sowie partiell deglykosyliertem RGMB mit immobilisierten BMP- und GDF-Wachstumsfaktoren zeigte sich, dass die Glykosylierung einen Einfluss auf die Bindungskinetiken der RGMB/BMP-2 Wechselwirkung zu haben scheint (siehe Abbildung 39 A, Tabelle 32). Die Bestimmung der Dissoziationsbindungskonstanten verdeutlichte hingegen, dass die Affinität dieser Interaktion trotz der veränderten kinetischen Parameter nahezu unverändert bleibt. Als Konsequenz dieser Ergebnisse sollte eine Hemmung BMP-2 induzierter Signale in zellbasierten Nachweisverfahren durch lösliches RGMB Protein unbeeinflusst von dessen Glykosylierungszustand sein.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden daher die biologischen Aktivitäten von glykosyliertem RGMB (RGMB_{wt}) sowie partiell deglykosyliertem Corezeptor (RGMB_{EndoH}) vergleichend in einem zellbasierenden ALP-Nachweisverfahren (2.16.2) mit C2C12-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des RGMB-Proteins behandelt, dem Kulturmedium war der BMP-2 Ligand in einer Konzentration entsprechend dem zuvor ermittelten EC₅₀-Wert zugesetzt worden. Zur Bestimmung der in diesem Experiment

3. Ergebnisse

maximal möglichen Stimulation wurden Zellen in einem Kontrollansatz mit BMP-2 ohne RGMB-Zugabe stimuliert, die Detektion der Hintergrundexpression erfolgte durch Behandlung der Zellen in Abwesenheit des BMP-Wachstumsfaktors sowie RGMB. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Konzentration der exprimierten Alkalischen Phosphatase durch ein enzymatisches Nachweisverfahren (2.16.2) kolorimetrisch bestimmt.

Die Abbildung 40 zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieses Nachweisverfahrens unter Verwendung von C2C12 Zellen. Sowohl glykosyliertes, als auch deglykosyliertes RGMB konnten dosisabhängig die BMP-induzierte ALP-Expression hemmen. Die halbmaximalen inhibitorischen RGMB-Konzentrationen (IC_{50}) sind jeweils in den Grafiken angegeben. Für einen von den eingesetzten Substratkonzentrationen unabhängigen Vergleich der inhibitorischen Corezeptor-Wirkung wurden die Inhibitorkonstanten (K_i) bestimmt (siehe Formel 7, Kapitel 3.3.1) und in Tabelle 33 zusammengefasst.

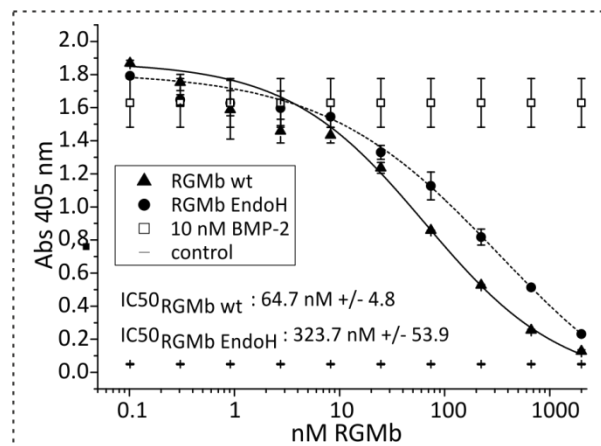


Abbildung 40: Untersuchung des Einflusses des RGMB-Glykosylierungszustands auf die Inhibition der BMP-2 induzierten Expression der Alkalischen Phosphatase in C2C12 Zellen. Dosisabhängige Hemmung der BMP-induzierten ALP-Expressionen in Gegenwart des löslichen $RGMB_{wt}$ - bzw. $RGMB_{EndoH}$ -Proteins. Die Konzentrationen der halbmaximalen Inhibition (IC_{50} Werte) sind jeweils angegeben.

Entgegen der anfänglich aufgestellten Hypothese basierend auf den vorigen SPR-Ergebnissen, nach welcher der RGMB-Glykosylierungszustand keinen Einfluss auf die Inhibition des BMP-2 Signals haben sollte, weist $RGMB_{EndoH}$ in diesem zellbasierten Nachweisverfahren jedoch 5fach höhere IC_{50} - sowie auch K_i -Werte verglichen mit $RGMB_{wt}$ auf (siehe Abbildung 40, Tabelle 33). Für dieses aufgrund der unveränderten Ligandenaffinität zunächst unerwartete Ergebnis könnte möglicherweise eine verringerte Stabilität des partiell deglykosylierten RGMB-Proteins gegenüber glykosyliertem RGMB verantwortlich zeichnen. So konnte eine Vielzahl an Studien zeigen, dass die Resistenz rekombinanter Proteine gegenüber einer proteolytischen Degradation in Anwesenheit von Glykosylierungen entscheidend verbessert wird (siehe beispielsweise:

(Nakagawa, H. et al. 2009; Russell, D. et al. 2009; Zheng, K. et al. 2011); für Übersichtsartikel: (Russell, D. et al. 2009; Sola, R.J. und Griebenow, K. 2009)).

Tabelle 33: Ermittlung der Inhibitorkonstante K_i . Die eingesetzte (konstante) BMP-2 Konzentration (Substratkonzentrationen) ist in Spalte S gekennzeichnet. Die halbmaximale effektive BMP-2 Konzentration (EC_{50}) entstammt dem Ergebnis der in Abbildung 36 A gezeigten Messung. Die IC_{50} -Konzentrationen sind in Abbildung 40 präsentiert.

	C2C12			
	S [nM]	EC₅₀ [nM]	IC₅₀ [nM]	K_i [nM]
RGMb_{wt}	10	18	65	42
RGMb_{EndoH}	10	18	324	208

So könnte eine verstärkte Proteolyse die Konzentration des partiell deglykosylierten RGMb Proteins in Lösung über den relativ langen Zeitraum des Experiments erniedrigen, wodurch eine höhere Ausgangsmenge des Corezeptors für den entsprechenden Hemmeffekt benötigt würde. Um die Stabilität des RGMb-Proteins in Abhängigkeit des Glykosylierungszustandes in zukünftigen Arbeiten zu untersuchen, könnten die Konsensussequenzen für die posttranslationale Anheftung von N-Glykosylierungen durch gerichtete Mutagenese entfernt werden. Anschließend könnte das rekombinant hergestellte RGMb-Protein in zellbasierten und biophysikalischen Studien auf dessen Stabilität überprüft werden.

3.3.3. UNTERSCHIEDE IN DER WIRKUNG VON MEMBRANSTÄNDIGEM UND LÖSLICHEM RGMb AUF DEN BMP-SIGNALWEG

Die RGM Proteine verfügen über eine konservierte C-terminale Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Domäne mit der sie in der Plasmamembran verankert werden können (siehe dazu auch Abbildung 11). Endogen vorhandene Phospholipasen oder auch spezifische Pro-Protein Konvertasen könnten diese Corezeptoren von der Membranverankerung lösen, wodurch sowohl membranständige, als auch lösliche Varianten generiert werden könnten. Die posttranslationale Prozessierung aller RGM-Familienmitglieder konnte bisher bereits in vitro gezeigt werden (Brinks, H. et al. 2004; Kuninger, D. et al. 2006; Abarca-Buis, R.F. et al. 2011; Tassew, N.G. et al. 2012). Für lösliches RGMc gibt es darüber hinaus bereits erste Studien, die die Existenz dieser Variante in humanen Seren nachweisen und in vivo eine funktionelle Relevanz dieses Faktors im Eisenmetabolismus aufzeigen konnten (Brasse-Lagnel, C. et al. 2010; Finkenstedt, A. et al. 2012; Rumjon, A. et al. 2012; Shalev, H. et al. 2013). Während Literaturdaten auf eine inhibitorische Wirkung der löslichen RGM-Familienmitglieder auf den BMP-Signalweg hinweisen, werden die membrangebundenen Varianten mehrheitlich mit einem aktivierenden Mechanismus auf diese Signalkaskade in Verbindung gebracht (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L.

et al. 2006; Xia, Y. et al. 2008). Hingegen konnte die Arbeitsgruppe um K. Kanomata (2009) hemmende Eigenschaften sowohl der löslichen, als auch der membrangebundenen RGMb Variante in einer zellbasierten Studie unter Verwendung von C2C12 Zellen aufzeigen.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine inhibierende Wirkung des löslichen rekombinanten RGMb Proteins in unterschiedlichen zellbasierten Nachweisverfahren unter Verwendung verschiedener BMP-responsiver Zelllinien nachgewiesen und vorausgehende Publikationen somit bestätigt werden (siehe 3.3.1). Aufgrund der kontroversen Literaturdaten hinsichtlich der Wirkung von membranverankertem RGMb wurden eigene Experimente durchgeführt, in denen die Wirkung der GPI-verankerten RGMb-Variante auf die BMP-induzierte Signalaktivierung in Zellen untersucht wurde.

Die Struktur eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers ist schematisch in Abbildung 41 B dargestellt. Die Biosynthese dieser posttranslationalen Modifikation verläuft in einem mehrstufigen Prozess im Endoplasmatischen Retikulum (ER), wobei Phosphatidylinositol schrittweise durch Anfügen von Zuckern, Fettsäureketten sowie Ethanolaminphosphat modifiziert wird (siehe Abbildung 41 B, für eine Übersicht: (Fujita, M. und Kinoshita, T. 2010; Maeda, Y. und Kinoshita, T. 2011; Fujita, M. und Kinoshita, T. 2012)). Der anschließende Transfer einer GPI-Vorläuferstruktur auf ein entsprechendes Protein wird über die GPI-Transamidase vermittelt. Das Enzym erkennt und entfernt die GPI-Erkennungssequenz des Proteins und koppelt anschließend den GPI-Anker mittels einer Amidbindung an den prozessierten C-Terminus (für Übersichtsartikel siehe: (Fujita, M. und Kinoshita, T. 2010; Maeda, Y. und Kinoshita, T. 2011; Fujita, M. und Kinoshita, T. 2012)). Die GPI-Erkennungssequenz zeichnet sich eher durch eine spezifische Anordnung struktureller Eigenschaften als durch eine definierte Aminosäurekonsensussequenz aus. Der GPI-Anker wird zudem vorwiegend an die Aminosäuren Gly, Ala, Ser, Asn, Asp oder Cys geknüpft (diese Position wird mit ω bezeichnet). Der GPI-Rest ist in RGMb an einen am prozessierten C-Terminus vorkommenden Asparaginrest lokalisiert (orange gekennzeichnet in Abbildung 41 C). Weiterhin sollte die Position $\omega + 2$ durch eine Aminosäure mit einer kleinen Seitenkette besetzt sein und sich ab der Position $\omega + 3$ ein Abfolge bestehend aus sechs bis zehn Aminosäuren mit hydrophilen Seitenketten anschließen (in Abbildung 41 C lila gekennzeichnet). Die GPI-Erkennungssequenz wird durch eine Abfolge von zehn bis zwanzig Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten am C-Terminus vervollständigt (in Abbildung 41 C rot gekennzeichnet; für Übersichtsartikel: (Fujita, M. und Kinoshita, T. 2010; Maeda, Y. und Kinoshita, T. 2011; Fujita, M. und Kinoshita, T. 2012)). Die GPI-Domäne des so modifizierten Proteins wird im ER sowie im Golgi-Apparat abschließend prozessiert und das GPI-gekoppelte Protein schließlich in der Plasmamembran verankert.

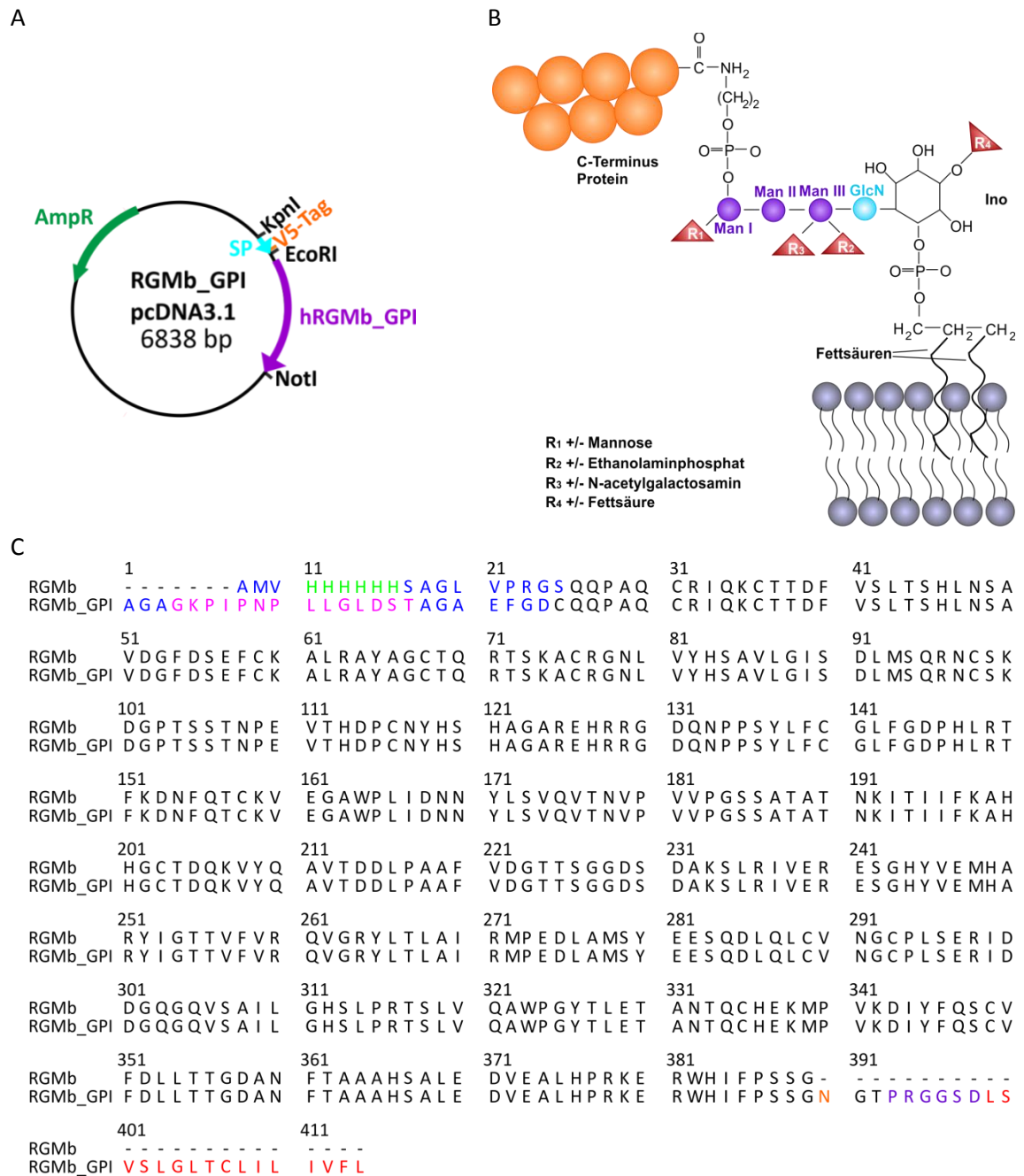


Abbildung 41: A) Schema des Expressionskonstruktes pcDNA3.1_RGMb_GPI. B) Schematische Darstellung der Grundstruktur einer Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankerdomäne. Das Phosphatidylinositol wird in einem mehrstufigen Prozess mit einem N-Glucosamin (GlcN) sowie drei Mannoseresten (Man I-III) verknüpft. Man I wird an ein Ethanolaminphosphat gekoppelt, welches über eine Amidbindung mit dem C-Terminus des posttranslational modifizierten Proteins verbunden ist. Diese Grundstruktur kann durch zusätzliche Reste (R1-R4) modifiziert werden. C) Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen nach Abspaltung der Signalpeptide des löslichen rekombinanten (RGMb) sowie des membranverankerten Corezeptor-Proteins (RGMb_GPI). Die Sequenzanalyse erfolgte mittels Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Blau markierte Aminosäuresequenzen entstammen dem pcDNA3.1-Vektorrückgrat, grün- bzw. magenta-gekennzeichnete Aminosäuren markieren die Histidin- sowie die V5-Peptid-Markersequenzen. Die GPI-Anker-Domäne wird an die orange hervorgehobene Asparagin-Seitenkette geknüpft. Lila bzw. rot gekennzeichnete Aminosäuren repräsentieren die GPI-Erkennungssequenz (Details siehe Haupttext).

Zudem wurde vorgeschlagen, dass die GPI-Ankerdomänen den selektiven intrazellulären Transport der assoziierten Proteine vom ER über das Golgi-Netzwerk bis zur Plasmamembran sowie auch deren spezifische Endozytose regulieren (für eine Übersicht: (Fujita, M. und Kinoshita, T. 2010; Maeda, Y. und Kinoshita, T. 2011; Fujita, M. und Kinoshita, T. 2012)). Diese Sortierungsmechanismen scheinen darüber hinaus mit der Assoziation der GPI-verankerten Proteine mit Membranmikrodomänen, den sogenannten *Lipid Raft*-Domänen, zu korrelieren (für Übersichtsartikel: (Fujita, M. und Kinoshita, T. 2010; Maeda, Y. und Kinoshita, T. 2011; Fujita, M. und Kinoshita, T. 2012)). Einige Studien deuten darauf hin, dass die Membranlokalisierung der Ligand/Rezeptor-Komplexe auch innerhalb des BMP-Signalweges Auswirkungen auf die induzierten Signalkaskaden hat (Nohe, A. et al. 2002; Hartung, A. et al. 2006). Eine Aufklärung der Lokalisierung der RGM-Proteine in spezialisierten Membrandomänen sowie ihres Endozytoseweges könnte somit interessante neue Erkenntnisse der spezifischen Interaktionen der Corezeptoren mit dem BMP-Signalweg liefern. Diese Zusammenhänge werden in Kapitel 3.4.1 detailliert dargelegt.

Zunächst wurde die Wirkung des membranverankerten RGMb-Corezeptors auf den BMP-Signalweg untersucht. Dazu wurde ein cDNA-Konstrukt für die transiente Expression in Säugerzellen kloniert. Nach der DNA-Sequenz für den Promoter wurde eine für die Initiation der Proteintranslation wichtige Kozaksequenz gefolgt von einem für das Signalpeptid von humanem RGMb codierenden DNA Abschnitt und einer für einen V5-Peptidtag codierenden DNA-Sequenz zwischen die Restriktionsenzymststellen *KpnI* sowie *EcoRI* des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3.1 eingefügt. Anschließend wurde das Gen codierend für die reife RGMb Proteinsequenz und die GPI-Ankerdomäne zwischen die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI* kloniert (Abbildung 41 A). Das DNA-Konstrukt wurde mittels Sequenzierung überprüft (für DNA- und Proteinsequenzen siehe Anhang 6.1).

Die Expression des mit einer V5-Peptidsequenz versehenen membranständigen RGMb-Proteins wurde im Anschluss an eine Transfektion in AD-293 bzw. HeLa-Zellen mittels Western Blot Analyse (2.5.4) getestet und konnte in beiden verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Abbildung 42). Das rekombinante monomere V5-RGMb-Fusionsprotein zeigt ein apparentes Molekulargewicht von etwa 45 kDa (unterer schwarzer Pfeil in Abbildung 42), während es sich bei der höhermolekularen Proteinspezies möglicherweise um dimeres Corezeptor-Protein handelt (apparentes Molekulargewicht ca. 95 kDa).

Um die Expression der membranständigen Form des RGMb Corezeptors auf der Zelloberfläche zu verifizieren, wurden transiente Expressionen in AD-293, C2C12- und ATDC5-Zellen durchgeführt und die transfizierten Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie (2.17)

analysiert. Die Ergebnisse dieser Zellanalyse sind in Tabelle 34 zusammengefasst. In allen getesteten Zelllinien konnte das rekombinante membranständige RGMB-Protein an der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

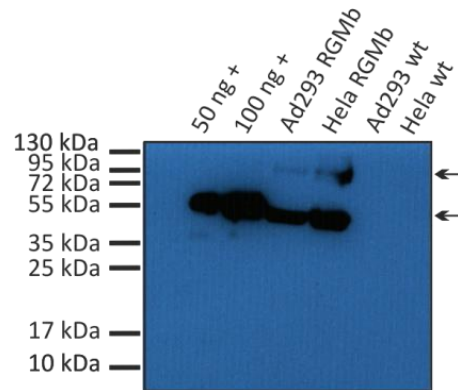


Abbildung 42: Western Blot Analyse der Expression von membranständigem RGMB mit einem gegen die N-terminale V5-Peptidsequenz gerichteten anti-V5 Antikörper. Als Positivkontrolle wurde ein gereinigtes mit einer V5-Sequenz versehenes Protein verwendet (+, ca. 60 kDa; IL13R α 1, Quelle: Dr. Markos Pechlivanis). Die Pfeile kennzeichnen die Banden für das V5-markierte RGMB-Protein. Die Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 45 kDa entspricht RGMB in seiner monomeren Form, während die schwach angefärbte Bande in der Western Blot Analyse auf der Höhe der Markerbande für 95 kDa möglicherweise auf dimeres RGMB Protein hinweist.

Tabelle 34: Durchflusszytometrische Analyse verschiedener, mit RGMB transfizierten Zelllinien. Jeweils wiedergegeben ist der prozentuale Anteil positiv markierter Zellen.

	Anti-V5 Antikörper positiv sortierte Zellen	Anti-RGMB Antikörper positiv sortierte Zellen
AD-293	77%	83%
ATDC5	33%	(nicht durchgeführt)
C2C12	10%	(nicht durchgeführt)

Die Arbeitsgruppe um K. Kanomata (2009) verwendete in ihren zellbasierten Nachweismethoden die BMP-responsive C2C12-Zelllinie und wies zum ersten Mal einen inhibierenden Einfluss des membranständigen RGMB-Proteins auf den BMP-Signalweg nach. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Auswirkungen des membranverankerten RGMB-Corezeptors auf BMP-induzierte Signale auch in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung dieser Zelllinie etabliert. Dazu wurden C2C12-Zellen mit dem in Abbildung 41 A dargestellten RGMB-Expressionskonstrukt („RGMB“ in Abbildung 43) oder mit dem reinen pcDNA3.1 Vektor ohne inserierte cDNA-Sequenz („Mock“ in Abbildung 43) sowie mit dem BMP-responsiven Luciferase-Reporterkonstrukt BRE-Luc transfiziert (2.16.4). Anschließend wurde das induzierte Luciferasesignal in Gegenwart oder in Abwesenheit eines BMP-2 Stimulus analysiert (2.16.4).

3. Ergebnisse

Die in den Abbildung 43 A und C für C2C12-Zellen gezeigten Analysen der SMAD Aktivierung zeigen, dass BMP-2 auch in Gegenwart von membranständigem RGMB zu einer dosisabhängigen Stimulierung des SMAD Signalwegs führt, obwohl der Corezeptor bei Verwendung der löslichen Form von RGMB eine Inhibition des Signalwegs bewirkt hatte (vergleiche Abschnitt 3.3.1). Ein Vergleich der quantitativen Auswertung der Zellstimulation in Gegenwart (RGMB + BMP-2) und Abwesenheit von RGMB (Mock + BMP-2) zeigt nicht die eigentlich für einen Inhibitor erwartete Erhöhung des EC_{50} -Werts (EC_{50} für RGMB exprimierende C2C12 Zellen: 0.7 nM; EC_{50} in Abwesenheit von RGMB: 1.2 – 2.2 nM).

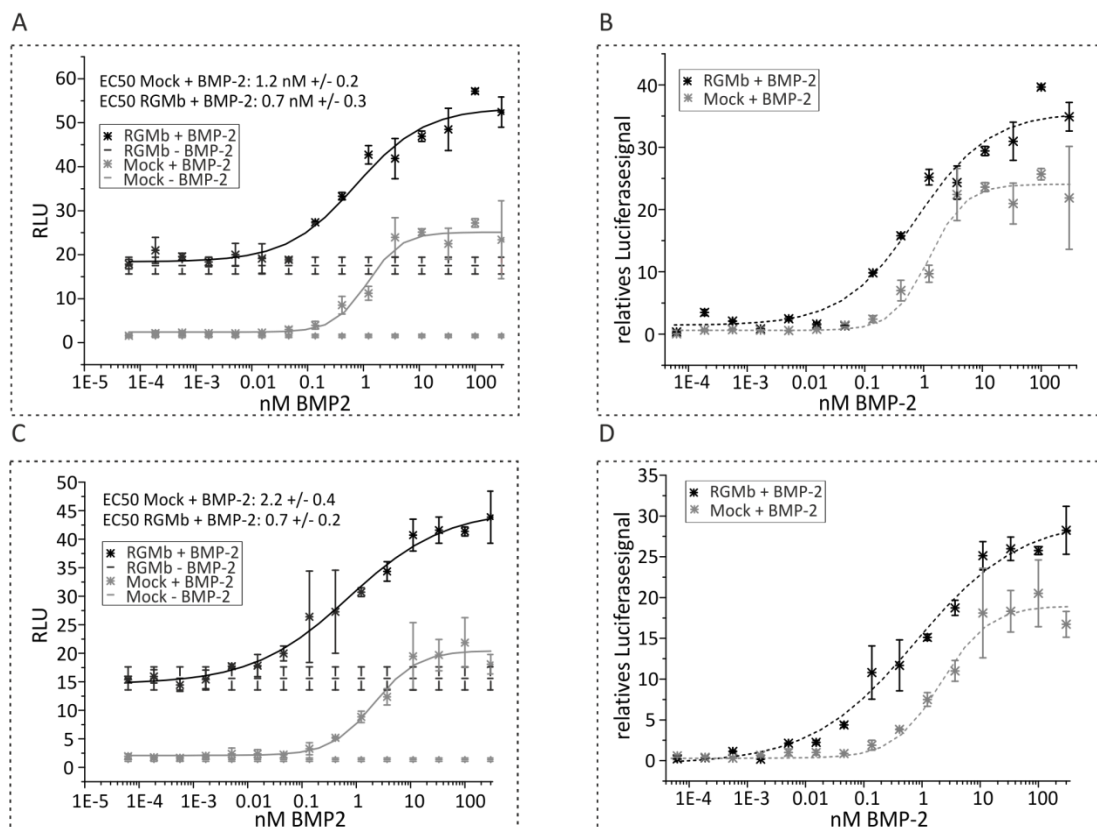


Abbildung 43: A & C) Reporterexpressionsanalyse unter Verwendung von C2C12 Zellen, die mit pcDNA3.1_RGMB_GPI („RGMB“ in den Abbildungen) bzw. pcDNA3.1_Leervektor („Mock“ in den Abbildungen) transfiziert wurden. In den Studien wird der SMAD-1/5/8 Signalweg durch die Zugabe von BMP-2 dosisabhängig stimuliert. Durch die Co-Transfektion eines BRE-Luciferase-Reporterkonstrukts erfolgt eine BMP-2 abhängige Expression der Luciferase, die durch einen enzymatischen Nachweis quantitativ erfasst wird. Die aus den Luciferasenachweisen erhaltenen EC_{50} -Werte sind in den einzelnen Diagrammen angegeben. B & D) Darstellung der relativen Luciferasesignale: Für eine Signalnormierung wurden jeweils die Hintergrundsignale in Abwesenheit exogen zugegebenen BMP-2 Proteins (RGMB – BMP-2, bzw. Mock – BMP-2) aus A) bzw. C) von den entsprechenden Lumineszenzwerten nach BMP-2 Stimulation abgezogen.

Basierend auf den EC_{50} -Werten scheint zunächst die Aktivierung des SMAD-Signalwegs durch BMP-2 unbeeinflusst. Allerdings zeigen die C2C12 Zellen, welche membranständiges RGMB an ihrer Oberfläche exprimieren eine stark erhöhte SMAD-Aktivierung auch in Abwesenheit eines

exogenen BMP-2-Stimulus. Hierbei erreicht die SMAD-abhängige Hintergrundexpression des Luciferase Reportergens fast 80% des Maximalwerts der mit BMP-2 stimulierten Mock-transfizierten C2C12 Zellen. Dies konnte in mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten (wie in Abbildungen 43 A und C an zwei Beispielen gezeigt) beobachtet werden.

Für eine von den Hintergrundwerten unabhängige Darstellung dieser Reporter-Gen-Analysen wurden in den Abbildung 43 B) und D) die relativen Lumineszenzwerte nach Abzug der jeweiligen basalen Lumineszenzwerte verwendet. Diese Darstellungsweise verdeutlicht, dass die Lumineszenzwerte von RGMB-exprimierenden verglichen mit Mock-transfizierten C2C12-Zellen höhere Maximalwerte erreichen, während der konzentrationsabhängige Verlauf der BMP-2 Stimulation und damit auch die zugrundeliegenden EC_{50} -Werte nahezu identisch sind. Die BMP-abhängige Luciferaseinduktion wird jedoch bei RGMB exprimierenden Zellen jeweils bereits bei niedrigeren Konzentrationen des Wachstumsfaktors stimuliert. Dadurch erscheint der Kurvenverlauf des Lumineszenzsignals in den Abbildung 43 B) und D) zu niedrigeren BMP-2 Konzentrationen versetzt.

Zwar sind die hier gezeigten Effekte des membranständigen RGMB-Proteins auf den BMP-Signalweg gering, dennoch könnten diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass die Expression des Corezeptors in C2C12 Zellen eine Reaktion auf ein niedrigeres BMP-Signal ermöglicht. Auch die erhöhte basale Hintergrundlumineszenz könnte unter der Annahme eines Sensitivierungsmechanismus erklärt werden: Microarray-Daten (unveröffentlichte Daten Dr. Axel Seher) weisen auf eine endogene Expression von BMP-Faktoren (BMP-4, -6, -7) in C2C12 Zellen hin. Möglicherweise ist die Konzentration dieser Faktoren in Abwesenheit des membranständigen RGMB unter basalen Bedingungen zu niedrig, um den BMP-Signalweg zu aktivieren, was erst durch die Expression des membranverankerten Corezeptors ermöglicht wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Überexpressionsversuche von RGMB zusammen mit dem BMP-responsiven Reporter-Genkonstrukt BRE-Luc in der Nierenepithelzelllinie (LLC-PK1) sowie in C3H10T1/2 Zellen beschrieben (Samad, T.A. et al. 2005). Jedoch wird die Signifikanz dieser Ergebnisse dadurch in Frage gestellt, dass die Microarray-Daten (unveröffentlichte Daten Dr. Axel Seher) bereits eine hohe endogene Expression des Corezeptors RGMB in untransfizierten C2C12 Zellen nachweisen. Dadurch stellt sich die Frage, ob bzw. wie eine zusätzliche Expression dieses Modulatorproteins einen solchen Effekt hervorrufen kann. Diese könnte durch zukünftige Studien untersucht werden, die die Auswirkungen einer gezielten Inhibition der endogenen Expression von RGMB durch Transfektion spezifischer siRNAs auf den BMP-Signalweg analysieren.

Die in dieser Arbeit präsentierten zellbasierten Studien mit der löslichen Variante des RGMB-Proteins konnten eine eindeutige inhibierende Wirkung auf die BMP-induzierten Signale nachweisen (siehe 3.3.1). Darüber hinaus zeigten die hier durchgeführten in vitro Bindungsstudien hochaffine selektive Interaktionen des rekombinanten RGMB mit Liganden der BMP-/GDF-Familie (siehe 3.2.2), während bisher angenommene direkte Wechselwirkungen zwischen dem Corezeptor und den Typ I sowie Typ II Rezeptortodomänen widerlegt werden konnten (siehe 3.2.4). Die oben gezeigten Ergebnisse zeigten hingegen keine direkte Inhibition der BMP-induzierten SMAD-Signalkaskade durch das GPI-verankerte RGMB-Protein in C2C12-Zellen, wie von etwa K. Kanomata (2009) beschrieben, sondern deuten eventuell auf einen BMP-sensitivierenden Effekt dieser Corezeptor-Variante hin. Unsere Ergebnisse zusammen mit den in der Literatur publizierten Daten werfen die Frage auf, wie das membranverankerte RGMB Protein eine Verstärkung des BMP-Signals verursachen könnte, ohne direkt mit den BMP-Rezeptoren zu interagieren. Hier gilt es auch die scheinbar konträre Wirkweise der löslichen RGMB Form zu erklären, da zunächst erwartet werden muss, dass ein inhibitorisches Molekül durch die bloße Immobilisierung auf einer Oberfläche normalerweise keine Änderung des Binde- und damit des Inhibitionsmechanismus erfährt. Ein möglicher klärender Ansatz wäre, dass das GPI-verankerte RGMB dazu dient, lösliche BMP-Faktoren in bestimmten Membranmikrodomänen zu binden, dadurch an der Zelloberfläche zu fixieren und so in räumliche Nähe zu ihren Transmembranrezeptoren zu bringen. Die in diesem Fall nicht zum Tragen kommende inhibitorische Wirkung kann eventuell durch einen kinetischen Mechanismus erklärt werden, bei dem durch die lokale Konzentrierung auf der Membran eine kompetitive Verdrängung des RGMB Corezeptors durch die gegenwärtigen BMP Rezeptoren erfolgt. Im Folgenden wurde daher analysiert, ob RGMB auf zellulärer Ebene mit BMP Typ I sowie Typ II Rezeptoren colokalisieren und somit Teil eines höhermolekularen Ligand-Rezeptor Signalkomplexes werden kann (siehe Abschnitt 3.4.1).

3.4. RGMB ALS TEIL HÖHERMOLEKULARER SIGNALKOMPLEXE

3.4.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR COLOKALISATION DES RGMB COREZEPTORS UND BMP-REZEPTOREN

Um fluoreszenzmarkierte Rezeptor- und Corezeptorproteine auf der Zelloberfläche zu analysieren, wurde ein neuer Ansatz gewählt, der es erlaubt, die rekombinant überexprimierten Rezeptorproteine mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen orthogonal anfärben zu können. Hierzu bietet sich das sogenannte CLIP-/SNAP-Fusionsprotein-System (NEB Biolabs) an, bei dem das gewünschte Protein an dessen N- oder C-Terminus an Derivate der humanen O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) gekoppelt werden kann. Diese Enzyme reagieren autokatalytisch und spezifisch mit Fluoreszenz-markierten Benzylcytosinen (CLIP-tag[®]) oder Benzylguaninen (SNAP-tag[®]), wodurch die Fusionsproteine selektiv und kovalent mit den Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Diese Methode bietet entscheidende Vorteile gegenüber Antikörper-basierten Lokalisationsanalysen sowie auch gegenüber einer Fusion der rekombinanten Proteine an Fluoreszenzproteine (z. B. GFP) für anschließende Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET) Analysen. So sind die hAGT-Fusionsenzyme im Vergleich mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern deutlich kleiner (20 kDa) und weisen auch gegenüber den klassisch verwendeten XFP Proteinen (etwa 26 bis 30 kDa) noch Größenvorteile auf. Zudem kann die Anregungs- und somit auch die Emissionswellenlänge erst bei der entsprechenden Anwendung gewählt werden und liegt nicht wie bei den XFP Proteinen zum Zeitpunkt der Klonierung bereits fest. Darüber hinaus existieren derzeit verschiedene membran-permeable als auch membranimpermeable hAGT-Fluoreszenzsubstrate, so dass eine spezifische Markierung intrazellulärer sowie membranständiger Fusionsproteine möglich ist. Da aufgrund der zumeist relativ starken Überexpression immer auch ein Teil der rekombinanten sekretierten Membranproteine im Endoplasmatischen Retikulum oder in intrazellulären Vesikeln verbleiben, kann durch die spezifische Anfärbung nur der auf der Membran befindlichen Rezeptoren diese Methodik auch idealerweise für Endozytose und Transportstudien verwendet werden. Somit können transient überexprimierte membranständige SNAP- und CLIP-Fusionsproteine gleichzeitig und hochselektiv fluoreszenzmarkiert werden.

In den bisher vorgestellten eigenen Studien konnten mittels in vitro Bindungsstudien weder eine direkte Bindung von RGMB an Typ I noch an Typ II Rezeptoren nachgewiesen werden (3.2.4), allerdings konnte in diesen SPR Studien gezeigt werden, dass RGMB mit Subgruppen von BMP/GDF Liganden direkt interagiert (3.2.2). Zudem konnte beobachtet werden, dass lösliches RGMB-Protein BMP-induzierte Signale konzentrationsabhängig inhibiert (3.3.1), während die

membranständige Form des Corezeptors jedoch möglicherweise sensitivierend/aktivierend auf den BMP-Signalweg in C2C12 Zellen wirken kann (3.3.3). Um den dieser Aktivierung zugrundeliegenden molekularen Mechanismus aufzuklären, wurde daher die SNAP-/CLIP-Methode etabliert, um Colokalisationen der BMP-Rezeptoren BMPR-IA sowie BMPR-II mit dem Corezeptor RGMb in der Zellmembran zu untersuchen und Hinweise auf die Existenz höhermolekularer Signalkomplexe zu bekommen.

Dazu wurden cDNA-Fusionskonstrukte für die transiente Expression der BMP-Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-II sowie des GPI-verankerten RGMb-Corezeptors in Fusion mit den CLIP/SNAP Enzymen kloniert. Nach der Promotorsequenz des Vektors wurde im Falle des Corezeptor-Konstruktes die Signalpeptidsequenz für das humane RGMb zwischen die Restriktionsenzym-schnittstellen *Clal* und *EcoRI* des eukaryotischen Expressionsvektors pCLIP-tag[®] eingefügt. Anschließend wurde das Gen codierend für die reife RGMb Proteinsequenz inklusive der GPI-Ankererkennungsequenz zwischen die Restriktionsschnittstellen *AscI* und *NotI* kloniert (Oligonukleotide: 2.1.13; siehe auch 2.2.5 - 2.2.11), so dass es hinter dem Genabschnitt kodierend für CLIP bzw. SNAP lokalisiert wird (Abbildung 44 A; DNA- und Proteinsequenzen siehe Anhang 6.1). Für eine transiente Expression der Typ I und Typ II Rezeptoren wurde jeweils die Signalpeptidsequenz des humanen BMPR-IA Rezeptors zwischen die Schnittstellen *Clal* sowie *EcoRI* der Expressionsvektoren pCLIP-tag[®] sowie pSNAP-tag[®] eingefügt. Daraufhin wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen des humanen BMPR-IA bzw. des BMPR-II Rezeptors jeweils zwischen die Restriktionsenzym-schnittstellen *BamHI* sowie *NotI* (Oligonukleotide: 2.1.13; siehe auch 2.2.5 - 2.2.11) beider Expressionsvektoren kloniert (siehe Abbildung 44 B-E; DNA- und Proteinsequenzen siehe Anhang 6.1).

Die Expression der Fusionsproteine wurde im Anschluss an eine Transfektion in AD-293-Zellen mittels Western Blot Analyse (2.5.4) getestet und konnte für alle rekombinanten CLIP-/SNAP-Proteine nachgewiesen werden (siehe Abbildung 44 F). Das CLIP-RGMb Fusionsprotein wies ein apparentes Molekulargewicht von etwa 65 kDa auf (gekennzeichnet durch grauen Pfeil in Abbildung 44). Darüber hinaus zeigten die SNAP- bzw. CLIP-BMPR-IA Fusionsproteine ein apparentes Molekulargewicht von etwa 80 kDa (mittlerer schwarzer Pfeil in Abbildung 44 F) und das SNAP-Typ II Rezeptor Fusionsprotein ein apparentes Molekulargewicht von ca. 140 kDa (oberer schwarzer Pfeil in Abbildung 44 F). Hingegen konnte das CLIP-BMPR-II Fusionsprotein nicht eindeutig mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Dafür könnte das hohe apparente Molekulargewicht verantwortlich zeichnen, wodurch die Fusionsproteine möglicherweise nur unzureichend auf die Nitrozellulosemembran transferiert werden konnten. Dieses wird auch dadurch bestätigt, dass jeweils SNAP- bzw. CLIP-Fusionsproteine in den

Auftragstaschen des Polyacrylamidgels nachgewiesen werden konnten (grüner Pfeil in Abbildung 44 F).

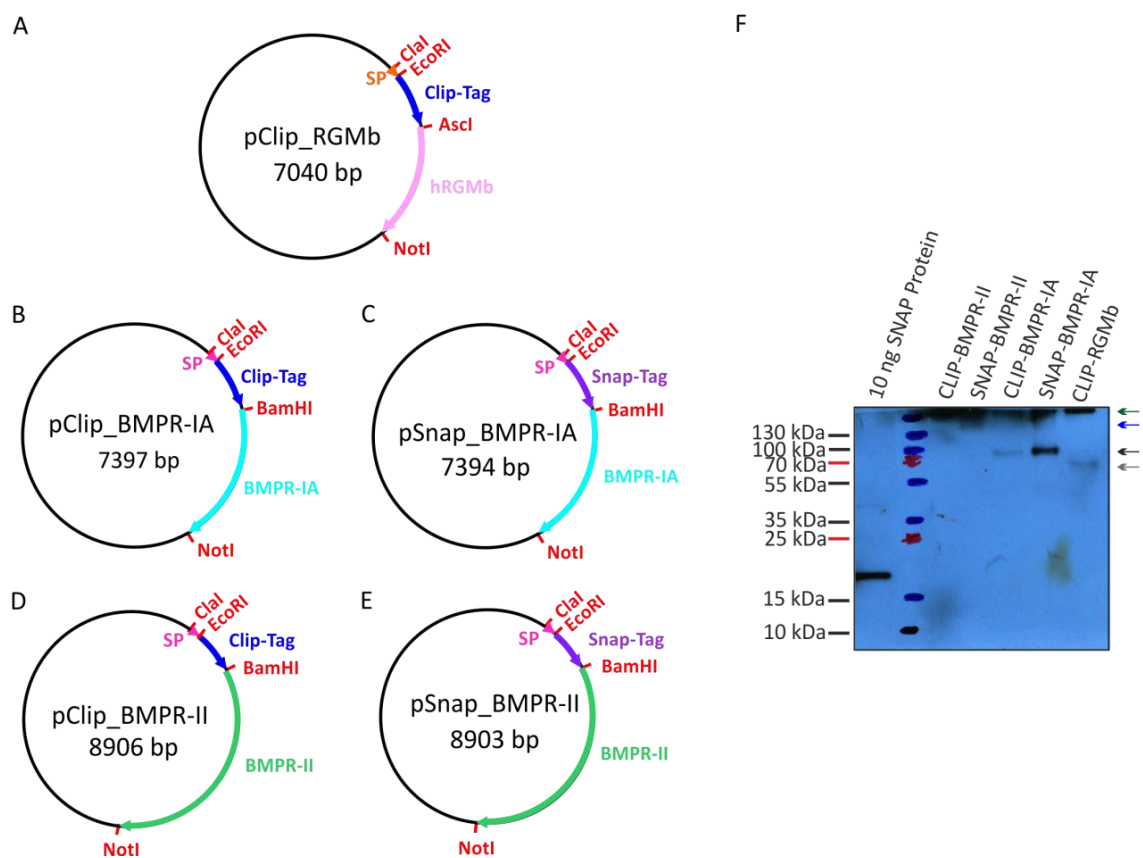


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Fusionsprotein-Expressionskonstrukte, die eine N-terminale Fusion der Rezeptor bzw. Corezeptorproteine mit den Alkylguanin- bzw. Alkylcytosin-DNA-Alkyltransferase SNAP und CLIP erlauben. A) pClip_RGMb. B) pClip_BMPR-IA. C) pSnap_BMPR-IA. D) pClip_BMPR-II. E) pSnap_BMPR-II. F) Western Blot mit Zelllysaten von CLIP- bzw. SNAP-Fusionsprotein exprimierenden AD-293 Zellen. Als Positivkontrolle diente 10 ng gereinigtes SNAP-Protein (*SNAP-tag® purified protein*, P9312S, NEB Biolabs) mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 20 kDa. Der graue Pfeil kennzeichnet das CLIP-RGMb Fusionsprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 65 kDa. Der schwarze Pfeil markiert die Banden der SNAP- bzw. CLIP-BMPR-IA Fusionsproteine, welche apparente Molekulargewichte von etwa 80 kDa aufweisen. Der blaue Pfeil kennzeichnet das SNAP-BMPR-II Fusionsprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 140 kDa. Darüber hinaus markiert der grüne Pfeil Fusionsproteine, welche in den Probestaschen des Polyacrylamidgels präzipitierten und nicht aufgetrennt werden konnten.

Um die Expression dieser Fusionsproteine auch an der Zelloberfläche zu analysieren, wurden die Konstrukte zunächst einzeln durch Transfektionen in AD-293-Zellen getestet (2.18.2). Nach transienter Expression der Fusionsproteine wurden die Zellen mit einem entsprechenden, nicht membranpermeablen CLIP- bzw. SNAP-spezifischen Farbstoff (2.18.2) angefärbt und mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (LSM, 2.18.3) analysiert. Repräsentative Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt.

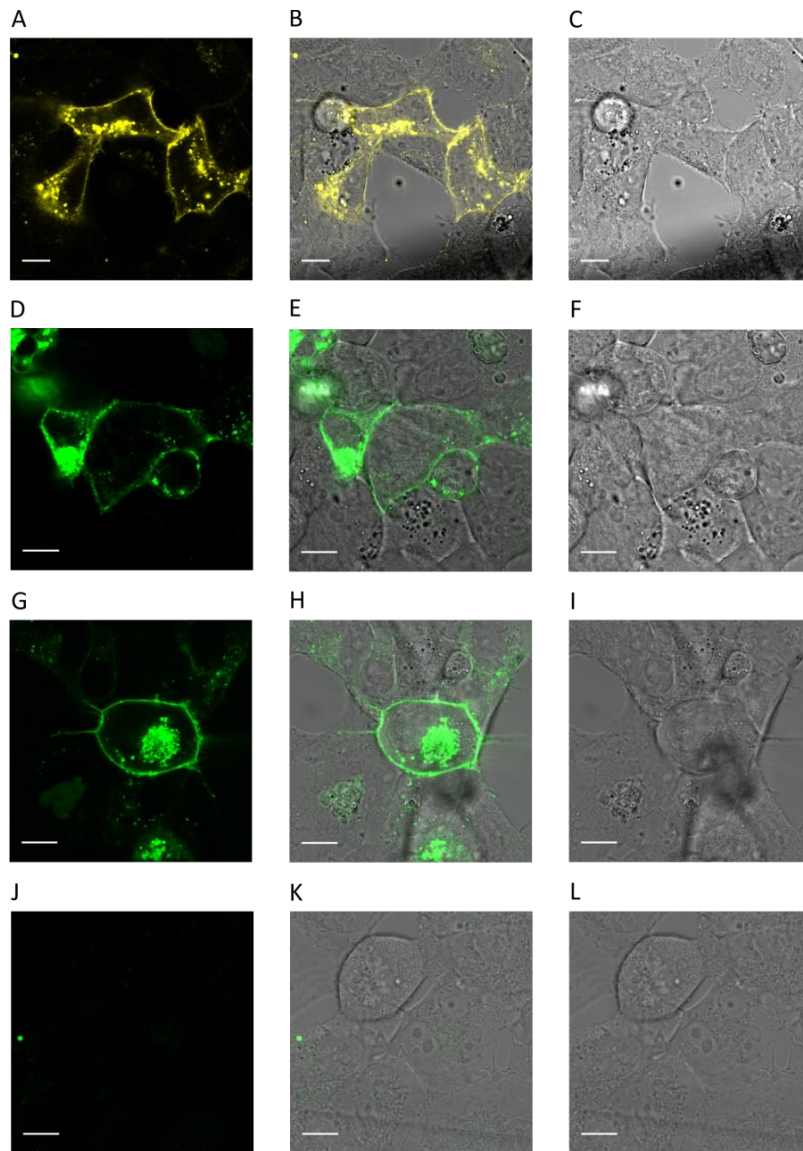


Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Expression der CLIP- und SNAP-Fusionsproteine in AD-293-Zellen. A bis C) CLIP-RGMB. A) Fluoreszenzkanal (Anregung: 633 nm HeNe, 25% Laserleistung; Emission: Leica Cy5 Filter, 650 bis 700 nm). B) Überlagerung der Durchlicht- und der Fluoreszenzaufnahme. C) Durchlichtaufnahme. D bis F) SNAP-BMPR-IA. D) Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). E) Überlagerung der Durchlicht- und der Fluoreszenzaufnahme. F) Durchlichtaufnahme. G - I) SNAP-BMPR-II. G) Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). H) Überlagerung der Durchlicht- und der Fluoreszenzaufnahme. I) Durchlichtaufnahme. J - L) Untransfizierte AD-293-Zellen angefärbt mit SNAP-Farbstoff. J) Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). K) Überlagerung der Durchlicht- und der Fluoreszenzaufnahme. L) Durchlichtaufnahme. Die Maßstableisten kennzeichnen jeweils 10 μm .

Die Teilabbildungen A bis C zeigen AD-293 Zellen nach der Transfektion mit dem Konstrukt pCLIP_RGMB. Durch die Behandlung mit dem membranimpermeablen CLIP-Substrat konnte membranständiges RGMB-Fusionsprotein spezifisch mit dem Fluoreszenzmarker gekoppelt werden. Weiterhin konnte die Expression der Rezeptorfusionsproteine SNAP-BMPR-IA (Abbildung 45 D - F) sowie SNAP-BMPR-II (Abbildung 45 G - I) an der Zelloberfläche

entsprechend transfizierter AD-293-Zellen nachgewiesen werden. Hingegen zeigten untransfizierte Kontrollzellen nach der Behandlung mit dem spezifischen SNAP-Substrat sowie einer entsprechenden Exzitation keine Fluoreszenzmission. Die in dieser Arbeit etablierte Lokalisationsmethode erwies sich somit als geeignet, um die transient exprimierten membranständigen SNAP- bzw. CLIP-Fusionsproteine hochspezifisch mit Fluoreszenzmarkern zu koppeln und auf Zellen zu visualisieren.

Da das hier verwendete System zudem die gleichzeitige und selektive Kopplung verschiedener Fluoreszenzmarker an coexprimierte SNAP- und CLIP-Fusionsproteine ermöglicht, wurden im nächsten Schritt Doppeltransfektionen mit beiden Rezeptortypen beziehungsweise mit je einem Rezeptor und dem Corezeptor RGMb etabliert. Die Zellen wurden wie unter 2.18.2 angegeben behandelt und anschließend gleichzeitig mit den membranimpermeablen SNAP- sowie CLIP-Substraten bei 37 °C inkubiert (2.18.2). Anschließend erfolgte die Analyse am LSM (2.18.3). Abbildung 46 fasst die Ergebnisse dieser Colokalisationsexperimente zusammen. Die ersten vier Abbildungen zeigen die Coexpression der transmembranären Rezeptorfusionsproteine SNAP-BMPR-IA (Abbildung 46 B) sowie CLIP-BMPR-II (Abbildung 46 A). Die Fluoreszenz-basierte mikroskopische Analyse verdeutlicht, dass einige Zellen einen der beiden Rezeptortypen verstärkt exprimierten. Hierfür könnten unterschiedliche Transfektions- oder auch Translationseffizienzen der entsprechenden Konstrukte verantwortlich zeichnen. So zeigt beispielsweise die in der linken Bildhälfte abgebildete Zelle in Abbildung 46 A ein starkes CLIP-spezifisches Fluoreszenzsignal (hier grün dargestellt) und somit eine überwiegende Expression des CLIP-BMPR-II Rezeptors. Hingegen wird die AD-293 Zelle in der rechten Bildhälfte sowohl die Expression des SNAP-BMPR-IA Proteins (Abbildung 46 B & C; rot) als auch des CLIP-BMPR-II Rezeptors (Abbildung 46 A & C; grün) deutlich. Eine Überlagerung der Fluoreszenzbildkanäle zeigt Bereiche in der Membran vor allem bei der in der rechten Bildhälfte abgebildeten Zelle, in denen die Rezeptoren SNAP-BMPR-IA sowie CLIP-BMPR-II in unmittelbarer Nähe an der Oberfläche lokalisiert waren (Abbildung 46 C; gelblich-orange Bereiche). Dieses deutet auf eine Colokalisation beider Rezeptortypen hin.

Abbildung 46 E bis H zeigen die Ergebnisse der Coexpression von SNAP-BMPR-IA sowie CLIP-RGMb in AD-293-Zellen. Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie konnte die Expression sowohl des CLIP-Corezeptorkonstruktes (Abbildung 46 E & G; grün), als auch des SNAP-Typ I Rezeptorfusionsproteins (Abbildung 46 F & G; rot) an der Zelloberfläche visualisiert und nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

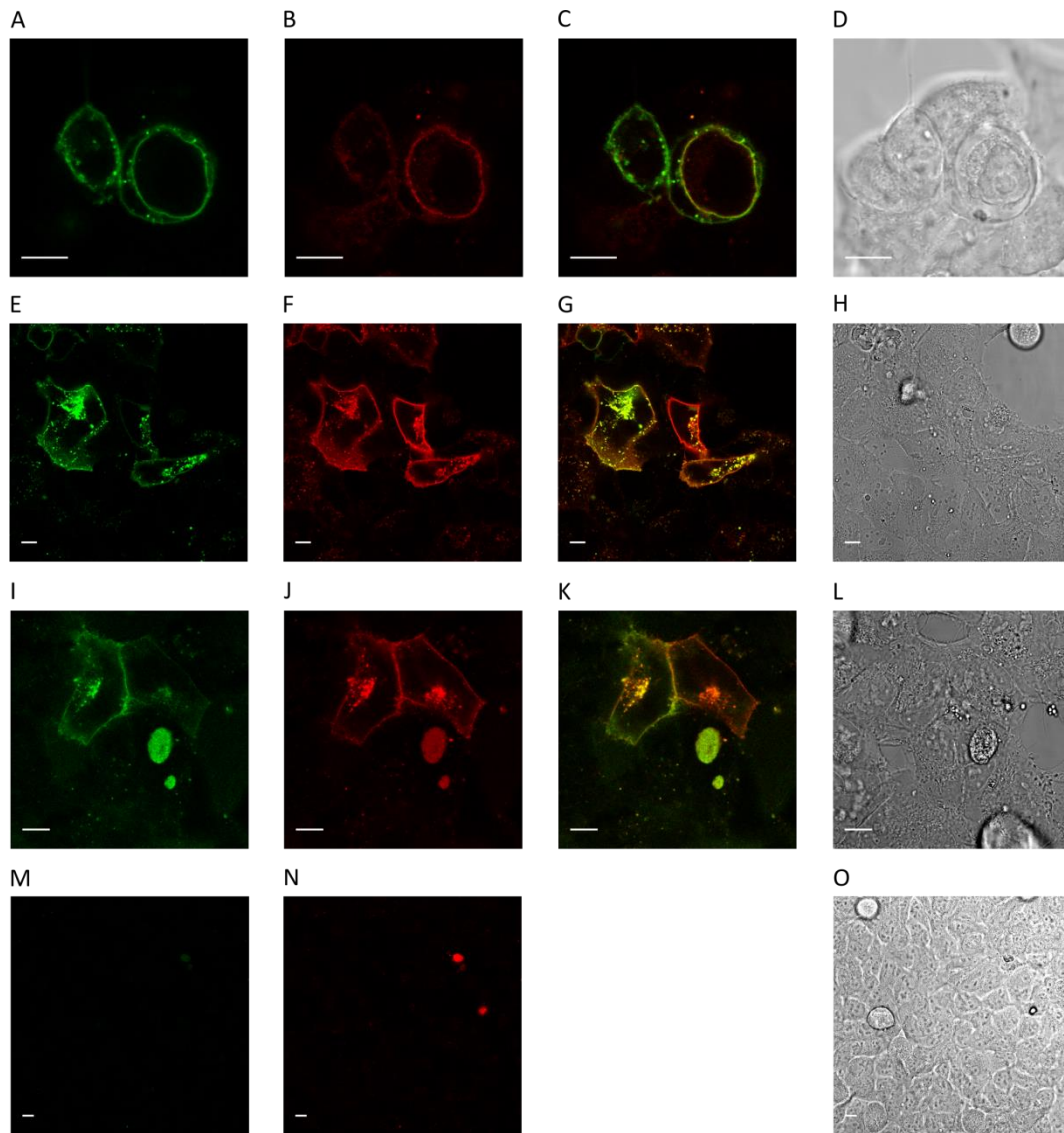


Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung von AD-293-Zellen nach der Coexpression der CLIP- und SNAP-Fusionsproteine. A – D) CLIP-BMPR-II und SNAP-BMPR-IA. A) CLIP-BMPR-II, Fluoreszenzkanal (Anregung: 633 nm HeNe, 25% Laserleistung; Emission: Leica Cy5 Filter, 650 bis 700 nm). B) SNAP-BMPR-IA, Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). C) Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen. D) Durchlichtaufnahme. E – H) CLIP-RGMb und SNAP-BMPR-IA. E) CLIP-RGMb, Fluoreszenzkanal (Anregung: 633 nm HeNe, 25% Laserleistung; Emission: Leica Cy5 Filter, 650 bis 700 nm). F) SNAP-BMPR-IA, Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). G) Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen. H) Durchlichtaufnahme. I – L) CLIP-RGMb und SNAP-BMPR-II. I) CLIP-RGMb, Fluoreszenzkanal (Anregung: 633 nm HeNe, 25% Laserleistung; Emission: Leica Cy5 Filter, 650 bis 700 nm). J) SNAP-BMPR-II, Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). K) Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen. L) Durchlichtaufnahme. M – O) Untransfizierte AD-293-Zellen. M) CLIP-Fluoreszenzkanal (Anregung: 633 nm HeNe, 25% Laserleistung; Emission: Leica Cy5 Filter, 650 bis 700 nm). N) SNAP-Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). O) Durchlichtaufnahme. Die Maßstableisten entsprechen jeweils 10 μm .

Die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle zeigt Bereiche in der Zellmembran, in denen RGMb sowie BMPR-IA nach der Transfektion und Expression in nächster Nähe lokalisiert waren

(Abbildung 46 G; gelblich-orange Bereiche). Auch für die Coexpression des CLIP-gekoppelten Corezeptors (Abbildung 46 I und K; grün) mit dem Typ II Rezeptor Fusionsprotein SNAP-BMPRII (Abbildung 46 J und K; rot) konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. So wurden auch hier beide Fusionsproteine an der Zelloberfläche spezifisch markiert und visualisiert. Darüber hinaus verdeutlicht die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle auch in diesem Fall eine Coexpression des Typ II Rezeptors sowie des Corezeptors in unmittelbarer Nähe zueinander. Die Abbildung 46 M und N stellen untransfizierte AD-293 Zellen nach der Behandlung mit den CLIP- (M) sowie SNAP-spezifischen Farbstoffen (N) dar. Aus den Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop wird ersichtlich, dass außer einigen wenigen Vesikeln, die offenbar Zelltrümmer darstellen (siehe Durchlichtaufnahme Abbildung 46 O), keine Zelloberflächen angefärbt werden konnten. Diese Kontrollen belegen, dass die Anfärbungen mit den CLIP- und SNAP-Substraten hochselektiv sind, und dass die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe nicht unspezifisch durch Endozytose in das Zellinnere aufgenommen werden.

Bei einer detaillierten Betrachtung der Einzel- sowie Doppelfärbungen wird deutlich, dass in den AD-293-Zellen offenbar Internalisierungsprozesse stattgefunden haben. So können in allen mikroskopischen Aufnahmen der CLIP- und SNAP-Fusionsprotein überexprimierenden AD-293 Zellen Vesikel beobachtet werden, welche sich von der Zellmembran abgeschnürt haben oder sich bereits im Zytoplasma befinden (siehe Abbildung 46). Gelingt es nachzuweisen, dass RGMb gemeinsam mit den beiden Rezeptortypen in denselben Vesikeln internalisiert wird, wäre dies ein zusätzlicher Hinweis auf eine tatsächliche Colokalisation dieser Membranproteine. Um dies zukünftig detailliert untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit zunächst ein Verfahren entwickelt, welches die anfängliche Internalisierung von Membranfragmenten verhindert.

Das bereits etablierte Verfahren wurde dahingehend abgewandelt, dass das Anfärben der transfizierten AD-293-Zellen mit den membranimpermeablen CLIP- und SNAP-Fluoreszenzfarbstoffen nicht wie zuvor bei 37 °C, sondern bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) durchgeführt wurde (2.18.2). Darüber hinaus wurden die Zellen während der weiteren Behandlung sowie bis zur mikroskopischen Analyse auf Eis gelagert. Abbildung 47 stellt die Ergebnisse dieser Untersuchung dar. Die ersten vier Abbildungen zeigen die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Coexpressionen der CLIP-RGMb A) und SNAP-BMPRII B) Fusionsproteine sowie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle C). Der Corezeptor wird dabei, wie auch in den vorangegangenen Untersuchungen, in nächster Nähe zu dem Typ I Rezeptor exprimiert, was einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Colokalisation der Membranproteine liefert. Die mikroskopischen Untersuchungen bei einer Coexpression von RGMb und dem Typ II Rezeptor BMPRII lassen vergleichbare Ergebnisse erkennen (Abbildung 47 E - H). Durch die Anfärbung bei

3. Ergebnisse

Raumtemperatur sowie die Lagerung der Zellen auf Eis konnte eine Internalisierung von Membranfragmenten effektiv verhindert werden, sodass eine gezielte Induktion der Internalisierungsprozesse während der fluoreszenzmikroskopischen Analyse in zukünftigen Untersuchungen durch dieses Verfahren ermöglicht wird.

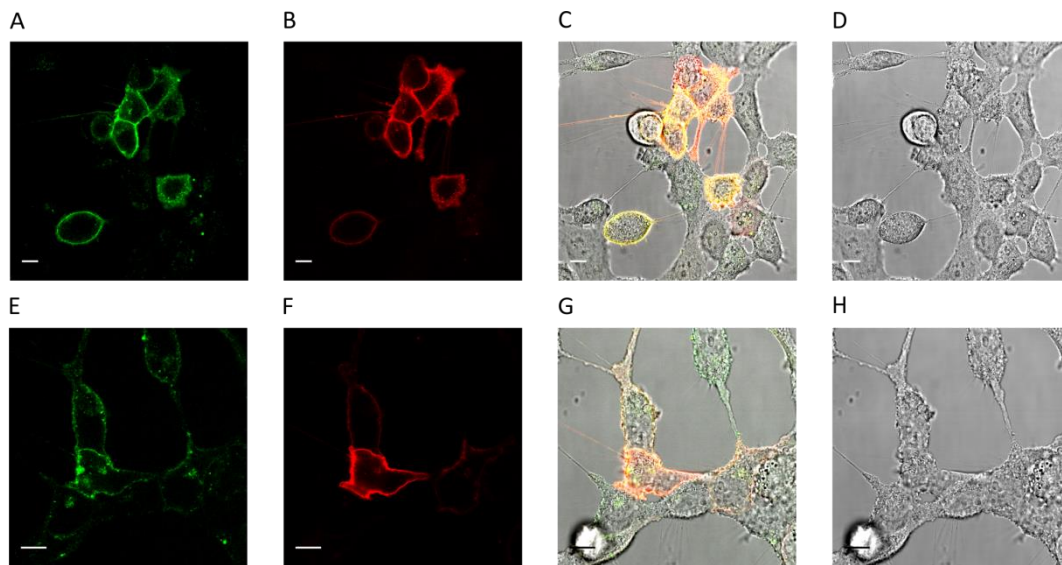


Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AD-293-Zellen nach der Coexpression der CLIP- und SNAP-Fusionsproteine und nach dem Färbeverfahren bei Raumtemperatur. A – D) CLIP-RGMb und SNAP-BMPRI-A. A) CLIP-RGMb, Fluoreszenzkanal (Anregung: 633 nm HeNe, 25% Laserleistung; Emission: Leica Cy5 Filter, 650 bis 700 nm). B) SNAP-BMPRI-A, Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). C) Überlagerung der Fluoreszenzkanäle mit dem Durchlichtkanal. D) Durchlichtaufnahme. E – H) CLIP-RGMb und SNAP-BMPRII. E) CLIP-RGMb, Fluoreszenzkanal (Anregung: 633 nm HeNe, 25% Laserleistung; Emission: Leica Cy5 Filter, 650 bis 700 nm). F) SNAP-BMPRII, Fluoreszenzkanal (Anregung: 561 nm DPSS, 18% Laserleistung; Emission: Leica Cy3 Filter, 580 bis 620 nm). G) Überlagerung der Fluoreszenzkanäle mit dem Durchlichtkanal. H) Durchlichtaufnahme. Die Maßstableisten kennzeichnen jeweils 10 μm .

Zusammengefasst weisen diese Experimente zunächst auf eine mögliche Colokalisation des Corezeptors RGMb mit BMPRI-A sowie BMPRII in der Zellmembran hin. Die laterale Auflösung des konfokalen Mikroskops kann mit der Formel

$$r = 0.4 \times \frac{\lambda}{NA} \quad (8)$$

berechnet werden und beträgt bei den in dieser Arbeit verwendeten Wellenlängen etwa 160 bis 200 nm. Dabei entspricht λ der Emissionswellenlänge und NA der numerischen Apertur des genutzten Objektivs. Aufgrund dieser nur begrenzten Auflösung lassen sich keine Aussagen über die tatsächlichen Distanzen der untersuchten Membranproteine zueinander beziehungsweise über direkte Interaktionen treffen. Diese könnten in der Membran durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET-) Messungen untersucht werden, welche Distanzen von maximal 10 nm

zwischen den Bindungspartnern tolerieren ((Förster, T. 1948), für Übersichtsartikel: (Kenworthy, A.K. 2001; Sekar, R.B. und Periasamy, A. 2003)). Hingegen zeigen die hier beobachteten Colokalisationen der untersuchten BMP-Transmembranrezeptoren mit dem Corezeptor RGMb, dass diese Proteine in der Zellmembran lokalisiert sind und ein ähnliches Verteilungsmuster aufweisen. Dieses weist auf eine mögliche Positionierung der Proteine in gleichen Membrandomänen hin. Aufgrund der geringen Größe der Membranmikrodomänen (siehe unten) sowie der begrenzten optischen Auflösung des Mikroskops kann dieses jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden und bedarf weiterer hochauflösender Analysen. GPI-verankerte Proteine assoziieren überwiegend mit sogenannten *Lipid Raft*-Domänen (für eine Übersicht siehe (Maeda, Y. und Kinoshita, T. 2011)). Diese werden als kleine (10 bis 200 nm) heterogene sowie hochdynamische Mikrodomänen definiert, welche reich an Sphingolipiden und Sterolen sind und zelluläre Prozesse kompartmentieren (Pike, L.J. 2006). Auch für den BMP Corezeptor RGMb wurde eine Lokalisation in *Lipid Raft*-Domänen beschrieben (Xia, Y. et al. 2005). Zudem gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass die Kompartimentierung der BMP-Rezeptoren in der Membran entscheidenden Einfluss auf deren Endozytose sowie die Induktion der intrazellulären Signalkaskaden hat. So scheinen vorgeformte Rezeptorkomplexe (*Preformed Complexes*, PFCs) in *Lipid Raft*-unabhängigen Membranbereichen zu residieren und Clathrin-abhängig endozytiert zu werden, während BMP-induzierte Signalkomplexe (*BMP Induced Signaling Complex*, BISC) in *Lipid Raft*-Domänen vorliegen und einer Caveolae-vermittelten Endozytose unterliegen (Hartung, A. et al. 2006). Darüber hinaus zeigen aktuelle Studien, dass Caveolae-assoziierte BMP-Rezeptoren die Induktion des SMAD-Signalwegs regulieren (Bonor, J. et al. 2012) und dass diese Bereiche auch für die SMAD-unabhängigen Signalkaskaden verantwortlich zeichnen (Hartung, A. et al. 2006). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass RGMb möglicherweise Liganden-induziert BMP-Rezeptoren in *Lipid Raft*-Domänen rekrutieren und dadurch deren Membranlokalisation regulieren könnte.

Da jedoch in der vorliegenden Arbeit *in vitro* keine direkten Interaktionen von RGMb mit den Typ I und den Typ II Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (3.2.4), ist dieser Prozess möglicherweise Liganden-abhängig. Die hier etablierten Colokalisationsstudien der Rezeptoren mit dem Corezeptor stellen die Basis für eine Vielzahl nachfolgender interessanter Analysen dar, die einen noch umfassenderen Einblick in die Zusammensetzung sowie die Domänenstruktur der Komponenten des BMP-Signalweges liefern könnten. So sind die SNAP- und CLIP-Fusionskonstrukte sowie die etablierten Färbeprotokolle effiziente Werkzeuge, um in zukünftigen Studien direkte Interaktionen der BMP-Rezeptoren zusammen mit dem Corezeptor in Anwesenheit und in Abwesenheit von exogen zugegebenen BMP-Liganden in der Zellmembran mittels FRET-Messungen zu analysieren. Zudem könnten weitere hochauflösende

mikroskopische Verfahren (beispielsweise STED „*Stimulated Emission Depletion*“, (d)STORM „*(direct) Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*“) Anwendung in der Charakterisierung der Membrankompartimentierung und der Endozytose dieser Signalmoleküle finden.

3.4.2. BILDUNG DER BMP-LIGAND/REZEPTOR KOMPLEXE IN GEGENWART DES BMP COREZEPTORS RGMB

Um die Ausbildung eines höhermolekularen Signalkomplexes bestehend aus Typ I und Typ II Rezeptoren sowie dem Corezeptor RGMB direkt in Abhängigkeit von BMP-Liganden zu charakterisieren wurden jedoch in dieser Arbeit keine weiteren mikroskopischen Verfahren sondern in vitro Bindungsstudien basierend auf der Oberflächen-Plasmonresonanz (2.11) etabliert (3.4.2). Dazu wurden die Ektodomänen verschiedener BMP Typ I und Typ II Rezeptoren zunächst durch kovalente Kopplung an den aktivierten Oberflächen von SPR-Biosensoren immobilisiert. Anschließend wurden diese mit einer gleichmäßigen, alle Rezeptorbindungsstellen des Sensors sättigenden, BMP-2 Konzentration überströmt. Nach dem Saturieren aller Bindestellen, erkennbar am Erreichen eines konstanten, nicht mehr zu erhöhenden SPR-Signals, wurde dann mittels eines Coinjektionsschrittes der Corezeptor als Analyt zusammen mit BMP-2 (letzteres in der zuvor verwendeten Sättigungskonzentration) über den auf dem Sensor transient entstandenen BMP-Ligand/Rezeptorkomplex geleitet. Kontrollmessungen haben zuvor bereits ergeben, dass keine direkten Interaktionen zwischen RGMB und den Rezeptoren der TGF- β Superfamilie stattfinden (siehe 3.2.4). In Abbildung 48 sind die Sensogramme dieser Coinjektion-SPR Messungen dargestellt. Da es sich hierbei um ein in der Durchführung relativ komplexes SPR-Experiment handelt, wurde der experimentelle Aufbau und die korrekte Funktionsweise mittels eines sehr ähnlichen SPR-Coinjektionsexperiments, der von Weber et al. (2007) publizierten sequentiellen Bildung des ternären BMP-Ligand/Rezeptorkomplexes, überprüft. Hierbei wird auf der Sensoroberfläche ebenfalls zuerst transient der binäre Komplex aus BMP-2 und BMPRI-A gebildet, indem BMP-2 als Analyt in hoher Konzentration über den auf dem Sensor immobilisierten Typ I Rezeptor BMPRI-A geleitet wird. Der auf dem Sensor gebildete, nicht-kovalente Ligand/Rezeptorkomplex wird direkt anschließend mit einer Mischung des Typ II Rezeptors ActR-IIB und BMP-2 in der zuvor verwendeten Sättigungskonzentration als Analyt perfundiert. Die konzentrationsabhängige Massenzunahme auf dem Biosensor mit steigender Konzentration an ActR-IIB zeigt deutlich (Abbildung 48 A), dass sich hierbei ein ternärer Komplex von BMP-2 gebunden an die Rezeptorektodomänen beider Subtypen bildet. Diese Komplexbildung ist Liganden-vermittelt, da eine direkte Interaktionsmessung von BMPRI-A und ActR-IIB negativ verläuft. In einer zweiten Kontrollmessung wurde der SPR-Aufbau dahingehend geändert, dass hier ActR-IIB auf der

158

Sensoroberfläche immobilisiert wurde und somit die Reihenfolge der Interaktionen von BMP-2 mit den beiden Rezeptorsubtypen umgekehrt wurde (Abbildung 48 B). Anschließend wurden die auf der Sensoroberfläche immobilisierten Rezeptortodomänen analog zunächst mit BMP-2 in sättigender Konzentration perfundiert und die intermediär entstandenen BMP/Rezeptor-Komplexe mit RGMb als Analyt in einer ansteigenden Konzentrationsreihe überspült. Die Beobachtung einer Massenzunahme (ersichtlich an dem weiteren Anstieg des RU-Signals) nach Absättigen der Rezeptorbindestellen mit dem ersten Analyt BMP-2 bedeutet hier, dass eine Bindung der Ektodomäne des entsprechenden BMP Rezeptors auch in Gegenwart des an BMP-2 gebundenen Corezeptors RGMb möglich ist und somit die Bindeepitope beider BMP-2 Interaktionspartner nicht destruktiv überlappen (Abbildung 48 C – G).

Im Rahmen dieser Experimente konnte für RGMb keine direkte Interaktion mit BMP-2 gebundenem BMP-2 beobachtet werden (siehe Abbildung 48 E). Zwar konnte in den Flusszellen, auf denen die BMP-Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB sowie ActR-II immobilisiert waren (Abbildung 48 C, D, F), eine geringfügige Massenzunahme bei Perfusion der binären Ligand/Rezeptor-Komplexe mit RGMb verzeichnet werden. Allerdings wiesen diese Signale keine Konzentrationsabhängigkeit auf und hatten im Vergleich mit der Positivkontrolle, der Bildung der ternären Ligand/Typ I/Typ II Rezeptor-Komplexe (siehe Abbildung 48 A, B) eine nur sehr geringe Amplitude. Daher kann angenommen werden, dass es sich hierbei um keine direkten, physiologisch relevanten Interaktionen des Corezeptors RGMb mit dem Rezeptor-gebundenen Liganden handelt. Lediglich für das Coinjektionsexperiment, bei dem der BMP Typ II Rezeptor ActR-IIB auf der Sensoroberfläche immobilisiert vorlag, konnte eine deutliche Interaktion des RGMb Corezeptorproteins mit ActR-IIB-gebundenem BMP-2 beobachtet werden, die hinsichtlich ihrer Bindungskinetik und Signalamplitude mit den Referenzmessungen zur Bildung der ternären BMP-2-Rezeptorkomplexe vergleichbar war (Abbildung 48 A, B und G). Diese Beobachtung deutet an, dass eine gleichzeitige Bindung von BMP-2 an BMP-Rezeptoren beiden Subtyps sowie an den Corezeptor RGMb nur für wenige Ligand-Rezeptorpaarungen möglich ist. So scheint eine gleichzeitige Interaktion von Rezeptor-gebundenem BMP-2 mit RGMb ausschließlich dann möglich zu sein, wenn BMP-2 im Komplex gebunden an die Ektodomäne des Activin Typ-II Rezeptors vorliegt. Hingegen verlaufen alle Wechselwirkungen von BMP-2 mit dem Corezeptor RGMb und anderen TGF- β Typ I und Typ II Rezeptoren exklusiv. Es werden also nur Bindungen von BMP-2 entweder an RGMb oder aber an den entsprechenden BMP-Rezeptor zugelassen.

3. Ergebnisse

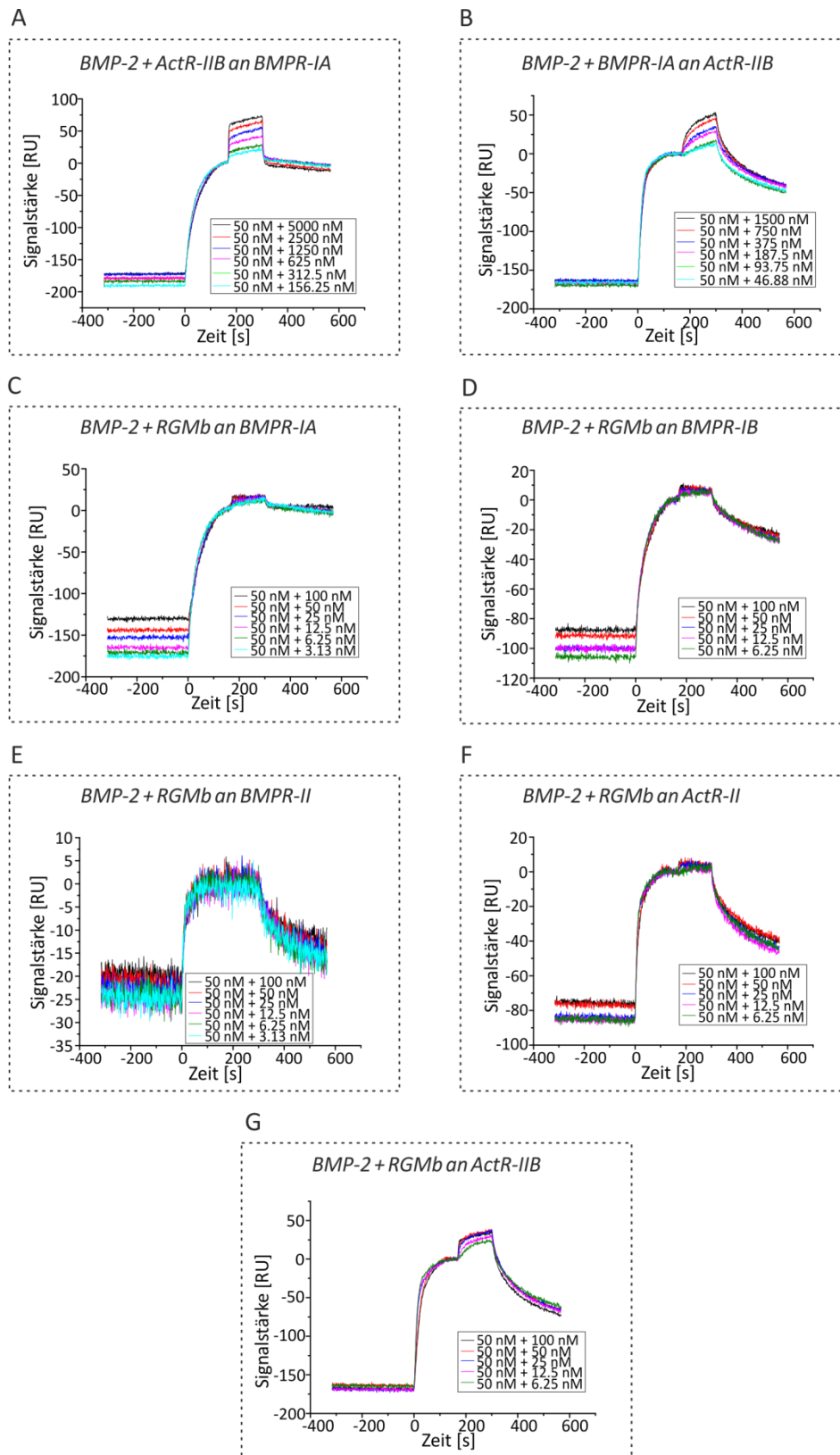


Abbildung 48: Plasmonresonanzanalyse der Bindung von RGMB an Rezeptor-gebundenes BMP-2. Hierzu wurden Coinjektionsstudien von $RGMB_{\Delta N_{cys}}$ und BMP-2 an Biosensoren mit immobilisierten BMP-Rezeptoren durchgeführt. Über die Rezeptorsensoroberfläche wurde ab dem Zeitpunkt $t = 0$ s mit einer Flussrate von $75 \mu\text{l min}^{-1}$ für 160 s eine konstante Konzentration BMP-2 (50 nM) geleitet, um den binären Ligand-Rezeptorkomplex zu bilden. Ab dem Zeitpunkt $t = 160$ s wurde dann der transient gebildete binäre BMP-2 Rezeptorkomplex für 133 s und mit einer Flussrate von $75 \mu\text{l min}^{-1}$ mit verschiedenen Konzentrationen von $RGMB_{\Delta N_{cys}}$ (Analytkonzentrationen von 6.25 bis 100

nM) in Gegenwart von 50 nM BMP-2 überspült. Ab dem Zeitpunkt $t = 293$ s wurde der Biosensor mit Puffer perfundiert. Die einzelnen Sensogramme der RGMB Konzentrationsreihe wurden auf den Gleichgewichtswert nach Sättigung der Rezeptorbindstellen mit BMP-2 unmittelbar vor der Perfusion des Corezeptors gemittelt. A) Coinjektion von BMP-2 plus ActR-IIB. BMPR-IA wurde auf der Sensoroberfläche mittels Kopplung primärer Aminogruppen immobilisiert. B) Coinjektion von BMP-2 plus BMPR-IA. ActR-IIB wurde auf der Sensoroberfläche mittels Kopplung primärer Aminogruppen immobilisiert. C) Coinjektion von BMP-2 plus RGMB über eine mit BMPR-IA funktionalisierte Sensoroberfläche (vergleiche A). D) Coinjektion von BMP-2 plus RGMB über eine mit BMPR-IB funktionalisierte Sensoroberfläche. E) Coinjektion von BMP-2 plus RGMB über eine mit BMPR-II funktionalisierte Sensoroberfläche. F) Coinjektion von BMP-2 plus RGMB über einen mit ActR-II funktionalisierten Biosensor. G) Coinjektion von BMP-2 plus RGMB über einen mit ActR-IIB funktionalisierten Biosensor (vergleiche B).

Um eine semiquantitative Auswertung der zweiten Interaktion durchführen zu können, wurden die RU-Werte kurz vor Injektion (Coinjektion erfolgte in Abbildung 48 ab dem Zeitpunkt 160 s) des zweiten Analyten auf einen gemeinsamen Mittelwert normiert. Dies ist bei dem in dieser Arbeit verwendeten Oberflächen-Plasmonresonanzsystem notwendig, da die Immobilisierung der Liganden (hier: BMP-Rezeptoren) auf sechs unterschiedlichen Oberflächenpunkten des Biosensors stattfindet. Dadurch können sich in späteren Interaktionsmessungen sowohl der Beladungsgrad als auch der basale Plasmonresonanzmesswert der sechs Interaktionspunkte untereinander unterscheiden. Durch die geringfügig unterschiedlich funktionalisierten Flusszellen wird eine Normierung auf einen gemeinsamen Ausgangswert vor der Injektion des zweiten Analyten erforderlich. Die kinetischen Parameter der zweiten Interaktion sind nicht direkt durch die ProteON Manager Analysesoftware (Version 2.1.2.05) auswertbar. Daher wurden die Dissoziationsbindungskonstanten aus den konzentrationsabhängigen Gleichgewichtsbindungen unter der Annahme eines Langmuir'schen Modells einer 1:1 Interaktion zu einem definierten Zeitpunkt nach folgender Gleichung bestimmt:

$$R_{eq}(\text{gebundenes Protein [RU]}) = \frac{C_A \times R_{max}}{C_A + K_{Deq}} \quad (9)$$

Hierbei kennzeichnen die Parameter C_A die Analytkonzentration, K_{Deq} die Dissoziationskonstante und R_{max} den Messwert bei Erreichen der maximalen Bindekapazität der Sensoroberfläche. Die Werte für die Dissoziationskonstante sowie für R_{max} wurden durch Auftragen der erhaltenen SPR-Gleichgewichtswerte (R_{eq}) gegen die verwendeten Analytkonzentrationen und eine nicht-lineare Kurvenanpassung dieser Sättigungskurve mit Hilfe des Programms OriginPro 8.6G (OriginLab) bestimmt.

Die Abbildung 49 zeigt die Berechnung der Dissoziationsbindungskonstanten aus den konzentrationsabhängigen Gleichgewichtsbindungen für die Positivkontrollmessung aus

3. Ergebnisse

Abbildung 48 A und B sowie für die Interaktion von RGMB an ActR-IIB gebundenes BMP-2 (Abbildung 48 G). In Tabelle 35 sind die Dissoziationsbindungskonstanten der RGMB/BMP-2 Komplexe aus den Coinjektionsinteraktionen mit den SPR-Daten für die Interaktion von RGMB mit immobilisiertem BMP-2 angegeben.

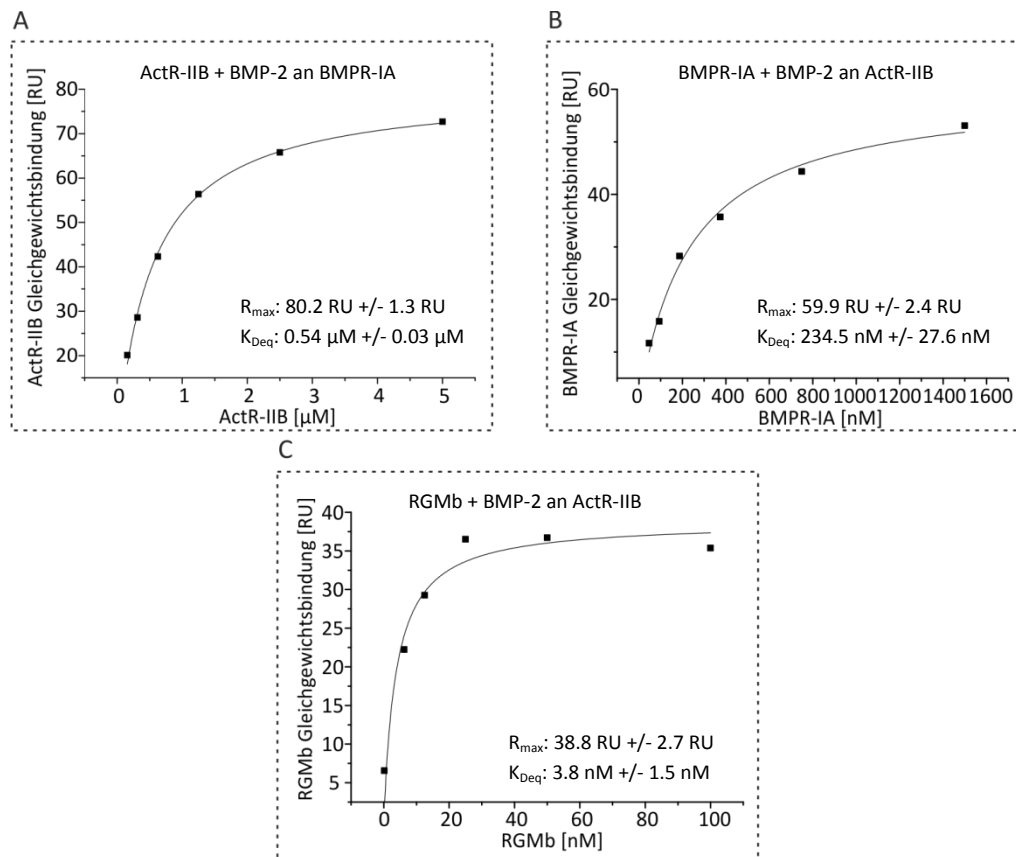


Abbildung 49: Analyse der Dissoziationsbindungskonstanten aus SPR-Coinjektionsstudien. Für die Ermittlung der Affinität wurde die dosisabhängige Gleichgewichtsbindung analysiert, hierfür wurden die SPR-Daten zu einem definierten Zeitpunkt gegen die eingesetzte Analytkonzentration aufgetragen. Ausführungen siehe Haupttext und Formel (9). A) Analyse der Bindungsparameter R_{max} sowie K_{Deq} der Coinjektion von ActR-IIB über BMPR-IA gebundenes BMP-2. B) Bestimmung von R_{max} sowie K_{Deq} der Coinjektion von BMPR-IA über ActR-IIB gebundenes BMP-2. C) Analyse von R_{max} sowie K_{Deq} der Coinjektion von RGMB über ActR-IIB gebundenes BMP-2.

Tabelle 35: Vergleich der Dissoziationsbindungskonstanten aus den Coinjektionsstudien von RGMB mit ActR-IIB gebundenem BMP-2 und der direkten Interaktion von RGMB und BMP-2. Die K_{Deq} der Interaktion von RGMB an immobilisiertes BMP-2 wurde mit Hilfe der ProteON Manager Software 2.1.2 (Version 2.1.2.05) bestimmt.

Ligand	Analyt	Ligand	Analyt
BMP-2 (ActR-IIB)	RGMB	BMP-2	RGMB
K_{Deq} [nM]	3.8 \pm 1.5	K_{Deq} [nM]	3.9 \pm 0.8

Der direkte Vergleich dieser Daten zeigt, dass sich die ermittelten Dissoziationsbindungskonstanten im Rahmen der Messgenauigkeit nicht voneinander

unterscheiden. Der lösliche RGMB Corezeptor bindet in diesen in vitro Interaktionsstudien mit unveränderter Bindungsaffinität sowohl an den isolierten Liganden, als auch an „gebundenes“ BMP-2, welches bereits an ActR-IIB assoziiert vorliegt.

Da eine Aktivierung des BMP-Signalwegs eine Heteroligomerisierung beider BMP Rezeptorsubtypen voraussetzt, kann aus den hier erhaltenen SPR Daten geschlossen werden, dass RGMB in seiner löslichen Form offenbar mit allen für BMP-2 verfügbaren Typ I Rezeptoren um die Ligandenbindung kompetiert. Die lösliche Form von RGMB könnte somit die Bildung eines ternären BMP-Ligand/Rezeptorkomplexes verhindern, indem die Bindung von BMP-2 an die für die Signalinitiation essentiellen Typ I Rezeptoren blockiert wird. Bezüglich der Einschränkung der Typ II Rezeptorbindung - von den Typ II Rezeptoren ist nur die Komplexbildung mit ActR-IIB möglich - ergeben sich außer der inhibitorischen Wirkung von RGMB weitergehende interessante Aspekte, z. B. eine potentielle Modulation des BMP-2 Signals durch Änderung der Typ II Rezeptorspezifität, die jedoch weiterer Untersuchungen bedarf.

In weiteren SPR-basierten Coinjektionsstudien wurde anschließend versucht, diese überraschenden Beobachtungen der Typ II Rezeptorspezifität zu verifizieren. Dazu wurden auch Liganden der GDF-Familie mit in diese weiterführenden Analysen einbezogen, um eine mögliche Ligandenspezifität für die oben beobachtete Selektivität hinsichtlich der BMP Typ II Rezeptorrekrutierung zu überprüfen. In einem modifizierten Versuchsaufbau wurden hierzu zunächst anstelle der BMP-Rezeptoren ausgewählte TGF- β Faktoren auf der Oberfläche des SPR-Sensors immobilisiert. Anschließend wurden durch Perfusion mit RGMB in sättigenden Konzentrationen transient die binären Komplexe von RGMB gebunden an BMP/GDF-Liganden auf der Sensoroberfläche erzeugt. In einem anschließenden Coinjektionsexperiment wurde dann die Rezeptortodomäne des BMP Rezeptors ActR-IIB als Analyt in verschiedenen Konzentrationen über diesen transient erzeugten BMP/GDF-RGMB Komplex perfundiert. Die Ergebnisse dieser Coinjektionsanalysen sind in Abbildung 50 wiedergegeben.

Um die Bindungseigenschaften der immobilisierten Liganden zu testen, wurde zunächst ActR-IIB über die auf dem Biosensor immobilisierten Wachstumsfaktoren perfundiert und so transient die entsprechenden binären BMP/GDF Typ II Rezeptorkomplexe gebildet. Eine zweite Kontrollmessung, bei welcher der Typ I Rezeptor coinjiziert wird, um eventuell auf diese Weise die kompetitive Inhibition der Typ I Rezeptorinteraktion durch RGMB auf komplementäre Weise zeigen zu können, konnte aufgrund der schnellen Dissoziationsrate der ActR-IIB/Ligand-Interaktionen nicht durchgeführt werden. Für eine semiquantitative Auswertung erfolgte wie oben beschrieben eine Normierung der Coinjektionsdaten auf die Gleichgewichtswerte der SPR-Signale unmittelbar vor Perfusion der Rezeptoren.

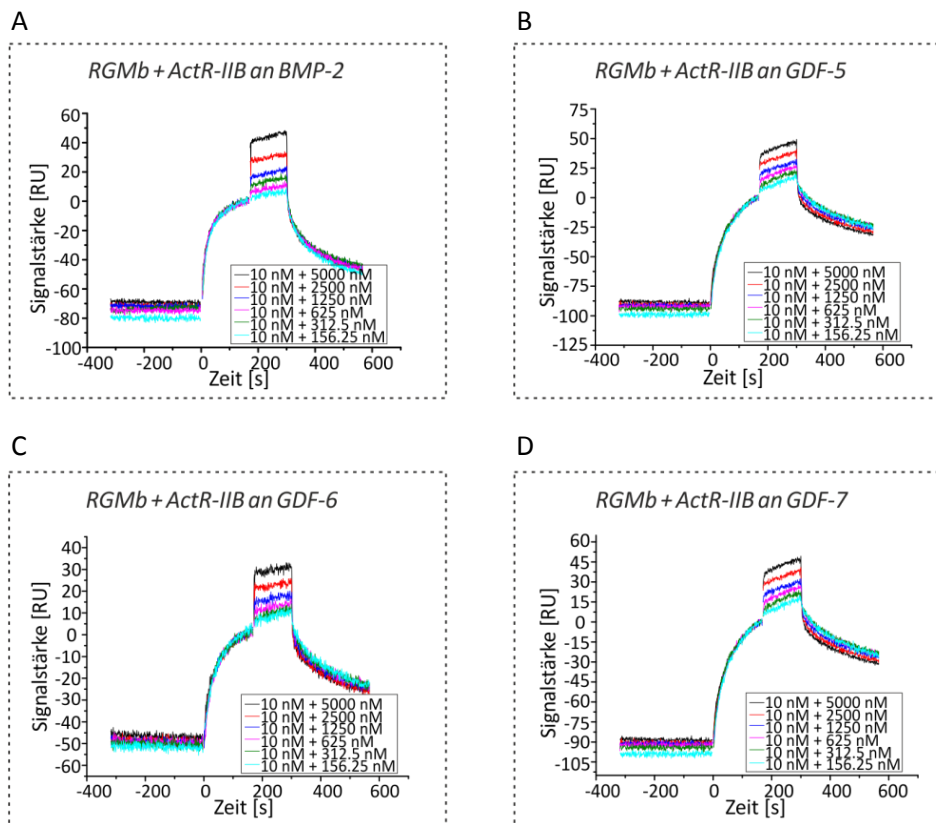


Abbildung 50: Plasmonresonanzanalyse der Bindung von ActR-IIB an RGMB $_{\Delta Ncys}$ -gebundene BMP-/GDF-Liganden. Hierzu wurden Coinjektionsstudien von ActR-IIB und RGMB $_{\Delta Ncys}$ an Biosensoren mit immobilisierten BMP-/GDF-Liganden durchgeführt. Ab dem Zeitpunkt $t = 0$ s wurde bei einer Flussrate von $75 \mu\text{l min}^{-1}$ für 160 s eine konstante Konzentration von RGMB $_{\Delta Ncys}$ (10 nM) über die Rezeptorsensoroberfläche geleitet, um so den binären Corezeptor/BMP-/GDF-Ligandkomplex zu bilden. Ab dem Zeitpunkt $t = 160$ s wurde der transient gebildete binäre Ligand/Corezeptorkomplex für 133 s und bei einer Flussrate von $75 \mu\text{l min}^{-1}$ mit verschiedenen Konzentrationen von ActR-IIB (Analytkonzentrationen von 156,25 bis 5000 nM) in Gegenwart von 10 nM RGMB $_{\Delta Ncys}$ überspült. Ab dem Zeitpunkt $t = 293$ s wurde der Biosensor mit Puffer perfundiert. Die einzelnen Sensogramme der BMP-Typ II Rezeptor-Konzentrationsreihen wurden auf den Gleichgewichtswert nach der Sättigung der Rezeptorbindestellen mit RGMB $_{\Delta Ncys}$ unmittelbar vor der Perfusion der Rezeptorektodomänen gemittelt. A) Coinjektion von RGMB $_{\Delta Ncys}$ plus ActR-IIB an eine mit BMP-2 funktionalisierte Sensoroberfläche. B) Coinjektion von RGMB $_{\Delta Ncys}$ plus ActR-IIB an eine mit GDF-5 funktionalisierte Sensoroberfläche. C) Coinjektion von RGMB $_{\Delta Ncys}$ plus ActR-IIB an eine mit GDF-6 funktionalisierte Sensoroberfläche. D) Coinjektion von RGMB $_{\Delta Ncys}$ plus ActR-IIB an eine mit GDF-7 funktionalisierte Sensoroberfläche.

Die Abbildung 50 A - D zeigen, dass in der Tat verschiedene BMP- und GDF-Liganden gleichzeitig an RGMB und ActR-IIB binden können und die veränderte Typ II Rezeptorselektivität nicht ausschließlich für BMP-2 gilt. Die Ergebnisse einer semiquantitativen Auswertung der Bindungsaffinitäten für die ActR-IIB Bindung an die Ligand/RGMB Komplexe durch Analyse der dosisabhängigen Gleichgewichtsbindung sind in Abbildung 51 sowie in Tabelle 36 dargestellt.

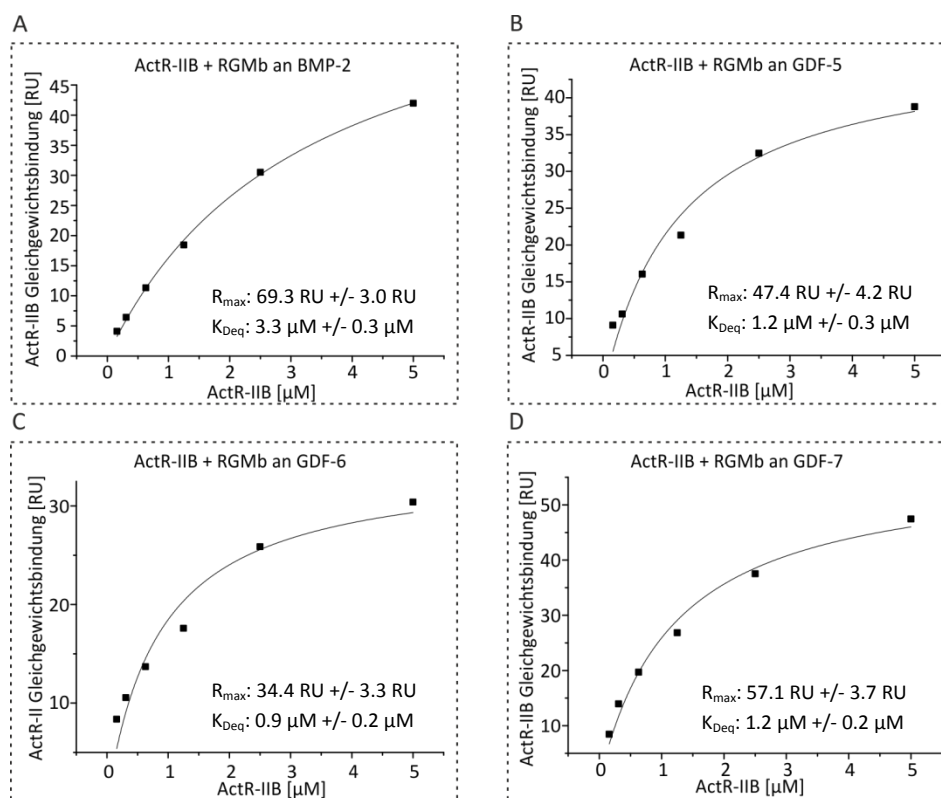


Abbildung 51: Analyse der Dissoziationsbindungskonstanten aus SPR-Coinjektionsstudien. Für die Ermittlung der Affinität wurde die dosisabhängige Gleichgewichtsbindung analysiert, hierfür wurden die SPR-Daten zu einem definierten Zeitpunkt gegen die eingesetzte Analytkonzentration aufgetragen. Ausführungen siehe Haupttext und Formel (9). A) Analyse der Bindungsparameter R_{max} sowie K_{Deq} der Coinjektion von ActR-IIB an RGMB gebundenes BMP-2. B) Bestimmung von R_{max} sowie K_{Deq} der Coinjektion von von ActR-IIB an RGMB gebundenes GDF-5. C) Analyse von R_{max} sowie K_{Deq} der Coinjektion von ActR-IIB an RGMB gebundenes GDF-6. D) Bestimmung von R_{max} sowie K_{Deq} der Coinjektion von ActR-IIB an RGMB gebundenes GDF-7.

Tabelle 36: Vergleich der Dissoziationsbindungskonstanten aus den Coinjektionsstudien von ActR-IIB an RGMB- bzw. BMPR-IA-gebundene (kursiv, ^{*1}) Liganden und den direkten Wechselwirkungen von ActR-IIB mit immobilisierten Liganden aus eigenen sowie veröffentlichten (kursiv, ^{*2}) Daten. Die Gleichgewichtsbindungskonstante K_{Deq} der direkten Interaktionen von ActR-IIB mit immobilisierten Liganden wurde mit Hilfe der ProteON Manager Software (Version 2.1.2.05) bestimmt. Mit ^{*1} bzw. ^{*2}-markierte Werte wurden aus (Heinecke, K. et al. 2009) entnommen.

Ligand + RGMB	Analyt	Ligand + BMPR-IA	Analyt	Ligand	Analyt	
BMP-2/RGMB	ActR-IIB	BMP-2/BMPR-IA	ActR-IIB ^{*1}	BMP-2	ActR-IIB	ActR-IIB ^{*2}
K_{Deq} [μM]	3.3 +/- 0.3	K_{Deq} [μM]	2.8 +/- 0.4	K_{Deq} [μM]	1.8 +/- 0.7	3.1 +/- 0.5
GDF-5/RGMB	ActR-IIB	GDF-5/BMPR-IA	ActR-IIB ^{*1}	GDF-5	ActR-IIB	ActR-IIB ^{*2}
K_{Deq} [μM]	1.2 +/- 0.3	K_{Deq} [μM]	2.9 +/- 0.3	K_{Deq} [μM]	1.1 +/- 0.3	4.7 +/- 0.7
GDF-6/RGMB	ActR-IIB			GDF-6	ActR-IIB	
K_{Deq} [μM]	0.9 +/- 0.2			K_{Deq} [μM]	1.8 +/- 0.01	
GDF-7/RGMB	ActR-IIB			GDF-7	ActR-IIB	
K_{Deq} [μM]	1.2 +/- 0.2			K_{Deq} [μM]	1.1 +/- 0.3	

3. Ergebnisse

Ein Vergleich der eigenen Messungen mit Literaturdaten zeigt ähnliche Gleichgewichtsbindungskonstanten K_{Deq} für die Bindung von ActR-IIB an freies BMP-2 (Tabelle 36 Spalte 5 und 6, 1.8 μM bzw. 3.1 μM , ^{*2}; (Heinecke, K. et al. 2009)) beziehungsweise an freies GDF-5 (Tabelle 36, 1.1 μM bzw. 4.7 μM , ^{*2}; (Heinecke, K. et al. 2009)). Die ermittelten Affinitäten der ActR-IIB/Ligand Interaktion ändern sich weder in Anwesenheit des Typ I Rezeptors BMPR-IA (Tabelle 36 Spalte 3 und 4, ^{*1}, BMP-2: 2.8 μM , GDF-5: 2.9 μM ; (Heinecke, K. et al. 2009)), noch in Gegenwart des Corezeptors RGMb (Tabelle 36 Spalte 1 und 2, BMP-2: 3.3 μM , GDF-5: 1.2 μM). Diese Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Bindung von RGMb und ActR-IIB an die Wachstumsfaktoren keine Änderung der Bindungsaffinität hervorruft und somit kein kooperativer Bindungsmechanismus zwischen RGMb und den BMP-Rezeptoren vorliegt.

Die bisher erhobenen SPR Daten, insbesondere die aus den Coinjektionsmessungen, deuten an, dass die Interaktion von RGMb mit BMP-/GDF-Liganden eine vollständige möglicherweise sterische Blockade des Typ I Rezeptorbindeepitops verursacht (siehe Abbildung 48). Darüber hinaus weisen sie darauf hin, dass binäre BMP-/GDF-Ligand/RGMb-Komplexe eine sehr hohe Selektivität für bestimmte Typ II Rezeptoren aufweisen (siehe Abbildung 48 und Abbildung 50). Die "freien" oder an einen Typ I Rezeptor gebundenen Liganden BMP-2 oder GDF-5 haben für alle drei verwendeten Typ II Rezeptoren BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB ähnliche Bindungsaffinitäten und zeigen somit keine durch die Typ I Rezeptorbindung beeinflusste Typ II Rezeptorselektivität (siehe Tabelle 37; (Heinecke, K. et al. 2009)).

Tabelle 37: Dissoziationsbindungskonstanten der Interaktionen der "freien" sowie BMPR-IA gebundenen BMP-Liganden mit den Typ II Rezeptoren ActR-IIB, ActR-II sowie BMPR-II. Die Daten wurden aus (Heinecke, K. et al. 2009) entnommen.

Ligand + BMPR-IA	Analyt		
BMP-2 (BMPR-IA)	ActR-IIB	ActR-II	BMPR-II
K_{Deq} [μM]	2.8 +/- 0.4	4.2 +/- 0.7	22 +/- 6.2
GDF-5 (BMPR-IA)	ActR-IIB	ActR-II	BMPR-II
K_{Deq} [μM]	2.9 +/- 0.3	20 +/- 3.7	32 +/- 5.6
"freier" Ligand	Analyt		
BMP-2	ActR-IIB	ActR-II	BMPR-II
K_{Deq} [μM]	3.1 +/- 0.5	3.8 +/- 0.6	13 +/- 2.5
GDF-5	ActR-IIB	ActR-II	BMPR-II
K_{Deq} [μM]	4.7 +/- 0.7	22 +/- 2.4	60 +/- 9.6

Hingegen kann ein aus BMP-2 und löslichem RGMb bestehender Ligand-Corezeptor Komplex in vitro lediglich mit dem Typ II Rezeptor ActR-IIB, nicht aber mit den Rezeptoren BMPR-II oder

ActR-II interagieren (Abbildung 48). Auch hier wird die Affinität der BMP-2/RGMB Interaktion nicht durch die Anwesenheit des Typ II Rezeptors beeinflusst (siehe Tabelle 35). Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der Coinjektionsversuche daraufhin, dass die Selektivität gegenüber einer Interaktion der hier analysierten BMP/GDF-Liganden mit ActR-IIB in Gegenwart von RGMB nicht auf kooperative Effekte durch die Ligand/RGMB Wechselwirkung zurückzuführen ist, sondern dass die Interaktionen mit ActR-II und BMPR-II sehr wahrscheinlich rein sterisch gehemmt werden.

In der Literatur wurden in der Nierenzelllinie mIMCD3 mittels siRNA-basierter spezifischer Inhibition der Typ II Rezeptor-Genexpression ebenfalls RGMB-induzierte Änderungen der BMP-eigenen Typ II Rezeptorselektivität beschrieben (Xia, Y. et al. 2010). Allerdings wurde hier nach Interaktion von RGMB mit BMP-4 eine verstärkte Signalweiterleitung über den Typ II Rezeptor ActR-II zusätzlich zu dem endogen in dieser Zelllinie hauptsächlich genutzten BMPR-II gezeigt (Xia, Y. et al. 2010). Daher wurde in einem weiteren SPR-basierten Ansatz die Selektivität hinsichtlich der Widersprüche zu den Literaturdaten überprüft. Zunächst wurden die Ektodomänen verschiedener BMP Typ I und Typ II Rezeptoren mittels Kopplung ihrer primären Aminogruppen in einer Dichte von je etwa 300 RU kovalent auf der Oberfläche eines SPR-Sensors immobilisiert. Anschließend wurden diese mit den Rezeptorektodomänen funktionalisierten Sensoroberflächen mit einer definierten Konzentration des Liganden BMP-2 (200 nM) überspült und die Intensität des mit dieser Konzentration erhaltenen SPR-Signals bestimmt. Nach Regeneration wurde dann der Biosensor mit einer BMP-2 Lösung derselben Konzentration perfundiert, der jedoch eine definierte Konzentration der löslichen Form von RGMB (siehe Abbildung 52) zugefügt war. Hierbei wurden verschiedene molare stöchiometrische Konzentrationsverhältnisse für BMP-2 und RGMB getestet (1:2, 1:6 und 1:14). Aus der ersten Interaktionsmessung konnte so das für die Interaktion von BMP-2 mit dem jeweiligen Rezeptor zu erwartende maximale SPR-Signal ermittelt werden. In den nachfolgenden Messungen wurde durch einen hohen molaren Überschuss von RGMB unter Annahme einer 1:2 (BMP-2 : RGMB) Bindungsstöchiometrie ein Großteil des BMP-2 in einen binären BMP-2/RGMB Komplex überführt, dessen Bindungseigenschaften aus den vorangegangenen SPR-Experimenten bekannt sind bzw. abgeschätzt werden können.

Kann die jeweilige Rezeptorektodomäne lediglich freies BMP-2, nicht jedoch den BMP-2/RGMB-Komplex binden, so kommt es durch die Komplexbildung mit dem Corezeptor zu einer Erniedrigung der freien BMP-2 Konzentration. Dadurch wird die effektive BMP-2 Konzentration gesenkt und die Intensität des SPR-Signals nimmt bei der Messung in Gegenwart von RGMB ab oder wird vollständig auf Null reduziert. Vermag jedoch der Rezeptor auch den Komplex zu

3. Ergebnisse

binden, so sollte die Intensität des SPR-Signals aufgrund des höheren Molekulargewichts für den BMP-2/RGMB Komplex im Vergleich zu reinem BMP-2 gegenüber der Referenzmessung mit BMP-2 in jedem Fall zunehmen.

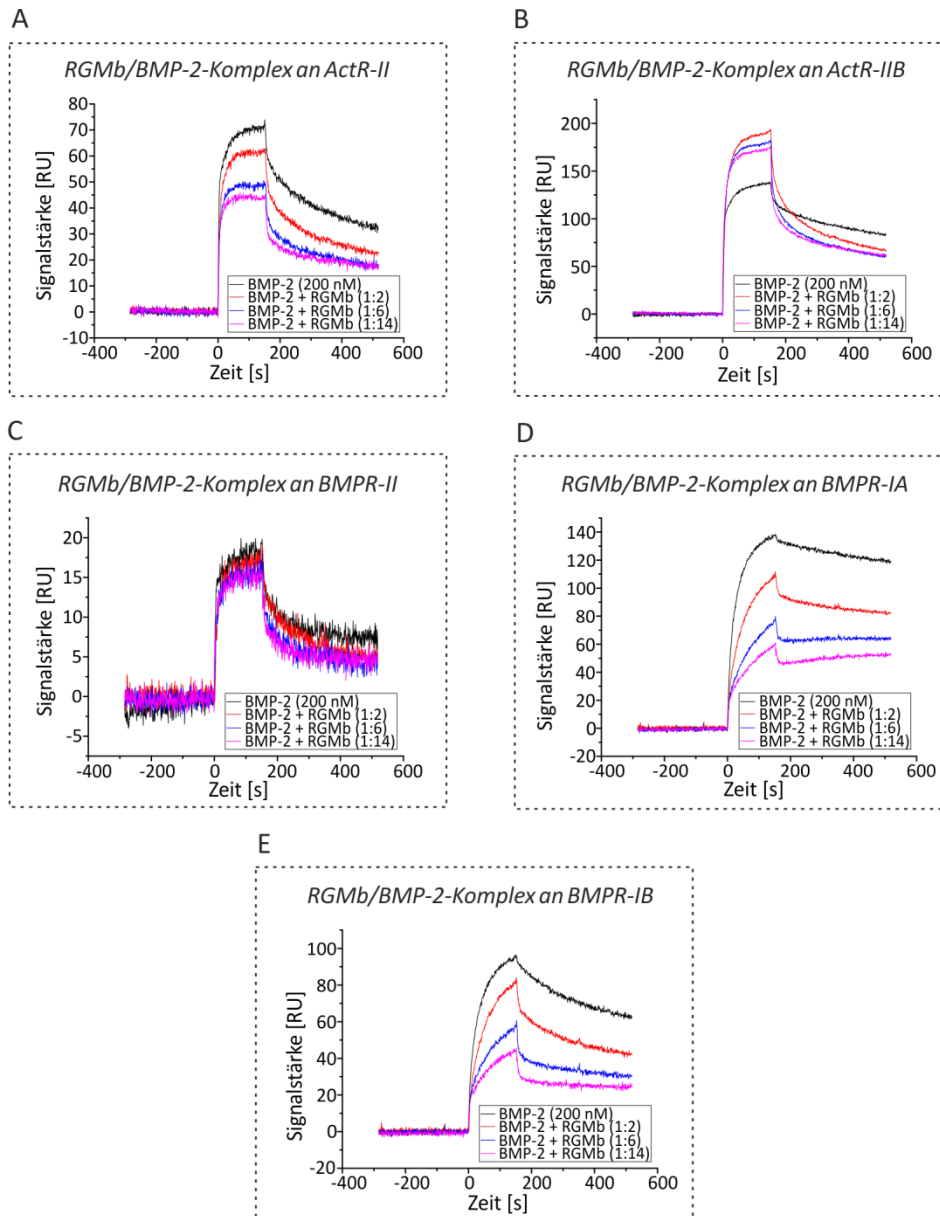


Abbildung 52: Plasmonresonanzanalyse der Interaktion von BMP-2 bzw. BMP-2/RGMB-Komplexen mit den Ektodomänen der BMP-Rezeptoren ActR-II (A), ActR-IIB (B), BMPR-II (C), BMPR-IA (D) und BMPR-IB (E). Das schwarz gekennzeichnete SPR-Sensogramm gibt die Interaktion von 200 nM BMP-2 mit den auf der Sensoroberfläche immobilisierten Rezeptorektodomänen wieder. Die übrigen SPR-Sensogramme wurden durch Perfusion von 200 nM BMP-2 zusammen mit 400 nM (molare Stöchiometrie 1:2, rot), 1200 nM (molare Stöchiometrie 1:6, blau) oder 2800 nM (molare Stöchiometrie 1:14, magenta) der löslichen Form von RGMB erhalten.

Wie aus der Abbildung 52 ersichtlich, wird für die BMP-2-spezifischen Typ I-Rezeptoren sowie für den Typ II-Rezeptor ActR-II, nicht aber für ActR-IIB, ein erniedrigtes SPR-Signal bei Perfusion mit dem BMP-2/RGMB-Komplex verglichen mit dem „freien“ BMP-2-Analyten beobachtet. Dieses

Experiment deutet demnach für die Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB, aber auch für den Typ II Rezeptor ActR-II darauf hin, dass eine gleichzeitige Bindung von BMP-2 an diese Rezeptortodomänen und an RGMB nicht möglich zu sein scheint. Darüber hinaus sinkt das SPR-Signal jeweils mit steigenden RGMB zu BMP-2 Verhältnissen, also mit abnehmenden Konzentrationen für das freie BMP-2. Auch die Dissoziationsraten scheinen in Anwesenheit des Corezeptors biphasischer zu verlaufen (vgl. BMP-2 und BMP-2:RGMB 1:2, 1:6 und 1:14 in Abbildung 52 A, D, E). Eine Besonderheit zeigt sich in diesem Zusammenhang für den Typ II Rezeptor BMPR-II, da hier zwar keine Zunahme, jedoch auch nur eine minimale (möglicherweise nicht signifikante) Abnahme des SPR-Signals in Anwesenheit des löslichen RGMB-Proteins zu verzeichnen war (Abbildung 52 C). Da in diesem Fall jedoch das Signal zu Rausch-Verhältnis aufgrund der schwachen BMP-2/BMPR-II Wechselwirkung sehr niedrig ist, müssen weitere Studien die Beeinflussung dieser Interaktion durch RGMB klären. Hierzu wären insbesondere hochauflösende mikroskopische Analysen, wie zum Beispiel FRET-Studien, geeignet. Demgegenüber ist bei Perfusion eines BMP-2/RGMB Komplexes über einen mit ActR-IIB beschichteten Biosensor eine eindeutige Zunahme des SPR-Signals zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass der BMP-2:RGMB Komplex im Gegensatz zu den anderen getesteten TGF- β Rezeptoren effektiv an den Typ II Rezeptor ActR-IIB binden kann. Bei Betrachtung der verschiedenen RGMB zu BMP-2 Verhältnisse wird deutlich, dass für alle BMP-2:RGMB Stöchiometrien nahezu identische SPR Amplituden bei gleichzeitiger Interaktion mit ActR-IIB beobachtet werden konnten (vgl. 1:2, 1:6 und 1:14 in Abbildung 52 B). Die Bindungskinetik der BMP-2/ActR-IIB-Wechselwirkung ändert sich möglicherweise aber auch in diesem Fall in Gegenwart des Corezeptors, da vor allem bei Betrachtung der Dissoziationsraten ein biphasischer Verlauf verglichen mit der Interaktion von BMP-2 mit diesem Typ II Rezeptor alleine deutlich wird. Das Auftreten dieser biphasischen SPR-Signale bei allen Messungen weist auf Änderungen in den Interaktionskinetiken der BMP/Rezeptor-Komplexe in Gegenwart von RGMB hin. Diese könnte durch Dissoziationen der Ligand/Corezeptor-Interaktionen verursacht werden, da der dadurch wieder unkomplexiert vorliegende Ligand mit den immobilisierten Rezeptortodomänen wechselwirken und so die entsprechenden Dissoziationsraten scheinbar verzögern könnte.

In den zellbasierten Hemmstudien unter Verwendung von C2C12 (siehe Abschnitt 3.3.1, Abbildung 36) bzw. C3H10T1/2 Zellen (siehe Abschnitt 3.3.1, Abbildung 38) konnte das BMP-abhängige Signal ab einer RGMB-Konzentration entsprechend dem 10fachen IC_{50} -Wert auf den Hintergrundwert abgesenkt werden. Hingegen zeigt sich in den hier dargestellten Oberflächen-Plasmonresonanzstudien trotz eines 7fachen Überschusses (unter Annahme einer Bindung von zwei RGMB-Molekülen an ein BMP-2 Homodimer) von RGMB keine vollständige Inhibition der

3. Ergebnisse

SPR-Signale an den immobilisierten Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II sowie ActR-II. Folglich konnte in diesen *in vitro* Bindungsstudien ungeachtet der hohen Affinität der RGMB/BMP-2 Interaktion ($K_{Deq} = 3.9$ nM, siehe Tabelle 35) der Wachstumsfaktor scheinbar nicht vollständig in einen binären Komplex mit dem Corezeptor gebracht werden. Die IC_{50} -Werte der zellbasierten Studien sowohl mit C2C12- (136 nM) als auch mit C3H10T1/2-Zellen (40.8 nM) zeigen jedoch wesentlich höhere Konzentrationen, als aus den Bindungsaffinitäten der BMP-2/Corezeptor Interaktion zu erwarten sind. Hieraus könnte sich als Ursache für die hier beobachteten SPR-Effekte ableiten, dass in den zellbasierten Studien möglicherweise Interaktionen von RGMB mit der extrazellulären Matrix oder noch unbekanntem endogen exprimierten löslichen oder membranverankerten Modulatoren/Rezeptoren die Konzentration des löslichen Corezeptors herabsetzen und somit die höheren halbmaximalen Inhibitions-konzentrationen hervorrufen.

Eine Möglichkeit die theoretisch in den durchgeführten SPR-Studien zu erwartenden Konzentrationen an freiem BMP-2 abzuschätzen bietet die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes ($A + 2 B \leftrightarrow AB + B \leftrightarrow AB_2$) unter Annahme eines 1:2 Komplexes (ein Liganden-Dimer mit zwei Corezeptoren). Durch Einsetzen der Werte für die Dissoziationsbindungskonstante der RGMB/BMP-2 Interaktion (K_D , etwa 4 nM) sowie der eingesetzten BMP-2 (C_A , 200 nM) und RGMB (C_B , 400, 1200, 2800 nM) Konzentrationen in Formel 12 und 13 erhält man so die Konzentration des Corezeptor/Ligand-Komplexes (C_{AB}). Daraus kann dann im Umkehrschluss auch die rechnerisch anzunehmende, unkomplexiert vorliegende Menge an freiem BMP-2 prognostiziert werden:

$$C_{AB} = \frac{(C_A - x) \times (C_B - x)}{K_D^{(B/AB)}} \quad ; \quad C_{AB_2} = \frac{(C_{AB} - x) \times (C_B - x)}{K_D^{(B/AB_2)}} \quad (10); (11)$$

durch Umformung erhält man:

$$C_{AB} = \frac{x^2 - (C_A + C_B)x + (C_A \times C_B)}{K_D^{(B/AB)}} \quad ; \quad C_{AB_2} = \frac{x^2 - (C_{AB} + C_B)x + (C_{AB} \times C_B)}{K_D^{(B/AB_2)}} \quad (12); (13)$$

Die Lösung der quadratischen Gleichung ergibt bereits für das stöchiometrische Verhältnis von einem Molekül BMP-2 zu zwei Molekülen RGMB (1:2, kein RGMB Überschuss) eine theoretisch maximal zu erwartende freie Konzentration des Wachstumsfaktors von nur etwa 7.6 nM ($\cong 3.8\%$) [1:6, 3facher RGMB Überschuss = 3.6 nM ($\cong 1.8\%$); 1:14, 7facher RGMB Überschuss = 0.6 nM ($\cong 0.3\%$)]. Der Vergleich mit Abbildung 52 zeigt, dass in den hier präsentierten SPR-Studien andere Verhältnisse vorliegen müssen. So werden in Gegenwart des jeweils höchsten RGMB Überschusses die Interaktionen von BMP-2 mit den Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB auf etwa 36% bzw. 40% des Ausgangswertes herabgesetzt, während die BMP-2/ActR-II

Wechselwirkung auf nur circa 60% des ursprünglichen BMP-2 Signals sinkt. Diese Abweichungen von den rechnerischen abgeschätzten Werten leiten sich vermutlich aus dem äußerst komplexen Messaufbau dieser Bindungsstudien ab. Die Interaktion des Corezeptors RGMb mit BMP-2 zeichnet sich zwar durch eine hohe Affinität aus, diese resultiert jedoch kinetisch aus sehr schnellen Assoziations- und auch Dissoziationsraten (siehe auch 3.2.2). Dies lässt auf eine begrenzte Stabilität des Corezeptor/Ligand Komplexes in Lösung schließen. Hieraus ergibt sich neben der eigentlichen Interaktionskinetik des Komplexes mit den immobilisierten Rezeptortodomänen noch eine zusätzliche Dynamik aus der Dissoziation des RGMb/BMP-2 Komplexes innerhalb des Messzyklusses. Dadurch könnten in Lösung Mischverhältnisse von Komplexen aus einem BMP-2 Dimer sowie einem (1:1 Verhältnis) oder zwei RGMb-Molekülen (1:2) sowie auch eine wesentlich höhere als mathematisch abgeschätzte freie BMP-2 Konzentration vorliegen. Unter der Annahme einer vollständigen Blockade der Typ I Rezeptor-Wechselwirkung sowie einer peripheren sterischen Hemmung der Typ II Rezeptorbindung durch RGMb könnte ein 1:2 Ligand/Corezeptor Komplex weder mit den Typ I Rezeptoren, noch mit den Typ II Rezeptoren ActR-II und BMPR-II interagieren. Jedoch wäre für eine 1:1 Interaktionen denkbar, dass jeweils ein Rezeptorbindeepitop des Liganden-Dimers zugänglich verbleibt und zusätzlich zu frei in Lösung vorliegendem BMP-2 an die immobilisierten Rezeptortodomänen binden kann. Diese Mischsituationen könnten - in Kombination mit den unterschiedlichen Molekulargewichten von freiem BMP-2 sowie 1:1 Ligand/Corezeptor-Komplexen - die biphasischen Verläufe der SPR-Signale verursachen und auch die unvollständige Hemmung durch nicht-dissoziierte 1:2 BMP-2/RGM-Komplex begründen.

Zusammengefasst lässt sich aus diesen in vitro Coinjektionsstudien schlussfolgern, dass in Anwesenheit von RGMb eine gleichzeitige Bindung des Liganden an den Corezeptor sowie an die Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB beziehungsweise an die Typ II Rezeptoren BMPR-II und ActR-II sehr wahrscheinlich ausgeschlossen ist. Ermöglicht wird dagegen einzig eine Interaktion des Ligand/RGMb Komplexes mit dem Typ II Rezeptor ActR-IIB (vgl. Abbildung 48, Abbildung 50 und Abbildung 52). Weiterhin weisen die Coinjektionsmessungen zusammen mit den BMP-2/RGMb Komplexstudien darauf hin, dass die Wechselwirkung von RGMb mit BMP-2 die Affinität des Wachstumsfaktors zu dem Typ II Rezeptor ActR-IIB nicht verstärkt (vgl. Abbildung 50, Abbildung 51, Tabelle 36 und Abbildung 52) und somit keine Kooperativität vorliegt.

3.4.3. DER COREZEPTOR RGMb SOWIE DIE BMP TYP I UND TYP II REZEPTOREN NUTZEN

UNTERSCHIEDLICHE HAUPTBINDEDETERMINANTEN DES BMP-2 LIGANDEN

Basierend auf den Ergebnissen der Coinjektionsstudien (siehe 3.4.2) sowie der zellbasierten BMP-Hemmversuche (siehe 3.3.1) konnte gezeigt werden, dass RGMb die Typ I Rezeptorbindung der BMP- und GDF-Liganden sterisch blockiert. Aufgrund der beobachteten Selektivität des RGMb/BMP-2 Komplexes für den Typ II Rezeptor ActR-IIB muss die Binderegion des Corezeptors darüber hinaus auch teilweise (wahrscheinlich in der Peripherie) mit der der Typ II Rezeptoren interferieren, während der Kernbereich dieser Ligand/Typ II Rezeptorwechselwirkungen jedoch unbeeinflusst bleiben sollte. Im Folgenden wurde daher unter Verwendung spezieller BMP-2 Varianten durch Oberflächen-Plasmonresonanzmessungen (2.11) einerseits analysiert, ob RGMb möglicherweise die gleichen Bindedeterminanten verglichen mit der BMP-2/Typ I Rezeptorinteraktion benutzt und dies ursächlich für die Blockade der Typ I Rezeptorbindung sein könnte. Zum anderen fanden BMP-2 Varianten Verwendung, welche über Punktmutationen in dem Kernbereich der Ligand/Typ II Rezeptorwechselwirkung verfügen. Nach dem bisherigen Ergebnisstand sollten diese Mutationen hingegen keine Auswirkung auf die Wechselwirkung des Wachstumsfaktors mit RGMb haben.

Die beiden gleichzeitig in BMP-2 vorhandenen Punktmutationen L100K und N102D (BMP-2L100K/N102D) konvertieren die niederaffine Wechselwirkung des Liganden mit dem Typ II Rezeptor ActR-IIB in eine hochaffine, mit der Activin A/ActR-II vergleichbare Interaktion (Weber, D. et al. 2007). Hingegen werden die Varianten BMP-2L51P sowie BMP-2A34D/L51P durch die Deletion von Hauptbindedeterminanten charakterisiert, die für eine hochaffine Interaktion des Liganden mit den Typ I Rezeptoren (L51P, (Keller, S. et al. 2004)) bzw. mit den Typ II Rezeptoren (A34D, (Kirsch, T. et al. 2000a; Weber, D. et al. 2007)) essentiell sind.

Zunächst wurden die unterschiedlichen BMP-2 Varianten sowie wildtypisches BMP-2 in einer Dichte von 550 bis 600 (wt, L100K/N102D) bzw. 410 bis 450 (L51P, A34D/L51P) RU mittels der direkten kovalenten Kopplung primärer Aminogruppen (2.11) auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Das Corezeptorprotein RGMb wurde hier als Analyt in sechs verschiedenen Konzentrationen in einem Pufferstrom über den Biosensor perfundiert. Die Bindungsaktivität der Liganden wurde nach der Immobilisierung durch Referenzmessungen mit den entsprechenden hochaffinen Rezeptoren BMPRI-A sowie ActR-IIB überprüft. Um mögliche Interaktionen des Corezeptors mit der Sensormatrix auszugleichen, wurden die unspezifischen Interaktionen des Analyten mit einem Leerkanal von den erhaltenen Interaktionsdaten subtrahiert. Die kinetischen Daten wurden anschließend mit der ProteON Manager Software (Version 2.1.2.05) ermittelt und mit Hilfe des Modells für heterogene Liganden ausgewertet.

Repräsentative Ergebnisse dieser in vitro Bindungsstudien sind in Abbildung 53 dargestellt, die kinetischen Parameter sowie die ermittelten Affinitäten sind in Tabelle 38 zusammengefasst. Erwartungsgemäß weisen die Interaktionen des Corezeptors mit BMP-2 Varianten, welche über Mutationen innerhalb des Kernbereiches der Ligand/Typ II Rezeptorwechselwirkung (L100K/N102D; A34D/L51P) verfügen, verglichen mit wildtypischem BMP-2 keine Unterschiede auf.

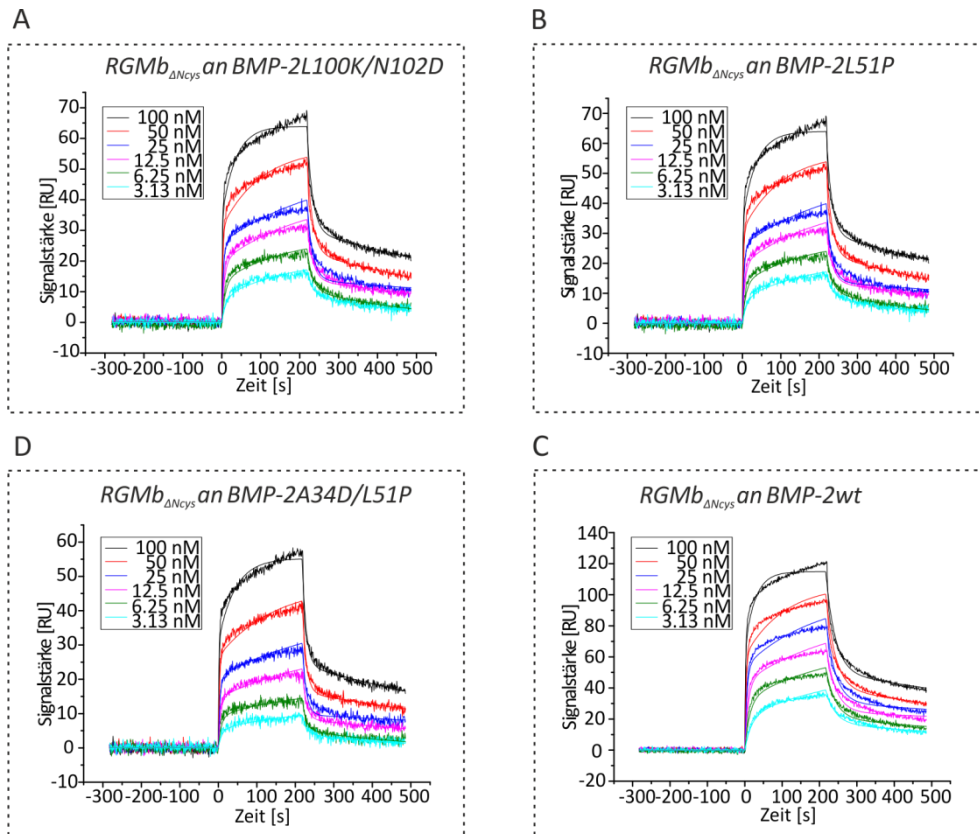


Abbildung 53: Oberflächen-Plasmonresonanzanalyse der Interaktionen von RGMb_{ΔNcys} mit BMP-2 Varianten. Die Konzentrationen des Analyten RGMb_{ΔNcys} sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen angegeben. Die Daten wurden mit Hilfe des Modells für heterogene Liganden mit der ProteON Manager Software (Version 2.1.2.05) evaluiert.

Tabelle 38: Ermittelte kinetische Parameter (k_a , k_d und K_D) sowie Dissoziationsbindungskonstanten aus den Gleichgewichtsbindungen (K_{Deq}) der Interaktionen von RGMb_{ΔNcys} mit den immobilisierten BMP-2 Varianten.

	$k_a \times 10^5 [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d \times 10^{-3} [s^{-1}]$	$K_D [nM]$	$K_{Deq} [nM]$
BMP-2wt	3.4 +/- 1.9	0.9 +/- 0.3	3.1 +/- 1.5	10.9
BMP-2L100K/N102D	2.4 +/- 1.3	2.6 +/- 1.1	11.2 +/- 3.1	31.8
BMP-2L51P	3.3 +/- 2.1	2.0 +/- 1.0	6.5 +/- 1.9	18.3
BMP-2A34D/L51P	2.1 +/- 1.1	2.2 +/- 1.4	10.0 +/- 2.9	33.5

Diese Ergebnisse unterstützen die auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten basierende Annahme, dass die RGMB/Ligand-Interaktion nicht mit den Hauptbindeterminanten der Typ II Rezeptorbindung überlappt und die Typ II Rezeptorselektivität durch eine periphere sterische Beeinflussung des Typ II Rezeptorbindeepitops verursacht wird. Die Wechselwirkungen des Corezeptors mit den BMP-2 Varianten, welche über die Mutation einer Hauptbindeterminanten der Typ I Rezeptorinteraktion (L51P) verfügen (BMP-2L51P; BMP-2A34D/L51P), zeigen ebenfalls mit Wildtyp-BMP-2 vergleichbare kinetische Parameter. Auch die erhaltenen Affinitäten lassen keine prägnanten Unterschiede zu wildtypischem BMP-2 erkennen. Daher müssen andere RGMB/BMP-2 Wechselwirkungen innerhalb des Typ I Rezeptorbindeepitops der BMP-Liganden für die beobachtete Typ I Rezeptorblockade verantwortlich zeichnen.

Eine umfangreiche Mutationsanalyse basierend auf der BMP-2 Struktur oder aber die strukturelle Aufklärung eines BMP-Liganden im Komplex mit RGMB könnte in zukünftigen Arbeiten Aufschluss über das RGMB-spezifische Bindeepitop und die vorliegenden Hauptbindeterminanten liefern. Basierend auf diesen Ergebnissen könnten die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der sterischen Hemmung der Ligand/Typ I Rezeptorinteraktion in Gegenwart des Corezeptors RGMB sowie auch der in dieser Arbeit nachgewiesenen Selektivität gegenüber des Typ II Rezeptors ActR-IIB gezeigt werden.

4. DISKUSSION

Die Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie und ihre Regulation

Die BMP-Liganden umfassen eine evolutionär hochkonservierte Gruppe multifunktionaler Wachstumsfaktoren und bilden die größte Untergruppe der TGF- β Superfamilie (für Übersichtsartikel: (Heldin, C.H. et al. 1997; Massague, J. 1998; Newfeld, S.J. et al. 1999)). Sie steuern eine Vielzahl zentraler zellulärer Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie Chemotaxis und regulieren Zellwachstum auch über ihre Beteiligung an apoptotischen Prozessen (für eine Übersicht: (Hogan, B.L. 1996a; Hogan, B.L. 1996b)). Während der Embryonalentwicklung wirken sie unter anderem bei der Musterbildung sowie der Organogenese zahlreicher Organe mit (für Übersichtsartikel: (Kingsley, D.M. 1994; Hogan, B.L. 1996a)). Auch im adulten Organismus tragen die Wachstumsfaktoren, neben ihrer Schlüsselrolle bei der Regulation osteogener Prozesse, essentiell zur Geweberegeneration sowie -homöostase bei (für eine Übersicht: (Rosen, V. und Thies, R.S. 1992; Reddi, A.H. 1997; Reddi, A.H. 1998)). Aufgrund dieser pleiotropen Funktionen werden deregulierte oder mutierte TGF- β Wachstumsfaktoren mit zahlreichen Krankheitsbildern wie Osteoporose, Knochen- und Knorpelfehlbildungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes oder auch Krebs assoziiert (siehe beispielsweise: (Wu, X.B. et al. 2003; Mikic, B. 2004), für Übersichtsartikel: (Massague, J. et al. 2000; Tobin, J.F. und Celeste, A.J. 2006)).

Nach dem klassischen Bild wird die Signaltransduktion in der TGF- β Superfamilie induziert, indem ein Ligand an zwei verschiedene Subtypen transmembranärer Serin-/Threonin-Rezeptorkinasen, genannt Typ I und Typ II Rezeptoren, bindet und diese entweder oligomerisiert oder deren oligomere Architektur allosterisch verändert und dadurch aktiviert ((Carcamo, J. et al. 1994; ten Dijke, P. et al. 1996), für eine Übersicht: (Massague, J. 1998; Massague, J. und Chen, Y.G. 2000)). Daraufhin transphosphoryliert die konstitutiv aktive Kinasedomäne des Typ II Rezeptors den Typ I Rezeptor in dessen Glycin- und Serin-reichen GS-Box, wodurch der Typ I Rezeptor aktiviert wird (Übersichtsartikel: (Shi, Y. und Massague, J. 2003)). Nachfolgend werden intrazelluläre Signalmoleküle, die R-SMADs, durch die Typ I-Rezeptorkinase phosphoryliert und oligomerisieren mit dem Co-SMAD, SMAD-4. Dieser Komplex dient in Verbindung mit weiteren Proteinen als Transkriptionsregulator (Übersichtsartikel: (Derynck, R. et al. 1996; Heldin, C.H. et al. 1997; Massague, J. et al. 2005)). Neben diesem klassischen SMAD-Signalweg können auch SMAD-unabhängige Signaltransduktionsketten initiiert werden (für eine Übersicht: (Moustakas, A. und Heldin, C.H. 2005; Zhang, Y.E. 2009)).

Die Familie der TGF- β Signalmoleküle ist durch eine große Überzahl an Liganden im Vergleich zu den zur Verfügung stehenden Transmembranrezeptoren charakterisiert. Den bisher mehr als 30 in Säugetieren identifizierten TGF- β Liganden stehen lediglich fünf verschiedene Typ II Rezeptoren sowie sieben Typ I Rezeptoren für eine Signaltransduktion zur Verfügung (als Übersicht: (Massague, J. 1998; Chen, D. et al. 2004)). Diese hohe Promiskuität der Ligand-Rezeptor-Interaktionen bedarf einer begrenzten Spezifität, damit die Rezeptoren in der Regel mit mehreren unterschiedlichen Liganden wechselwirken können. Interessanterweise können aber auch die meisten Liganden mit mehr als einem Rezeptor des jeweiligen Subtyps wechselwirken ((Nickel, J. et al. 2009), für eine Übersicht: (Mueller, T.D. und Nickel, J. 2012)).

Vor diesem Hintergrund drängen sich zwei entscheidende Fragen auf: Erstens, wie sind die beteiligten Epitope aufgebaut, damit unterschiedliche Rezeptoren dennoch mit einer limitierten Spezifität erkannt und gebunden werden? Zweitens, welche molekularen Mechanismen ermöglichen dieser enormen Vielfalt an Wachstumsfaktoren trotz der begrenzten Zahl an Rezeptoren ihr eigenes, spezifisches Signal zu transduzieren?

Studien zur Analyse der embryonalen Musterbildung zeigen eine dosisabhängige Wirkung der BMP-Liganden, wie auch der übrigen TGF- β Mitglieder, wodurch angenommen wird, dass diese Signalmoleküle als klassische Morphogene fungieren (siehe beispielsweise: (Lapraz, F. et al. 2009), für eine Übersicht: (Plouhinec, J.L. et al. 2011; Ramel, M.C. und Hill, C.S. 2012)). Als Morphogene bezeichnet man diffusible Faktoren, die von einer lokalen Quelle synthetisiert werden und sich von der Quelle aus in dem umgebenden Gewebe ausbreiten. Dabei generieren sie graduelle Positionssignale, die wiederum in spezifische zelluläre Antworten translatiert werden können (für eine Übersicht: (Wu, M.Y. und Hill, C.S. 2009; Ramel, M.C. und Hill, C.S. 2012)). Voraussetzungen für die Übermittlung eines individuellen Signals sind dabei einerseits exakte zeitliche und räumliche Expressionsmuster der beteiligten Liganden und Membranrezeptoren sowie andererseits eine stringente Regulation der Signaltransduktion. Für die Familie der TGF- β Wachstumsfaktoren konnte bereits eine enorme Vielfalt an Regulationsmechanismen auf allen Ebenen der Signaltransduktion aufgedeckt werden, die zur Ausbildung einer Signalspezifität beitragen (für eine Übersicht: (Nickel, J. et al. 2009; Mueller, T.D. und Nickel, J. 2012)). Nachfolgend wird eine Übersicht über Mechanismen zur Regulation der Ligandenaktivität angeführt (siehe auch Abbildung 54). Detaillierte Informationen über weitere Modulationsmöglichkeiten sind unter Abschnitt 1.4 sowie in den Übersichtsartikeln (Nickel, J. et al. 2009; Mueller, T.D. und Nickel, J. 2012) zusammengefasst.

Bei exklusiver Betrachtung der SMAD-Signaltransduktion zeigt sich, dass bereits zahlreiche intrazelluläre Regulationsmechanismen diesen Signalweg beeinflussen (siehe Abbildung 54). Das

inhibitorische SMAD-Protein, SMAD-7, kann beispielsweise mit dem aktivierten T β RI-Rezeptor interagieren und verhindert so die Aktivierung der R-SMAD-Moleküle (Hayashi, H. et al. 1997). Zudem ermöglicht die SMAD-7 Bindung eine Rekrutierung bestimmter E3 Ubiquitin Ligasen, wie zum Beispiel Smurf2, was eine Ubiquitinierung sowie anschließende Degradation des Rezeptorkomplexes zur Folge hat (Kavsak, P. et al. 2000). Das TGF- β vermittelte Signal kann weiterhin durch gezielte Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen aktivierter Rezeptoren sowie R-SMAD Proteine moduliert werden (für ein Review (Xu, P. et al. 2012)). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass neben vielen weiteren intrazellulären Mechanismen microRNAs (miRNA) die Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren durch Inhibition der Rezeptorexpression beeinflussen können (Lipchina, I. et al. 2011; Keklikoglou, I. et al. 2012).

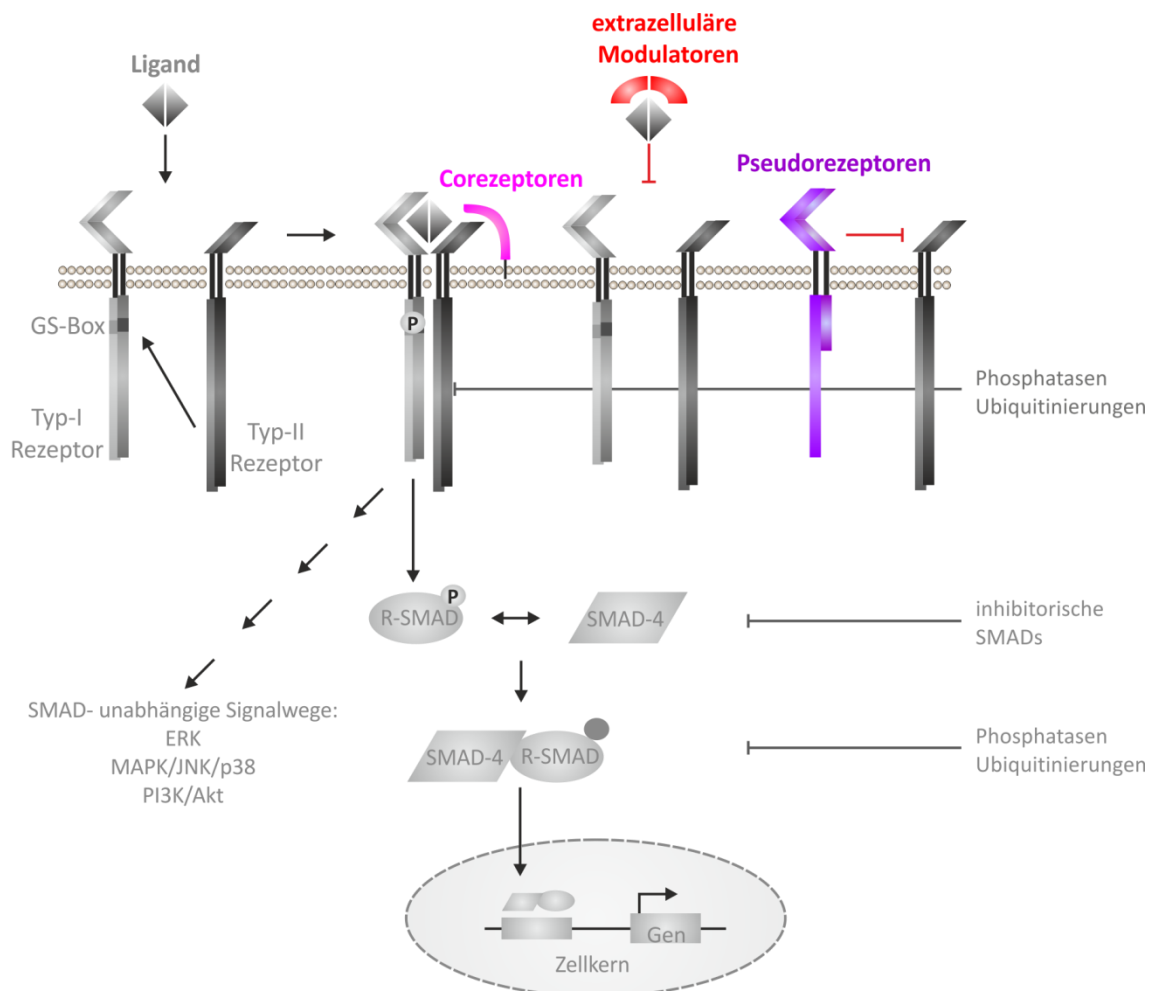


Abbildung 54: Eingriffsmöglichkeiten in die Regulation der Signalkaskade der TGF- β -Superfamilie. Ausführliche Erklärung siehe Haupttext bzw. Abschnitt 1.4. Verändert mit Erlaubnis von InTech nach (Hellmann, T.V. et al. 2012).

Auch auf extrazellulärer Ebene können TGF- β vermittelte Signale durch eine Vielfalt löslicher Antagonisten moduliert werden (siehe Abbildung 54). Diese zeigen zumeist ein wiederkehrendes Muster hinsichtlich ihres Inhibitionsmechanismus, da sie die Liganden

üblicherweise mit sehr hoher Affinität binden und dabei deren Verfügbarkeit bzw. Rezeptoraktivierung durch Maskierung beider Rezeptorbindeepitope herabsetzen. Beispiele hierfür sind unter anderem der BMP-Antagonist Noggin und der Activin/BMP-Modulator Follistatin (Groppe, J. et al. 2002; Harrington, A.E. et al. 2006). Ein komplexerer Regulationsmechanismus zeigt sich bei der Ausbildung der dorsoventralen Achse in *Xenopus*-Embryonen. Hier bewirkt ein fein abgestimmtes Zusammenspiel der beiden Modulatorproteine Chordin und Tsg (*Twisted gastrulation*) mit BMP-Liganden und der Metalloprotease Tolloid die Ausbildung eines dorso-ventralen BMP-Gradienten (De Robertis, E.M. und Kuroda, H. 2004). Dabei bindet und inhibiert Chordin die BMP-Liganden in dorsalen Bereichen des Embryos, während die Interaktion von Tsg mit dem Chordin/BMP-Komplex dessen Diffusibilität erhöht und so die Ausbreitung der BMP-Wachstumsfaktoren verbessert (De Robertis, E.M. und Kuroda, H. 2004). Die Freisetzung aktiver BMP-Liganden aus diesem ternären Komplex wird durch die Protease Tolloid in den ventralen Bereichen des Embryos durch die gezielte Degradation von Chordin erzielt (De Robertis, E.M. und Kuroda, H. 2004).

An der Zelloberfläche können die Signale der TGF- β -Faktoren zudem durch Komponenten der extrazellulären Matrix oder auch durch andere membranständige Modulatoren beeinflusst werden (siehe Abbildung 54). Die extrazelluläre Domäne des Transmembranproteins BAMBI (*BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor*) ähnelt in ihrer Sequenz und Aufbau der eines TGF- β Typ I Rezeptors (Onichtchouk, D. et al. 1999). Aufgrund einer fehlenden intrazellulären Kinasedomäne und der Ausbildung von signalinaktiven Komplexen mit Typ I und Typ II Rezeptoren fungiert BAMBI als Pseudorezeptor und antagonisiert BMP und Activin-Signale (Onichtchouk, D. et al. 1999). Einige BMP-Liganden und Modulatorproteine, wie beispielsweise Noggin, können direkt mit Matrixbestandteilen wie Heparin bzw. Heparansulfat interagieren (Paine-Saunders, S. et al. 2002). Die funktionellen Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen Heparin und den BMP-Liganden bzw. den Antagonisten sind noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch könnten diese Interaktionen die Verteilung der Signalmoleküle im Gewebe modulieren (für eine Übersicht: (Rider, C.C. und Mulloy, B. 2010)). In der Subfamilie der TGF- β Liganden wurden zudem verschiedene membranständige Corezeptoren identifiziert, welche die Signale der Wachstumsfaktoren regulieren können (exemplarisch siehe: (Gritsman, K. et al. 1999; Goumans, M.J. et al. 2002; Goumans, M.J. et al. 2003; Gray, P.C. et al. 2003)). In Endothelzellen konnte beispielsweise das transmembranäre Protein Endoglin als Hilfsprotein für TGF- β spezifische Funktionen nachgewiesen werden (Goumans, M.J. et al. 2002; Goumans, M.J. et al. 2003). Der Corezeptor moduliert hier die Balance zwischen den zwei gegensätzlich wirkenden Signalwegen von TGF- β über die Typ I-Rezeptoren ALK5 sowie SMAD-2/3 bzw. ALK1 und SMAD-1/5 (Lebrin, F. et al. 2004).

4.1. DIE BMP-SPEZIFISCHEN COREZEPTOREN DER RGM-FAMILIE

Im Jahre 2005 wurden mit der Familie der *Repulsive Guidance Molecules* (RGMs) die ersten BMP-spezifischen Corezeptoren entdeckt (Samad, T.A. et al. 2005). Ursprünglich wurde RGMa (bzw. cRGM) aufgrund seiner repulsiven Eigenschaft auf das Wachstum retinaler Axone im optischen Tektum des Huhns identifiziert (Monnier, P.P. et al. 2002). Basierend auf Sequenzvergleichen konnten zwei weitere Mitglieder der RGM-Familie zugeordnet werden: RGMb (auch Dragon) und RGMc (auch Hemojuvelin oder Hfe2) (Niederkofler, V. et al. 2004; Oldekamp, J. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004). Die RGMs sind sekretierte GPI-verankerte Membranproteine. Während RGMc überwiegend in Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert wird, zeigen RGMa und RGMb ein vor allem neuronales, zumeist nicht überlappendes Muster (Oldekamp, J. et al. 2004; Samad, T.A. et al. 2004; Schmidtmer, J. und Engelkamp, D. 2004). Aufgrund eines ähnlichen Expressionsmusters der RGMs mit einigen Rezeptoren der TGF- β Superfamilie wurde die Wirkung der GPI-verankerten Proteine auf diesen Signalweg untersucht (Samad, T.A. et al. 2005). Dabei entdeckten T. A. Samad und Kollegen (2005) mithilfe von BMP- bzw. TGF- β spezifischen Reportergeräten-Nachweisverfahren, dass RGMb den BMP- nicht aber den TGF- β Signalweg beeinflusst. Zudem konnten sie zeigen, dass die Wirkung von RGMb Liganden-abhängig ist und dass RGMb mit Liganden der BMP-Familie nicht aber mit Vertretern der TGF- β Subgruppe interagiert (Samad, T.A. et al. 2005). Die BMP-unterstützende Wirkung von RGMb ist dabei von seiner Membranverankerung abhängig (Samad, T.A. et al. 2005). Weiterhin wurden auch Hinweise auf eine direkte Interaktion des Corezeptors mit verschiedenen Typ I und Typ II Rezeptoren präsentiert (Samad, T.A. et al. 2005). Nachfolgende Untersuchungen zeigten ähnliche Wirkmechanismen für die Familienmitglieder RGMa und RGMc (Babitt, J.L. et al. 2005; Halbrooks, P.J. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2008). Hinweise auf eine Funktion der RGM-Proteine während der endochondralen Knochenentwicklung liefert eine aktuelle Studie. Hier konnte die Expression aller RGM-Familienmitglieder in Chondrozyten in vivo und in Zellkultur zusammen mit BMP-Rezeptoren sowie Neogenin nachgewiesen werden (Zhou, Z. et al. 2010). Die Autoren wiesen mittels Co-Immunopräzipitationen in Chondrozyten zudem die Bildung eines Superkomplexes bestehend aus BMPRII, BMPRII, RGMc und Neogenin in Gegenwart von BMP-2 nach und stellten daraufhin die Hypothese auf, dass Neogenin die Interaktion zwischen BMP-Liganden, ihren Rezeptoren sowie RGM-Molekülen in Chondrozyten zusätzlich stabilisieren könnte (Zhou, Z. et al. 2010).

Die Theorie der RGM-Proteine als BMP-Corezeptoren mit einer pro-BMP Aktivität wird allerdings teilweise durch eine Studie von K. Kanomata (2009) in Frage gestellt. Anhand von Co-Transfektionsanalysen mit RGMs sowie konstitutiv aktiven Typ I Rezeptorkonstrukten in der

BMP-responsiven C2C12-Zelllinie konnten die Autoren zeigen, dass die Induktion der Alkalischen Phosphatase bei einer Transfektion von RGMb inhibiert wird, während es durch die Expression von RGMa und RGMc hingegen gesteigert wird (Kanomata, K. et al. 2009). Der hemmende Effekt auf das BMP-Signal konnte zudem durch Reporter-gen-Nachweisverfahren bestätigt werden, sodass membranverankertes RGMb-Protein offenbar selektiv in dieser Zelllinie die BMP-Signaltransduktion inhibiert (Kanomata, K. et al. 2009).

4.1.1. RGMb INTERAGIERT SELEKTIV MIT BMP-, NICHT ABER MIT TGF- β LIGANDEN

Aufgrund dieser kontroversen Datenlage war es das Ziel dieser Arbeit das RGM-Familienmitglied RGMb rekombinant herzustellen und umfassend zu charakterisieren. Insbesondere sollten die Wechselwirkungen des Corezeptors mit BMP und TGF- β Liganden sowie Typ I und Typ II Rezeptoren sowohl mit Hilfe von in vitro Bindungsstudien, als auch durch zellbasierte Methoden analysiert werden.

Da es sich bei RGMb um ein komplexes sekretiertes Protein bestehend aus 437 Aminosäuren mit zwei potentiellen N-Glykosylierungsstellen sowie 15 Cysteinresten handelt, wurde ein eukaryotisches Expressionsverfahren gewählt, um posttranslationale Modifikationen zu ermöglichen. Daher wurde eine Expression des rekombinanten RGMb Proteins in Insektenzellkultur und ein darauf ausgerichtetes Reinigungsverfahren etabliert (siehe Kapitel 3.1). Nach erfolgreicher Detektion und Deletion des freien Cysteins (siehe Abschnitt 3.1.1), welches eine unphysiologische Dimerisierung des rekombinanten RGMb Proteins bewirkt, konnte die Variante RGMb _{Δ NCys} hochrein und in ausreichenden Mengen für alle anschließenden Charakterisierungen hergestellt werden (siehe 3.1.2).

Vorausgegangene Studien lieferten bereits erste Hinweise auf direkte Interaktionen der *Repulsive Guidance* Moleküle mit Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie und darüber hinaus eine Selektivität der Corezeptoren für BMP-Signalmoleküle. Hier wurde zumeist das zellfreie System des Radioliganden-Nachweisverfahrens verwendet (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Xia, Y. et al. 2007), welches zwar die Ermittlung einer Dissoziationskonstanten (K_D) als Bindedeterminante, jedoch keine Analyse der kinetischen Parameter ermöglicht. Zudem wurden bisher nur einige wenige ausgewählte der über 30 verschiedenen TGF- β Wachstumsfaktoren analysiert. Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) stellt hingegen die kinetischen Bindedeterminanten in Echtzeit dar und ermöglicht so die Detektion von Unterschieden in den Assoziations (k_a)- sowie Dissoziationsraten (k_d). Zudem liefert dieses Verfahren genauere und somit vergleichbare Daten für die Gleichgewichtsbindungskonstanten.

In dieser Arbeit konnte ein SPR-Verfahren für die Wechselwirkungen zwischen dem monomeren Corezeptor RGMb sowie einer Vielzahl an TGF- β Liganden etabliert werden (siehe Kapitel 3.2.2). Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien zeigen eine Selektivität des Corezeptors für BMP-Wachstumsfaktoren der BMP-2/-4, der BMP-5/-6/-7/-8 sowie der GDF-5/-6/-7 Untergruppen, während keine Interaktionen mit den analysierten Liganden der anderen TGF- β /BMP und Activin Subgruppen detektiert werden konnten (siehe Tabelle 39).

Tabelle 39: Zusammenfassung der Ergebnisse der in vitro-Bindungsstudien zwischen RGMb und den aufgeführten Liganden der TGF- β Subfamilie. k. B. = keine Bindung, k_a = Assoziationsrate, k_d = Dissoziationsrate, K_D = Dissoziationskonstante.

	$k_a \times 10^6 [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d \times 10^{-3} [s^{-1}]$	$K_{D(kin)} [nM]$
BMP-2	2.0 +/- 1.1	2.5 +/- 0.2	1.6 +/- 0.8
BMP-4	0.9 +/- 0.3	1.4 +/- 0.3	1.8 +/- 0.6
BMP-6	1.2 +/- 0.4	2.3 +/- 0.4	2.4 +/- 1.4
BMP-7	0.6 +/- 0.1	1.2 +/- 0.4	2.0 +/- 0.9
GDF-5	0.7 +/- 0.2	0.4 +/- 0.3	0.7 +/- 0.4
GDF-6	1.0 +/- 0.4	1.5 +/- 0.3	1.9 +/- 1.0
GDF-7	1.2 +/- 0.4	0.9 +/- 0.2	0.9 +/- 0.4
BMP-3	k. B.	k. B.	k. B.
BMP-15	k. B.	k. B.	k. B.
GDF-2	k. B.	k. B.	k. B.
GDF-8	k. B.	k. B.	k. B.
GDF-9	k. B.	k. B.	k. B.
TGF-β 2	k. B.	k. B.	k. B.
TGF-β 3	k. B.	k. B.	k. B.
AMH	k. B.	k. B.	k. B.
Activin A	k. B.	k. B.	k. B.

T. A. Samad gab 2005 für die Interaktion von RGMb-Fc mit radioaktiv-markiertem und immobilisiertem BMP-2 eine Dissoziationskonstante von 1.5 nM an, während für die Bindung von RGMa-Fc und den jodierten Liganden BMP-2 bzw. BMP-4 Affinitäten von 2.4 +/- 0.2 nM und 1.4 +/- 0.1 nM ermittelt wurden (Xia, Y. et al. 2007). Trotz der Verwendung Fc-fusionierter RGM Proteine, wodurch artifizielle Dimere entstehen und somit Aviditätseffekte hervorgerufen werden können, korrelieren die Affinitätsdaten für die Bindung von RGMb-Fc an BMP-2 (Samad, T.A. et al. 2005) sehr gut mit den hier ermittelten SPR-Daten (1.6 +/- 0.8 nM). Das in dieser Arbeit hergestellte rekombinante RGMb-Protein weist zudem ähnliche Affinitäten zu den Liganden BMP-2 (1.6 +/- 0.8 nM) und BMP-4 (1.8 +/- 0.6 nM) verglichen mit RGMa-Fc (RGMa/BMP-2: 2.4 +/- 0.2 nM, RGMa/BMP-4: 1.4 +/- 0.1 nM; (Xia, Y. et al. 2007)) auf. Peter J. Halbrooks (2007) führte mittels Oberflächen-Plasmonresonanz die ersten vergleichenden Bindungsstudien zu den RGM-Corezeptoren durch. Dabei wurden die Liganden BMP-2 sowie

GDF-7 (auch BMP-12 bezeichnet) auf der Sensoroberfläche immobilisiert und mit Konzentrationsreihen der drei RGM-Fc Proteine perfundiert (Halbrooks, P.J. et al. 2007). Für alle Corezeptoren konnten niedernanomolare Affinitäten ermittelt werden, wobei RGMb eine Dissoziationskonstante von 5.4 nM zu BMP-2 sowie von 2.1 nM zu GDF-7 aufwies (siehe Tabelle 40 und (Halbrooks, P.J. et al. 2007)). Auch diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der hier repräsentierten Studie überein. Interessanterweise zeigt sich auch hier eine im Vergleich mit BMP-2 erhöhte Affinität von RGMb gegenüber der Interaktion mit GDF-7 (Halbrooks: 2.7fach (Halbrooks, P.J. et al. 2007), hier: 2fach höhere Affinität).

Jedoch werden bei einer Betrachtung der kinetischen Parameter auch Unterschiede deutlich. So zeigt RGMb-Fc langsamere Assoziationsraten an beide Liganden sowie auch eine deutlich verzögerte Dissoziation des RGMb-Fc/BMP-2 Komplexes, während die von uns ermittelte Dissoziationsrate für die Interaktion von RGMb_{ΔNCys} und GDF-7 mit den Literaturdaten übereinstimmt (siehe Tabelle 40 sowie 3.2.2 und (Halbrooks, P.J. et al. 2007)). Diese unterschiedlichen Bindungskinetiken sind möglicherweise mit der Verwendung eines Fc-Fusionsproteins begründet. Durch die Dimerisierung mit dem Fc-Fragment entstehen Proteine mit einem mehr als doppelt so großen Molekulargewicht verglichen mit den RGM-Monomeren. Dies könnte während der Assoziationsphase zu sterischen Behinderungen führen, woraus eine langsamere Assoziation resultiert. Die Dissoziationsrate könnte indes durch Aviditätseffekte verringert werden, somit ergibt sich ein für die Gleichgewichtsbindungskonstante kompensatorischer Effekt, während die kinetischen Parameter jedoch inkorrekte Werte darstellen.

Tabelle 40: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Parameter für die Interaktion von RGMb mit BMP-2 sowie GDF-7 (BMP-12) mit den erhobenen Daten aus (Halbrooks, P.J. et al. 2007). k_a = Assoziationsrate, k_d = Dissoziationsrate, K_D = Dissoziationskonstante. Die Daten oberhalb des Trennstriches entsprechen eigenen Messungen, während die kursiv gedruckten Daten aus (Halbrooks, P.J. et al. 2007) entnommen wurden.

	$k_a \times 10^6 [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d \times 10^{-3} [s^{-1}]$	$K_{D(kin)} [nM]$
BMP-2	2.0 +/- 1.1	2.5 +/- 0.2	1.6 +/- 0.8
GDF-7	1.2 +/- 0.4	0.9 +/- 2.1	0.9 +/- 0.4
<i>BMP-2</i>	<i>0.047</i>	<i>0.26</i>	<i>5.43</i>
<i>GDF-7</i>	<i>0.057</i>	<i>0.12</i>	<i>2.06</i>

In einer weiteren SPR-basierten Studie zu den Bindungskinetiken der RGM-Proteine konnten ebenfalls unterschiedliche Interaktionspräferenzen zwischen den drei RGM-Familienmitglieder beobachtet werden (Wu, Q. et al. 2012). Während für RGMc die höchsten Bindungsaffinitäten zu den Liganden BMP-5, -6 und -7 ermittelt wurde, war für RGMa und RGMb die Bindungsaffinität für die Liganden BMP-2 und -4 am höchsten. Alle drei getesteten Corezeptoren

zeigten *in vitro* keine Wechselwirkung mit BMP-9 (Wu, Q. et al. 2012). Liganden der TGF- β Unterfamilie wurden in dieser Studie nicht untersucht (Wu, Q. et al. 2012). Die Daten der vorliegenden Arbeit korrelieren mit den Ergebnissen von Wu et al. (2012), da ebenfalls Interaktionen des Corezeptors RGMb mit den Liganden der BMP-2/-4 sowie der BMP-5/-6/-7/-8 Familien nachgewiesen wurden (3.2.2). Während in den hier gezeigten *in vitro* Bindungsstudien sehr ähnliche niedrig nanomolare Affinitäten für die Interaktionen des Corezeptors mit den Liganden BMP-2, -4, -6 und -7 nachgewiesen werden konnten, stellten Wu et al. (2012) allerdings deutliche Unterschiede heraus (siehe Tabelle 41). So stimmen zwar die Dissoziationskonstanten für die Wechselwirkungen von RGMb mit BMP-2 und BMP-4 gut mit den hier gemessenen Werten überein, jedoch wurden in der vergleichenden Arbeit wesentlich niedrigere Affinitäten für die Interaktionen von RGMb mit BMP-6 und BMP-7 gezeigt, die vor allem aus deutlich langsameren Assoziationsraten resultieren (siehe Tabelle 41 sowie 3.2.2 und (Wu, Q. et al. 2012)).

Tabelle 41: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Parameter der Interaktionen von RGMb mit BMP-Liganden (siehe 3.2.2) mit Literaturdaten (Wu, Q. et al. 2012). k_a = Assoziationsrate, k_d = Dissoziationsrate, K_D = Dissoziationskonstante. Die Daten oberhalb des Trennstriches entsprechen eigenen Messungen, während die kursiv gedruckten Daten aus den Ergänzungsabbildungen S1, S3 - S5 aus (Wu, Q. et al. 2012) entnommen wurden.

	$k_a \times 10^6 [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d \times 10^{-3} [s^{-1}]$	$K_{D(kin)} [nM]$
BMP-2	2.0 +/- 1.1	2.5 +/- 0.2	1.6 +/- 0.8
BMP-4	0.9 +/- 0.3	1.4 +/- 0.3	1.8 +/- 0.6
BMP-6	1.2 +/- 0.4	2.3 +/- 0.4	2.4 +/- 1.4
BMP-7	0.6 +/- 0.1	1.2 +/- 0.4	2.0 +/- 0.9
<i>BMP-2</i>	<i>0.18</i>	<i>1.04</i>	<i>5.78</i>
<i>BMP-4</i>	<i>0.20</i>	<i>0.55</i>	<i>2.72</i>
<i>BMP-6</i>	<i>0.044</i>	<i>1.11</i>	<i>25.09</i>
<i>BMP-7</i>	<i>0.007</i>	<i>0.88</i>	<i>126.3</i>

Diese Abweichungen ergeben sich möglicherweise aus unterschiedlichen Aktivitäten der Liganden im Anschluss an die Immobilisierungsreaktion. Wu et al. (2012) verwendeten ebenfalls die direkte kovalente Aminokopplungsmethode (siehe 2.11). Da gewöhnlich mehrere funktionelle Gruppen (hier die Lysin-Reste des zu immobilisierenden Proteins) innerhalb der Proteinsequenz zur Verfügung stehen, kann dies zu einer heterogenen Immobilisierung oder zu einer mehrfachen Kopplung des Liganden führen. Weiterhin könnte die kovalente Bindung der Liganden an die Chipoberfläche die Zugänglichkeit der Analyt-Bindeepitope beeinträchtigen und dadurch niedrigere Interaktionsaffinitäten verursachen. Aus diesem Grund wurden die Aktivitäten der Liganden in der hier präsentierten Studie stets im Anschluss an die Immobilisierung mit Hilfe geeigneter Rezeptoren validiert und mit bekannten Daten verglichen.

Da Wu et al. (2012) in ihrer Arbeit jedoch nicht auf eine derartige Überprüfung hinweisen, könnten kopplungsbedingte Beeinträchtigungen der Ligand-Analyt Interaktion für die abweichenden Bindungskinetiken verantwortlich zeichnen.

In zellfreien Verfahren wurde in vorangegangenen Studien zudem die Bindung der RGM-Moleküle an die Liganden der TGF- β -Unterfamilie, TGF- β 1 - 3 sowie Activin A, überprüft. Diese Studien zeigten jeweils keine Interaktionen der Corezeptoren mit den getesteten Liganden (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Andriopoulos, B., Jr. et al. 2009). Die in dieser Arbeit präsentierten in vitro Ergebnisse bestätigen diese Daten und erweitern darüber hinaus die Interaktionsanalysen, da keine direkten Wechselwirkungen von RGMb mit einer Vielzahl weiterer Mitglieder der TGF- β Familie gezeigt werden konnten (siehe Abschnitt 3.2.2 und Tabelle 39). Interessanterweise konnten mittels Oberflächen-Plasmonresonanzanalyse auch keine homophilen Interaktionen des Corezeptors beobachtet werden, obwohl diese als Grundlage für eine Funktionen der RGM-Proteine in der Zell-Zelladhäsion vermutet wurden (Samad, T.A. et al. 2004). Auch mit anderen untersuchten Modulatorproteinen der BMP-Familie (BAMBI, Tsg1, Noggin) konnten keine direkten Wechselwirkungen von RGMb nachgewiesen werden (siehe 3.2.3).

Zusammengefasst korrelieren die hier erhobenen Daten bezüglich der Selektivität der RGMb-Wechselwirkung mit Liganden der BMP-Unterfamilie gut mit veröffentlichten Studien. So bestätigen die Bindungsstudien Interaktionen des Corezeptors mit den Liganden der BMP-2/-4 sowie der BMP-5/-6/-7/-8 Familien. Darüber hinaus erweitern die in vitro Analysen den bisherigen Kenntnisstand, da hier einerseits zum ersten Mal niedrig nanomolare Wechselwirkungen des Corezeptors mit der GDF-5/-6/-7 Untergruppe mit einer präferentiellen Bindung von RGMb an die Liganden GDF-5 und GDF-7 gezeigt werden konnte. Zudem wurden die direkten Wechselwirkungen zwischen RGMb sowie einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Unterfamilie und verschiedenen Modulatorproteinen mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonresonanz verifiziert.

4.2. ANALYSE DER ZUGRUNDELIEGENDEN MOLEKULAREN MECHANISMEN DER BEEINFLUSSUNG DES BMP-SIGNALWEGES DURCH RGMb

4.2.1. RGMb ZEIGT IN VITRO KEINE DIREKTEN INTERAKTIONEN MIT DEN EKTODOMÄNEN DER BMP TYP I UND TYP II REZEPTOREN

Die Betrachtung der RGM-Proteine als BMP-spezifische Corezeptoren beruht neben den hochaffinen Interaktionen mit BMP-Liganden vor allem darauf, dass einige Studien Hinweise auf direkte Wechselwirkungen mit den TGF- β Typ I und Typ II Rezeptoren lieferten (Babitt, J.L. et al.

2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006). Dabei wurden *in vitro* Bindungsanalysen basierend auf Co-Immunopräzipitationen bzw. *Pulldown*-Verfahren durchgeführt. Co-Immunopräzipitationen nach Protein-Überexpressionen in Zellkulturen bergen die Gefahren falsch-positiver Ergebnisse, da hier möglicherweise die Protein-Protein-Wechselwirkung anstelle einer direkten physikalischen Interaktion auch durch zusätzliche Interaktionspartner und damit indirekt vermittelt werden könnte. Babitt und Kollegen (2006) wiesen darauf hin, dass in HEK293-Zellen überexprimiertes RGMc-Protein nur in Anwesenheit des Liganden BMP-2 zusammen mit dem BMP-Rezeptor BMPR-IB präzipitierte. Da BMP-2, wie alle Liganden der TGF- β Superfamilie, ein dimeres Protein ist, kann so nicht ausgeschlossen werden, dass Rezeptor und Corezeptor gemeinsam an BMP-2 oder aber jeder der beiden Interaktionspartner einzeln an einer Monomeruntereinheit gebunden vorliegen. Eine direkte Interaktion zwischen Rezeptor und Corezeptor kann auf Grundlage dieses Experimentes nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Auch *Pulldown*-Experimente erfordern stringente Kontrollen, um unspezifische Interaktionen auszuschließen. Basierend auf dieser Nachweismethode sowie eines anschließenden Anti-RGMa Western Blots begründeten Babitt und Kollegen (2005), dass RGMa in Lösung mit dem Typ I Rezeptor BMPR-IB sowie mit BMP-2 komplexiert. Dabei wurden langsamer auf dem SDS-Gel migrierende Proteinbanden als Komplexe aus Rezeptor und Corezeptor bzw. Ligand und Corezeptor angesehen (Babitt, J.L. et al. 2005). Notwendige Kontroll-Immunnachweisverfahren mit entsprechenden Antikörpern gegen den Typ I-Rezeptor bzw. den Liganden wurden in den Veröffentlichungen nicht dargestellt (Babitt, J.L. et al. 2005). Ohne diese Kontrollen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei auch möglicherweise um Artefakte handeln könnte.

Zur Charakterisierung der direkten Interaktionen des rekombinanten RGMb-Proteins mit einer Vielzahl an Typ I und Typ II Rezeptoren wurde in der vorliegenden Arbeit das Verfahren der Oberflächen-Plasmonresonanz (siehe Kapitel 3.2.4) angewendet. Diese Methode ermöglicht die direkte quantitative und markierungsfreie Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* und gibt Zugang zu vergleichbaren Affinitätsdaten sowie Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten. Somit verfügt eine Charakterisierung basierend auf Oberflächen-Plasmonresonanz deutliche Vorteile gegenüber einer Co-Immunopräzipitation. Die Ergebnisse dieser Interaktionsstudien stellen die bisher veröffentlichten Annahmen bezüglich einer direkten Wechselwirkung der RGM-Proteine mit Typ I sowie Typ II BMP-Rezeptoren (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006) in Frage, da keine der getesteten immobilisierten Rezeptortodomänen rekombinantes, als Analyt eingesetztes RGMb-Protein

binden konnte (siehe Abschnitt 3.2.4). Eine direkte Interaktion des Corezeptors mit den BMP-Rezeptoren konnte mit unseren *in vitro* Bindungsexperimenten widerlegt werden.

Da jedoch sowohl auf Oberflächen-Plasmonresonanz basierende Methoden als auch Co-Immunopräzipitationen und *Pulldown*-Verfahren artifizielle Systeme darstellen, gilt es zu klären, welche Interaktionen *in vivo* stattfinden. Die Co-Immunopräzipitationen wurden mit Sequenzmarkierten überexprimierten Proteinen durchgeführt (Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006), wodurch nicht vollständig gefaltete rekombinante Proteine resultieren könnten, die über hydrophobe Bereiche unspezifisch miteinander reagieren. Zudem könnte eine starke Überexpression auch schwache, nicht physiologische Wechselwirkungen sichtbar machen. Weiterhin wurden sowohl die Co-Immunopräzipitationen als auch die *Pulldown*-Verfahren in Anwesenheit eines chemischen Reagenz zur Quervernetzung durchgeführt (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006), was darauf hinweist, dass die in der Studie detektierten Interaktionen zwischen den Corezeptoren und Rezeptoren eventuell sehr niedrige Affinitäten aufweisen. Darüber hinaus schließen die hier durchgeführten Oberflächen-Plasmonresonanz-Studien eine Beeinflussung der beobachteten Protein-Protein-Interaktionen durch endogen vorkommende Faktoren aus.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Charakterisierungen, dass keine direkten Interaktionen zwischen dem Corezeptor RGMb und den Typ I sowie Typ II Rezeptoren nachweisbar sind.

4.2.2. DIE KOMPLEXBILDUNG VON RGMb MIT BMP-LIGANDEN INHIBIERT DEREN INTERAKTION MIT TYP I REZEPTOREN UND VERMITTELT EINE SELEKTIVITÄT GEGENÜBER DER TYP II REZEPTORWAHL

Um zu analysieren, ob die Ausbildung eines (höhermolekularen) Signalkomplexes aus RGMb zusammen mit BMP-Rezeptoren und dem BMP-Liganden möglich ist, wurden SPR-Coinjektionsstudien durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.2). Diese ermöglichten eine direkte *in vitro* Simulation der Ausbildung eines oligomeren Komplexes bestehend aus immobilisierten BMP-Rezeptoren, perfundierten Liganden sowie löslichem RGMb-Protein (siehe Abbildung 55). Im Widerspruch zu den veröffentlichten Co-Immunopräzipitations- und *Pulldown*-Daten (Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006) weisen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse keine gleichzeitigen Interaktionen des Corezeptors mit Typ I Rezeptoren (hier: BMPRI-A bzw. BMPRI-B) sowie BMP-2 nach (siehe Abbildung 48, Abschnitt 3.4.2). Hingegen zeigen diese Studien zur Komplexbildung, dass das Typ I Rezeptorepitop der Liganden durch die Interaktion mit RGMb

wahrscheinlich vollständig blockiert und dadurch die Ausbildung von oligomeren RGMB, BMP-Ligand sowie Typ I Rezeptor enthaltenden Komplexen verhindert wird.

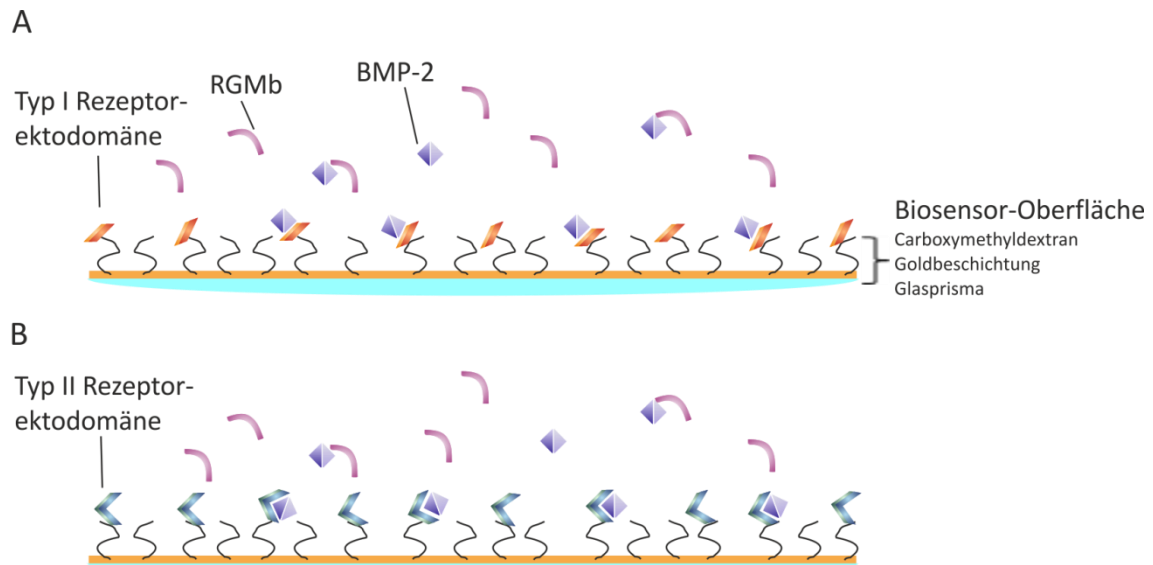


Abbildung 55: Schema des Aufbaus der Coinjektionsstudien. Typ I (A) oder Typ II (B) Rezeptorektodomänen wurden immobilisiert und anschließend zunächst mit konstanten Liganden-Konzentrationen im Pufferstrom perfundiert und in einem zweiten Schritt mit einer Konzentrationsreihe von RGMB in Puffer überströmt (siehe 2.11 sowie 3.2.4).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die RGMB-Ligand Interaktion die Typ II Rezeptorselektivität des Liganden beeinflusst wird. Während keine gleichzeitigen Wechselwirkungen mit RGMB möglich ist, wenn BMP-2 an die auf dem Sensorchip immobilisierten Typ II Rezeptorektodomänen BMPR-II und ActR-II gebunden vorliegt, konnte jedoch eine Bindung von RGMB-komplexiertem BMP-2 an ActR-IIB nachgewiesen werden (Abbildung 48, Abschnitt 3.4.2). Die Coinjektionsstudien mit den (auf der Sensoroberfläche immobilisierten) Ligandenproteinen BMP-2, GDF-5, -6 sowie -7 konnten diese Typ II Rezeptorspezifität bestätigen. So war eine Interaktion von ActR-IIB mit allen getesteten, mit RGMB komplexierten Liganden möglich (Abbildung 50, Kapitel 3.4.2). Die Selektivität des BMP/RGMB Komplexes für den Typ II Rezeptor ActR-IIB konnte auch durch die Perfusion von RGMB/BMP-2-Komplexen bestätigt werden. Diese wurden durch Inkubation von BMP-2 und RGMB in unterschiedlichen stöchiometrischen Mengenverhältnissen gebildet und anschließend über einen Biosensor mit immobilisierten Typ I sowie Typ II Rezeptorektodomänen perfundiert (siehe Abbildung 52, Kapitel 3.4.2).

Diese hier gezeigten neuen Erkenntnisse bezüglich der Typ II Rezeptorspezifität in Gegenwart des Corezeptors sind insbesondere deshalb von großem Interesse, da zuvor in der Literatur zwar auch eine veränderte Typ II Rezeptornutzung der Liganden in Anwesenheit der RGM-Proteine

beschrieben, diese jedoch gänzlich gegensätzlich dargestellt wurde (siehe auch für folgende Ausführungen: (Xia, Y. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2008; Xia, Y. et al. 2010)). Die Autoren hemmten mit Hilfe spezifischer siRNA-Konstrukte jeweils die Expression der Typ II Rezeptoren ActR-II, ActR-IIB sowie BMPR-II. Anschließend analysierten sie die Auswirkung dieser Inhibitionen auf die BMP-induzierten Signale in Anwesenheit der RGM-Corezeptoren. Dabei wiesen sie für alle drei RGM-Mitglieder nach, dass die Corezeptoren das BMP-Signal durch eine zusätzliche Nutzung von ActR-II neben dem üblicherweise verwendeten Typ II Rezeptor BMPR-II verstärken, während hingegen keine Signale über ActR-IIB transduziert werden.

Wie lassen sich nun diese widersprüchlichen Ergebnisse miteinander in Einklang bringen? Zum einen wurden die in dieser Arbeit präsentierten Analysen der Rezeptorspezifität durch in vitro Bindungsstudien ermittelt, während die siRNA-vermittelten Studien an Zelllinien durchgeführt wurden. So visualisieren die Oberflächen-Plasmonresonanzstudien die direkten Interaktionen der Signalmoleküle, während die zellbasierten siRNA-Analysen möglicherweise durch endogene Mediatoren, wie zum Beispiel zusätzliche Membranrezeptoren oder Cofaktoren beeinflusst werden könnten. Diese additiven Faktoren könnten zudem ein Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster aufweisen, wodurch diese zum Teil widersprüchlichen Beeinflussungen der Typ II Rezeptorselektivität durch die RGM-Moleküle erklärt werden können.

Weiterhin werden die Wechselwirkungen der löslichen beziehungsweise der membranständigen RGM-Mitglieder mit dem BMP-Signalweg in der Literatur kontrovers diskutiert. Während die löslichen RGM-Proteine BMP-induzierte Signale inhibieren (Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2007; Andriopoulos, B., Jr. et al. 2009; Nili, M. et al. 2010), werden für die membranständigen Faktoren neben aktivierenden Wirkungen (siehe beispielsweise (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Xia, Y. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2010)) auch ein hemmender Effekt von membranverankertem RGMb beschrieben (Kanomata, K. et al. 2009). Diese unterschiedlichen Funktionen der RGM-Proteine sowie sich daraus ableitende mögliche Auswirkungen auf die Entstehung der unterschiedlichen Typ II Rezeptorspezifitäten werden im folgenden Kapitel (4.3) detailliert diskutiert.

4.3. INTERAKTIONSMECHANISMEN VON RGMb MIT DEM SIGNALWEG DER KNOCHENWACHSTUMSFAKTOREN

Wie auf molekularer Ebene ist bislang auch sehr wenig über die zellulären Zusammenhänge der Wechselwirkungen der RGM-Familienmitglieder mit dem BMP-Signalweg bekannt. Im Folgenden wird versucht die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zusammen mit bereits veröffentlichten Daten in einen gemeinsamen Kontext zu bringen. Dabei werden mögliche

Interaktionsmechanismen von RGMB mit der Signalkaskade der Knochenwachstumsfaktoren analysiert.

Lösliches RGMB Protein stellt einen effektiven Inhibitor der BMP- bzw. GDF-induzierten Signaltransduktionen dar

In Kapitel 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit präsentierten Kompetitionsstudien unter Verwendung des löslichen RGMB Proteins mit BMP-responsiven Zelllinien eine dosisabhängige Inhibition der BMP-induzierten Signaltransduktion zeigen. Zudem konnte durch die hier gezeigten *in vitro* Bindungsstudien dargelegt werden, dass die Bindeepitope der BMP-Liganden für RGMB und für die Typ I Rezeptoren miteinander überlappen (siehe 3.2.4 und 3.4.2 sowie 4.2.1 und 4.2.2). Mit einem Komplex bestehend aus RGMB und BMP- bzw. GDF-Liganden kann zusätzlich ausschließlich die Ektodomäne des Typ II Rezeptors ActR-IIIB interagieren (siehe 3.4.2 und 4.2.2). Als Konsequenz ergibt sich daraus eine vollständige Konkurrenz des Corezeptors mit den Typ I Rezeptoren und möglicherweise eine partielle Hemmung der Typ II Rezeptor-Ligandbindung und damit ein Mechanismus für die Inhibition der BMP-Signalkaskade. Daher könnte die Hemmung der Liganden-induzierten Expression der Alkalischen Phosphatase beziehungsweise der SMAD-Aktivierung (siehe 3.3.1) darin begründet sein, dass lösliches RGMB-Protein die Liganden hochaffin bindet und somit eine Interaktion mit ihren Rezeptoren unterbindet. Ähnliche dosisabhängige Inhibitionen wurden mit ALP-Nachweisverfahren bei Verwendung spezifischer, gegen das BMP-2 Bindeepitop von BMPRII gerichteter Fab-Fragmente (Harth, S. et al. 2010) erzielt. Diese Ergebnisse unterstützen demzufolge die in dieser Arbeit präsentierten *in vitro* Ligandenbindungsstudien (siehe 3.2.2), da auch durch die zellbasierten Nachweisverfahren eine direkte Interaktion von rekombinantem RGMB mit den BMP-Liganden BMP-2, -4, -6, -7 sowie GDF-5 nachgewiesen werden konnte (siehe 3.3.1).

Bei der Betrachtung der EC_{50} und IC_{50} Werte sowie der daraus abgeleiteten Inhibitorkonstante K_i wird ein Unterschied der RGMB Wirkung in den beiden verwendeten Zelllinien ATDC5 und C2C12 deutlich (siehe Abbildung 36, Abbildung 37 und Tabelle 30 in Kapitel 3.3.1). ATDC5 Zellen reagieren bereits auf eine Stimulationen mit niedrigeren BMP-Konzentrationen und weisen entsprechend niedrigere EC_{50} Werte als C2C12 Zellen auf (unveröffentlichte Daten Dr. Joachim Nickel sowie eigene Daten: siehe Kapitel 3.3.1, Abbildung 36, Abbildung 37 sowie Tabelle 30). Daraus resultiert, dass eine höhere Konzentration des löslichen, inhibitorisch wirkenden RGMB benötigt wird, um eine halbmaximale Konkurrenz zu erzielen. Da Microarray-Daten weder signifikante Unterschiede in der BMP-Rezeptor- noch in der RGM-Corezeptorexpression erkennen lassen (unveröffentlichte Daten Dr. Axel Seher), müssen hierfür andere Mechanismen

verantwortlich zeichnen. Möglicherweise existiert in ATDC5 Zellen ein zusätzlicher Rezeptor, der Zelltyp-spezifisch das BMP-Signal verstärkt.

Inzwischen existieren auch weitere *in vitro* Daten zu löslichen RGM-Proteinen. So konnten Andriopoulos und Kollegen (2009) zeigen, dass lösliche RGMb- sowie RGMc-Fc Fusionsproteine die BMP-induzierte Hepcidin-Expression in Hep3B Zellkulturen kompetitieren. Durch intraperitoneale Injektionen der Fusionsproteine in Mäusen sowie daran anschließende Hepcidin-Konzentrationsbestimmungen konnte zudem *in vivo* aufgezeigt werden, dass nur RGMc-Fc die Hepcidinexpression verhindert, während RGMb-Fc keinerlei Effekt zeigt (Andriopoulos, B., Jr. et al. 2009). Hepcidin ist ein von der Leber sekretierter Schlüsselregulator der systemischen Eisenregulation (Pigeon, C. et al. 2001). Durch die Verminderung der Oberflächenexpression des Eisenexporters Ferroportin, verhindert Hepcidin die Freisetzung von Eisen aus Makrophagen und somit eine Aufnahme von Eisen in die Organe (Nemeth, E. et al. 2004). Mutationen in dem für RGMc codierenden Gen *HFE2* stehen in Zusammenhang mit der Eisenspeicherkrankheit Juvenile Hämochromatose (Papanikolaou, G. et al. 2004; Beutler, E. 2006). Während niedrige BMP-Signalaktivitäten in der Leber durch Mutationen in *HFE2* mit einem sehr niedrigen Hepcidin-Level einhergehen (Niederkofler, V. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006), bewirkt eine BMP-Stimulation *in vitro* eine Induktion der Hepcidin Expression (Babitt, J.L. et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe von P. Rotwein durch zellbasierte *in vitro* Nachweisverfahren zeigen (Nili, M. et al. 2010). So inhibierten rekombinante Fc-fusionierte lösliche RGMc-Isoformen die BMP-2 sowie BMP-6 induzierten Signale auf der Ebene der SMAD-Induktion (Nili, M. et al. 2010). Co-Transfektionsstudien mit einem konstitutiv aktiven BMP-Typ I Rezeptor sowie einem RGMb-Konstrukt ohne GPI-Ankerdomäne zeigten ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Expression der Alkalischen Phosphatase und somit den BMP-Signalweg (Kanomata, K. et al. 2009).

Zusammenfassend zeigen die hier erhobenen Kompletionsdaten des löslichen RGMb-Proteins im Einklang mit den Ergebnissen aus zellbasierten Nachweisverfahren anderer Arbeitsgruppen, dass die RGM-Moleküle in ihrer löslichen Form effektive Inhibitoren BMP-induzierter Signale darstellen. Aufgrund der breit gefächerten und hochaffinen Interaktion von RGMb mit einer Vielzahl an BMP-Liganden (siehe Abschnitt 4.1.1, Tabelle 39) deutet dies auf eine wichtige Funktion dieses Faktors in der komplexen Regulation der BMP-Signaltransduktion hin.

Lösliches RGMb Protein inhibiert den Signalweg der Knochenwachstumsfaktoren in Analogie zu sekretierten BMP-Antagonisten

Die Konkurrenz BMP-induzierter Signale durch lösliches RGMb scheint in sehr ähnlicher Weise zu funktionieren, wie es bereits für einige sekretierte lösliche BMP-Antagonisten gezeigt wurde.

Kristallstrukturen einiger dieser Modulatorproteine in Komplexen mit ihren Liganden zeigen, dass diese die Rezeptor/Ligand-Interaktion unterbinden, indem die Antagonisten nach Ligandenbindung beide Rezeptorbindeepitope überdecken (siehe u.a. (Groppe, J. et al. 2002; Thompson, T.B. et al. 2005; Zhang, J.L. et al. 2008; Cash, J.N. et al. 2009)). Dabei weisen die Modulatoren interessanterweise untereinander keinerlei strukturelle Ähnlichkeit auf (Groppe, J. et al. 2002; Thompson, T.B. et al. 2005; Zhang, J.L. et al. 2008; Cash, J.N. et al. 2009). Für eine Übersicht stellt Abbildung 10 in Kapitel 1.4 beispielhaft die Strukturen von Noggin gebunden an BMP-7 (Groppe, J. et al. 2002) beziehungsweise der N-terminalen Von Willebrand Typ C Domäne (VWC1) von Crossveinless-2 (CV2) in Komplex mit BMP-2 (Zhang, J.L. et al. 2008) dar.

Ähnlich den sekretierten BMP-Antagonisten (für eine Übersicht: (Balemans, W. und Van Hul, W. 2002)) könnten lösliche RGM-Proteine somit die Konzentration aktiver Liganden regulieren und dadurch eine entscheidende funktionelle Rolle in der Kontrolle BMP- und GDF-spezifischer Signale einnehmen. Möglicherweise erhöht die Interaktion mit den löslichen RGM-Proteinen zudem die Löslichkeit der BMP-/GDF-Liganden, indem sie deren hydrophobe Oberflächendomänen maskieren. Dadurch könnte die Diffusibilität der sekretierten Wachstumsfaktoren und somit deren biologische Wirkungsreichweite im zellulären Verbund erhöht werden. Ähnliche regulative Funktionen werden auch für die Prodomänen der Liganden der TGF- β Superfamilie diskutiert (Hillger, F. et al. 2005; Sengle, G. et al. 2008; Sengle, G. et al. 2011; Shi, M. et al. 2011).

Darüber hinaus deuten die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Interaktionsstudien jedoch zudem auf einen wesentlichen Unterschied des Inhibitionsmechanismus des löslichen RGMb im Vergleich mit den sekretierten extrazellulären Modulatoren hin. So blockiert der Corezeptor die Interaktion mit den Typ-I Rezeptoren und hemmt darüber hinaus die Bindung an bestimmte Typ-II Rezeptoren (siehe 3.2.4 und 3.4.2 sowie 4.2.1 und 4.2.2). Dies stellt möglicherweise einen völlig neuartigen Modulationsmechanismus dar, durch den die Typ II Rezeptorspezifität selektiv reguliert und BMP-induzierte Signale so zusätzlich fein moduliert werden könnten.

RGMb-Protein reguliert den BMP-Signalweg möglicherweise durch die Rekrutierung spezifischer BMP-Rezeptoren und BMP-Liganden in Membranmikrodomänen

Während für die löslichen RGM-Familienmitglieder, wie im vorigen Kapitel beschrieben, inhibierende Eigenschaften auf den BMP-Signalweg durch die vorliegende Arbeit sowie auch durch andere Studien gezeigt werden konnten, scheinen sich die Effekte der membranverankerten Corezeptoren weitaus komplexer darzustellen. So wurden in Gegenwart der rekombinant exprimierten, membranständigen RGM-Proteine BMP-sensitivierende Aktivitäten beobachtet (siehe zum Beispiel: (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005;

Babitt, J.L. et al. 2006; Xia, Y. et al. 2010)), während für GPI-verankertes RGMB zusätzlich auch ein inhibierender Effekt auf das BMP-Signal in zellbasierten Studien gezeigt werden konnte (Kanomata, K. et al. 2009).

Um diese Widersprüche aufklären zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zellbasierte Studien zur Analyse des Effektes des membranständigen RGMB Corezeptors auf den BMP-Signalweg unter Verwendung von C2C12 Zellen etabliert (siehe 3.3.3). Trotz der gezeigten inhibierenden Wirkung der löslichen RGMB-Variante auf BMP-induzierte Signale (3.3.1) und des durch in vitro Bindungsstudien belegten Ausschlusses direkter Interaktionen des Corezeptors mit Typ I und Typ II Rezeptoren (3.2.4), konnte in diesen Nachweisverfahren jedoch keine eindeutige Hemmung des BMP-Signals durch membranverankertes RGMB herausgestellt werden. Hingegen deuten die Ergebnisse dieser zellbasierten Studien in Analogie zu den entsprechenden Literaturdaten möglicherweise auf einen sensitivierenden Effekt des Corezeptors auf den BMP-Signalweg hin (siehe 3.3.3 und (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Xia, Y. et al. 2010)).

Hieraus ergibt sich die Fragestellung, wie ein GPI-verankertes Protein ohne transmembranäre sowie zytoplasmatische Domäne das BMP-Signal positiv beeinflussen kann, wenn es zudem die Interaktion der Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren durch eine teilweise Blockade der Bindeepitope beeinträchtigt. Ein erster Ansatz zur Lösung dieses Problems ergibt sich aus den Analysen zur Ausbildung höhermolekularer Komplexe bestehend aus BMP-Liganden, RGMB sowie Typ I und Typ II Rezeptoren (siehe 3.4.2). Hier konnte durch in vitro Bindungsstudien gezeigt werden, dass Komplexe aus BMP-Liganden sowie RGMB ausschließlich mit dem Typ II Rezeptor ActR-IIB in Wechselwirkung treten können. RGMB zeigt aufgrund seiner GPI-Verankerung eine Lokalisierung in *Lipid Raft*-Membranmikrodomänen (Xia, Y. et al. 2005). Darüber hinaus werden in der Literatur spezifische Einflüsse unterschiedlicher Membrankompartimente auf die verschiedenen BMP-Signalwege diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass eine Signaltransduktion in *Lipid Raft*-Bereichen vor allem über BMP-induzierte Signalkomplexe (BMP-Induced Signaling Complex, BISC) vermittelt wird, während die Kaskade in den übrigen Domänen über vorgeformte Rezeptorkomplexe (Preformed Complex, PFC) induziert wird (Nohe, A. et al. 2002; Hartung, A. et al. 2006). Diese Membrandomänen unterscheiden sich zudem in den zugrundeliegenden Mechanismen der Rezeptor-Endozytose. Während *Lipid Raft*-Kompartimente einer Caveolae-abhängigen Internalisierung unterliegen, werden *Raft*-unabhängige Bereiche Clathrin-vermittelt endozytiert (Hartung, A. et al. 2006). Auch scheinen sich diese Membrankompartimente in der Weiterleitung der BMP-Signale zu unterscheiden, nach dem aktuellen Modell werden so in Clathrin-gekoppelten Bereichen über vorgeformte BMP-Komplexe SMAD-abhängige und in den Caveolae über BISCs SMAD-unabhängige Signale

transduziert (Hartung, A. et al. 2006). Darüber hinaus gibt es Hinweise in der Literatur, wonach SMAD-Signale auch außerhalb von Clathrin-Kompartimenten induziert werden können (siehe beispielsweise (Rauch, C. et al. 2002; Chen, Y.G. et al. 2007; Murphy, C. 2007; Shi, W. et al. 2007; Wertz, J.W. und Bauer, P.M. 2008; Bragdon, B. et al. 2009)). Eine aktuelle Studie konnte zudem zeigen, dass BMP-2 in C2C12-Zellen stärker mit den Rezeptoren in Caveolae-Bereichen interagiert und dass in Abwesenheit dieser Membrandomänen eine stark verringerte Induktion der SMAD-Signaltransduktion nachweisbar ist (Bonor, J. et al. 2012). Daraus schlossen die Autoren, dass diese Mikrokompimente zusätzlich zu den Clathrin-gekoppelten Domänen für die Induktion dieses kanonischen BMP-Signalweges verantwortlich zeichnen (Bonor, J. et al. 2012). Basierend auf diesen Ergebnissen schlagen die Autoren eine Erweiterung des Modells der BMP-abhängigen Signaltransduktion vor: Demnach induzieren die Caveolae-assoziierten Membrankompimente die SMAD-unabhängigen Signale und regulieren darüber hinaus neben den Clathrin-gekoppelten Domänen auch die Induktion des SMAD-Signalwegs (Bonor, J. et al. 2012). Eine Expression von RGM-Proteinen könnte so die BMP-Liganden selektiv in *Lipid-Raft/Caveolae*-Mikrodomänen lokalisieren und infolgedessen sowohl SMAD, als auch SMAD-unabhängige Signale beeinflussen. Da die Interaktion der BMP-Liganden mit RGMb dabei die Typ I Rezeptorbindung vollständig blockiert und darüber hinaus auch die Interaktion der Liganden mit den Typ II Rezeptoren ActR-II und BMPR-II behindert, sind verschiedene Regulationsmechanismen denkbar. Zum einen könnte RGMb das BMP-abhängige Signal in *Lipid Raft*-Domänen über ActR-IIB verstärken. Dazu müsste jedoch die Möglichkeit bestehen, neben RGMb noch einen Signal-vermittelnden Typ I Rezeptor in den Komplex zu rekrutieren. In vorigen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Signalkomplex bestehend aus zwei Typ II Rezeptoren und nur einer Typ I Rezeptordomäne für die BMP-abhängige Induktion der Alkalischen Phosphatase ausreichend ist (Knaus, P. und Sebald, W. 2001; Heinecke, K. et al. 2009). Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Signale über BMP-induzierte asymmetrische Signalkomplexe transduziert werden, wodurch die gleichzeitige Bindung eines RGMb-Corezeptors sowie einer Typ I Rezeptordomäne an den BMP-Liganden möglich wäre.

Ein alternativer Wirkmechanismus neben einem positiven Effekt auf den BMP-Signalweg könnte sein, dass RGMb ein BMP-Signal über ActR-IIB spezifisch inhibiert, falls die Rekrutierung eines zusätzlichen Typ I Rezeptor in einen ternären Komplex unterbunden wird. Möglicherweise stehen so ActR-IIB vermittelte Signale in den *Raft*-Mikrodomänen solchen gegenüber, die in anderen Membranbereichen über PFCs mit den Typ II Rezeptoren ActR-II bzw. BMPR-II ausgelöst werden. Dieses könnte auch die bereits erwähnte hinsichtlich der Literatur widersprüchliche Typ II Rezeptorselektivität in Anwesenheit der RGM-Corezeptoren erklären (siehe 4.2.2). So könnte RGMb selektiv eine BMP-induzierte Signaltransduktion über ActR-II und BMPR-II und

möglicherweise auch über ActR-IIB in *Lipid Rafts* inhibieren, wodurch die SMAD-unabhängigen Signale gehemmt werden würden. Unter Einbeziehung des erweiterten BMP-Signalmodells nach J. Bonor und Kollegen (2012) könnte so zudem indirekt die Induktion der SMAD-abhängigen Signalweiterleitung über ActR-II und BMPR-II in nicht-*Raft* Bereichen verstärkt werden. Die spezifischen siRNA-vermittelten Inhibitionen der ActR-II sowie BMPR-II Expression, wie bei Y. Xia und Kollegen (2007, 2008 und 2010) dargestellt, würden unter Annahme dieses Mechanismus auch die Signaltransduktion in *Raft*-unabhängigen Bereichen hemmen. Trotz fehlender direkter Interaktionen, würden diese Hemmungen so in der Folge als direkte Beeinflussung durch die RGM-Proteine fehlgedeutet.

Diese Betrachtungen sind jedoch rein spekulativ. Um daher Aussagen über die direkten Einflüsse der RGM-Proteine auf den BMP-Signalweg treffen zu können, bedarf es einer Analyse der konkreten Interaktionen von RGM-Proteinen mit den entsprechenden Typ I und Typ II Rezeptoren in Abhängigkeit von BMP-Liganden auf der Zelloberfläche. Dazu eignen sich insbesondere Visualisierungen basierend auf hochauflösenden mikroskopischen Verfahren, wie zum Beispiel FRET-Analysen. Als Ausgangspunkt für die zukünftige Durchführung dieser Studien stehen nun die in dieser Arbeit erstellten, leistungsfähigen SNAP- und CLIP-Fusionskonstrukte sowie die etablierten Transfektions- und Färbeprotokolle zur Verfügung (siehe 3.4.1).

4.4. STRUKTURELLE ANALYSEN LIEFERN HINWEISE AUF MÖGLICHE MOLEKULARE MECHANISMEN DER TYP II REZEPTORSELEKTIVITÄT

Analyse struktureller und funktioneller Unterschiede der Corezeptor interagierenden sowie nicht interagierenden Ligandengruppen

Um mögliche strukturelle und funktionelle Bereiche zu identifizieren, die für die Interaktionen der Liganden mit RGMb, die Blockade der Typ I Rezeptorwechselwirkung sowie die beobachtete Typ II Rezeptor-Selektivität in Anwesenheit des Corezeptors verantwortlich zeichnen könnten (für Details siehe Kapitel 4.2 und 4.3), werden die TGF- β Mitglieder im Folgenden miteinander strukturell verglichen.

Zunächst werden die Aminosäuresequenzen der humanen reifen Domänen solcher BMP-/GDF-Liganden auf konservierte Abschnitte analysiert, welche in dieser Arbeit direkte Interaktionen mit RGMb zeigten (siehe Abbildung 56 B). Die Konservierung der Aminosäuresequenzen ist beispielhaft mit Hilfe der Kristallstruktur von BMP-2 visualisiert (siehe Abbildung 56 A). Diese Analyse zeigt eine ausgeprägte Konservierung der Liganden der BMP-2/-4, BMP-5/-6/-7/-8 sowie der GDF-5/-6/-7 Familien auf Ebene der Aminosäuresequenz und somit auch übereinstimmende strukturelle Merkmale (gekennzeichnet durch rote Strukturbereiche sowie rote Konsensussequenzen in Abbildung 56). Ein relativ geringer Konservierungsgrad (unter 29% Sequenzidentität) wird durch blaue Bereiche in der BMP-2 Struktur markiert (Abbildung 56 A). Derartige Bereiche finden sich vor allem an den N-Termini der reifen Liganden sowie in den Schleifendomänen zwischen den β -Faltblättern 7 und 8 von Finger 2 (markiert durch die grüne Ellipse, für Nomenklaturen siehe auch Abbildung 5, Kapitel 1.2). Die N-Termini der BMP-Liganden sind flexibel und verfügen über zahlreiche positiv geladene Aminosäurereste, welche die Interaktion der Wachstumsfaktoren mit der extrazellulären Matrix vermittelt über Heparin ermöglichen (Griffith, D.L. et al. 1996; Ruppert, R. et al. 1996; Scheufler, C. et al. 1999; Nickel, J. et al. 2005). Der Schleifenbereich zwischen den β -Faltblättern 7 und 8 zeigt zwar insgesamt einen niedrigen Konservierungsgrad, ist aber geprägt durch polare Aminosäurereste.

Dieses zeigt sich auch in einem Aminosäuresequenzvergleich der Liganden der TGF- β Superfamilie, welche keine direkte Interaktion mit RGMb zeigten (siehe Abbildung 57). Diese Wachstumsfaktoren weisen auch untereinander eine sehr viel niedriger ausgeprägte Konservierung auf der Ebene der Aminosäuresequenzen verglichen mit den RGMb-bindenden Liganden auf, wobei die strukturellen Merkmale jedoch überwiegend erhalten bleiben. Dadurch wird die Analyse markanter Sequenzunterschiede zwischen diesen beiden Liganden-Gruppen erschwert, die auf mögliche Interaktionsbereiche des Corezeptors hinweisen könnten. In dem Schleifenbereich zwischen den β -Faltblättern 2 und 3 konnte jedoch ein hochkonservierter

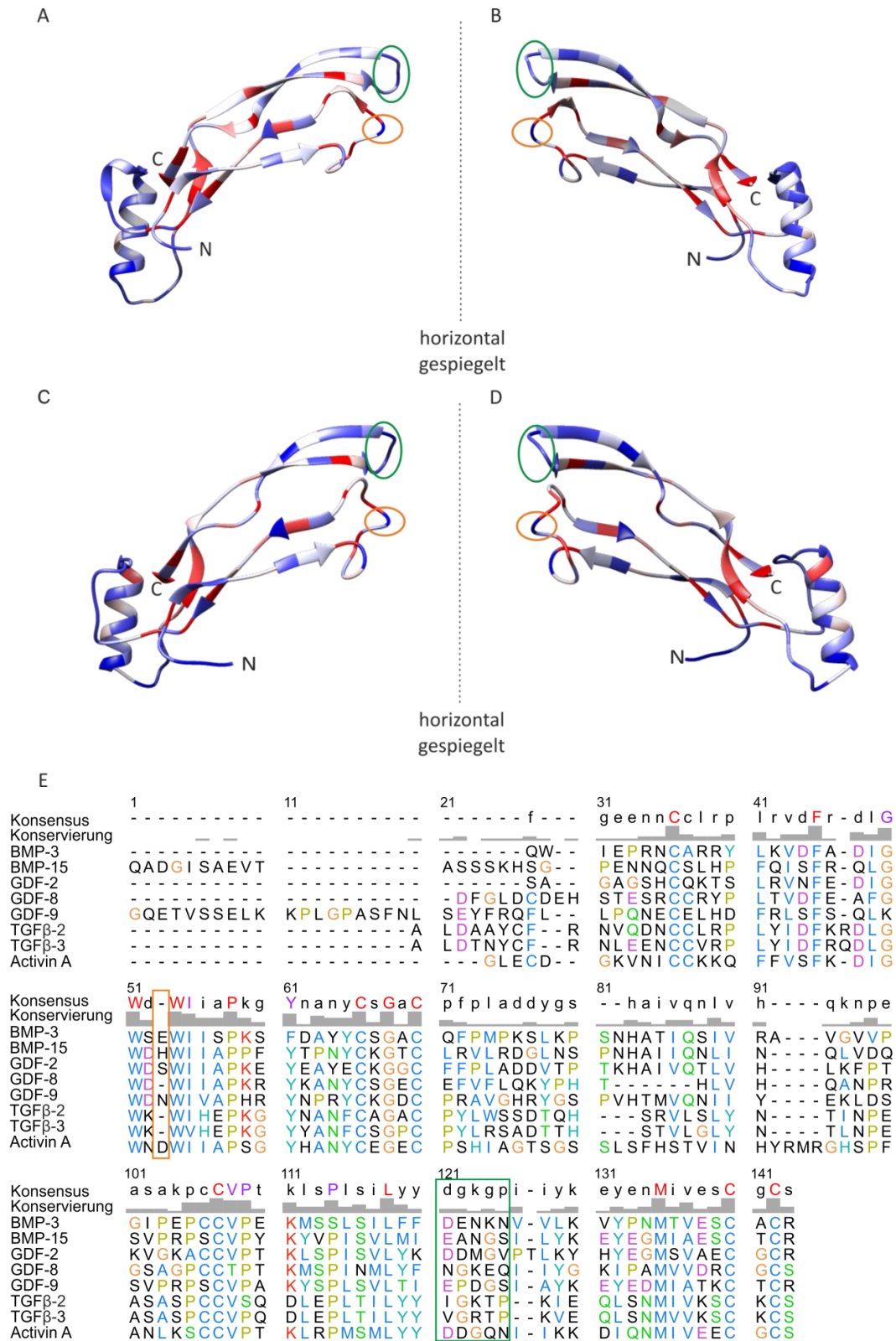


Abbildung 57: Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen reifen Domänen von Liganden der TGF-β Superfamilie, die nicht mit RGMB interagieren. A - B) Übertragung der in (E) ermittelten Konservierung der Aminosäuresequenzen auf die Kristallstruktur von BMP-3 (PDB: 2QCQ, (Allendorph, G.P. et al. 2007)) mit Hilfe des Programms UCSF Chimera Version 1.7 (University of California). Rot: Invariante Aminosäuren, weiß: Konservierung von maximal 56%, blau: Konservierung von maximal 13%. Die grüne Ellipse hebt den variablen Schleifenbereich von Finger 2 zwischen den β-Faltblättern 7 und 8 (siehe auch Abbildung 5, Kapitel 1.2), die orange Ellipse kennzeichnet den in den RGMB interagierenden Liganden konservierten Asparaginsäurerest (siehe auch Abbildung 56). C - D)

4. Diskussion

Übertragung des ermittelten Aminosäuresequenzvergleichs von BMP-2 sowie aller in (E) angegebenen Liganden auf die Kristallstruktur von BMP-2 (PDB: 3BMP, (Scheufler, C. et al. 1999)) mit Hilfe des Programms UCSF Chimera Version 1.7 (University of California). Rot: Invariante Aminosäuren, weiße Bereiche: Konservierung von maximal 61%, blaue Bereiche: Konservierung von maximal 22%. E) Aminosäuresequenzvergleich der TGF- β -Liganden, die nicht direkt mit RGMb interagieren können. Die Sequenzanalyse sowie die Kennzeichnungen erfolgten wie in Abbildung 56 beschrieben. Die Sequenzanalysen erfolgten mittels der Internet-Applikation Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Eine gerichtete Mutationsanalyse könnte Aufschluss darüber geben, ob diese Abweichungen in den Aminosäuresequenzen auch eine funktionelle Relevanz für die Interaktion der Liganden mit RGMb haben könnten.

Unterschiede in der Typ II Rezeptorerkenkung verschiedener Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie geben Hinweise für die Ausbildung der Selektivität der RGMb Interaktion

Die Untersuchungen zur Ausbildung von Komplexen aus BMP-Liganden, Typ I bzw. Typ II Rezeptortodomänen sowie RGMb zeigten, dass keine zusätzliche Interaktion des Corezeptors mit bereits BMPR-IA oder BMPR-IB komplexierten Liganden möglich ist (siehe 3.4.2). Für die zusätzliche Wechselwirkung mit den Typ II Rezeptoren konnte in dieser Arbeit eine Selektivität gegenüber der Interaktion mit ActR-IIB herausgestellt werden (siehe 3.4.2). Auf Basis von bereits vorhandenen Strukturen von Ligand/Rezeptor-Komplexen sollen im Folgenden Unterschiede in der Wechselwirkung verschiedener Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie mit ihren Typ II Rezeptoren herausgestellt werden. Diese könnten Hinweise auf das potentielle RGMb Bindeepitop geben und auf mögliche strukturelle Mechanismen hindeuten, die für die Ausbildung der Typ II Rezeptorselektivität verantwortlich zeichnen.

Abbildung 58 A und B zeigen die Interaktionen der BMP-Liganden mit ihren Rezeptoren beispielhaft an der Kristallstruktur von BMP-2 im Komplex mit BMPR-IA sowie ActR-IIB (Weber, D. et al. 2007). Die Typ I Rezeptoren wechselwirken mit beiden Liganden-Monomeren, wobei sich das Bindeepitop aus den konkaven Bereichen der β -Faltblattstrukturen der einen sowie aus der Prä-Helix-Schleife und der α -helikalen Domäne der zweiten Untereinheit zusammensetzt (siehe auch Abschnitt 1.3, (Weber, D. et al. 2007)). Hingegen interagiert jede Typ II Rezeptortodomäne lediglich mit einem der Ligandenmonomere und die entsprechenden Bindeepitope befinden sich in den konvexen Bereichen der β -Faltblattstrukturen (siehe auch Abschnitt 1.3, (Weber, D. et al. 2007)). Die Liganden der TGF- β Subfamilie interagieren im Vergleich mit der BMP-Untergruppe in einem ähnlichen Bereich mit den Typ I Rezeptoren, wohingegen die Interaktion mit den Typ II Rezeptoren in den Schleifenbereichen zwischen den β -Faltblättern 7 und 8 sowie 2 und 3 (Fingerspitzendomänen) und somit in einem stark divergierenden Bindeepitop stattfindet (siehe Abbildung 58 C und D, (Radaev, S. et al. 2010)).

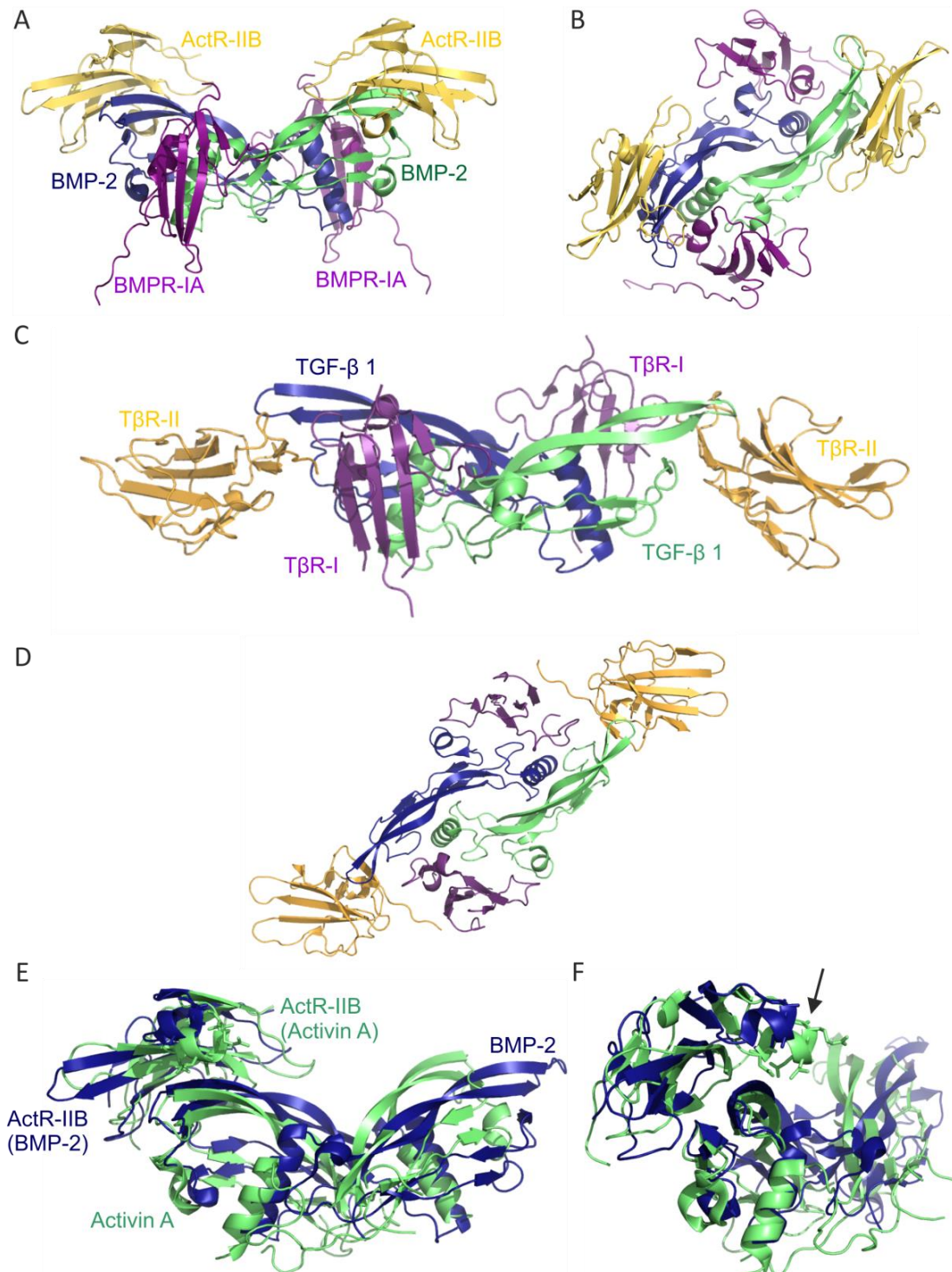


Abbildung 58: Strukturen beispielhafter Komplexe aus Liganden der TGF- β Superfamilie und ihren Rezeptoren. A) Seitenansicht sowie B) Aufsicht auf die Kristallstruktur des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA und ActR-IIB in der Bänderdarstellung (PDB: 2H64, (Weber, D. et al. 2007)). C) Seitenansicht sowie D) Aufsicht auf die Kristallstruktur des ternären Komplexes aus TGF- β 1, T β R-I und T β R-II in der Bänderdarstellung (PDB: 3KFD, (Radaev, S. et al. 2010)). E) Seitenansicht einer Überlagerung der Kristallstrukturen aus Activin A mit ActR-IIB (grün, PDB: 1S4Y, (Greenwald, J. et al. 2004)) und BMP-2 mit ActR-IIB (blau, PDB: 2H62, (Weber, D. et al. 2007)) in der Bänderdarstellung. F) Drehung der Struktur in E) gegen den Uhrzeigersinn ($\sim 45^\circ$). Der Pfeil kennzeichnet die veränderte Neigung von ActR-IIB.

Abbildung 58 E und F stellen die Überlagerung der Kristallstrukturen von Komplexen aus Activin A und ActR-IIB (grün, PDB: 1S4Y (Greenwald, J. et al. 2004)) sowie aus BMP-2 und ActR-IIB dar (blau, PDB: 2H62; (Weber, D. et al. 2007)). Für eine bessere Übersicht wurde jeweils nur eine Rezeptorektodomäne visualisiert. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, dass die Activin-Liganden wiederum in vergleichbarer Weise mit den Typ II Rezeptorektodomänen wie die BMP-Wachstumsfaktoren interagieren. Es werden jedoch auch markante Unterschiede deutlich. So sind die monomeren Untereinheiten der beiden Liganden verschieden zueinander angeordnet. In Anlehnung an die Schmetterlingsstruktur des BMP-2 Dimers sind die Monomere von Activin A wie in einem Flügelaufschlag weiter zueinander geneigt, wofür vermutlich eine stärkere Flexibilität der Activin Liganden verantwortlich zeichnet (für Details: (Thompson, T.B. et al. 2003; Greenwald, J. et al. 2004)). Zudem nimmt auch die Rezeptorektodomäne unterschiedliche Positionen ein und ist in der Activin A Struktur verglichen mit der BMP-2 Interaktion stärker über die β -Faltblattstrukturen des Liganden geneigt (markiert durch den Pfeil in Abbildung 58 F).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der *in vitro* Bindungsstudien eindeutig gezeigt werden, dass rekombinantes RGMB Protein mit den Wachstumsfaktoren der BMP-2/-4, der BMP-5/-6/-7/-8 sowie der GDF-5/-6/-7 Familien interagiert, nicht aber mit Vertretern der TGF- β oder Activin Gruppen (siehe 3.2.2 sowie 4.1.1). Für die hier präsentierte selektive Wechselwirkung der RGMB/Ligand-Komplexe mit ActR-IIB (für Details 4.2 und 4.3) müssen daher strukturelle Unterschiede zwischen den BMP interagierenden Typ II Rezeptoren verantwortlich zeichnen. Möglicherweise nutzt der Corezeptor für die Ligandenbindung die Fingerspitzen-domänen, welche im Falle der TGF- β Liganden die Typ II Rezeptorbindung vermitteln. Dieses könnte zudem auch die fehlenden Wechselwirkungen von RGMB mit TGF- β Liganden erklären, da hier die Sequenzunterschiede am größten sind.

Um mögliche Hinweise auf die molekularen Grundlagen der Typ II Rezeptorspezifität zu erlangen, werden im Folgenden die Aminosäuresequenzen sowie die Kristallstrukturen der BMP spezifischen Typ II Rezeptorektodomänen (ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II) miteinander verglichen. Da in den *in vitro* Bindungsstudien ausschließlich Ektodomänen von rekombinanten humanen Typ II Rezeptoren Anwendung fanden, können Aussagen über eine RGMB-abhängige Beeinflussung dieser Spezifität nur in Bezug auf das humane System getroffen werden. Daher wurden die Aminosäuresequenzvergleiche auch auf humane Rezeptorektodomänen begrenzt und die Analyse nicht auf weitere Organismen ausgeweitet. Auf Grund dieser Einschränkungen wird im Folgenden nicht von Aminosäurekonservierungen, sondern von Sequenzidentitäten gesprochen.

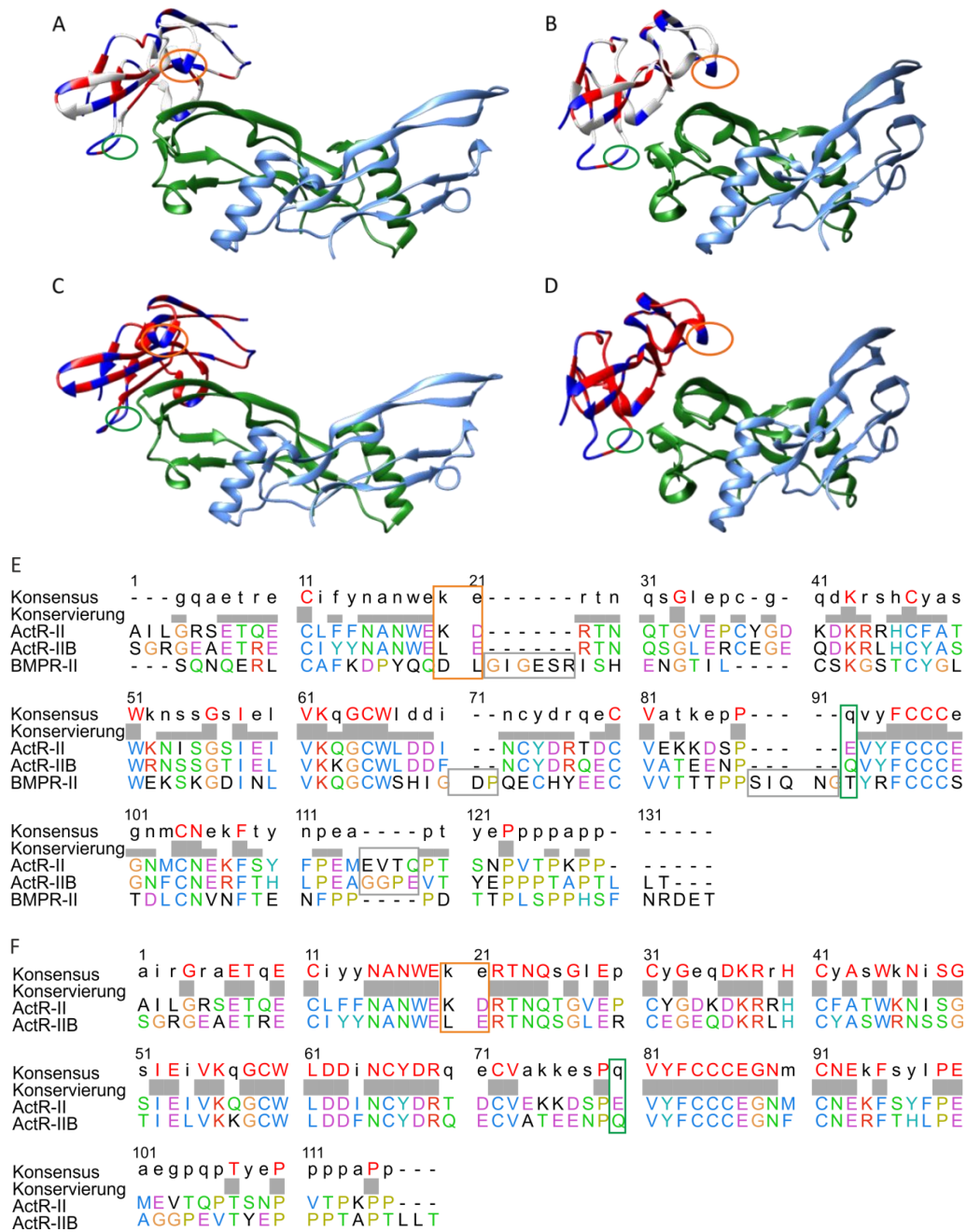


Abbildung 59: Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen BMP-spezifischen Typ II Rezeptortodomänen. A - B) Übertragung der in (E) ermittelten Sequenzidentitäten der Aminosäuresequenzen auf die Kristallstruktur von ActR-IIB gebunden an BMP-2 (grün-blau) (PDB: 2H62, (Weber, D. et al. 2007)). Rot: Invariante Aminosäuren, weiß: Sequenzübereinstimmung bei zwei Rezeptortodomänen, blau: variable Sequenzbereiche. C - D) Übertragung der in (F) ermittelten Aminosäuresequenzkonservierung auf die Kristallstruktur von ActR-IIB gebunden an BMP-2 (grün-blau) (PDB: 2H62, (Weber, D. et al. 2007)). Rot: Invariante Aminosäuren, blau: variable Sequenzbereiche. E) Aminosäuresequenzvergleich der BMP spezifischen Typ II Rezeptortodomänen. F) Aminosäuresequenzvergleich der ActR-II und ActR-IIB Ektodomänen. Die Sequenzanalysen erfolgten mittels der Internet-Applikation Clustal Omega und die Konservierung sowie die entsprechende Konsensussequenz wurde mit Hilfe des Programms UCSF Chimera Version 1.7 (University of California) analysiert (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Die Markierung der Aminosäuren entspricht dem Clustal X Farbschema (für Details siehe: <http://www.jalview.org/help/html/colour-schemes/clustal.html>). Die farbigen Kästen umranden die variablen (grün bzw. orange) Bereiche sowie Sequenzinsertionen (grau). Die entsprechenden Strukturbereiche sind mit orangen bzw. grünen Ellipsen gekennzeichnet.

In den Abbildung 59 A und B wurden die Aminosäuresequenzidentitäten der drei humanen Typ II Rezeptortodomänen (siehe Abbildung 59 E) beispielhaft auf die Kristallstruktur von ActR-IIB gebunden an den Liganden BMP-2 (PDB: 2H62, (Weber, D. et al. 2007)) übertragen. Rote Sequenzbereiche markieren invariante Aminosäurereste (100% Sequenzidentität), während weiße Bereiche Sequenzidentitäten von mindestens zwei Rezeptoren und blaue einzigartige Sequenzen widerspiegeln. Strukturbereiche mit niedrigen Sequenzidentitäten, die in Richtung des BMP-Liganden weisen, finden sich vor allem in dem α -helikalen Bereich (orange Ellipse bzw. Umrandung) sowie in der Schleifendomäne zwischen den β -Faltblättern 1 und 2 (grüne Ellipse bzw. Umrandung, für Nomenklaturen siehe auch Abbildung 7 in Abschnitt 1.3). Diese markanten Unterschiede finden sich auch in einem direkten Aminosäuresequenzvergleich zwischen den Ektodomänen der Typ II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB (siehe Abbildung 59 C und D bzw. F).

In den Schleifendömänen zwischen den β -Faltblättern 1 und 2 (grün gekennzeichnet) zeigt sich die Substitution einer polaren ungeladenen Seitenkette in ActR-IIB (Gln80/Q80) mit einer polaren negativ geladenen Aminosäure in ActR-II (Glu80/E80). Da dieser Glutaminrest jedoch Teil des BMP-2/ActR-IIB-Bindeepitops ist (Weber, D. et al. 2007), sollte diese Sequenzvarianz keine Auswirkung auf die Typ II Rezeptorselektivität in Anwesenheit des Corezeptors RGMb spielen. Besonders interessant erscheint hingegen der Aminosäureaustausch von Leucin (Leu20/L20) in ActR-IIB zu Lysin (Lys20/K20) in ActR-II bzw. Aspartat (Asp17/D17) in BMPR-II (orange gekennzeichnet). Hier wurde nicht nur eine hydrophobe (Leu20/L20) mit einer polaren positiv geladenen (Lys20/K20) bzw. polaren negativ geladenen (Asp17/D17) Aminosäure substituiert, sondern im Fall von Lysin auch eine große Seitenkette eingefügt, die eventuell eine zusätzliche Bindung von RGMb sterisch behindern könnte. Zudem könnten die geladenen Seitenketten in ActR-II und BMPR-II auch zu elektrostatischen Hinderungen führen.

Diese Unterschiede werden im Folgenden durch eine direkte Gegenüberstellung der Kristallstrukturen von BMP-2 in Komplex mit der ActR-IIB (Weber, D. et al. 2007) beziehungsweise der ActR-II (Allendorph, G.P. et al. 2006) Rezeptortodomäne analysiert. Abbildung 60 zeigt detaillierte Darstellungen der entsprechenden BMP-2/Typ II Rezeptorwechselwirkungen in der Stereoansicht. Die Seitenketten der Aminosäuren, die durch den Sequenzvergleich als besonders interessant identifiziert wurden, sind entsprechend hervorgehoben und gekennzeichnet.

Die Seitenkette von Leucin an der Position 20 (Leu20/L20) ist in der ActR-IIB Struktur in Richtung der Rezeptortodomäne ausgerichtet. Hingegen ragt die entsprechende Lysin Seitenkette (Lys20/K20) von ActR-II in die Vertiefung zwischen der Typ II Rezeptortodomäne und dem BMP-2 Liganden. Bei einer Interaktion von RGMb mit den Schleifenbereichen zwischen den β -Faltblattodomänen der BMP-Liganden, könnte dieser Lysinrest somit eine sterische Hinderung hervorrufen.

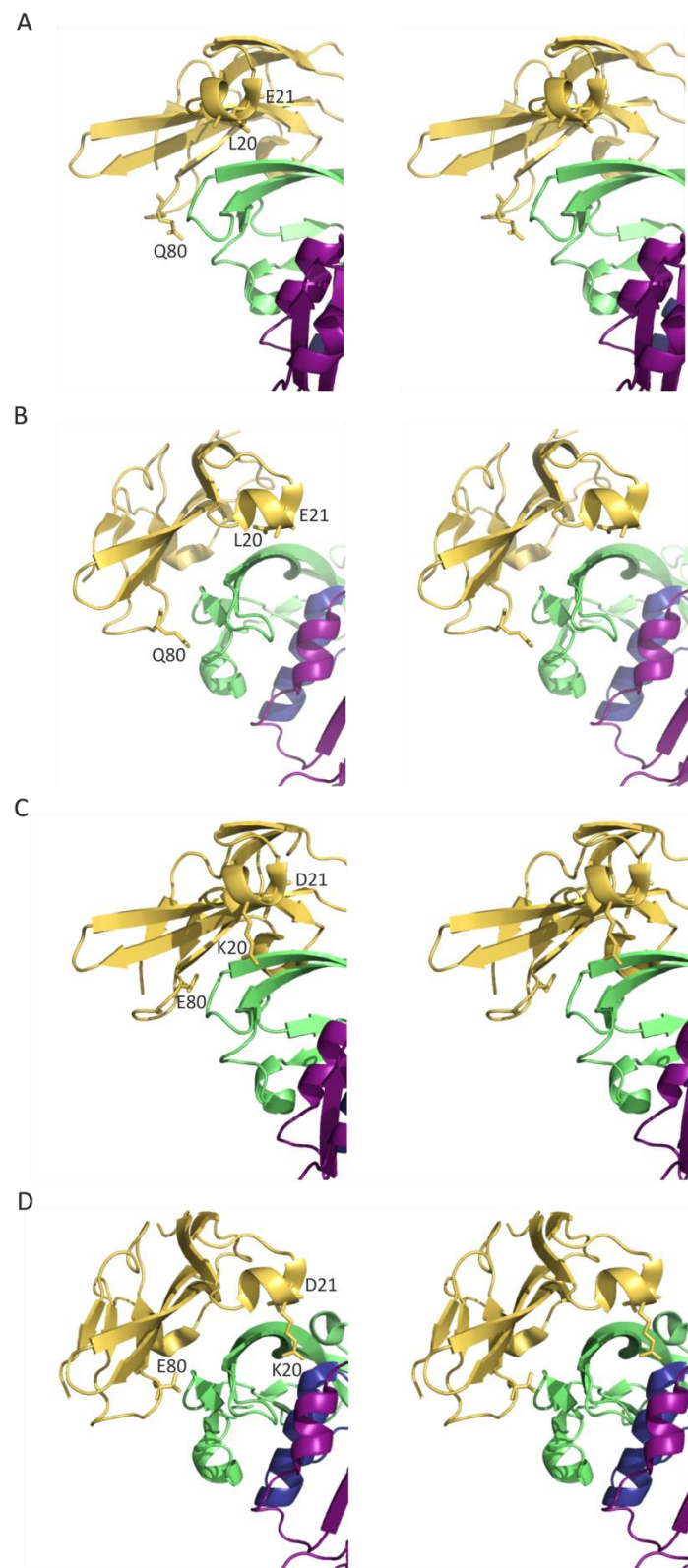


Abbildung 60: Vergleich der Kristallstrukturen für die ternären Komplexe aus BMP-2 (grün), BMPR-IA (violett) und ActR-IIB (gelb) (Weber, D. et al. 2007) bzw. ActR-II (gelb) (Allendorph, G.P. et al. 2007) in der Bänderdarstellung. A) Stereoansicht der Interaktion von BMP-2 mit ActR-IIB (PDB: 2H62, (Weber, D. et al. 2007)). Die Seitenketten der Aminosäuren Leu20 (L20), Glu21 (E21) und Gln80 (Q80) sind hervorgehoben. B) Drehung von A) um $\sim 45^\circ$ gegen den Uhrzeigersinn. C) Stereoansicht der Interaktion von BMP-2 mit ActR-II (PDB: 2GOO, (Allendorph, G.P. et al. 2007)). Die Seitenketten der Aminosäuren Lys20 (K20), Asp21 (D21) und Glu80 (E80) sind hervorgehoben. D) Drehung von C) um $\sim 45^\circ$ gegen den Uhrzeigersinn.

Diese Betrachtungen geben erste Hinweise auf das potentielle RGMb-Bindeepitop sowie auf mögliche molekulare Mechanismen, die in Gegenwart des Corezeptors für die Typ II Rezeptor-selektivität verantwortlich zeichnen könnten. Um eine funktionelle Relevanz dieser Aminosäure-varianzen bezüglich der Typ II Rezeptorwahl herauszustellen und um das RGMb-Bindeepitop der Corezeptor/Ligand-Interaktion weiter einzugrenzen, müssen in zukünftigen Arbeiten gerichtete Mutagenesestudien durchgeführt werden. Ein detaillierter Einblick in die Wechselwirkung von RGMb mit seinen BMP-/GDF-Liganden bedarf hingegen der strukturellen Aufklärung eines Corezeptor/Ligand Komplexes.

Potentielle Interaktionsmechanismen von RGMb mit der BMP-Signalkaskade

Weder über die Struktur der RGMs noch über die molekularen Mechanismen, mit denen diese Faktoren mit den Liganden sowie den Signalrezeptoren der BMP-Familie interagieren, sind bisher Details bekannt. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen sowie aufbauend auf den vorherigen Diskussionsthemen werden im Folgenden mögliche Mechanismen der Wechselwirkung des RGMb Corezeptors mit dem BMP-Signalweg entwickelt. Bisher wurde in der Literatur diskutiert, dass die RGM-Corezeptoren mit BMP-Liganden sowie auch mit beiden Signalrezeptor-Subtypen direkt wechselwirken können (siehe beispielsweise: (Babitt, J.L. et al. 2005; Samad, T.A. et al. 2005; Babitt, J.L. et al. 2006; Xia, Y. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2008)). Zudem wurde vermutet, dass der beobachtete sensitivierende Effekt der Corezeptoren auf die BMP-Signaltransduktion auf einer Erweiterung der Typ II Rezeptornutzung auf BMPRII und ActR-II beruht (Xia, Y. et al. 2007; Xia, Y. et al. 2008; Xia, Y. et al. 2010).

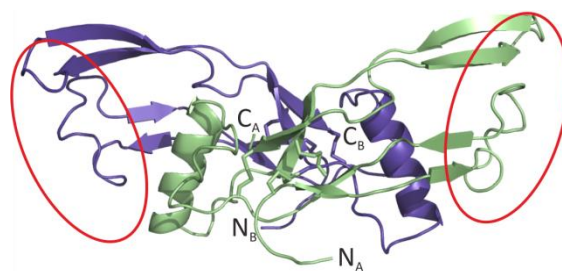


Abbildung 61: Bänderdarstellung der Struktur des BMP-2 Dimers. Mögliche Bereiche für die Interaktion mit dem Modulatorprotein RGMb sind durch die roten Ovale gekennzeichnet (PDB Datei 3BMP (Scheufler, C. et al. 1999)).

Da direkte Interaktionen von RGMb mit isolierten Typ I sowie Typ II Rezeptoren ausgeschlossen werden konnten (3.2.4), der Corezeptor das Typ I Rezeptorbindeepitop vollständig blockiert und ein RGMb/BMP-Ligand Komplex ausschließlich mit ActR-IIB wechselwirken kann (3.4.2), müssen die zuvor in der Literatur angenommenen Überlegungen zumindest für RGMb differenziert im Licht der neuen Faktenlage betrachtet werden (für ausführliche Diskussionen siehe Kapitel 4.3). Basierend auf diesen Ergebnissen sowie der im vorherigen Abschnitt dargestellten

vergleichenden Analyse vorhandener Kristallstrukturen könnte sich das Bindeepitop somit aus Bereichen der Typ I Rezeptorbindungsstelle und den Schleifendomänen zwischen den β -Faltblattdomänen der BMP-Liganden zusammensetzen (siehe Abbildung 61).

Um einen aktivierenden Effekt in Anwesenheit des Corezeptors RGMb auf die BMP-abhängigen Signale zu ermöglichen, ergeben sich aus den derzeitigen Daten zwei potentielle Mechanismen. So ist zum einen ein übergeordneter asymmetrisch aufgebauter Signalkomplex bestehend aus BMP-Ligand, einem RGMb-Corezeptormolekül, zwei ActR-IIB Rezeptorkinasen sowie eines Typ I Rezeptormoleküls denkbar. Eine derartige Zusammensetzung der Signalkomponenten wird auch durch Studien unterstützt, welche einen (ebenfalls asymmetrischen) Signalkomplex bestehend aus dem Liganden, zwei Typ II Rezeptoren und nur einer Typ I Rezeptordomäne als ausreichend für eine aktive Signaltransduktion zeigen konnten (Knaus, P. und Sebald, W. 2001; Heinecke, K. et al. 2009). Da die Lokalisierung des Corezeptors aufgrund seiner GPI-Ankerdomäne in *Lipid Raft*-Domänen vermutet wird (Xia, Y. et al. 2005) und sich diese Membranmikrodomänen darüber hinaus vor allem durch BMP-induzierte Signalkomplexe (BISC) auszeichnen (Nohe, A. et al. 2002; Hartung, A. et al. 2006), könnten so – wie in Kapitel 4.3 detailliert beschrieben – Membrankompartiment-spezifische Signale generiert werden. So könnte der RGMb Corezeptor BMP-Liganden aus dem extrazellulären Bereich binden und damit selektiv in den *Raft*-Membrandomänen an der Zelloberfläche konzentrieren (siehe Abbildung 62 A). Anschließend könnten zwei ActR-IIB Rezeptorkinasen sowie ein Typ I Rezeptor in den Komplex rekrutiert werden, woraufhin auch in Anwesenheit des Corezeptors eine BMP-abhängige Signaltransduktion induziert werden könnte.

Eine zweiter potentieller Mechanismus ergibt sich aus der Annahme, dass für eine aktive Weiterleitung der BMP-induzierten Signale zwei Typ I Rezeptoren benötigt werden (siehe Abbildung 62 B). Auch in diesem Falle könnte RGMb der Membranmikrodomänen-spezifischen Konzentrierung von BMP-Faktoren dienen. Anschließend könnten im Falle einer 1:1 Stöchiometrie des Ligand/Corezeptor Komplexes zudem ebenfalls zwei ActR-IIB Moleküle sowie ein Typ I Rezeptor binden. Die Interaktion mit dem zweiten Typ I Rezeptor und somit die Ausbildung des aktiven Signalkomplexes müsste hingegen im Austausch mit RGMb durch einen Übergabemechanismus stattfinden. Dieser Bindungsmechanismus wäre auch bei einem stöchiometrischen Verhältnis von zwei RGMb Molekülen zu einem BMP-2 denkbar. Hier könnte der Corezeptor wieder zunächst den Liganden an die Zelloberfläche rekrutieren und anschließend die Interaktion mit ActR-IIB stabilisieren. In einem sequentiellen Prozess könnten schließlich beide Typ I Rezeptordomänen nacheinander im Austausch gegen die beiden Corezeptordomänen an den Komplex binden. Die SPR-Messungen mit BMP-2 Varianten mit beeinträchtigten Typ I Rezeptorinteraktionen geben erste Hinweise darauf, dass die Typ I

Rezeptoren sowie der Corezeptor zwar ähnliche Oberflächenepitope, jedoch offenbar unterschiedliche Hauptbindedeterminanten nutzen (3.4.3).

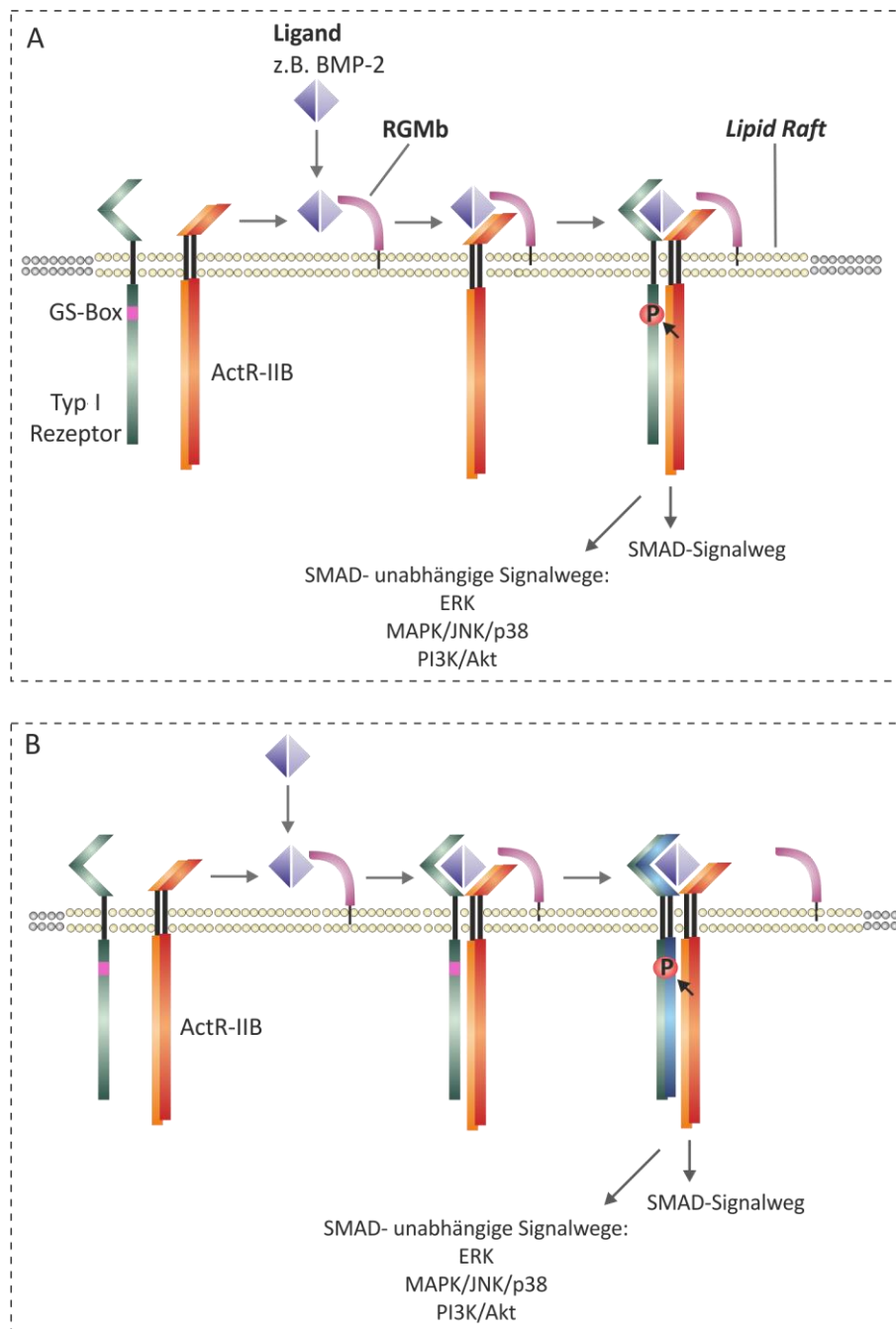


Abbildung 62: Potentielle Interaktionsmechanismen von RGMb mit den BMP-Signalkomponenten. A) Der Corezeptor RGMb bindet BMP-Liganden in einem 1:1 Komplex und konzentriert diese an der Zelloberfläche in *Lipid Raft*-Domänen. Der Ligand/Corezeptor-Komplex rekrutiert dann zwei ActR-IIB Moleküle in den Komplex und ermöglicht schließlich die Interaktion mit einer Typ I Rezeptorkinase. Die Signaltransduktion kann induziert werden. B) RGMb konzentriert BMP-Liganden in 1:1 oder 1:2 Komplexen an der Zelloberfläche in *Raft*-Bereichen. Zwei Moleküle der Rezeptorkinase ActR-IIB interagieren mit dem Komplex und anschließend werden die Corezeptoren sequentiell durch die Bindung von zwei Typ I Rezeptoren aus dem heterooligomeren Komplex verdrängt und die Signalkaskade eingeleitet.

So wären in dem zweiten vorgeschlagenen Bindemechanismus auch Übergangssituationen denkbar, in denen RGMb noch transient an den Liganden gebunden vorliegt, während der Typ I Rezeptor bereits bindet. Diese Prozesse könnten zudem mit einer so schnellen Kinetik ablaufen, dass sie eine Konzentrierung/Kooperativität der Signalkomponenten in den *Lipid Raft*-Domänen benötigen und so nicht mittels der eingesetzten in vitro Bindungsstudien zu verfolgen sind. Ein ähnlicher Übergabemechanismus wird für die Interaktion von TNF (*Tumor Necrosis Factor*) mit seinen Rezeptoren p55 (auch: TNF-R1) und p75 (auch: TNF-R2) vorgeschlagen (*ligand passing*-Theorie; (Tartaglia, L.A. et al. 1993)). Hierbei wird TNF nahe der Zelloberfläche durch die selektive Interaktion mit p75 konzentriert, anschließend dissoziiert dieser Rezeptor und der Ligand bindet mit einer höheren Effizienz an den zweiten Rezeptor p55 (Tartaglia, L.A. et al. 1993; Pinckard, J.K. et al. 1997). Darüber hinaus wird die *ligand passing*-Theorie auch als Erklärung für die Interaktionen von NGF (*Nerve Growth Factor*) mit den Transmembranrezeptoren TrkA und p75 herangezogen (Mehta, H.M. et al. 2012).

4.5. AUSBLICK

Für ein umfassendes Verständnis der Beeinflussung des BMP-Signalweges durch den Corezeptor RGMb bedarf es der detaillierten Aufklärung der zugrundeliegenden komplexen molekularen Interaktionsmechanismen. Bisher sind jedoch nur wenige Einzelheiten über die Wechselwirkungen der RGM-Corezeptoren mit den BMP-Signalkomponenten bekannt. Unklar ist darüber hinaus, ob der membranverankerte Corezeptor RGMb aktivierend oder inhibierend auf die BMP-induzierten Signale einwirkt. Die vorliegende Arbeit liefert diesbezüglich neue Erkenntnisse, welche zur Aufklärung der Wechselwirkungen des Corezeptors mit den Signalkomponenten des BMP-Signalweges beitragen können. Jedoch ergeben sich aus diesen Ergebnissen auch neue Fragen. Daher bedarf die Analyse der molekularen Mechanismen der Interaktion von RGMb mit dem BMP-Signalweg weiterführender Untersuchungen.

In diesem Zusammenhang ermöglicht das etablierte Expressionsverfahren die Herstellung ausreichender Mengen des löslichen RGMb-Proteins für eine anschließende röntgenkristallographische Strukturaufklärung. Hierbei ist eine vergleichende Analyse der freien RGMb-Kristallstruktur mit der Struktur eines Corezeptor/BMP-2 Komplexes von besonderem Interesse. Dadurch ließen sich neben den RGMb-Bindeepitopen auch durch die Liganden-Bindung bedingte eventuelle Konformationsänderungen aufklären. Da Vorversuche zur Isolation eines Ligand/RGMb Komplexes sowie die anschließende HPLC-basierte Analyse der zugrundeliegenden Komplexstöchiometrie (Durchführung siehe 2.15) keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, könnte die strukturelle Analyse eines RGMb/BMP-2 Komplexes auch diese offene Frage klären. Im Rahmen dieser Arbeit führten erste Kristallisationsversuche (2.14) zur

Ausbildung von RGMb-Kristallen, welche jedoch aufgrund ihrer geringen Größe keine Strukturanalyse möglich machten. Diese Kristallisationsbedingungen könnten in folgenden Studien optimiert und zudem auf die Kristallisation eines RGMb/BMP-2 Komplexes ausgeweitet werden.

Weiterhin gilt es durch zukünftige Arbeiten zu klären, wie sich die hier gezeigten *in vitro* Bindungsstudien mit den Effekten der Corezeptoren auf den BMP-Signalweg in Einklang bringen lassen. Können diese Corezeptoren Liganden-abhängig mit den BMP-Rezeptoren in höhermolekulare Signalkomplexe rekrutiert werden? Wie ist ein derartiger oligomerer Komplex zusammengesetzt? Lässt sich die in dieser Arbeit *in vitro* gezeigte Typ II Rezeptorselektivität auch auf die zelluläre Situation ausdehnen? Kann eine Lokalisation dieser RGMb/Ligand/Rezeptor Komplexe in *Lipid Raft*-Domänen bestätigt werden? Zeigen die Komplexe in den Membranmikrodomänen von den übrigen Membranbereichen abweichende Internalisierungsmechanismen? Diese und weitere Fragestellungen lassen sich zukünftig aufbauend auf den hier erarbeiteten Erkenntnissen durch hochauflösende, mikroskopische Analysen (z. B. FRET-Studien) klären. Als effektive Werkzeuge stehen hierfür nun die in dieser Arbeit synthetisierten SNAP- und CLIP-Fusionskonstrukte sowie die etablierten Protokollen zur konfokalen Mikroskopie zur Verfügung.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Abarca-Buis, R.F., R. Cuervo, A.J. Rios-Flores, M. Díaz-Hernández, C. Lozano-Flores, M. Bustamante und J. Chimal-Monroy (2011). "6. Limb development". "Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis". J. Chimal-Monroy, 978-81-7895-506-3, Transworld Research Network: 113- 134.

Abou-Samra, A.B., H. Juppner, T. Force, M.W. Freeman, X.F. Kong, E. Schipani, P. Urena, J. Richards, J.V. Bonventre, J.T. Potts, Jr. und et al. (1992). "Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium". Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2732-2736.

Adkins, H.B., C. Bianco, S.G. Schiffer, P. Rayhorn, M. Zafari, A.E. Cheung, O. Orozco, D. Olson, A. De Luca, L.L. Chen, K. Miatkowski, C. Benjamin, N. Normanno, K.P. Williams, M. Jarpe, D. LePage, D. Salomon und M. Sanicola (2003). "Antibody blockade of the Cripto CFC domain suppresses tumor cell growth in vivo". J Clin Invest **112**(4): 575-587.

Allard, P. und C.J. Tabin (2009). "Achieving bilateral symmetry during vertebrate limb development". Semin Cell Dev Biol **20**(4): 479-484.

Allendorph, G.P., M.J. Isaacs, Y. Kawakami, J.C. Izpisua Belmonte und S. Choe (2007). "BMP-3 and BMP-6 structures illuminate the nature of binding specificity with receptors". Biochemistry **46**(43): 12238-12247.

Allendorph, G.P., W.W. Vale und S. Choe (2006). "Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member". Proc Natl Acad Sci U S A **103**(20): 7643-7648.

Andersen, T.L., T.E. Sondergaard, K.E. Skorzynska, F. Dagnaes-Hansen, T.L. Plesner, E.M. Hauge, T. Plesner und J.M. Delaisse (2009). "A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone". Am J Pathol **174**(1): 239-247.

Anderson, E., S. Peluso, L.A. Lettice und R.E. Hill (2012). "Human limb abnormalities caused by disruption of hedgehog signaling". Trends Genet **28**(8): 364-373.

Andriopoulos, B., Jr., E. Corradini, Y. Xia, S.A. Faasse, S. Chen, L. Grgurevic, M.D. Knutson, A. Pietrangelo, S. Vukicevic, H.Y. Lin und J.L. Babitt (2009). "BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism". Nat Genet **41**(4): 482-487.

Annes, J.P., J.S. Munger und D.B. Rifkin (2003). "Making sense of latent TGFbeta activation". J Cell Sci **116**(Pt 2): 217-224.

Asahina, I., T.K. Sampath und P.V. Hauschka (1996). "Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells". Exp Cell Res **222**(1): 38-47.

Ash, P., J.F. Loutit und K.M. Townsend (1980). "Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells". Nature **283**(5748): 669-670.

Attisano, L. und J.L. Wrana (2002). "Signal transduction by the TGF-beta superfamily". Science **296**(5573): 1646-1647.

- Babitt, J.L., F.W. Huang, D.M. Wrighting, Y. Xia, Y. Sidis, T.A. Samad, J.A. Campagna, R.T. Chung, A.L. Schneyer, C.J. Woolf, N.C. Andrews und H.Y. Lin (2006). "Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression". Nat Genet **38**(5): 531-539.
- Babitt, J.L., F.W. Huang, Y. Xia, Y. Sidis, N.C. Andrews und H.Y. Lin (2007). "Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance". J Clin Invest **117**(7): 1933-1939.
- Babitt, J.L., Y. Zhang, T.A. Samad, Y. Xia, J. Tang, J.A. Campagna, A.L. Schneyer, C.J. Woolf und H.Y. Lin (2005). "Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor". J Biol Chem **280**(33): 29820-29827.
- Balemans, W. und W. Van Hul (2002). "Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators". Dev Biol **250**(2): 231-250.
- Balemans, W., L. Van Wesenbeeck und W. Van Hul (2005). "A clinical and molecular overview of the human osteopetroses". Calcif Tissue Int **77**(5): 263-274.
- Barbara, N.P., J.L. Wrana und M. Letarte (1999). "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily". J Biol Chem **274**(2): 584-594.
- Benazet, J.D. und R. Zeller (2009). "Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system". Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(4): a001339.
- Beutler, E. (2006). "Hemochromatosis: genetics and pathophysiology". Annu Rev Med **57**: 331-347.
- Bianco, P., M. Riminucci, S. Gronthos und P.G. Robey (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications". Stem Cells **19**(3): 180-192.
- Billington, C.J., Jr., J.E. Fiebig, C.L. Forsman, L. Pham, N. Burbach, M. Sun, T. Jaskoll, K. Mansky, R. Gopalakrishnan, M.B. O'Connor, T.D. Mueller und A. Petryk (2011). "Glycosylation of Twisted Gastrulation is Required for BMP Binding and Activity during Craniofacial Development". Front Physiol **2**: 59.
- Bobinac, D., J. Spanjol, M. Marinovic, S. Zoricic Cvek, I. Maric, T. Cicvaric, D. Fuckar, D. Markic und B. Vojnikovic (2008). "Expression of bone morphogenetic proteins, cartilage-derived morphogenetic proteins and related receptors in normal and osteoarthritic human articular cartilage". Coll Antropol **32 Suppl 2**: 83-87.
- Bogan, A.A. und K.S. Thorn (1998). "Anatomy of hot spots in protein interfaces". J Mol Biol **280**(1): 1-9.
- Bonewald, L.F. (2005). "Generation and function of osteocyte dendritic processes". J Musculoskelet Neuronal Interact **5**(4): 321-324.
- Bonewald, L.F. (2011). "The amazing osteocyte". J Bone Miner Res **26**(2): 229-238.
- Bonor, J., E.L. Adams, B. Bragdon, O. Moseychuk, K.J. Czymmek und A. Nohe (2012). "Initiation of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane". J Cell Physiol **227**(7): 2880-2888.
- Boyle, W.J., W.S. Simonet und D.L. Lacey (2003). "Osteoclast differentiation and activation". Nature **423**(6937): 337-342.

- Bragdon, B., S. Thinakaran, J. Bonor, T.M. Underhill, N.O. Petersen und A. Nohe (2009). "FRET reveals novel protein-receptor interaction of bone morphogenetic proteins receptors and adaptor protein 2 at the cell surface". Biophys J **97**(5): 1428-1435.
- Brasse-Lagnel, C., M. Poli, C. Lesueur, B. Grandchamp, A. Lavoinne, C. Beaumont und S. Bekri (2010). "Immunoassay for human serum hemojuvelin". Haematologica **95**(12): 2031-2037.
- Brinks, H., S. Conrad, J. Vogt, J. Oldekamp, A. Sierra, L. Deitinghoff, I. Bechmann, G. Alvarez-Bolado, B. Heimrich, P.P. Monnier, B.K. Mueller und T. Skutella (2004). "The repulsive guidance molecule RGMa is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus". J Neurosci **24**(15): 3862-3869.
- Brown, M.A., Q. Zhao, K.A. Baker, C. Naik, C. Chen, L. Pukac, M. Singh, T. Tsareva, Y. Parice, A. Mahoney, V. Roschke, I. Sanyal und S. Choe (2005). "Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors". J Biol Chem **280**(26): 25111-25118.
- Bucay, N., I. Sarosi, C.R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H.L. Tan, W. Xu, D.L. Lacey, W.J. Boyle und W.S. Simonet (1998). "osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification". Genes Dev **12**(9): 1260-1268.
- Burgess, T.L., Y. Qian, S. Kaufman, B.D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W.J. Boyle, C.R. Dunstan, S. Hu und D.L. Lacey (1999). "The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts". J Cell Biol **145**(3): 527-538.
- Canalis, E., A.N. Economides und E. Gazzerro (2003). "Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton". Endocr Rev **24**(2): 218-235.
- Carcamo, J., F.M. Weis, F. Ventura, R. Wieser, J.L. Wrana, L. Attisano und J. Massague (1994). "Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin". Mol Cell Biol **14**(6): 3810-3821.
- Cash, J.N., C.A. Rejon, A.C. McPherron, D.J. Bernard und T.B. Thompson (2009). "The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding". EMBO J **28**(17): 2662-2676.
- Chang, H., C.W. Brown und M.M. Matzuk (2002). "Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily". Endocr Rev **23**(6): 787-823.
- Chang, V.T., M. Crispin, A.R. Aricescu, D.J. Harvey, J.E. Nettleship, J.A. Fennelly, C. Yu, K.S. Boles, E.J. Evans, D.I. Stuart, R.A. Dwek, E.Y. Jones, R.J. Owens und S.J. Davis (2007). "Glycoprotein structural genomics: solving the glycosylation problem". Structure **15**(3): 267-273.
- Chen, A.L., C. Fang, C. Liu, M.P. Leslie, E. Chang und P.E. Di Cesare (2004). "Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage". J Orthop Res **22**(6): 1188-1192.
- Chen, C., S.M. Ware, A. Sato, D.E. Houston-Hawkins, R. Habas, M.M. Matzuk, M.M. Shen und C.W. Brown (2006). "The Vg1-related protein Gdf3 acts in a Nodal signaling pathway in the pre-gastrulation mouse embryo". Development **133**(2): 319-329.
- Chen, D., M. Zhao und G.R. Mundy (2004). "Bone morphogenetic proteins". Growth Factors **22**(4): 233-241.
- Chen, Y., A. Bhushan und W. Vale (1997). "Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 [corrected] receptor serine kinase". Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 12938-12943.

- Chen, Y.G. und J. Massague (1999). "Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors". J Biol Chem **274**(6): 3672-3677.
- Chen, Y.G., Z. Wang, J. Ma, L. Zhang und Z. Lu (2007). "Endofin, a FYVE domain protein, interacts with Smad4 and facilitates transforming growth factor-beta signaling". J Biol Chem **282**(13): 9688-9695.
- Cheng, S.K., F. Olale, J.T. Bennett, A.H. Brivanlou und A.F. Schier (2003). "EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1". Genes Dev **17**(1): 31-36.
- Cheng, Y.-C. und W.H. Prusoff (1973). "Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction.". Biochem Pharmacol. **22**(23): 10.
- Chevallier, A., M. Kieny und A. Mauger (1977). "Limb-somite relationship: origin of the limb musculature". J Embryol Exp Morphol **41**: 245-258.
- Christ, B., H.J. Jacob und M. Jacob (1977). "Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos". Anat Embryol (Berl) **150**(2): 171-186.
- Chubinskaya, S., C. Merrihew, G. Cs-Szabo, J. Mollenhauer, J. McCartney, D.C. Rueger und K.E. Kuettner (2000). "Human articular chondrocytes express osteogenic protein-1". J Histochem Cytochem **48**(2): 239-250.
- Clackson, T. und J.A. Wells (1995). "A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface". Science **267**(5196): 383-386.
- Constam, D.B. und E.J. Robertson (1999). "Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases". J Cell Biol **144**(1): 139-149.
- Cunningham, N.S., V. Paralkar und 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**(24): 11740-11744.
- Daopin, S., K.A. Piez, Y. Ogawa und D.R. Davies (1992). "Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily". Science **257**(5068): 369-373.
- Dathe, K., K.W. Kjaer, A. Brehm, P. Meinecke, P. Nurnberg, J.C. Neto, D. Brunoni, N. Tommerup, C.E. Ott, E. Klopocki, P. Seemann und S. Mundlos (2009). "Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2". Am J Hum Genet **84**(4): 483-492.
- de Jesus Perez, V.A., T.P. Alastalo, J.C. Wu, J.D. Axelrod, J.P. Cooke, M. Amieva und M. Rabinovitch (2009). "Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways". J Cell Biol **184**(1): 83-99.
- De Robertis, E.M. und H. Kuroda (2004). "Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos". Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 285-308.
- Degnin, C., F. Jean, G. Thomas und J.L. Christian (2004). "Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4". Mol Biol Cell **15**(11): 5012-5020.

- Dennis, J.E., A. Merriam, A. Awadallah, J.U. Yoo, B. Johnstone und A.I. Caplan (1999). "A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse". J Bone Miner Res **14**(5): 700-709.
- Derynck, R., W.M. Gelbart, R.M. Harland, C.H. Heldin, S.E. Kern, J. Massague, D.A. Melton, M. Mlodzik, R.W. Padgett, A.B. Roberts, J. Smith, G.H. Thomsen, B. Vogelstein und X.F. Wang (1996). "Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals". Cell **87**(2): 173.
- Ducy, P., T. Schinke und G. Karsenty (2000). "The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance". Science **289**(5484): 1501-1504.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall und G. Karsenty (1997). "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation". Cell **89**(5): 747-754.
- Dudley, A.T., K.M. Lyons und E.J. Robertson (1995). "A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye". Genes Dev **9**(22): 2795-2807.
- Eder, J., M. Rheinnecker und A.R. Fersht (1993). "Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence". J Mol Biol **233**(2): 293-304.
- Egli, R.J., L. Southam, J.M. Wilkins, I. Lorenzen, M. Pombo-Suarez, A. Gonzalez, A. Carr, K. Chapman und J. Loughlin (2009). "Functional analysis of the osteoarthritis susceptibility-associated GDF5 regulatory polymorphism". Arthritis Rheum **60**(7): 2055-2064.
- Eigenbrot, C. und N. Gerber (1997). "X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding". Nat Struct Biol **4**(6): 435-438.
- Elbein, A.D., J.E. Tropea, M. Mitchell und G.P. Kaushal (1990). "Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I". J Biol Chem **265**(26): 15599-15605.
- Endo, M. und T. Yamashita (2009). "Inactivation of Ras by p120GAP via focal adhesion kinase dephosphorylation mediates RGMa-induced growth cone collapse". J Neurosci **29**(20): 6649-6662.
- Everts, V., J.M. Delaisse, W. Korper, D.C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig und W. Beertsen (2002). "The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation". J Bone Miner Res **17**(1): 77-90.
- Feng, X.H. und R. Derynck (2005). "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads". Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 659-693.
- Fermor, B. und T.M. Skerry (1995). "PTH/PTHrP receptor expression on osteoblasts and osteocytes but not resorbing bone surfaces in growing rats". J Bone Miner Res **10**(12): 1935-1943.
- Finkenstedt, A., A. Widschwendter, C.G. Brasse-Lagnel, I. Theurl, M. Hubalek, H. Dieplinger, C. Tselepis, D.G. Ward, W. Vogel und H. Zoller (2012). "Hepcidin is correlated to soluble hemojuvelin but not to increased GDF15 during pregnancy". Blood Cells Mol Dis **48**(4): 233-237.
- Flanagan, M.T. (1984). "Surface plasmon resonance and immunosensors". Electronics Letters **20**(23): 3.
- Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.". Ann. Phys. **437**: 55-75.

- Francis-West, P.H., A. Abdelfattah, P. Chen, C. Allen, J. Parish, R. Ladher, S. Allen, S. MacPherson, F.P. Luyten und C.W. Archer (1999). "Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development". Development **126**(6): 1305-1315.
- Frank, D.B., A. Abtahi, D.J. Yamaguchi, S. Manning, Y. Shyr, A. Pozzi, H.S. Baldwin, J.E. Johnson und M.P. de Caestecker (2005). "Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension". Circ Res **97**(5): 496-504.
- Frost, H.M. (1969). "Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling". Calcif Tissue Res **3**(3): 211-237.
- Frost, H.M. (1989). "Some effects of basic multicellular unit-based remodelling on photon absorptiometry of trabecular bone". Bone Miner **7**(1): 47-65.
- Fujita, M. und T. Kinoshita (2010). "Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins". FEBS Lett **584**(9): 1670-1677.
- Fujita, M. und T. Kinoshita (2012). "GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics". Biochim Biophys Acta **1821**(8): 1050-1058.
- Fukui, N., Y. Ikeda, T. Ohnuki, A. Hikita, S. Tanaka, S. Yamane, R. Suzuki, L.J. Sandell und T. Ochi (2006). "Pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha induces bone morphogenetic protein-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation". J Biol Chem **281**(37): 27229-27241.
- Ganz, T. (2005). "Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages". Best Pract Res Clin Haematol **18**(2): 171-182.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel und A. Bairoch (2005). "Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server". Totowa, NJ 978-1-58829-343-5, Humana Press
- Gazzerro, E. und E. Canalis (2006). "Bone morphogenetic proteins and their antagonists". Rev Endocr Metab Disord **7**(1-2): 51-65.
- Ge, G., D.R. Hopkins, W.B. Ho und D.S. Greenspan (2005). "GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells". Mol Cell Biol **25**(14): 5846-5858.
- Gentry, L.E. und B.W. Nash (1990). "The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor". Biochemistry **29**(29): 6851-6857.
- Gilbert, S.F. (2003). "Developmental Biology", 978-0878932580, Palgrave Macmillan.
- Gilboa, L., A. Nohe, T. Geissendorfer, W. Sebald, Y.I. Henis und P. Knaus (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**(3): 1023-1035.
- Gonzalez, D.S., K. Karaveg, A.S. Vandersall-Nairn, A. Lal und K.W. Moremen (1999). "Identification, expression, and characterization of a cDNA encoding human endoplasmic reticulum mannosidase I, the enzyme that catalyzes the first mannose trimming step in mammalian Asn-linked oligosaccharide biosynthesis". J Biol Chem **274**(30): 21375-21386.

- Gougos, A. und M. Letarte (1988). "Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line". J Immunol **141**(6): 1925-1933.
- Gougos, A. und M. Letarte (1990). "Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells". J Biol Chem **265**(15): 8361-8364.
- Goumans, M.J., G. Valdimarsdottir, S. Itoh, F. Lebrin, J. Larsson, C. Mummery, S. Karlsson und P. ten Dijke (2003). "Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling". Mol Cell **12**(4): 817-828.
- Goumans, M.J., G. Valdimarsdottir, S. Itoh, A. Rosendahl, P. Sideras und P. ten Dijke (2002). "Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors". EMBO J **21**(7): 1743-1753.
- Gray, H. (2000). "Anatomy of the human body". W.H. Lewis, Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000.
- Gray, P.C., C.A. Harrison und W. Vale (2003). "Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling". Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5193-5198.
- Greenwald, J., W.H. Fischer, W.W. Vale und S. Choe (1999). "Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase". Nat Struct Biol **6**(1): 18-22.
- Greenwald, J., J. Groppe, P. Gray, E. Wiater, W. Kwiatkowski, W. Vale und S. Choe (2003). "The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly". Mol Cell **11**(3): 605-617.
- Greenwald, J., M.E. Vega, G.P. Allendorph, W.H. Fischer, W. Vale und S. Choe (2004). "A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors". Mol Cell **15**(3): 485-489.
- Gregory, K.E., R.N. Ono, N.L. Charbonneau, C.L. Kuo, D.R. Keene, H.P. Bachinger und L.Y. Sakai (2005). "The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix". J Biol Chem **280**(30): 27970-27980.
- Griffith, D.L., P.C. Keck, T.K. Sampath, D.C. Rueger und 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**(2): 878-883.
- Grigoriadis, A.E., J.N. Heersche und J.E. Aubin (1988). "Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone". J Cell Biol **106**(6): 2139-2151.
- Gritsman, K., J. Zhang, S. Cheng, E. Heckscher, W.S. Talbot und A.F. Schier (1999). "The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling". Cell **97**(1): 121-132.
- Groppe, J., J. Greenwald, E. Wiater, J. Rodriguez-Leon, A.N. Economides, W. Kwiatkowski, M. Affolter, W.W. Vale, J.C. Izpisua Belmonte und S. Choe (2002). "Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin". Nature **420**(6916): 636-642.
- Groppe, J., J. Greenwald, E. Wiater, J. Rodriguez-Leon, A.N. Economides, W. Kwiatkowski, K. Baban, M. Affolter, W.W. Vale, J.C. Izpisua Belmonte und S. Choe (2003). "Structural basis of

BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein". J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 3**: 52-58.

Grotewold, L., M. Plum, R. Dildrop, T. Peters und U. Ruther (2001). "Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis". Mech Dev **100**(2): 327-330.

Guerrero-Esteo, M., T. Sanchez-Elsner, A. Letamendia und C. Bernabeu (2002). "Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II". J Biol Chem **277**(32): 29197-29209.

Halbrooks, P.J., R. Ding, J.M. Wozney und G. Bain (2007). "Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling". J Mol Signal **2**: 4.

Hall, B.K. und T. Miyake (1992). "The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis". Anat Embryol (Berl) **186**(2): 107-124.

Hall, B.K. und T. Miyake (2000). "All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development". Bioessays **22**(2): 138-147.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids". J Mol Biol **166**(4): 557-580.

Harrington, A.E., S.A. Morris-Triggs, B.T. Ruotolo, C.V. Robinson, S. Ohnuma und M. Hyvonen (2006). "Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin". EMBO J **25**(5): 1035-1045.

Harrison, R.L. und D.L. Jarvis (2006). "Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins". Adv Virus Res **68**: 159-191.

Harth, S. (2010). "Molecular recognition in BMP ligand-receptor interactions". Fakultät für Biologie, Lehrstuhl für Physiologische Chemie II Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Harth, S., A. Kotzsch, J. Hu, W. Sebald und T.D. Mueller (2010). "A selection fit mechanism in BMP receptor IA as a possible source for BMP ligand-receptor promiscuity". PLoS One **5**(9): e13049.

Hartung, A., K. Bitton-Worms, M.M. Rechtman, V. Wenzel, J.H. Boergemann, S. Hassel, Y.I. Henis und P. Knaus (2006). "Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling". Mol Cell Biol **26**(20): 7791-7805.

Hassel, S., S. Schmitt, A. Hartung, M. Roth, A. Nohe, N. Petersen, M. Ehrlich, Y.I. Henis, W. Sebald und P. Knaus (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, K., M. Fujitani, Y. Yasuda, H. Doya, T. Saito, S. Yamagishi, B.K. Mueller und T. Yamashita (2006). "RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury". J Cell Biol **173**(1): 47-58.

Hayashi, H., S. Abdollah, Y. Qiu, J. Cai, Y.Y. Xu, B.W. Grinnell, M.A. Richardson, J.N. Topper, M.A. Gimbrone, Jr., J.L. Wrana und D. Falb (1997). "The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling". Cell **89**(7): 1165-1173.

- Heinecke, K., A. Seher, W. Schmitz, T.D. Mueller, W. Sebald und J. Nickel (2009). "Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins". BMC Biol **7**: 59.
- Heino, T.J., T.A. Hentunen und H.K. Vaananen (2002). "Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen". J Cell Biochem **85**(1): 185-197.
- Heldin, C.H., K. Miyazono und P. ten Dijke (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins". Nature **390**(6659): 465-471.
- Hellmann, T.V., J. Nickel und T.D. Müller (2012). "Missense mutations in GDF-5 signaling: molecular mechanisms behind skeletal malformation". "Mutations in Human Genetic Disease". D. Cooper, 979-953-307-448-0, InTech - Open Access Publisher: 11-54.
- Henriksen, K., A.V. Neutzsky-Wulff, L.F. Bonewald und M.A. Karsdal (2009). "Local communication on and within bone controls bone remodeling". Bone **44**(6): 1026-1033.
- Hildebrand, M. und G. Goslow (2003). "Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere ", 978-3540007579, Springer.
- Hillger, F., G. Herr, R. Rudolph und E. Schwarz (2005). "Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor". J Biol Chem **280**(15): 14974-14980.
- Hinck, A.P., S.J. Archer, S.W. Qian, A.B. Roberts, M.B. Sporn, J.A. Weatherbee, M.L. Tsang, R. Lucas, B.L. Zhang, J. Wenker und D.A. Torchia (1996). "Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2". Biochemistry **35**(26): 8517-8534.
- Hogan, B.L. (1996a). "Bone morphogenetic proteins in development". Curr Opin Genet Dev **6**(4): 432-438.
- Hogan, B.L. (1996b). "Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development". Genes Dev **10**(13): 1580-1594.
- Holtzhauer, M. und J. Behlke (1996). "Methoden in der Proteinanalytik". Berlin ; New York, 3540602100 Springer.
- Hoodless, P.A., T. Haerry, S. Abdollah, M. Stapleton, M.B. O'Connor, L. Attisano und J.L. Wrana (1996). "MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways". Cell **85**(4): 489-500.
- Huang, F.W., J.L. Pinkus, G.S. Pinkus, M.D. Fleming und N.C. Andrews (2005). "A mouse model of juvenile hemochromatosis". J Clin Invest **115**(8): 2187-2191.
- Iimura, T., N. Denans und O. Pourquie (2009). "Establishment of Hox vertebral identities in the embryonic spine precursors". Curr Top Dev Biol **88**: 201-234.
- Ikonomou, L., Y.J. Schneider und S.N. Agathos (2003). "Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins". Appl Microbiol Biotechnol **62**(1): 1-20.
- Imamura, T., M. Takase, A. Nishihara, E. Oeda, J. Hanai, M. Kawabata und K. Miyazono (1997). "Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily". Nature **389**(6651): 622-626.
- Inouye, M. (1991). "Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding". Enzyme **45**(5-6): 314-321.

- Insogna, K.L., M. Sahni, A.B. Grey, S. Tanaka, W.C. Horne, L. Neff, M. Mitnick, J.B. Levy und R. Baron (1997). "Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts". J Clin Invest **100**(10): 2476-2485.
- Ito, H., H. Akiyama, C. Shigeno und T. Nakamura (1999). "Bone morphogenetic protein-6 and parathyroid hormone-related protein coordinately regulate the hypertrophic conversion in mouse clonal chondrogenic EC cells, ATDC5". Biochim Biophys Acta **1451**(2-3): 263-270.
- Itoh, S. und P. ten Dijke (2007). "Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction". Curr Opin Cell Biol **19**(2): 176-184.
- Jiang, M.S., L.F. Liang, S. Wang, T. Ratovitski, J. Holmstrom, C. Barker und R. Stotish (2004). "Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide". Biochem Biophys Res Commun **315**(3): 525-531.
- Jonsson, U., L. Fagerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Lofas, B. Persson, H. Roos, I. Ronnberg und et al. (1991). "Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology". Biotechniques **11**(5): 620-627.
- Jornvall, H., A. Blokzijl, P. ten Dijke und C.F. Ibanez (2001). "The orphan receptor serine/threonine kinase ALK7 signals arrest of proliferation and morphological differentiation in a neuronal cell line". J Biol Chem **276**(7): 5140-5146.
- Juppner, H., A.B. Abou-Samra, M. Freeman, X.F. Kong, E. Schipani, J. Richards, L.F. Kolakowski, Jr., J. Hock, J.T. Potts, Jr., H.M. Kronenberg und et al. (1991). "A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide". Science **254**(5034): 1024-1026.
- Kanomata, K., S. Kokabu, J. Nojima, T. Fukuda und T. Katagiri (2009). "DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts". Genes Cells **14**(6): 695-702.
- Karlsson, R., L. Fagerstam, H. Nilshans und B. Persson (1993). "Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters". J Immunol Methods **166**(1): 75-84.
- Karlsson, R., A. Michaelsson und L. Mattsson (1991). "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system". J Immunol Methods **145**(1-2): 229-240.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, T. Ikeda, S. Yoshiki, J.M. Wozney, V. Rosen, E.A. Wang, H. Tanaka, S. Omura und T. Suda (1990). "The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2". Biochem Biophys Res Commun **172**(1): 295-299.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J.M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara und T. Suda (1994). "Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage". J Cell Biol **127**(6 Pt 1): 1755-1766.
- Kavsak, P., R.K. Rasmussen, C.G. Causing, S. Bonni, H. Zhu, G.H. Thomsen und J.L. Wrana (2000). "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation". Mol Cell **6**(6): 1365-1375.

- Keklikoglou, I., C. Koerner, C. Schmidt, J.D. Zhang, D. Heckmann, A. Shavinskaya, H. Allgayer, B. Guckel, T. Fehm, A. Schneeweiss, O. Sahin, S. Wiemann und U. Tschulena (2012). "MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-kappaB and TGF-beta signaling pathways". Oncogene **31**(37): 4150-4163.
- Keller, S., J. Nickel, J.L. Zhang, W. Sebald und T.D. Mueller (2004). "Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA". Nat Struct Mol Biol **11**(5): 481-488.
- Kenworthy, A.K. (2001). "Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy". Methods **24**(3): 289-296.
- Kingsley, D.M. (1994). "What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation". Trends Genet **10**(1): 16-21.
- Kirsch, T., J. Nickel und W. Sebald (2000a). "BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II". EMBO J **19**(13): 3314-3324.
- Kirsch, T., J. Nickel und W. Sebald (2000b). "Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2". FEBS Lett **468**(2-3): 215-219.
- Kirsch, T., W. Sebald und M.K. Dreyer (2000c). "Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex". Nat Struct Biol **7**(6): 492-496.
- Kishigami, S. und Y. Mishina (2005). "BMP signaling and early embryonic patterning". Cytokine Growth Factor Rev **16**(3): 265-278.
- Klages, J., A. Kotsch, M. Coles, W. Sebald, J. Nickel, T. Muller und H. Kessler (2008). "The solution structure of BMPR-IA reveals a local disorder-to-order transition upon BMP-2 binding". Biochemistry **47**(46): 11930-11939.
- Klahr, S. (2003). "The bone morphogenetic proteins (BMPs). Their role in renal fibrosis and renal function". J Nephrol **16**(2): 179-185.
- Knaus, P. und W. Sebald (2001). "Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily". Biol Chem **382**(8): 1189-1195.
- Korchynskyi, O. und P. ten Dijke (2002). "Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter". J Biol Chem **277**(7): 4883-4891.
- Kotsch, A. (2008). "BMP Ligand-Rezeptor-Komplexe: Molekulare Erkennung am Beispiel der spezifischen Interaktion zwischen GDF-5 und BMPR-IB". Fakultät für Chemie und Pharmazie, Lehrstuhl für Physiologische Chemie II Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Kotsch, A., J. Nickel, A. Seher, K. Heinecke, L. van Geersdaele, T. Herrmann, W. Sebald und T.D. Mueller (2008). "Structure analysis of bone morphogenetic protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome". J Biol Chem **283**(9): 5876-5887.
- Kotsch, A., J. Nickel, A. Seher, W. Sebald und T.D. Muller (2009). "Crystal structure analysis reveals a spring-loaded latch as molecular mechanism for GDF-5-type I receptor specificity". EMBO J **28**(7): 937-947.

Kretschmar, M., F. Liu, A. Hata, J. Doody und J. Massague (1997). "The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase". Genes Dev **11**(8): 984-995.

Kretschmar, M. und J. Massague (1998). "SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling". Curr Opin Genet Dev **8**(1): 103-111.

Kular, J., J. Tickner, S.M. Chim und J. Xu (2012). "An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level". Clin Biochem **45**(12): 863-873.

Kuninger, D., R. Kuns-Hashimoto, R. Kuzmickas und P. Rotwein (2006). "Complex biosynthesis of the muscle-enriched iron regulator RGMc". J Cell Sci **119**(Pt 16): 3273-3283.

Lacroix, P. (1945). "RECENT INVESTIGATIONS ON THE GROWTH OF BONE". Nature **156**.

Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature **227**(5259): 680-685.

Lapraz, F., L. Besnardeau und T. Lepage (2009). "Patterning of the dorsal-ventral axis in echinoderms: insights into the evolution of the BMP-chordin signaling network". PLoS Biol **7**(11): e1000248.

Lawson, E.Q., B.E. Hedlund, M.E. Ericson, D.A. Mood, G.W. Litman und R. Middaugh (1983). "Effect of carbohydrate on protein solubility". Arch Biochem Biophys **220**(2): 572-575.

Lebrin, F., M.J. Goumans, L. Jonker, R.L. Carvalho, G. Valdimarsdottir, M. Thorikay, C. Mummery, H.M. Arthur und P. ten Dijke (2004). "Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction". EMBO J **23**(20): 4018-4028.

Lee, S.J. und A.C. McPherron (2001). "Regulation of myostatin activity and muscle growth". Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9306-9311.

Lefebvre, V. und P. Bhattaram (2010). "Vertebrate skeletogenesis". Curr Top Dev Biol **90**: 291-317.

Letamendia, A., P. Lastres, L.M. Botella, U. Raab, C. Langa, B. Velasco, L. Attisano und C. Bernabeu (1998). "Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan". J Biol Chem **273**(49): 33011-33019.

Lin, H.Y., X.F. Wang, E. Ng-Eaton, R.A. Weinberg und H.F. Lodish (1992). "Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase". Cell **68**(4): 775-785.

Lin, L., Y.P. Goldberg und T. Ganz (2005). "Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin". Blood **106**(8): 2884-2889.

Lipari, F., B.J. Gour-Salin und A. Herscovics (1995). "The *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha 1,2-mannosidase is an inverting glycosidase". Biochem Biophys Res Commun **209**(1): 322-326.

Lipchina, I., Y. Elkabetz, M. Hafner, R. Sheridan, A. Mihailovic, T. Tuschl, C. Sander, L. Studer und D. Betel (2011). "Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response". Genes Dev **25**(20): 2173-2186.

- Liu, X., M. Hashimoto, H. Horii, A. Yamaguchi, K. Naito und T. Yamashita (2009). "Repulsive guidance molecule b inhibits neurite growth and is increased after spinal cord injury". Biochem Biophys Res Commun **382**(4): 795-800.
- Logeart-Avramoglou, D., M. Bourguignon, K. Oudina, P. Ten Dijke und H. Petite (2006). "An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct". Anal Biochem **349**(1): 78-86.
- Lories, R.J. und F.P. Luyten (2009). "Bone morphogenetic protein signaling and arthritis". Cytokine Growth Factor Rev **20**(5-6): 467-473.
- Luo, G., C. Hofmann, A.L. Bronckers, M. Sohocki, A. Bradley und G. Karsenty (1995). "BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning". Genes Dev **9**(22): 2808-2820.
- Ma, Y.L., R.L. Cain, D.L. Halladay, X. Yang, Q. Zeng, R.R. Miles, S. Chandrasekhar, T.J. Martin und J.E. Onyia (2001). "Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation". Endocrinology **142**(9): 4047-4054.
- Macias-Silva, M., S. Abdollah, P.A. Hoodless, R. Pirone, L. Attisano und J.L. Wrana (1996). "MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling". Cell **87**(7): 1215-1224.
- Macias-Silva, M., P.A. Hoodless, S.J. Tang, M. Buchwald und J.L. Wrana (1998). "Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2". J Biol Chem **273**(40): 25628-25636.
- Maeda, Y. und T. Kinoshita (2011). "Structural remodeling, trafficking and functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins". Prog Lipid Res **50**(4): 411-424.
- Maejima-Ikeda, A., M. Aoki, K. Tsuritani, K. Kamioka, K. Hiura, T. Miyoshi, H. Hara, T. Takano-Yamamoto und M. Kumegawa (1997). "Chick osteocyte-derived protein inhibits osteoclastic bone resorption". Biochem J **322 (Pt 1)**: 245-250.
- Maley, F., R.B. Trimble, A.L. Tarentino und T.H. Plummer, Jr. (1989). "Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases". Anal Biochem **180**(2): 195-204.
- Mann, M. und M. Wilm (1995). "Electrospray mass spectrometry for protein characterization". Trends Biochem Sci **20**(6): 219-224.
- Mariani, F.V., C.P. Ahn und G.R. Martin (2008). "Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning". Nature **453**(7193): 401-405.
- Martini, F.H., M.J. Timmons und R.B. Tallitsch (2012). "Anatomie Kompaktlehrbuch", 978-3868941982, Pearson Studium.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction". Annu Rev Biochem **67**: 753-791.
- Massague, J., S.W. Blain und R.S. Lo (2000). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders". Cell **103**(2): 295-309.
- Massague, J. und Y.G. Chen (2000). "Controlling TGF-beta signaling". Genes Dev **14**(6): 627-644.

- Massague, J., J. Seoane und D. Wotton (2005). "Smad transcription factors". Genes Dev **19**(23): 2783-2810.
- Matsunaga, E., H. Nakamura und A. Chedotal (2006). "Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance". J Neurosci **26**(22): 6082-6088.
- McDonald, N.Q. und W.A. Hendrickson (1993). "A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif". Cell **73**(3): 421-424.
- McHugh, K.P., K. Hodivala-Dilke, M.H. Zheng, N. Namba, J. Lam, D. Novack, X. Feng, F.P. Ross, R.O. Hynes und S.L. Teitelbaum (2000). "Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts". J Clin Invest **105**(4): 433-440.
- McIver, K.S., E. Kessler, J.C. Olson und D.E. Ohman (1995). "The elastase propeptide functions as an intramolecular chaperone required for elastase activity and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*". Mol Microbiol **18**(5): 877-889.
- Mehta, H.M., S.B. Woo und K.E. Neet (2012). "Comparison of nerve growth factor receptor binding models using heterodimeric muteins". J Neurosci Res **90**(12): 2259-2271.
- Metzger, M., S. Conrad, G. Alvarez-Bolado, T. Skutella und L. Just (2005). "Gene expression of the repulsive guidance molecules during development of the mouse intestine". Dev Dyn **234**(1): 169-175.
- Mikic, B. (2004). "Multiple effects of GDF-5 deficiency on skeletal tissues: implications for therapeutic bioengineering". Ann Biomed Eng **32**(3): 466-476.
- Miller, L.K. (1993). "Baculoviruses: high-level expression in insect cells". Curr Opin Genet Dev **3**(1): 97-101.
- Mishina, Y., R. Rey, M.J. Finegold, M.M. Matzuk, N. Josso, R.L. Cate und R.R. Behringer (1996). "Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation". Genes Dev **10**(20): 2577-2587.
- Mittl, P.R., J.P. Priestle, D.A. Cox, G. McMaster, N. Cerletti und M.G. Grutter (1996). "The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding". Protein Sci **5**(7): 1261-1271.
- Miyamoto, Y., A. Mabuchi, D. Shi, T. Kubo, Y. Takatori, S. Saito, M. Fujioka, A. Sudo, A. Uchida, S. Yamamoto, K. Ozaki, M. Takigawa, T. Tanaka, Y. Nakamura, Q. Jiang und S. Ikegawa (2007). "A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis". Nat Genet **39**(4): 529-533.
- Miyazawa, K., M. Shinozaki, T. Hara, T. Furuya und K. Miyazono (2002). "Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling". Genes Cells **7**(12): 1191-1204.
- Miyazono, K., K. Kusanagi und H. Inoue (2001). "Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling". J Cell Physiol **187**(3): 265-276.
- Monnier, P.P., A. Sierra, P. Macchi, L. Deitinghoff, J.S. Andersen, M. Mann, M. Flad, M.R. Hornberger, B. Stahl, F. Bonhoeffer und B.K. Mueller (2002). "RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons". Nature **419**(6905): 392-395.
- Moustakas, A. und C.H. Heldin (2005). "Non-Smad TGF-beta signals". J Cell Sci **118**(Pt 16): 3573-3584.

- Moustakas, A. und C.H. Heldin (2008). "Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton". FEBS Lett **582**(14): 2051-2065.
- Moustakas, A., S. Souchelnytskyi und C.H. Heldin (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction". J Cell Sci **114**(Pt 24): 4359-4369.
- Mueller, T.D., M. Gottermeier, W. Sebald und J. Nickel (2005). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human growth and differentiation factor 5 (GDF-5)". Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **61**(Pt 1): 134-136.
- Mueller, T.D. und J. Nickel (2012). "Promiscuity and specificity in BMP receptor activation". FEBS Lett **586**(14): 1846-1859.
- Mundlos, S. und B.R. Olsen (1997). "Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis". FASEB J **11**(4): 227-233.
- Murphy, C. (2007). "Endo-fin-ally a SARA for BMP receptors". J Cell Sci **120**(Pt 7): 1153-1155.
- Nagaso, H., A. Suzuki, M. Tada und N. Ueno (1999). "Dual specificity of activin type II receptor ActRIIb in dorso-ventral patterning during zebrafish embryogenesis". Dev Growth Differ **41**(2): 119-133.
- Nakagawa, H., K. Wakabayashi-Nakao, A. Tamura, Y. Toyoda, S. Koshiba und T. Ishikawa (2009). "Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2". FEBS J **276**(24): 7237-7252.
- Nakamura, K., T. Shirai, S. Morishita, S. Uchida, K. Saeki-Miura und F. Makishima (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells". Exp Cell Res **250**(2): 351-363.
- Nakao, A., M. Afrakhte, A. Moren, T. Nakayama, J.L. Christian, R. Heuchel, S. Itoh, M. Kawabata, N.E. Heldin, C.H. Heldin und P. ten Dijke (1997a). "Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling". Nature **389**(6651): 631-635.
- Nakao, A., T. Imamura, S. Souchelnytskyi, M. Kawabata, A. Ishisaki, E. Oeda, K. Tamaki, J. Hanai, C.H. Heldin, K. Miyazono und P. ten Dijke (1997b). "TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4". EMBO J **16**(17): 5353-5362.
- Nakayama, N., C.Y. Han, L. Cam, J.I. Lee, J. Pretorius, S. Fisher, R. Rosenfeld, S. Scully, R. Nishinakamura, D. Duryea, G. Van, B. Bolon, T. Yokota und K. Zhang (2004). "A novel chordin-like BMP inhibitor, CHL2, expressed preferentially in chondrocytes of developing cartilage and osteoarthritic joint cartilage". Development **131**(1): 229-240.
- Nemeth, E., M.S. Tuttle, J. Powelson, M.B. Vaughn, A. Donovan, D.M. Ward, T. Ganz und J. Kaplan (2004). "Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization". Science **306**(5704): 2090-2093.
- Nettleship, J.E., N. Rahman-Huq und R.J. Owens (2009). "The production of glycoproteins by transient expression in Mammalian cells". Methods Mol Biol **498**: 245-263.
- Newfeld, S.J., R.G. Wisotzkey und S. Kumar (1999). "Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers". Genetics **152**(2): 783-795.

- Newman, J.H., L. Wheeler, K.B. Lane, E. Loyd, R. Gaddipati, J.A. Phillips, 3rd und J.E. Loyd (2001). "Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred". N Engl J Med **345**(5): 319-324.
- Nickel, J., A. Kotsch, W. Sebald und T.D. Mueller (2005). "A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB". J Mol Biol **349**(5): 933-947.
- Nickel, J., W. Sebald, J.C. Grope und T.D. Mueller (2009). "Intricacies of BMP receptor assembly". Cytokine Growth Factor Rev **20**(5-6): 367-377.
- Niederkofler, V., R. Salie und S. Arber (2005). "Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload". J Clin Invest **115**(8): 2180-2186.
- Niederkofler, V., R. Salie, M. Sigrist und S. Arber (2004). "Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system". J Neurosci **24**(4): 808-818.
- Nili, M., U. Shinde und P. Rotwein (2010). "Soluble repulsive guidance molecule c/hemojuvelin is a broad spectrum bone morphogenetic protein (BMP) antagonist and inhibits both BMP2- and BMP6-mediated signaling and gene expression". J Biol Chem **285**(32): 24783-24792.
- Nishimura, R., Y. Kato, D. Chen, S.E. Harris, G.R. Mundy und T. Yoneda (1998). "Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12". J Biol Chem **273**(4): 1872-1879.
- Niswander, L. (2003). "Pattern formation: old models out on a limb". Nat Rev Genet **4**(2): 133-143.
- Niswander, L., C. Tickle, A. Vogel, I. Booth und G.R. Martin (1993). "FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb". Cell **75**(3): 579-587.
- Nohe, A., S. Hassel, M. Ehrlich, F. Neubauer, W. Sebald, Y.I. Henis und P. Knaus (2002). "The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways". J Biol Chem **277**(7): 5330-5338.
- Oldekamp, J., N. Kramer, G. Alvarez-Bolado und T. Skutella (2004). "Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development". Gene Expr Patterns **4**(3): 283-288.
- Onichtchouk, D., Y.G. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Delius, J. Massague und C. Niehrs (1999). "Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI". Nature **401**(6752): 480-485.
- Paine-Saunders, S., B.L. Viviano, A.N. Economides und S. Saunders (2002). "Heparan sulfate proteoglycans retain Noggin at the cell surface: a potential mechanism for shaping bone morphogenetic protein gradients". J Biol Chem **277**(3): 2089-2096.
- Papanikolaou, G., M.E. Samuels, E.H. Ludwig, M.L. MacDonald, P.L. Franchini, M.P. Dube, L. Andres, J. MacFarlane, N. Sakellaropoulos, M. Politou, E. Nemeth, J. Thompson, J.K. Risler, C. Zaborowska, R. Babakiaff, C.C. Radomski, T.D. Pape, O. Davidas, J. Christakis, P. Brissot, G. Lockitch, T. Ganz, M.R. Hayden und Y.P. Goldberg (2004). "Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis". Nat Genet **36**(1): 77-82.
- Park, C.H., E.V. Valore, A.J. Waring und T. Ganz (2001). "Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver". J Biol Chem **276**(11): 7806-7810.

- Persson, U., S. Souchelnytskyi, P. Franzen, K. Miyazono, P. ten Dijke und C.H. Heldin (1997). "Transforming growth factor (TGF-beta)-specific signaling by chimeric TGF-beta type II receptor with intracellular domain of activin type IIB receptor". J Biol Chem **272**(34): 21187-21194.
- Pigeon, C., G. Ilyin, B. Courselaud, P. Leroyer, B. Turlin, P. Brissot und O. Loreal (2001). "A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload". J Biol Chem **276**(11): 7811-7819.
- Pike, L.J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function". J Lipid Res **47**(7): 1597-1598.
- Pinckard, J.K., K.C. Sheehan und R.D. Schreiber (1997). "Ligand-induced formation of p55 and p75 tumor necrosis factor receptor heterocomplexes on intact cells". J Biol Chem **272**(16): 10784-10789.
- Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig und D.R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". Science **284**(5411): 143-147.
- Plouhinec, J.L., L. Zakin und E.M. De Robertis (2011). "Systems control of BMP morphogen flow in vertebrate embryos". Curr Opin Genet Dev **21**(6): 696-703.
- Radaev, S., Z. Zou, T. Huang, E.M. Lafer, A.P. Hinck und P.D. Sun (2010). "Ternary complex of transforming growth factor-beta1 reveals isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the superfamily". J Biol Chem **285**(19): 14806-14814.
- Raggatt, L.J. und N.C. Partridge (2010). "Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling". J Biol Chem **285**(33): 25103-25108.
- Rajagopalan, S., L. Deitinghoff, D. Davis, S. Conrad, T. Skutella, A. Chedotal, B.K. Mueller und S.M. Strittmatter (2004). "Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule". Nat Cell Biol **6**(8): 756-762.
- Ramel, M.C. und C.S. Hill (2012). "Spatial regulation of BMP activity". FEBS Lett **586**(14): 1929-1941.
- Rauch, C., A.C. Brunet, J. Deleule und E. Farge (2002). "C2C12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis". Am J Physiol Cell Physiol **283**(1): C235-243.
- Rawadi, G., B. Vayssiere, F. Dunn, R. Baron und S. Roman-Roman (2003). "BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop". J Bone Miner Res **18**(10): 1842-1853.
- Reddi, A.H. (1981). "Cell biology and biochemistry of endochondral bone development". Coll Relat Res **1**(2): 209-226.
- Reddi, A.H. (1997). "Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens". Cytokine Growth Factor Rev **8**(1): 11-20.
- Reddi, A.H. (1998). "Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration". Nat Biotechnol **16**(3): 247-252.
- Reddi, A.H. (2005). "BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins". Cytokine Growth Factor Rev **16**(3): 249-250.

- Reddi, A.H. und W.A. Anderson (1976). "Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis". J Cell Biol **69**(3): 557-572.
- Rees, B. und A. Bilwes (1993). "Three-dimensional structures of neurotoxins and cardiotoxins". Chem Res Toxicol **6**(4): 385-406.
- Rendic, D., I.B.H. Wilson und K. Paschinger (2008). "The Glycosylation Capacity of Insect Cells". CCACAA **81**(1): 15.
- Rhodes, G. (2006). "Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models", 978-0125870733, Academic Press.
- Rider, C.C. und B. Mulloy (2010). "Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists". Biochem J **429**(1): 1-12.
- Rieger, G. und W. Westheide (2009). "Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere", 978-3827420398, Spektrum Akademischer Verlag.
- Robling, A.G., P.J. Niziolek, L.A. Baldrige, K.W. Condon, M.R. Allen, I. Alam, S.M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T.M. Bellido, S.E. Harris und C.H. Turner (2008). "Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin". J Biol Chem **283**(9): 5866-5875.
- Rodriguez, A., P. Pan und S. Parkkila (2007). "Expression studies of neogenin and its ligand hemojuvelin in mouse tissues". J Histochem Cytochem **55**(1): 85-96.
- Rodriguez Martinez, A., O. Niemela und S. Parkkila (2004). "Hepatic and extrahepatic expression of the new iron regulatory protein hemojuvelin". Haematologica **89**(12): 1441-1445.
- Rosen, V. und R.S. Thies (1992). "The BMP proteins in bone formation and repair". Trends Genet **8**(3): 97-102.
- Rountree, R.B., M. Schoor, H. Chen, M.E. Marks, V. Harley, Y. Mishina und D.M. Kingsley (2004). "BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage". PLoS Biol **2**(11): 1815-1827.
- Rumjon, A., P. Sarafidis, S. Brincat, R. Musto, J. Malyszko, S.S. Bansal und I.C. Macdougall (2012). "Serum hemojuvelin and hepcidin levels in chronic kidney disease". Am J Nephrol **35**(3): 295-304.
- Ruppert, R., E. Hoffmann und W. Sebald (1996). "Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity". Eur J Biochem **237**(1): 295-302.
- Russell, D., N.J. Oldham und B.G. Davis (2009). "Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation". Carbohydr Res **344**(12): 1508-1514.
- Saftig, P., E. Hunziker, O. Wehmeyer, S. Jones, A. Boyde, W. Rommerskirch, J.D. Moritz, P. Schu und K. von Figura (1998). "Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice". Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13453-13458.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis und H.A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". Science **239**(4839): 487-491.
- Saloman, D.S., C. Bianco, A.D. Ebert, N.I. Khan, M. De Santis, N. Normanno, C. Wechselberger, M. Seno, K. Williams, M. Sanicola, S. Foley, W.J. Gullick und G. Persico (2000). "The EGF-CFC family:

- novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer". Endocr Relat Cancer **7**(4): 199-226.
- Samad, T.A., A. Rebbapragada, E. Bell, Y. Zhang, Y. Sidis, S.J. Jeong, J.A. Campagna, S. Perusini, D.A. Fabrizio, A.L. Schneyer, H.Y. Lin, A.H. Brivanlou, L. Attisano und C.J. Woolf (2005). "DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor". J Biol Chem **280**(14): 14122-14129.
- Samad, T.A., A. Srinivasan, L.A. Karchewski, S.J. Jeong, J.A. Campagna, R.R. Ji, D.A. Fabrizio, Y. Zhang, H.Y. Lin, E. Bell und C.J. Woolf (2004). "DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties". J Neurosci **24**(8): 2027-2036.
- Saremba, S., J. Nickel, A. Seher, A. Kotzsch, W. Sebald und T.D. Mueller (2008). "Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand". FEBS J **275**(1): 172-183.
- Sauka-Spengler, T. und M. Bronner-Fraser (2008). "A gene regulatory network orchestrates neural crest formation". Nat Rev Mol Cell Biol **9**(7): 557-568.
- Savage-Dunn, C. (2005). "TGF-beta signaling". WormBook: 1-12.
- Scheufler, C., W. Sebald und M. Hulsmeyer (1999). "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution". J Mol Biol **287**(1): 103-115.
- Schier, A.F. (2003). "Nodal signaling in vertebrate development". Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 589-621.
- Schmidtmer, J. und D. Engelkamp (2004). "Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm". Gene Expr Patterns **4**(1): 105-110.
- Schmierer, B. und C.S. Hill (2007). "TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility". Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 970-982.
- Schreuder, H., A. Liesum, J. Pohl, M. Kruse und M. Koyama (2005). "Crystal structure of recombinant human growth and differentiation factor 5: evidence for interaction of the type I and type II receptor-binding sites". Biochem Biophys Res Commun **329**(3): 1076-1086.
- Sekar, R.B. und A. Periasamy (2003). "Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations". J Cell Biol **160**(5): 629-633.
- Sekiya, T., S. Adachi, K. Kohu, T. Yamada, O. Higuchi, Y. Furukawa, Y. Nakamura, T. Nakamura, K. Tashiro, S. Kuhara, S. Ohwada und T. Akiyama (2004a). "Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells". J Biol Chem **279**(8): 6840-6846.
- Sekiya, T., T. Oda, K. Matsuura und T. Akiyama (2004b). "Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling". Biochem Biophys Res Commun **320**(3): 680-684.
- Sengle, G., R.N. Ono, K.M. Lyons, H.P. Bachinger und L.Y. Sakai (2008). "A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7". J Mol Biol **381**(4): 1025-1039.

Sengle, G., R.N. Ono, T. Sasaki und L.Y. Sakai (2011). "Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability". J Biol Chem **286**(7): 5087-5099.

Senn, N. (1889). "On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone.". Am. J. Med. Sci. **98**: 34.

Shalev, H., G. Perez-Avraham, J. Kapelushnik, I. Levi, A. Rabinovich, D.W. Swinkels, C. Brasse-Lagnel und H. Tamary (2013). "High levels of soluble serum hemojuvelin in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I". Eur J Haematol **90**(1): 31-36.

Shea, C.M., C.M. Edgar, T.A. Einhorn und L.C. Gerstenfeld (2003). "BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis". J Cell Biochem **90**(6): 1112-1127.

Shen, M.M. (2007). "Nodal signaling: developmental roles and regulation". Development **134**(6): 1023-1034.

Shi, M., J. Zhu, R. Wang, X. Chen, L. Mi, T. Walz und T.A. Springer (2011). "Latent TGF-beta structure and activation". Nature **474**(7351): 343-349.

Shi, W., C. Chang, S. Nie, S. Xie, M. Wan und X. Cao (2007). "Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling". J Cell Sci **120**(Pt 7): 1216-1224.

Shi, Y. und J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus". Cell **113**(6): 685-700.

Shukunami, C., Y. Ohta, M. Sakuda und Y. Hiraki (1998). "Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5". Exp Cell Res **241**(1): 1-11.

Shukunami, C., C. Shigeno, T. Atsumi, K. Ishizeki, F. Suzuki und Y. Hiraki (1996). "Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor". J Cell Biol **133**(2): 457-468.

Siddique, A. und K.V. Kowdley (2012). "Review article: the iron overload syndromes". Aliment Pharmacol Ther **35**(8): 876-893.

Simon, L.S. (2007). "Osteoporosis". Rheum Dis Clin North Am **33**(1): 149-176.

Smith, G.E., M.D. Summers und M.J. Fraser (1983). "Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector". Mol Cell Biol **3**(12): 2156-2165.

Sola, R.J. und K. Griebenow (2009). "Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals". J Pharm Sci **98**(4): 1223-1245.

Sopory, S., S.M. Nelsen, C. Degnin, C. Wong und J.L. Christian (2006). "Regulation of bone morphogenetic protein-4 activity by sequence elements within the prodomain". J Biol Chem **281**(45): 34021-34031.

Steele, D.G. und C.A. Bramblett (1988). "The anatomy and biology of the human skeleton", 978-0890963265, Texas A&M University Press.

Storm, E.E., T.V. Huynh, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, D.M. Kingsley und S.J. Lee (1994). "Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily". Nature **368**(6472): 639-643.

Storm, E.E. und D.M. Kingsley (1996). "Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family". Development **122**(12): 3969-3979.

Stricker, S. und S. Mundlos (2011). "Mechanisms of digit formation: Human malformation syndromes tell the story". Dev Dyn **240**(5): 990-1004.

Studier, F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn und J.W. Dubendorff (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes". Methods Enzymol **185**: 60-89.

Stueber, D., I. Ibrahimi, D. Cutler, B. Dobberstein und H. Bujard (1984). "A novel in vitro transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences". EMBO J **3**(13): 3143-3148.

Styrkarsdottir, U., J.B. Cazier, A. Kong, O. Rolfsson, H. Larsen, E. Bjarnadottir, V.D. Johannsdottir, M.S. Sigurdardottir, Y. Bagger, C. Christiansen, I. Reynisdottir, S.F. Grant, K. Jonasson, M.L. Frigge, J.R. Gulcher, G. Sigurdsson und K. Stefansson (2003). "Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2". PLoS Biol **1**(3): 351-360.

Sun, X., F.V. Mariani und G.R. Martin (2002). "Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development". Nature **418**(6897): 501-508.

Swarthout, J.T., R.C. D'Alonzo, N. Selvamurugan und N.C. Partridge (2002). "Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells". Gene **282**(1-2): 1-17.

Tabin, C. und L. Wolpert (2007). "Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era". Genes Dev **21**(12): 1433-1442.

Tams, J.W., J. Vind und K.G. Welinder (1999). "Adapting protein solubility by glycosylation. N-glycosylation mutants of Coprinus cinereus peroxidase in salt and organic solutions". Biochim Biophys Acta **1432**(2): 214-221.

Tartaglia, L.A., D. Pennica und D.V. Goeddel (1993). "Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor". J Biol Chem **268**(25): 18542-18548.

Tassew, N.G., J. Charish, N.G. Seidah und P.P. Monnier (2012). "SKI-1 and Furin generate multiple RGMa fragments that regulate axonal growth". Dev Cell **22**(2): 391-402.

Teitelbaum, S.L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts". Science **289**(5484): 1504-1508.

ten Dijke, P. und C.S. Hill (2004). "New insights into TGF-beta-Smad signalling". Trends Biochem Sci **29**(5): 265-273.

ten Dijke, P., K. Miyazono und C.H. Heldin (1996). "Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors". Curr Opin Cell Biol **8**(2): 139-145.

Thawani, J.P., A.C. Wang, K.D. Than, C.Y. Lin, F. La Marca und P. Park (2010). "Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature". Neurosurgery **66**(2): 233-246; discussion 246.

Thies, R.S., T. Chen, M.V. Davies, K.N. Tomkinson, A.A. Pearson, Q.A. Shakey und N.M. Wolfman (2001). "GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding". Growth Factors **18**(4): 251-259.

Thompson, T.B., T.F. Lerch, R.W. Cook, T.K. Woodruff und T.S. Jardetzky (2005). "The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding". Dev Cell **9**(4): 535-543.

Thompson, T.B., T.K. Woodruff und T.S. Jardetzky (2003). "Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions". EMBO J **22**(7): 1555-1566.

Tickle, C. (2000). "Limb development: an international model for vertebrate pattern formation". Int J Dev Biol **44**(1): 101-108.

Tickle, C. (2003). "Patterning systems--from one end of the limb to the other". Dev Cell **4**(4): 449-458.

Tickle, C. (2006). "Making digit patterns in the vertebrate limb". Nat Rev Mol Cell Biol **7**(1): 45-53.

Tobin, J.F. und A.J. Celeste (2006). "Bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors as drug targets in cardiovascular and metabolic disease". Drug Discov Today **11**(9-10): 405-411.

Towers, M. und C. Tickle (2009). "Growing models of vertebrate limb development". Development **136**(2): 179-190.

Truksa, J., H. Peng, P. Lee und E. Beutler (2006). "Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6". Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10289-10293.

Urist, M.R. (1965). "Bone: formation by autoinduction". Science **150**(698): 893-899.

Vaughn, J.L., R.H. Goodwin, G.J. Tompkins und P. McCawley (1977). "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)". In Vitro **13**(4): 213-217.

Verborgt, O., N.A. Tatton, R.J. Majeska und M.B. Schaffler (2002). "Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation?". J Bone Miner Res **17**(5): 907-914.

Verga Falzacappa, M.V., G. Casanovas, M.W. Hentze und M.U. Muckenthaler (2008). "A bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element in the hepcidin promoter controls HFE2-mediated hepatic hepcidin expression and its response to IL-6 in cultured cells". J Mol Med (Berl) **86**(5): 531-540.

Vitt, U.A., S.Y. Hsu und A.J. Hsueh (2001). "Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules". Mol Endocrinol **15**(5): 681-694.

Wagner, D.O., C. Sieber, R. Bhushan, J.H. Borgermann, D. Graf und P. Knaus (2010). "BMPs: from bone to body morphogenetic proteins". Sci Signal **3**(107): mr1.

Wakefield, L.M., D.M. Smith, S. Broz, M. Jackson, A.D. Levinson und M.B. Sporn (1989). "Recombinant TGF-beta 1 is synthesized as a two-component latent complex that shares some

- structural features with the native platelet latent TGF-beta 1 complex". Growth Factors **1**(3): 203-218.
- Walsh, D.W., C. Godson, D.P. Brazil und F. Martin (2010). "Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots". Trends Cell Biol **20**(5): 244-256.
- Wanek, N., K. Muneoka, G. Holler-Dinsmore, R. Burton und S.V. Bryant (1989). "A staging system for mouse limb development". J Exp Zool **249**(1): 41-49.
- Wang, C., M. Eufemi, C. Turano und A. Giartosio (1996). "Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins". Biochemistry **35**(23): 7299-7307.
- Wang, D., J. Prakash, P. Nguyen, B.N. Davis-Dusenbery, N.S. Hill, M.D. Layne, A. Hata und G. Lagna (2012). "Bone morphogenetic protein signaling in vascular disease: anti-inflammatory action through myocardin-related transcription factor A". J Biol Chem **287**(33): 28067-28077.
- Wang, E.A., V. Rosen, P. Cordes, R.M. Hewick, M.J. Kriz, D.P. Luxenberg, B.S. Sibley und J.M. Wozney (1988). "Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors". Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9484-9488.
- Wang, R.H., C. Li, X. Xu, Y. Zheng, C. Xiao, P. Zerfas, S. Cooperman, M. Eckhaus, T. Rouault, L. Mishra und C.X. Deng (2005). "A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression". Cell Metab **2**(6): 399-409.
- Watanabe, R., Y. Yamada, Y. Ihara, Y. Someya, A. Kubota, S. Kagimoto, A. Kuroe, T. Iwakura, Z.P. Shen, A. Inada, T. Adachi, N. Ban, K. Miyawaki, Y. Sunaga, K. Tsuda und Y. Seino (1999). "The MH1 domains of smad2 and smad3 are involved in the regulation of the ALK7 signals". Biochem Biophys Res Commun **254**(3): 707-712.
- Weber, D. (2006). "Aufklärung der Struktur und Charakterisierung des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPRII und ActRII". Fakultät für Biologie, Lehrstuhl für Physiologische Chemie II Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Weber, D., A. Kotsch, J. Nickel, S. Harth, A. Seher, U. Mueller, W. Sebald und T.D. Mueller (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.
- Weiss, R.E. und A.H. Reddi (1980). "Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo". Proc Natl Acad Sci U S A **77**(4): 2074-2078.
- Wertz, J.W. und P.M. Bauer (2008). "Caveolin-1 regulates BMPRII localization and signaling in vascular smooth muscle cells". Biochem Biophys Res Commun **375**(4): 557-561.
- Wickham, T.J., T. Davis, R.R. Granados, M.L. Shuler und H.A. Wood (1992). "Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system". Biotechnol Prog **8**(5): 391-396.
- Wilson, N.H. und B. Key (2006). "Neogenin interacts with RGMa and netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain". Dev Biol **296**(2): 485-498.
- Wolpert, L. (1971). "Positional information and pattern formation". Curr Top Dev Biol **6**(6): 183-224.
- Wolpert, L. (1989). "Positional information revisited". Development **107** **Suppl**: 3-12.

- Wolpert, L. (2011). "Positional information and patterning revisited". *J Theor Biol* **269**(1): 359-365.
- Wozney, J.M. (1998). "The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult". *Eur J Oral Sci* **106 Suppl 1**: 160-166.
- Wozney, J.M., V. Rosen, A.J. Celeste, L.M. Mitsock, M.J. Whitters, R.W. Kriz, R.M. Hewick und E.A. Wang (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities". *Science* **242**(4885): 1528-1534.
- Wrana, J.L., L. Attisano, J. Carcamo, A. Zentella, J. Doody, M. Laiho, X.F. Wang und J. Massague (1992). "TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex". *Cell* **71**(6): 1003-1014.
- Wrana, J.L., H. Tran, L. Attisano, K. Arora, S.R. Childs, J. Massague und M.B. O'Connor (1994). "Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex". *Mol Cell Biol* **14**(2): 944-950.
- Wray, W., T. Boulikas, V.P. Wray und R. Hancock (1981). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels". *Anal Biochem* **118**(1): 197-203.
- Wu, M.Y. und C.S. Hill (2009). "Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis". *Dev Cell* **16**(3): 329-343.
- Wu, Q., C.C. Sun, H.Y. Lin und J.L. Babitt (2012). "Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs)". *PLoS One* **7**(9): e46307.
- Wu, X.B., Y. Li, A. Schneider, W. Yu, G. Rajendren, J. Iqbal, M. Yamamoto, M. Alam, L.J. Brunet, H.C. Blair, M. Zaidi und E. Abe (2003). "Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice". *J Clin Invest* **112**(6): 924-934.
- Xia, Y., J.L. Babitt, R. Bouley, Y. Zhang, N. Da Silva, S. Chen, Z. Zhuang, T.A. Samad, G.J. Brenner, J.L. Anderson, C.C. Hong, A.L. Schneyer, D. Brown und H.Y. Lin (2010). "Dragon enhances BMP signaling and increases transepithelial resistance in kidney epithelial cells". *J Am Soc Nephrol* **21**(4): 666-677.
- Xia, Y., J.L. Babitt, Y. Sidis, R.T. Chung und H.Y. Lin (2008). "Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin". *Blood* **111**(10): 5195-5204.
- Xia, Y., V. Cortez-Retamozo, V. Niederkofler, R. Salie, S. Chen, T.A. Samad, C.C. Hong, S. Arber, J.M. Vyas, R. Weissleder, M.J. Pittet und H.Y. Lin (2011). "Dragon (repulsive guidance molecule b) inhibits IL-6 expression in macrophages". *J Immunol* **186**(3): 1369-1376.
- Xia, Y., Y. Sidis, A. Mukherjee, T.A. Samad, G. Brenner, C.J. Woolf, H.Y. Lin und A. Schneyer (2005). "Localization and action of Dragon (repulsive guidance molecule b), a novel bone morphogenetic protein coreceptor, throughout the reproductive axis". *Endocrinology* **146**(8): 3614-3621.
- Xia, Y., P.B. Yu, Y. Sidis, H. Beppu, K.D. Bloch, A.L. Schneyer und H.Y. Lin (2007). "Repulsive guidance molecule RGMa alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4". *J Biol Chem* **282**(25): 18129-18140.

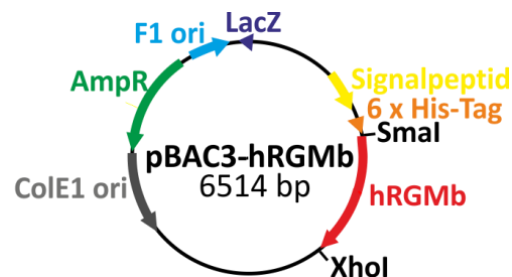
- Xu, P., J. Liu und R. Derynck (2012). "Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling". *FEBS Lett* **586**(14): 1871-1884.
- Yaffe, D. und O. Saxel (1977). "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle". *Nature* **270**(5639): 725-727.
- Yi, S.E., A. Daluiski, R. Pederson, V. Rosen und K.M. Lyons (2000). "The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb". *Development* **127**(3): 621-630.
- Yu, C., M. Crispin, A.F. Sonnen, D.J. Harvey, V.T. Chang, E.J. Evans, C.N. Scanlan, D.I. Stuart, R.J. Gilbert und S.J. Davis (2011). "Use of the alpha-mannosidase I inhibitor kifunensine allows the crystallization of apo CTLA-4 homodimer produced in long-term cultures of Chinese hamster ovary cells". *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **67**(Pt 7): 785-789.
- Zakin, L. und E.M. De Robertis (2010). "Extracellular regulation of BMP signaling". *Curr Biol* **20**(3): R89-92.
- Zeller, R. (2010). "The temporal dynamics of vertebrate limb development, teratogenesis and evolution". *Curr Opin Genet Dev* **20**(4): 384-390.
- Zeller, R., J. Lopez-Rios und A. Zuniga (2009). "Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis". *Nat Rev Genet* **10**(12): 845-858.
- Zhang, J.L., L.Y. Qiu, A. Kotsch, S. Weidauer, L. Patterson, M. Hammerschmidt, W. Sebald und T.D. Mueller (2008). "Crystal structure analysis reveals how the Chordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding". *Dev Cell* **14**(5): 739-750.
- Zhang, Y.E. (2009). "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling". *Cell Res* **19**(1): 128-139.
- Zheng, K., C. Bantog und R. Bayer (2011). "The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability". *MAbs* **3**(6): 568-576.
- Zhou, Z., J. Xie, D. Lee, Y. Liu, J. Jung, L. Zhou, S. Xiong, L. Mei und W.C. Xiong (2010). "Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation". *Dev Cell* **19**(1): 90-102.
- Zilberberg, L., P. ten Dijke, L.Y. Sakai und D.B. Rifkin (2007). "A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity". *BMC Cell Biol* **8**: 41.

6. ANHANG

6.1. DNA- SOWIE AMINOSÄURESEQUENZEN DER EXPRESSIONSKONSTRUKTE

Die Signalpeptide, Markerpeptidsequenzen sowie die DNA-Sequenzen der Gene sind, wie in den Vektorkarten angegeben, farblich gekennzeichnet. Die Restriktionsenzymchnittstellen sind entweder blau (pBAC3_hRGMb, pMK1_hRGMb, pcDNA3.1_hRGMb_GPI) oder rot (CLIP-/SNAP-Konstrukte) markiert.

pBAC3_hRGMb



DNA-Sequenz:

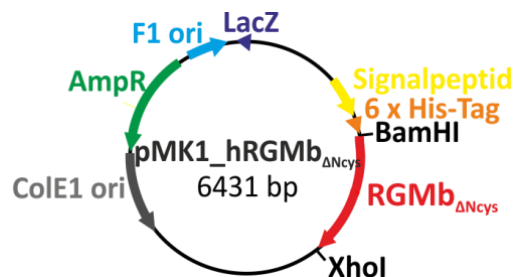
ATGCCCATGTTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGGCGGGCGCATTCTGCCTTTGCGGCCAT
 GGTCCATCATCACCACCATCACTCCGCGGGTTTGGTGCCAGAGGCAGCGCAAAGAAACGGCGGGCGGC
 GAAATTTGAACGCCAACACATGGACAGCGCTAGCGGTGGAGGTGATGACGACGACAAGAGCCCGGTG
 ACTGCCAACAGCCAGCCCAATGTGCAATCCAGAAATGCACCACGGACTTCGTGTCCCTGACTTCTCACCT
 GAACTCTGCCGTTGACGGCTTTGACTCTGAGTTTTGCAAGGCCTTGCGTGCCTATGCTGGCTGCACCCAG
 CGAACTTCAAAGCCTGCCGTGGCAACCTGGTATAACCATTCTGCCGTGTTGGGTATCAGTGACCTCATGA
 GCCAGAGGAATTGTTCCAAGGATGGACCCACATCCTCTACCAACCCCGAAGTGACCCATGATCCTTGCAA
 CTATCACAGCCACGCTGGAGCCAGGGAACACAGGAGAGGGGACCAGAACCCTCCAGTTACCTTTTTTG
 TGGCTTGTTTGGTGATCCTCACCTCAGAACTTTCAAGGATAACTTCAAACATGCAAAGTAGAAGGGGCC
 TGGCCACTCATAGATAATAATTATCTTTCAAGTCAAGTGACAAACGTACCTGTGGTCCCTGGTTCCAGTGC
 TACTGCTACAAATAAGATCACTATTATCTTCAAAGCCCACCATGGGTGTACAGATCAGAAAGTCTACCAA
 GCTGTGACAGATGACCTGCCGGCCGCTTTGTGGATGGCACCACCAGTGGTGGGGACAGCGATGCCAAG
 AGCCTGCGTATCGTGAAAGGGGAGAGTGGCCACTATGTGGAGATGCACGCCCGCTATATAGGGACCAC
 AGTGTTTGTGCGGCAGGTGGGTGCTACCTGACCCTTGCATCCGTATGCCTGAAGACCTGGCCATGTCC
 TACGAGGAGAGCCAGGACCTGCAGCTGTGCGTGAACGGCTGCCCCCTGAGTGAACGCATCGATGACGG
 GCAGGGCCAGGTGTCTGCCATCCTGGGACACAGCCTGCCTCGCACCTCCTTGGTGCAGGCCTGGCCTGG
 CTACACACTGGAGACTGCCAACACTCAATGCCATGAGAAGATGCCAGTGAAGGACATCTATTTCCAGTCC
 TGTGTCTTCGACCTGCTCACCCTGGTGATGCCAACTTTACTGCCGCAGCCACAGTGCCTTGGAGGATGT

GGAGGCCCTGCACCCAAGGAAGGAACGCTGGCACATTTTCCCCAGCTCGAGCACCACCACCACCACCACT
AACCTAGGTAGCTGA

Aminosäuresequenz:

MPMPMLSAIVLYVLLAAAAHSAFAAMVHHHHHSAGLVPRGSGKETAAAKFERQHMDASGGGDDDDKS
PGDCQQPAQCRIQKCTTDFVSLTSHLNSAVDGFDFSEFKALRAYAGCTQRTSKACRGNLVYHSAVLGISDLMS
QRNCSKDGPTSSTNPEVTHDPCNYHSHAGAREHRRGDQNPPSYLFCGLFGDPHLRTFKDNFQTKVEGAWP
LIDNNYLSVQVTNVPVVPVPGSSATATNKITIIFFKAHHGCTDQKVYQAVTDDLPAAFVDGTTSGGSDAKSLRIVE
RESGHYVEMHARYIGTTVFVRQVGRYLTLAIRMPEDLAMSYEESQDLQLCVNGCPLSERIDDGQGQVSAILG
HSLPRTSLVQAWPGYTLETANTQCHEKMPVKDIYFQSCVFDLLTTGDANFTAAHSALEDVEALHPRKERWH
IFPSSTTTTTTNLGS-

pMK1_hRGMb Δ Ncys



DNA-Sequenz:

ATGCCCATGTTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGCCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTGCGGCCAT
GGTCATCATCACCACCATCACTCCGCGGGTTTGGTGCCAGAGGATCCCAACAGCCAGCCCAATGTCGA
ATCCAGAAATGCACCACGGACTTCGTGTCCCTGACTTCTACCTGAACTCTGCCGTTGACGGCTTTGACTC
TGAGTTTTGCAAGGCCTTGCGTGCCTATGCTGGCTGCACCCAGCGAACTTCAAAGCCTGCCGTGGCAAC
CTGGTATACCATCTGCCGTGTTGGGTATCAGTGACCTCATGAGCCAGAGGAATTGTTCCAAGGATGGAC
CCACATCCTCTACCAACCCGAAGTGACCCATGATCCTTGCAACTATCACAGCCACGCTGGAGCCAGGGA
ACACAGGAGAGGGGACCAGAACCCTCCAGTTACCTTTTTGTGGCTTGTGGTATCCTCACCTCAGA
ACTTTCAAGGATAACTTCAAACATGCAAAGTAGAAGGGCCTGGCCACTCATAGATAATAATTATCTTTC
AGTTCAAGTGACAAACGTACCTGTGGTCCCTGGTCCAGTGCTACTGCTACAAATAAGATCACTATTATCT
TCAAAGCCCACCATGGGTGTACAGATCAGAAAGTCTACCAAGCTGTGACAGATGACCTGCCGGCCGCTT
TGTGGATGGCACCACAGTGGTGGGGACAGCGATGCCAAGAGCCTGCGTATCGTGAAAGGGAGAGTG
GCCACTATGTGGAGATGCACGCCGCTATATAGGGACCACAGTGTGGTGGCAGGTGGTTCGCTACC
TGACCCTGCCATCCGTATGCCTGAAGACCTGGCCATGTCTACGAGGAGAGCCAGGACCTGCAGCTGTG
CGTGAACGGCTGCCCTGAGTGAACGCATCGATGACGGGCAGGGCCAGGTGTCTGCCATCCTGGGACA

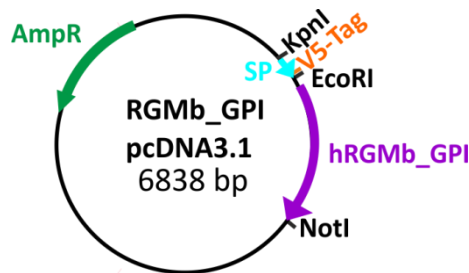
CAGCCTGCCTCGCACCTCCTTGGTGCAGGCCTGGCCTGGCTACACACTGGAGACTGCCAACACTCAATGC
 CATGAGAAGATGCCAGTGAAGGACATCTATTTCCAGTCCTGTGTCTTCGACCTGCTCACCCTGGTGATG
 CCAACTTTACTGCCGCAGCCACAGTGCCTTGGAGGATGTGGAGGCCCTGCACCCAAGGAAGGAACGCT
 GGCACATTTTCCCAGCAGTGGCTAACTCGAG

Aminosäuresequenz:

MPMLSAIVLYVLLAAAAHSAFAAMVHHHHHHSAGLVPRGSQQPAQCRIQKCTTDFVSLTSHLNSAVDGFDS
 EFCKALRAYAGCTQRTSKACRGNLVYHSAVLGISDLMQRNCSKDGPTSSTNPEVTHDPCNYHSHAGAREHR
 RGDQNPSSYLCGLFGDPLRFTKDNFQTKVEGAWPLIDNNYLSVQVTNVPVPGSSATATNKITIFKAHH
 GCTDQKVYQAVTDDLPAAFVDGTTSGGSDAKSLRIVERESGHYVEMHARYIGTTVFVRQVGRYLTLAIRM
 EDLAMSYESQDLQLCVNGCPLSERIDGQGVSAIGHSLPRTSLVQAWPGYTLETANTQCHEKMPVKDIY
 FQSCVFDLLTTGDANFTAAHSALEDVEALHPRKERWHIFPSSG-LE

=====

pcDNA3.1_hRGMb_GPI



DNA-Sequenz:

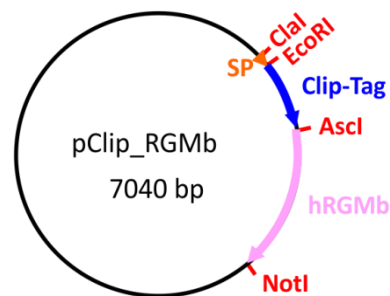
GGTACCGCCACCATGGGCTTGAGAGCAGCACCTCCAGCGCCGCGCTGCCGCCGCGAGGTTGAACAG
 CGCCGCCGCCCCGGGCTCTGCCCCCGCCGCTGGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTTTCAGCCTCGGGCTGC
 TCCACGCAAGCAGGTGCCGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGCAGGTGCCGA
 ATTCGGTGACTGCCAACAGCCAGCCCAATGTGCAATCCAGAAATGCACCACGGACTTCGTGTCCCTGACT
 TCTACCTGAACTCTGCCGTTGACGGCTTTGACTCTGAGTTTTGCAAGGCCTTGCCTGCCTATGCTGGCTG
 CACCCAGCGAACTTCAAAGCCTGCCGTGGCAACTGGTATAACCATTCTGCCGTGTTGGGTATCAGTGAC
 CTCATGAGCCAGAGGAATTGTTCCAAGGATGGACCCACATCCTCTACCAACCCGAAGTGACCCATGATC
 CTGCAACTATCACAGCCACGCTGGAGCCAGGGAACACAGGAGAGGGGACCAGAACCCTCCAGTTACC
 TTTTTGTGGCTTGTGGAGATCCTCACCTCAGAACTTCAAGGATAACTTCAAACATGCAAAGTAGAA
 GGGCCTGGCCACTCATAGATAATAATTATCTTTCAGTTCAAGTGACAAACGTACCTGTGGTCCCTGGAT
 CCAGTGCTACTGCTACAAATAAGATCACTATTATCTTCAAAGCCCACCATGGGTGTACAGATCAGAAAGT
 CTACCAAGCTGTGACAGATGACCTGCCGGCCGCTTTGTGGATGGCACCACAGTGGTGGGACAGCGA
 TGCCAAGAGCCTGCGTATCGTGAAAGGGAGAGTGGCCACTATGTGGAGATGCACGCCCGCTATATAG

GGACCACAGTGTGGTGTGCGGCAGGTGGGTGCTACCTGACCCTGCCATCCGTATGCCTGAAGACCTGGC
 CATGTCCTACGAGGAGAGCCAGGACCTGCAGCTGTGCGTGAACGGCTGCCCCCTGAGTGAACGCATCGA
 TGACGGGCAGGGCCAGGTGTCTGCCATCTGGGACACAGCCTGCCTCGCACCTCCTGGTGCAGGCCTG
 GCCTGGCTACACACTGGAGACTGCCAACACTCAATGCCATGAGAAGATGCCAGTGAAGGACATCTATTTCC
 CAGTCCTGTGTCTTCGACCTGCTCACCCTGGTGTGATGCCAACTTTACTGCCGAGCCACAGTGCCTTGGA
 GGATGTGGAGGCCCTGCACCCAAGGAAGGAACGCTGGCACATTTTCCCAGCAGTGGCAATGGGACTCC
 CCGTGGAGGCAGTGATTTGTCTGTCAGTCTAGGACTCACCTGCTTATCCTTATCGTGTTTTTGTAGGCGG
 CCGC

Aminosäuresequenz:

GTATMGLRAAPSSAAAAAAEVEQRRRPGLCPPPLELLLLLFLSLGLLHAAGAGKPIPNPLLDSTAGAEFGDC
 QQPAQCRIQKCTDFVSLTSHLNSAVDGFDFSEFKALRAYAGCTQRTSKACRGNLVYHSAVLGISDLMSQRN
 CSKDGPTSSTNPEVTHDPCNYHSHAGAREHRRGDQNPPSYLFCGLFGDPHLRTFKDNFQCKVEGAWPLID
 NNYLSVQVTNVPVPGSSATATNKITIFKAHHGCTDQKVYQAVTDDLPAAFVDGTTSGGSDAKSLRIVERE
 SGHYVEMHARYIGTTVFVRQVGRYLTLAIRMPEDLAMSYESQDLQLCVNGCPLSERIDDGQGQVSAILGHSL
 PRTSLVQAWPGYTLETANTQCHEKMPVKDIYFQSCVFDLLTTGDANFTAAHSALEDVEALHPRKERWHIFP
 SSGNGTPRGGSDLSVSLGLTCLILIVFL-AA

pCLIP_RGMb



DNA-Sequenz:

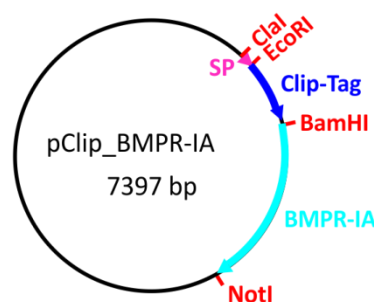
ATCGATGCCACCATGACTCAGCTATACATTTACATCAGATTATTGGGAGCCTATTTGTTTCATCATTCTCGT
 GTTCAAGGAGAATTCGCTAGCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTG
 GGCAAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCACGAGATCATCTTCTGGGCAAAGGAACATCT
 GCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAGAGCCACTGATCCAGGCC
 ACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCTGTGCCAGCCCTGCACC
 ACCAGTGTCCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCCG
 GAGAGGTCATCAGCGAGAGCCACCTGGCCGCCCTGGTGGGCAATCCCGCCGCCACCGCCGCCGTGAACA

CCGCCCTGGACGAAATCCCGTGCCATTCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGCAGGGCGACAGCGACG
TGGGGCCCTACCTGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCACGAGGGCCACAGACTGGGC
AAGCCTGGGCTGGGTCTGCAGGTATAGGCGCGCCGGGTGACTGCCAACAGCCAGCCCAATGTCGAATC
CAGAAATGCACCACGGACTTCGTGTCCCTGACTTCTCACCTGAACCTGCGCGTTGACGGCTTTGACTCTGA
GTTTTGCAAGGCCTTGCCTATGCTGGCTGCACCCAGCGAACTTCAAAGCCTGCGGTGGCAACTG
GTATACCATTCTGCCGTGTTGGGTATCAGTGACCTCATGAGCCAGAGGAATTGTTCCAAGGATGGACCCA
CATCCTCTACCAACCCGAAGTGACCCATGATCCTTGCACACTATCACAGCCACGCTGGAGCCAGGGAACA
CAGGAGAGGGGACCAGAACCCTCCCAGTTACCTTTTTGTGGCTTGTGGAGATCCTCACCTCAGAACTT
TCAAGGATAACTTCAAACATGCAAAGTAGAAGGGGCCTGGCCACTCATAGATAATAATTATCTTTTCAGT
TCAAGTGACAAACGTACCTGTGGTCCCTGGATCCAGTGCTACTGCTACAAATAAGATCACTATTATCTTCA
AAGCCCACCATGGGTGTACAGATCAGAAAGTCTACCAAGCTGTGACAGATGACCTGCCGGCCGCTTTGT
GGATGGCACCACCAGTGGTGGGACAGCGATGCCAAGAGCCTGCGTATCGTGGAAAGGGAGAGTGGC
CACTATGTGGAGATGCACGCCGCTATATAGGGACCACAGTGTGGTGGCAGGTGGGTGCTACCTG
ACCCTTGCCATCCGTATGCCTGAAGACCTGGCCATGCTCTACGAGGAGAGCCAGGACCTGCAGCTGTGC
GTGAACGGCTGCCCCCTGAGTGAACGCATCGATGACGGGCAGGGCCAGGTGTCTGCCATCCTGGGACAC
AGCCTGCCTCGACCTCCTTGGTGCAGGCCTGGCTGCTACACTGGAGACTGCCAACACTCAATGCC
ATGAGAAGATGCCAGTGAAGGACATCTATTTCCAGTCTGTGTCTTCGACCTGCTCACCCTGGTGTATGC
CAACTTTACTGCCGCAGCCACAGTGCCTTGGAGGATGTGGAGGCCCTGCACCCAAGGAAGGAACGCTG
GCACATTTCCCGCAGTGGCAATGGGACTCCCCGTGGAGGCAGTGATTTGTCTGTGCTAGGACTC
ACCTGCTTGATCCTTATCGTGTGTGTGTAGGCGGCCGC

Aminosäuresequenz:

IDATMTQLYIYIRLLGAYLFIISRVQGEFASMDKDCMKRRTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIIFLGKGTSAADAVE
VPAPAAVLGGPEPLIQATAWLNAYFHQPEAIEFFVVPALHHPVFQESFTRQVLWKLKVVKFGVEISEHLA
ALVGNPAATAAVNTALDGNPVPILIPCHRVVQGDSDVGPYLGGLAVKEWLLAHEGHRLGKPLGPAGIGAP
GDCCQPAQCRIQKCTTDFVSLTSHLNSAVDGFDFSEFKALRAYAGCTQRTSKACRGNLVYHSAVLGISDLMS
QRNCSKDGPTSSTNPEVTHDPCNYHSHAGAREHRRGDQNPSSYLCGLFGDPLRFTKDNFQTKVEGAWP
LIDNNYLSVQVTNPPVPGSSATATNKITIIIFKAHHGCTDQKVYQAVTDDLPAAFVDGTTSGGSDAKSLRIVE
RESGHYVEMHARYIGTTVFVRQVGRYLTLAIRMPEDLAMSYESQDLQLCVNGCPLSERIDDGQGQVSAILG
HSLPRTSLVQAWPGYTLETANTQCHEKMPVKDIYFQSCVFDLLTTGDANFTAAHSALEDVEALHPRKERWH
IFPSSNGTTPRGSDLSVSLGLTCLILIVFL-AA

pCLIP_BMPR-IA

**DNA-Sequenz:**

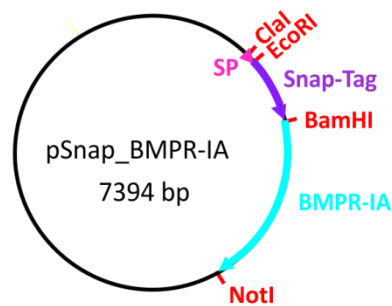
ATCGATGCCACCATGACTCAGCTATACATTACATCAGATTATTGGGAGCCTATTTGTTTCATCATTCTCGT
GTTCAAGGAGAATTCGCTAGCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTG
 GGCAAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCACGAGATCATCTTCTGGGCAAAGGAACATCT
 GCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAGAGCCACTGATCCAGGCC
 ACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCTGTGCCAGCCCTGCACC
 ACCCAGTGTCCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCCG
 GAGAGGTCATCAGCGAGAGCCACCTGGCCGCCCTGGTGGGCAATCCCGCCGCCACCGCCGCCGTGAACA
 CCGCCCTGGACGGAAATCCCGTGCCATTCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGCAGGGCGACAGCGACG
 TGGGGCCCTACCTGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCCACAGACTGGGC
 AAGCCTGGGCTGGTCTGCAGGTATAGGCGCGCCA**GGATCC**CAGAATCTGGATAGTATGCTTCATGGC
 ACTGGGATGAAATCAGACTCCGACCAGAAAAAGTCAGAAAATGGAGTAACCTTAGCACCAGAGGATACC
 TTGCCTTTTTAAAGTGCTATTGCTCAGGGCACTGTCCAGATGATGCTATTAATAACACATGCATAACTAA
 TGGACATTGCTTTGCCATCATAGAAGAAGATGACCAGGGAGAAACCACATTAGCTTCAGGGTGTATGAA
 ATATGAAGGATCTGATTTTCAGTGCAAAGATTCTCCAAAAGCCCAGCTACGCCGACAATAGAATGTTGT
 CGGACCAATTTATGTAACCAGTATTTGCAACCCACACTGCCCCCTGTTGTCATAGGTCCGTTTTTTGATGG
 CAGCATTGATGGCTGGTTTTGCTCATTCTATGGCTGTCTGCATAATTGCTATGATCATCTTCTCCAGCTG
 CTTTTGTTACAAACATTATTGCAAGAGCATCTCAAGCAGACGTCGTTACAATCGTGATTTGGAACAGGAT
 GAAGCATTTATCCAGTTGGAGAATCACTAAAAGACCTTATTGACCAGTCACAAAGTTCTGGTAGTGGGT
 CTGGACTACCTTTATTGGTTCAGCGAACTATTGCCAAACAGATTGATGGTCCGGCAAGTTGGTAAAGG
 CCGATATGGAGAAGTATGGATGGGCAAATGGCGTGGCGAAAAAGTGGCGGTGAAAGTATTCTTTACCA
 CTGAAGAAGCCAGCTGGTTTTGAGAAACAGAAATCTACAAAAGTGTGCTAATGCGCCATGAAAACATACT
 TGGTTTCATAGCGGCAGACATTAAGGTACAGGTTCTGGACTCAGCTCTATTTGATTACTGATTACCATG
 AAAATGGATCTCTCTATGACTTCTGAAATGTGCTACACTGGACACCAGAGCCCTGCTTAAATTGGCTTAT
 TCAGCTGCCTGTGGTCTGTGCCACCTGCACACAGAAATTTATGGCACCCAAGGAAAGCCCGCAATTGCTC
 ATCGAGACCTAAAGAGCAAAAACATCCTCATCAAGAAAAATGGGAGTTGCTGCATTGCTGACCTGGGCC
 TTGCTGTTAAATTCAACAGTGACACAAATGAAGTTGATGTGCCCTTGAATACCAGGGTGGGCACCAAACG
 CTACATGGCTCCCGAAGTGTGGACGAAAGCCTGAACAAAAACCACTTCCAGCCCTACATCATGGCTGAC

ATCTACAGCTTCGGCCTAATCATTGGGAGATGGCTCGTCGTTGTATCACAGGAGGGATCGTGGAAGAAT
 ACCAATTGCCATATTACAACATGGTACCGAGTGATCCGTCATACGAAGATATGCGTGAGGTTGTGTGTGT
 CAAACGTTTTCGGCCAATTGTGTCTAATCGGTGGAACAGTGATGAATGTCTACGAGCAGTTTTGAAGCTA
 ATGTCAGAATGCTGGGCCACAATCCAGCCTCCAGACTCACAGCATTGAGAATTAAGAAGACGCTTGCCA
 AGATGGTTGAATCCCAAGATGTAAAAATCTGAGCGGCCGC

Aminosäuresequenz:

IDATMTQLYIYIRLLGAYLFIISRVQGEFASMDKDCEMKRRTLDSP LGKLELSGCEQGLHEIIFLGKGTSAADAVE
 VPAPAAVLGGPELIQATAWLNAYFHQPEAIEFFVPALHHPVFQQESFTRQVLWLLKVVVFGEVISESHLA
 ALVGNPAATAAVNTALDGNPVPILIPCHRVVQGDSDVGPYLGGLAVKEWLLAHEGHRLGKPLGPAGIGAP
 GSQNLD SMLHGTGMKSDSDQKSENGVTLAPEDTLPFLKCYCSGHCPDDAINNTCITNGHCFAIIEEDDQGE
 TTLASGCMKYEGSDFQCKDSPKAQLRRTIECCRTNLCNQYLQPTLPPVVIGPFFDGSIRWL VLLISMAVCIAMI
 IFSSFCYKHYCKSISSRRRYNRDLEQDEAFIPVGESLKDLDIQSSGSGSGLPLLVRTIAKQIQMVRQVKGK
 RYGEVWMGKWRGEKVAVKVFFTTTEEASWFRETEYQTVLMRHENILGFIAADIKGTGSWTQLYLITDYHENG
 SLYDFLKCATLDTRALLKLAYSAAACGLCHLHTEIYGTQGKPAIAHRDLKSKNILIKNGSCCIADLGLAVKFNSDT
 NEVDVPLNTRVGTKRYMAPEVLDES LNKNHFQPYIMADIYSFGLI IWEMARRCITGGIVEEYQLPYNMVPSD
 PSYEDMREVVCKRLRPIVSNRWNSDECLRAVLKLMSECAWHPASRLTALRIKKTAKMVESQDVKI-AA

pSNAP_BMPR-IA



DNA-Sequenz:

ATCGATGCCACCATGACTCAGCTATACATTTACATCAGATTATTGGGAGCCTATTTGTTTCATCATTCTCGT
 GTTCAAGGAGAATTCACCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTGGGC
 AAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAACATCTGC
 CGCCGACGCCGTGGAAGTGCTGCCCGAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAGAGCCACTGATGCAGGCCA
 CCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCTGTGCCAGCCCTGCACCA
 CCCAGTGTTCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCGG
 AGAGGTCATCAGCTACCAGCAGCTGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCCACCGCCGCCGTGAAAAC

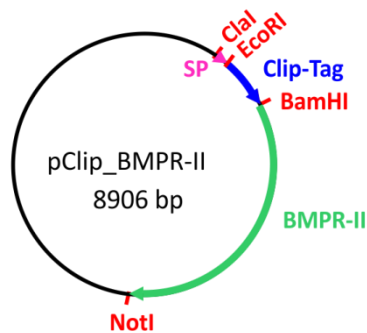
CGCCCTGAGCGGAAATCCCGTGCCATTCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGCCGTG
 GGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCACGAGGGCCACAGACTGGGCA
 AGCCTGGGCTGGTCTGCAGGTATAGGCGCGCCAGGATCCAGAATCTGGATAGTATGCTTCATGGCA
 CTGGGATGAAATCAGACTCCGACCAGAAAAAGTCAGAAAATGGAGTAACCTTAGCACCAGAGGATACCT
 TGCCTTTTTTAAAGTGCTATTGCTCAGGGCACTGTCCAGATGATGCTATTAATAACACATGCATAACTAAT
 GGACATTGCTTTGCCATCATAGAAGAAGATGACCAGGGAGAAACCACATTAGCTTCAGGGTGTATGAAA
 TATGAAGGATCTGATTTTCAGTGCAAAGATTCTCCAAAAGCCAGCTACGCCGACAATAGAATGTTGTC
 GGACCAATTTATGTAACCAGTATTTGCAACCCACACTGCCCCCTGTTGTCATAGGTCCGTTTTTTGATGGC
 AGCATTGATGGCTGGTTTTGCTCATTCTATGGCTGTCTGCATAATTGCTATGATCATCTTCTCCAGCTGC
 TTTTGTTACAAACATTATTGCAAGAGCATCTCAAGCAGACGTCGTTACAATCGTGATTGGAACAGGATG
 AAGCATTATTCCAGTTGGAGAATCACTAAAAGACCTTATTGACCAGTCACAAAGTTCTGGTAGTGGGTC
 TGGACTACCTTTATTGGTTCAGCGAACTATTGCCAACAGATTCAGATGGTCCGGCAAGTTGGTAAAGGC
 CGATATGGAGAAGTATGGATGGGCAAATGGCGTGGCGAAAAAGTGGCGGTGAAAGTATTCTTTACCACT
 GAAGAAGCCAGCTGGTTTCGAGAAACAGAAATCTACCAAAGTGTGCTAATGCGCCATGAAAACATACTT
 GGTTCATAGCGGCAGACATTAAAGGTACAGGTTCTGGACTCAGCTCTATTTGATTACTGATTACCATGA
 AAATGGATCTCTATGACTTCTGAAATGTGCTACACTGGACACCAGAGCCCTGCTAAATTGGCTTATT
 CAGCTGCCTGTGGTCTGTGCCACCTGCACACAGAAATTTATGGCACCCAAGGAAAGCCCGCAATTGCTCA
 TCGAGACCTAAAGAGCAAAAACATCCTCATCAAGAAAAATGGGAGTTGCTGCATTGCTGACCTGGGCCTT
 GCTGTAAATTCAACAGTGACACAAATGAAGTTGATGTGCCCTGAATACCAGGGTGGGCACCAAACGCT
 ACATGGCTCCCGAAGTGCTGGACGAAAGCCTGAACAAAAACCACTTCCAGCCCTACATCATGGCTGACAT
 CTACAGCTTCGGCCTAATCATTGGGAGATGGCTCGTCGTTGTATCACAGGAGGGATCGTGGAAGAATA
 CCAATTGCCATATTACAACATGGTACCGAGTGATCCGTCATACGAAGATATGCGTGAGGTTGTGTGTGTC
 AAACGTTTGGCGCAATTGTGTCTAATCGGTGGAACAGTGATGAATGTCTACGAGCAGTTTTGAAGCTAA
 TGTCAGAATGCTGGGCCACAATCCAGCCTCCAGACTCACAGCATTGAGAATTAAGAAGACGCTTGCCAA
 GATGGTTGAATCCCAAGATGTAAAAATCTGAGCGGCCGC

Aminosäuresequenz:

IDATMTQLYIYIRLLGAYLFIISRVQGEFTMDKDCMKRRTLDSP LGKLELSGCEQLHEIKLLGKGTSAADAVE
 VPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLKVVKFGVEISYQQL
 AALAGNPAATAAVKTA LSGNPVPILIPCHRVS SSGAVGGYEGGLAVKEWLLAHEGHRLGKPLGPAGIGAP
 GSQNLDSMLHGTGMKSDSDQKSENGVTLAPEDTLPFLKCYCSGHPDDAINNTCITNGHCFIIEEDDQGE
 TTLASGCMKYEGSDFQCKDSPAQLRRTIECCRTNLCNQYLQPTLPPVVIGPFFDGSIRWLVL LISMVCIAMI
 IFSSCFYKHYCKSISSRRRYNRDLEQDEAFIPVGESLKDLDIQSQSSGSGSGLPLL VQRTIAKQIQMVRQVKG
 RYGEVWMGKWRGEKVAVKVF FTTEEASWFRETEIYQTVLMRHENILGFIAADIKGTGSWTQLYLITDYHENG
 SLYDFLKCATLDRALLKLAYS AACGLCHLHTEIYGTQGKPAIAHRDLKSKNILIKNGSCCIADLGLAVKFNSDT

NEVDVPLNTRVGTKRYMAPEVLDES LNKNHFQPYIMADIYSFGLIWEMARRCITGGIVEEYQLPYINMVP
 PSYEDMREVV CVKRLRPIVSNRWNSDECLRAVLKLMSECWAHN PASRLTALRIKKT LAKMVESQDVKI-AA

pCLIP_BMPR-II



DNA-Sequenz:

ATCGATGCCACCATGACTCAGCTATACATTTACATCAGATTATTGGGAGCCTATTTGTTTCATCATTCTCGT
 GTTCAAGGAGAATTCGCTAGCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTG
 GGCAAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCACGAGATCATCTTCTGGGCAAAGGAACATCT
 GCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCCGTGTCTGGGCGGACCAGAGCCACTGATCCAGGCC
 ACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCTGTGCCAGCCCTGCACC
 ACCCAGTGTTCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCG
 GAGAGGTCATCAGCGAGAGCCACCTGGCCGCCCTGGTGGGCAATCCCGCCGCCACCGCCCGTGAACA
 CCGCCCTGGACGAAATCCCGTGCCATTCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGCAGGGCGACAGCGACG
 TGGGGCCCTACCTGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCACGAGGGCCACAGACTGGGC
 AAGCCTGGGCTGGGTCTGCAGGTATAGGCGCGCCAAGATCTCGCAGAATCAAGAACGGCTATGTGCG
 TTTAAAGATCCGTATCAGCAAGACCTTGGGATAGGTGAGAGTAGAATCTCTCATGAAAATGGGACAATAT
 TATGCTCGAAAGGTAGCACCTGCTATGGCCTTTGGGAGAAATCAAAGGGGACATAAATCTTGTA
 AAGGATGTTGGTCTCACATTGGAGATCCCCAAGAGTGTCACTATGAAGAATGTGTAGTA
 ACTACCACTCC TCCCTCAATTCAGAATGGAACATACCGTTTCTGCTGTTGTAGCACAGATTTATGTAATGTCAACTTTACTG
 AGAATTTTCCACCTCTGACACAACACCACTCAGTCCACCTCATTCAATTAACCGAGATGAGACAATAATC
 ATTGCTTTGGCATCAGTCTCTGTATTAGCTGTTTTGATAGTTGCCTTATGCTTTGGATACAGAATGTTGACA
 GGAGACCGTAAACAAGGTCTTCACAGTATGAACATGATGGAGGCAGCAGCATCCGAACCCTCTCTTGATC
 TAGATAATCTGAAACTGTTGGAGCTGATTGGCCGAGTGCATATGGAGCAGTATATAAAGGCTCCTTGG
 ATGAGCGTCCAGTTGCTGTAAAAGTGTTCCTTTGCAAACCGTCAGAATTTTATCAACGAAAAGAACATT
 TACAGAGTGCCTTTGATGGAACATGACAACATTGCCCGCTTTATAGTTGGAGATGAGAGAGTCACTGCAG
 ATGGACGCATGGAATATTTGCTTGTGATGGAGTACTATCCCAATGGATCTTTATGCAAGTATTTAAGTCTC

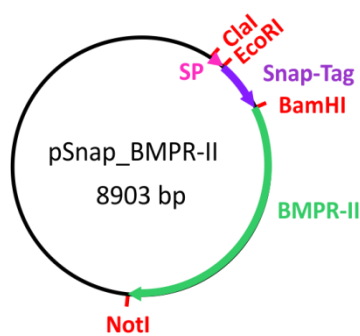
CACACAAGTGACTGGGTAAGCTCTTGCCGCTTGCTCATTCTGTTACTAGAGGACTGGCTTATCTTCACAC
AGAATTACCACGAGGAGATCATTATAAACCTGCAATTTCCCATCGAGATTTAAACAGCAGAAATGTCCTA
GTGAAAAATGATGGAACCTGTGTTATTAGTGACTTTGGACTGTCCATGAGGCTGACTGGAAATAGACTG
GTGCGCCCAGGGGAGGAAGATAATGCAGCCATAAGCGAGGTTGGCACTATCAGATATATGGCACCAGA
AGTGCTAGAAGGAGCTGTGAACTTGAGGGACTGTGAATCAGCTTTGAAACAAGTAGACATGTATGCTCT
TGGACTAATCTATTGGGAGATATTTATGAGATGTACAGACCTTCCCAGGGGAATCCGTACCAGAGTAC
CAGATGGCTTTTCAGACAGAGGTTGGAAACCATCCCACCTTTGAGGATATGCAGGTTCTCGTGTCTAGGG
AAAAACAGAGACCCAAGTCCCAGAAGCCTGGAAAGAAAATAGCCTGGCAGTGAGGTCACTCAAGGAG
ACAATCGAAGACTGTTGGGACCAGGATGCAGAGGCTCGGCTTACTGCACAGTGTGCTGAGGAAAGGAT
GGCTGAACTTATGATGATTTGGGAAAGAAACAAATCTGTGAGCCCAACAGTCAATCCAATGTCTACTGCT
ATGCAGAATGAACGCAACCTGTCACATAATAGGCGTGTGCCAAAAATTGGTCCTTATCCAGATTATTCTTC
CTCCTCATACATTGAAGACTCTATCCATCATACTGACAGCATCGTGAAGAATATTTCTCTGAGCATTCTAT
GTCCAGCACACCTTTGACTATAGGGGAAAAAACCGAAATTCATTAACTATGAACGACAGCAAGCACA
AGCTCGAATCCCCAGCCCTGAAACAAGTGTACCAGCCTCTCCACCAACACAACAACCACAAACACCACA
GGACTCACGCCAAGTACTGGCATGACTACTATATCTGAGATGCCATACCCAGATGAAACAAATCTGCATA
CCACAAATGTTGCACAGTCAATTGGGCCAACCCCTGTCTGCTTACAGCTGACAGAAGAAGACTTGAAAC
CAACAAGCTAGACCCAAAAGAAGTTGATAAGAACCTCAAGGAAAGCTCTGATGAGAATCTCATGGAGCA
CTCTCTTAAACAGTTCAGTGGCCCAGACCCACTGAGCAGTACTAGTTCTAGCTTGCTTTACCCACTCATAA
AATTGTCAGTAGAAGCAACTGGACAGCAGGACTTCACACAGACTGCAAATGGCCAAGCATGTTTGATTCC
TGATGTTCTGCCTACTCAGATCTATCCTCTCCCAAGCAGCAGAACCTTCCCAAGAGACCTACTAGTTTGC
CTTTGAACACCAAAAATTCAACAAAAGAGCCCCGGCTAAAATTTGGCAGCAAGCACAAATCAAATTGAA
ACAAGTCGAAACTGGAGTTGCCAAGATGAATACAATCAATGCAGCAGAACCTCATGTGGTGACAGTCAC
CATGAATGGTGTGGCAGGTAGAAACCACAGTGTTAACTCCCATGCTGCCACAACCCAATATGCCAATAGG
ACAGTACTATCTGGCCAAACAACCAACATAGTGACACATAGGGCCCAAGAAATGTTGCAGAATCAGTTTA
TTGGTGAGGACACCCGGCTGAATATTAATTCCAGTCCTGATGAGCATGAGCCTTTACTGAGACGAGAGCA
ACAAGCTGGCCATGATGAAGGTGTTCTGGATCGTCTTGTGGACAGGAGGGAACGGCCACTAGAAGGTG
GCCGAATAATTCCAATAACAACAACAGCAATCCATGTTCAGAACAAGATGTTCTTGCACAGGGTGTTC
AAGCACAGCAGCAGATCCTGGGCCATCAAAGCCCAGAAGAGCACAGAGGCCTAATTCTCTGGATCTTTC
AGCCACAAATGTCTGGATGGCAGCAGTATACAGATAGGTGAGTCAACACAAGATGGCAAATCAGGATC
AGGTGAAAAGATCAAGAAACGTGTGAAAACCTCCTATTCTCTTAAGCGGTGGCGCCCTCCACCTGGGTC
ATCTCCACTGAATCGCTGGACTGTGAAGTCAACAATAATGGCAGTAACAGGGCAGTTCATTCCAAATCCA
GCACTGCTGTTTACCTTGCAGAAGGAGGCACTGCTACAACCATGGTGTCTAAAGATATAGGAATGAAGTG
TCTGTGAGCGGCCGC

Aminosäuresequenz:

IDATMTQLYIYIRLLGAYLFIISRVQGEFASMDKDCEMKRTTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIIFLGKGTSAADAVE
 VPAPAAVLGGPEPLIQATAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWLLKLVVKGFEVISESHLA
 ALVGNPAATAAVNTALDGNPVPILIPCHRVVQGDSDVGPYLGGLAVKEWLLAHEGHRLGKPLGPAGIGAP
 GSSQNQERLCAFKDPYQQDLGIGESRISHENGITLCSKGSTCYGLWEKSKGDINLVKQGCWSHIGDPQECHYE
 ECVVTTTTPSIQNGTYRFCCSTDLNVTNFENFPPDPTPLSPPHSFNRDETIILASVSVLAVLIVALCFGYR
 MLTGDRKQGLHSMNMMEAAASEPSLDLNLKLELIGRGRYGAVYKGSlderPVAVKVFsfANRQNFINEK
 NIYRVPLMEHDNIARFIVGDERVTADGRMEYLLVMEYYPNGSLCKYLSLHTSDWVSSCRLAHSVTRGLAYLHT
 ELPRGDHYKPAISHRDLNSRNLVKNDGTCVISDFGLSMRLTGNRLVRPGEEDNAAISEVGTIRYMAPEVLEG
 AVNLRDCESALKQVDMYALGLIYWEIFMRCTDLFPGESVPEYQMAFQTEVGNHPTFEDMQVLVSREKQRPK
 FPEAWKENS LAVRSLKETIEDCWDQDAEARLTAQCAEERMAELMMIWERNKSVSPTVNPSTAMQNERN
 LSHNRRVPKIGPYPDYSSSYIEDSIHHTDSIVKNISSEHMSSTPLTIGEKNRNSINYERQQAQARIPSPETSVTS
 LSTNTTTNTTGLTPSTGMTTISEMPYPDETNLHTTNVAQSIGTPVCLQLTEEDLETNKLDPKVEVDKLNKESS
 DENLMEHSLKQFSGPDPLSSTSSSLYPLIKLAVEATGQQDFTQTANGQA CLIPDVLP TQIYPLPKQQNLPKRPT
 SLPLNTKNSTKEPRLKFGSKHKS NLKQVETGVAKMNTINAAEPHVVTVMNGVAGRNVSHVNSHAATTQYAN
 RTVLSGQTTNIVTHRAQEMLQNFQIGEDTRLNINSSPDEHEPLLREQQAGHDEGVLDRLVDRRERPLEGGR
 TNSNNNNSNPCSEQDVL AQGVPSTAADPGPSKPRRAQRPNSLDLSATNVLDGSSIQIGESTQDGKSGSGEKI
 KKRVKTPYSLKRWRPSTWVISTESLDCEVNNNGSNRAVHKSSTAVYLAEGGTATTMVSKDIGMNCL-AA

=====

pSNAP_BMPR-II



DNA-Sequenz:

ATCGATGCCACCATGACTCAGCTATACATTTACATCAGATTATTGGGAGCCTATTTGTTTCATCATTCTCGT
 GTTCAAGGAGAATTCACCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTGGGC
 AAGCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAACATCTGC
 CGCCGACCCGTGGAAGTGCTGCCAGCCGCGTGTGGGCGGACCAGAGCCACTGATGCAGGCCA
 CCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCTGTGCCAGCCCTGCACCA

CCCAGTGTCCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCGG
AGAGGTCATCAGCTACCAGCAGCTGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCCACCGCCGCCGTGAAAAC
CGCCCTGAGCGGAAATCCCGTGCCATTCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGCCGTG
GGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCACGAGGGCCACAGACTGGGCA
AGCCTGGGCTGGGTCTGCAGGTATAGGCGCGCCAAGATCCCGCAGAAATCAAGAACGGCTATGTGCGT
TTAAAGATCCGTATCAGCAAGACCTTGGGATAGGTGAGAGTAGAATCTCTCATGAAAATGGGACAATATT
ATGCTCGAAAGGTAGCACCTGCTATGGCCTTTGGGAGAAATCAAAAGGGGACATAAATCTTGTAACA
AGGATGTTGGTCTCACATTGGAGATCCCCAAGAGTGTCACTATGAAGAATGTGTAGTAACTACCACTCCT
CCCTCAATTCAGAATGGAACATAACCGTTTCTGCTGTTGTAGCACAGATTTATGTAATGTCAACTTTACTGA
GAATTTCCACCTCTGACACAACCACTCAGTCCACCTCATTCAATTAACCGAGATGAGACAATAATCA
TTGCTTTGGCATCAGTCTCTGTATTAGCTGTTTTGATAGTTGCCTTATGCTTTGGATACAGAATGTTGACA
GGAGACCGTAAACAAGGTCTTCACAGTATGAACATGATGGAGGCAGCAGCATCCGAACCCTCTTTGATC
TAGATAATCTGAAACTGTTGGAGCTGATTGGCCGAGGTGCATATGGAGCAGTATATAAAGGCTCCTTGG
ATGAGCGTCCAGTTGCTGTAAAAGTGTTCCTTTGCAAACCGTCAGAATTTTATCAACGAAAAGAACATT
TACAGAGTGCCTTTGATGGAACATGACAACATTGCCCGCTTATAGTTGGAGATGAGAGAGTCACTGCAG
ATGGACGCATGGAATATTTGCTTGATGGAGTACTATCCCAATGGATCTTTATGCAAGTATTTAAGTCTC
CACACAAGTGACTGGGTAAGCTCTTGCCGTCTTGCTCATTCTGTTACTAGAGGACTGGCTTATCTTCACAC
AGAATTACCACGAGGAGATCATTATAAACCTGCAATTTCCCATCGAGATTTAAACAGCAGAAATGCCTA
GTGAAAATGATGGAACCTGTGTTATTAGTGACTTTGGACTGTCCATGAGGCTGACTGGAAATAGACTG
GTGCGCCAGGGGAGGAAGATAATGCAGCCATAAGCGAGGTTGGCACTATCAGATATATGGCACCAGA
AGTGCTAGAAGGAGCTGTGAACTTGAGGGACTGTGAATCAGCTTTGAAACAAGTAGACATGTATGCTCT
TGGACTAATCTATTGGGAGATATTTATGAGATGTACAGACCTTCCAGGGGAATCCGTACCAGAGTAC
CAGATGGCTTTTCAGACAGAGGTTGAAACCATCCCACTTTGAGGATATGCAGGTTCTCGTGTCTAGGG
AAAAACAGAGACCCAAGTTCCAGAAGCCTGGAAAGAAAATAGCCTGGCAGTGAGGTCACTCAAGGAG
ACAATCGAAGACTGTTGGGACCAGGATGCAGAGGCTCGGCTTACTGCACAGTGTGCTGAGGAAAGGAT
GGCTGAACTTATGATGATTTGGGAAAGAAACAAATCTGTGAGCCCAACAGTCAATCCAATGTCTACTGCT
ATGCAGAATGAACGCAACCTGTCACATAATAGGCGTGTGCCAAAAATTGGTCCTTATCCAGATTATTCTTC
CTCCTCATAACATTGAAGACTCTATCCATCATACTGACAGCATCGTGAAGAATATTTCTCTGAGCATTCTAT
GTCCAGCACACCTTTGACTATAGGGGAAAAAAACCGAAATTCATTAATTAATGAACGACAGCAAGCACA
AGCTCGAATCCCCAGCCCTGAAACAAGTGTACCAGCCTCTCCACCAACACAACAACCACAAACACCACA
GGACTCACGCCAAGTACTGGCATGACTACTATATCTGAGATGCCATACCCAGATGAAACAAATCTGCATA
CCACAAATGTTGCACAGTCAATTGGGCCAACCCCTGTCTGCTTACAGCTGACAGAAGAAGACTTGAAAC
CAACAAGCTAGACCCAAAAGAAGTTGATAAGAACCTCAAGGAAAGCTCTGATGAGAATCTCATGGAGCA
CTCTCTTAAACAGTTCAGTGGCCAGACCCACTGAGCAGTACTAGTTCTAGCTTGCTTTACCACTCATAA
AATTGACAGTAGAAGCAACTGGACAGCAGGACTTCACACAGACTGCAAATGGCCAAGCATGTTTGATTCC

TGATGTTCTGCCTACTCAGATCTATCCTCTCCCAAGCAGCAGAACCTTCCAAGAGACCTACTAGTTTGC
CTTTGAACACCAAAAATTCAACAAAAGAGCCCCGGCTAAAATTTGGCAGCAAGCACAAATCAAACCTTGAA
ACAAGTCGAAACTGGAGTTGCCAAGATGAATACAATCAATGCAGCAGAACCTCATGTGGTGACAGTCAC
CATGAATGGTGTGGCAGGTAGAAACCACAGTGTTAACTCCCATGCTGCCACAACCAATATGCCAATAGG
ACAGTACTATCTGGCCAAACAACCAACATAGTGACACATAGGGCCCAAGAAATGTTGCAGAATCAGTTTA
TTGGTGAGGACACCCGGCTGAATATTAATTCCAGTCCTGATGAGCATGAGCCTTACTGAGACGAGAGCA
ACAAGCTGGCCATGATGAAGGTGTTCTGGATCGTCTTGTGGACAGGAGGGAACGGCCACTAGAAGGTG
GCCGAACTAATTCCAATAACAACAACAGCAATCCATGTTTCCAGAACAAAGATGTTCTTGACAGGGTGTTC
AAGCACAGCAGCAGATCCTGGGCCATCAAAGCCCAGAAGAGCACAGAGGCCTAATTCTCTGGATCTTTC
AGCCACAAATGTCTGGATGGCAGCAGTATACAGATAGGTGAGTCAACACAAGATGGCAAATCAGGATC
AGGTGAAAAGATCAAGAAACGTGTGAAAACCTCCATTCTCTTAAGCGGTGGCGCCCCCTCCACCTGGGTC
ATCTCCACTGAATCGCTGGACTGTGAAGTCAACAATAATGGCAGTAACAGGGCAGTTCATTCCAATCCA
GCACTGCTGTTTACCTTGAGAAGGAGGCACTGCTACAACCATGGTGTCTAAAGATATAGGAATGAACTG
TCTGTGAGCGGCCGC

Aminosäuresequenz:

IDATMTQLYIYIRLLGAYLFIISRVQGEFTMDKDCEMKRTTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVE
VPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLKVVKFGEVISYQQL
AALAGNPAATAAVKTALSGNPVPIIPCHRVSSTGAVGGYEGGLAVKEWLLAHEGHRGKPLGPAGIGAP
GSSQNQERLCAFKDPYQQDLGIGESRISHENGITLCSKGSTCYGLWEKSKGDINLVKQGCWSHIGDPQECHYE
ECVTTTTPPSIQNGTYRFCCSTDLNCFNFTENFPPDTPPLSPPHSFNRDETIILASVSVLAVLIVALCFGYR
MLTGDRKQGLHSMNMMEAAASEPSLDLNLKLELIGRGRYGAUVKGSLSLDERPVAVKVFSPANRQNFINEK
NIYRVPLMEHDNIARFIVGDERVTADGRMEYLLVMEYYPNGSLCKYLSLHTSDWVSSCRLAHSVTRGLAYLHT
ELPRGDHYKPAISHRDLNSRNVLVKNLGTGCVISDFGLSMRLTGNRLVVRPGEEDNAAISEVGTIRYMAPEVLEG
AVNLRDCESALKQVDMYALGLIYWEIFMRCTDLFPGESVPEYQMAFQTEVGNHPTFEDMQVLVSREKQRPK
FPEAWKENSLAVRSLKETIEDCWDQDAEARLTAQCAERMAELMMIWERNKSVPTVNPMTAMQNERN
LSHNRVVKIGPYPDYSSSYIEDSIHHTDSIVKNISSEHMSSTPLTIGEKNRNSINYERQQAQARIPSPETSVTS
LSTNTTTNTTGLTPSTGMTTISEMPYPDETNLHTTNVAQSIGPTPVCLQLTEEDLETNKLPKEVDKNLKES
DENLMEHSLKQFSGPDPLSSTSSSLYPLIKLAVEATGQQDFTQTANGQAACLIPDLPTQIYPLPKQQLPKRPT
SLPLNTKNSTKEPRLKFGSKHKSNLKQVETGVAKMNTINAAEPHVVTVMNGVAGRNVSHVSHAATTQYAN
RTVLSGQTTNIVTHRAQEMLQNFQIGEDTRLNINSSPDEHEPLLREQQAGHDEGVLDRLVDRRERPLEGGR
TNSNNNNSNPCSEQDVLAAQGVSTAADPGPSKPRRAQRPNSLDLSATNVLDGSSIQIGESTQDGKSGSGEKI
KKRVKTPYSLKRWRPSTWVISTESLDCEVNNNGSNRAVHSKSSTAVYLAEGGTATTMVSKDIGMNCL-AA

PUBLIKATIONEN

Tina V. Hellmann, Joachim Nickel, Thomas D. Müller:

“Missense mutations in GDF-5 signaling: molecular mechanisms behind skeletal malformation”

in: Mutations in Human Genetic Disease
Dr. David N. Cooper (Ed.);
ISBN 980-953-307-125-6
Druck: Juli, 2012
Online-Veröffentlichung: 12.10.2012

=====

Uschi Diestel, Marcus Resch, Kathrin Meinhardt, Sigrid Weiler, Tina V. Hellmann, Thomas D. Müller, Joachim Nickel, Jutta Eichler, Yves A. Müller:

“Identification of a Novel TGF- β -Binding Site in the Zona Pellucida C-terminal (ZP-C) Domain of TGF- β -Receptor-3 (TGFR-3).”

in: PLoS One, 2013 Jun 27;8(6):e67214. Print 2013.

DANKSAGUNG

An erster Stelle und im besonderen Maße möchte ich Herrn Professor Dr. Thomas Müller für die Möglichkeit danken, dieses spannende Thema zu bearbeiten. Seine stets offene Tür sowie die hervorragende Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft haben entscheidend zu dem freundlichen und motivierenden Arbeitsklima beigetragen!

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Professor Dr. Heike Walles für die Anfertigung des Zweitgutachtens bedanken!

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Sonderforschungsbereich 487.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Joachim Nickel und Dr. Axel Seher für die Unterstützung und Beratung bei diversen Belangen des Laborlebens, bei wissenschaftlichen Fragestellungen sowie für die Durchsicht dieser Arbeit!

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Botanik I – vor allem natürlich meinen Kollegen Stella Weidauer, Juliane Fiebig, Mathias Kottmaier, Simone Zapf, Jens Lautenschläger, Julia Frank, Stefan Saremba, Markos Pechlivanis, Eva Maria Muth, Alice Schaaf, Ramona Derr, Eva Wirth, Verena Boschert, Stefanie Hüttl, Caroline Weidmann, Markus Bauer sowie auch allen Praktikanten - möchte ich ganz besonders für die harmonische, kollegiale Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung danken.

Ganz besonders möchte ich Melanie Baumann, Stella Weidauer, Maria Zöllner und Nadja Stingl danken - ihr habt dazu beigetragen, dass die Zeit während der Promotion zu einem unvergesslichen und schönen Lebensabschnitt wurde!

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für den Rückhalt, die Unterstützung in allen Lebenslagen und den unerschütterlichen Glauben an mich danken. Mein innigster Dank gilt meinem Freund Markus, der mich in den letzten Jahren geduldig und unermüdlich begleitet, unterstützt, ertragen und vor allem immer wieder motiviert hat, wenn ich mal wieder kein Licht am Ende des Tunnels gesehen habe! Vielen Dank – ohne euch wäre diese Arbeit nie zustande gekommen!



EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

HIERMIT VERSICHERE ICH, DASS ICH DIE VORLIEGENDE DISSERTATION SELBSTÄNDIG ANGEFERTIGT UND KEINE ANDEREN ALS DIE ANGEGEBENEN QUELLEN UND HILFSMITTEL VERWENDET HABE.

DIESE ARBEIT WURDE IN GLEICHER ODER ÄHNLICHER FORM NOCH ZU KEINEM ANDEREN PRÜFUNGSVERFAHREN VORGELEGT.

ICH ERKLÄRE, DASS ICH BISHER KEINE AKADEMISCHEN GRADE ERWORBEN ODER ZU ERWERBEN VERSUCHT HABE.

BREMEN, 22.08.2013

(TINA HELLMANN)