

JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU WÜRZBURG

JULIUS-VON-SACHS-INSTITUT, BOTANIK I, LEHRSTUHL FÜR MOLEKULARE PFLANZENPHYSIOLOGIE UND BIOPHYSIK



Bambi – Charakterisierung eines inhibitorischen BMP-Pseudorezeptors

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrads
der bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Mathias Kottmair

aus Wertingen

Würzburg, 2014

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE MITGLIEDER DER TGF- β -PROTEINSUPERFAMILIE	1
1.2 DIE ROLLE DER TGF- β -SUPERFAMILIE IN DER EMBRYOGENESE.....	4
1.3 DIE REZEPTOREN DER TGF- β -PROTEINSUPERFAMILIE.....	10
1.4 DER MECHANISMUS DER SIGNALTRANSDUKTION IN DER TGF- β -PROTEINSUPERFAMILIE	14
1.5 PROMISKUITÄT UND SIGNALMODULATION DER TGF- β -SIGNALTRANSDUKTION.....	16
1.6 INHIBITOREN DER TGF- β -SUPERFAMILIE.....	19
1.6.1 Modulation der Signaltransduktion von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie durch extrazelluläre Antagonisten	21
1.6.2 Inhibition durch Blockade der Rezeptoren.....	25
1.6.3 Inhibition durch inhibitorische SMADs.....	26
1.6.4 Andere intrazelluläre Inhibitoren	27
1.7 DER MEMBRANSTÄNDIGE PSEUDOREZEPTOR BAMBI	28
1.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	31
2 MATERIAL UND METHODEN	- 33 -
2.1 MATERIAL	- 33 -
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	- 33 -
2.1.2 Verwendete Vektoren	- 33 -
2.1.3 Bakterienstämme	- 34 -
2.1.4 Medien	- 34 -
2.1.5 Verwendete Oligonukleotide	- 35 -
2.1.6 Verwendete Puffer und Lösungen.....	- 36 -
2.1.7 Verwendete Fertiganwendungen.....	- 37 -
2.2 METHODEN	- 37 -
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	- 37 -
2.2.2 Expression rekombinanter Proteine.....	- 44 -
2.2.3 Proteinchemische Methoden	- 51 -
2.2.4 Biophysikalische Methoden	- 55 -
2.2.5 Zellbiologische Methoden	- 61 -
3 ERGEBNISSE	- 71 -
3.1 ERSTELLUNG EINES 3D-HOMOLOGIEMODELS FÜR DIE EKTODOMÄNE DES BMP PSEUDOREZEPTORS BAMBI.....	- 71 -
3.2 KLONIERUNG UND REKOMBINANTE EXPRESSION VON hBAMBI-ECD AUS E.COLI.....	- 74 -
3.3 RÜCKFALTUNG DES hBAMBI PROTEINS UND ANSCHLIEßENDE CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG.....	- 75 -
3.4 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DES REKOMBINANT AUS BAKTERIEN ERHALTENEN hBAMBI-ECD PROTEINS.....	- 76 -
3.5 KLONIERUNG UND REKOMBINANTE EXPRESSION VON hBAMBI-ECD AUS Sf9-INSEKTENZELLEN	- 78 -
3.6 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG VON PROTEIN AUS ZELLKULTURÜBERSTAND	- 80 -
3.7 GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE VON hBAMBI-ECD AUS ZELLKULTUR.....	- 81 -
3.8 PROTEINCHARAKTERISIERUNG.....	- 84 -
3.8.1 Analytische Gelfiltration von hBambi-ECD zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades.....	- 84 -
3.8.2 Vergleichende Sekundärstrukturanalyse von hBambi-ECD-Proteinen mittels CD-Spektroskopie ..	- 86 -
3.9 AKTIVITÄTSNACHWEIS UND SUCHE VON BINDEPARTNERN VON hBAMBI-ECD MIT HILFE DER OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZSPEKTROSKOPIE	- 89 -
3.9.1 Vergleichender Aktivitätstest von hBambi-ECD aus unterschiedlichen Expressionssystemen	- 89 -
3.9.2 Interaktionsanalyse zwischen hBambi-ECD und Ektodomänen von Typ-I- und II-Rezeptoren	- 92 -
3.9.3 <i>In vitro</i> Interaktionsanalyse zwischen hBambi und ActivinA.....	- 93 -

3.9.4 Bindungsspezifität der Ektodomäne von Bambi für Liganden der BMP-Subfamilie	- 95 -
3.9.5 Affinitätsmessungen mit Bindungsmutanten von BMP-2	- 99 -
3.10 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITEN.....	- 101 -
3.10.1 Dosisabhängige Inhibition des BMP-2-Signals im zellulären Kontext durch die Ektodomäne von hBambi	- 101 -
3.10.2 Expressionsanalyse von Bambi in verwendeten Zelllinien mittels kinetischer PCR	- 108 -
3.10.3 Transfizierte Bambi-Chimären beeinflussen die TGF- β -induzierte Signalweiterleitung.....	- 110 -
4 DISKUSSION.....	- 123 -
4.1 ERSTELLUNG UND VERIFIZIERUNG EINES <i>IN SILICO</i> -HOMOLOGIE-MODELLS DER EKTODOMÄNE VON HBAMBI.....	- 123 -
4.2 VERGLEICH DER EXPRESSIONS- UND REINIGUNGSSTRATEGIEN VON HBAMBI-ECD	- 131 -
4.3 INTERAKTIONSANALYSEN ZEIGEN KEINE BINDUNG DER EKTODOMÄNE VON HBAMBI MIT REZEPTOREKTODOMÄNEN DER TGF- β -SIGNALWEITERLEITUNG	- 134 -
4.4 BAMBI HAT KEINERLEI DIREKTEN EINFLUSS AUF ACTIVINA, MÖGLICHERWEISE ABER AUF SEINE SIGNALWEITERLEITUNG	- 136 -
4.5 CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNG VON HBAMBI-ECD AN LIGANDEN DER BMP-/GDF-GRUPPE AM BEISPIEL VON BMP-2 ..	- 138 -
4.6 TRANSFEKTIONSEXPERIMENTE MIT CHIMÄREN OFFENBAREN DIE BINDESTELLE VON BAMBI AN BMP-2	- 141 -
4.7 DIE EKTODOMÄNE VON HBAMBI ZEIGT HOHE SPEZIFISCHE AFFINITÄT ZU MITGLIEDERN DER BMP-/GDF-PROTEINGRUPPE	- 146 -
5 SUMMARY.....	- 153 -
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	- 155 -
7 LITERATURVERZEICHNIS	- 157 -
8 ANHANG.....	- 177 -
8.1 THEORETISCHE VORHERSAGE ÜBER PHOSPHORYLIERUNGEN	- 177 -
8.2 THEORETISCHE VORHERSAGE ÜBER GLYKOSYLIERUNGEN	- 177 -
8.3 VERWENDETE KONSTRUKTE UND SEQUENZEN.....	- 178 -
8.4 KPCR-AUSWERTUNG AUS LYSIERTEN UNSTIMULIERTEN ZELLINIEN	- 182 -
9 FORMELLER ANHANG.....	- 183 -
9.1 SCHRIFTENVERZEICHNIS.....	- 183 -
9.2 DANKSAGUNG.....	- 184 -
9.3 LEBENSLAUF.....	- 185 -
9.4 ERKLÄRUNG	- 186 -

Abkürzungen (ohne SI-Einheiten)

Abkürzu	Bedeutung	Abkürzu	Bedeutung
2-ME	β -Mercaptoethanol	Kan	Kanamycin
Abb.	Abbildung	K_D	Dissoziationskonstante
AMH	<i>Anti-Müllerian-Hormone</i>	k_{off}	Dissoziationsgeschwindigkeit
Amp	Ampicillin	k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeit
APS	Ammoniumperoxodisulfat	LB	<i>luria bertani</i>
bp	Basenpaar(e)	LU	<i>light units</i> (engl.: Lichteinheiten)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderalbumin aus dem Serum)	MeOH	Methanol
CD	Circulardichroismus	MOPS	3-(N-Morpholino-)Propansulfonsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	MW	<i>molecular weight</i> (engl.: Molekulargewicht)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (engl.: Kernspinresonanz)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	oD_{600}	optische Dichte bei 600nm
DTT	Dithiothreitol	ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
DVR	<i>Decapentaplegic&Vg-1-related</i> (engl.: verwandt zu ...)	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (engl.: phosphatgepufferte Salzlösung)
ECD	<i>extracellular domain</i> (engl.: extrazelluläre Domäne)	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (engl.: Polymerasekettenreaktion)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RP-HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit umgekehrter Phase
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent-assay</i> (engl.: Enzymbasiertes Nachweisverfahren)	rpm	<i>rounds per minute</i> (engl.: Umdrehungen pro Minute)
et.al	<i>et alii</i> (lat.: und andere)	RT	Raumtemperatur (20°C)
EtOH	Ethanol	RU	<i>resonance units</i> (engl.: Resonanzeinheiten)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (engl.: fötales Kälberserum)	s.	siehe
FF	<i>fast flow</i> (engl. schneller Fluss)	SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (engl.: Natriumdodecylsulfat)
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid	SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (engl.: Oberflächenplasmonresonanz)
HBS	<i>hepes buffered saline</i> (engl.: Hepes-gepufferte Salzlösung)	TEMED	N'N'N'-Tetraethylendiamin
IMAC	<i>ionized metal affinity chromatography</i> (engl.: immobilisierte Metallaffinitätschromatographie)	TFA	Trifluoressigsäure
<i>In silico</i>	lat.: computergestützte Simulation	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>In vitro</i>	lat.: im Reagenzglas	ü.N.	über Nacht
<i>In vivo</i>	lat.: im lebenden Organismus	UV	ultraviolett
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	wt	wildtypisch

TABELLE 1: VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Die Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen der Aminosäuren gehen mit der Empfehlung der IUBAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur einher. Wird ein Aminosäureaustausch im Wildtyp vorgenommen, wird die neue Mutante mit der

Einbuchstabenabkürzung beschrieben. So beschreibt als Beispiel BMP-2 L51P den Austausch von Leucin an der Position 51 im wildtypischen BMP-2 zu Prolin.

Vorsätze

Abkürzung	Bedeutung
M	Mega- (10^6)
k	Kilo- (10^3)
d	Dezi- (10^{-1})
c	Centi- (10^{-2})
m	Milli- (10^{-3})
μ	Mikro- (10^{-6})
n	Nano- (10^{-9})
p	Pico- (10^{-12})
f	Femto- (10^{-15})

TABELLE 2: VORSÄTZE VOR EINHEITEN

Vorsatz	Organismus
c	<i>c</i> hicken ; <i>Gallus domesticus</i> ; Haushuhn
d	<i>D</i> rosophila melanogaster ; schwarzbäuchige Taufliege
h	<i>H</i> omo sapiens ; Mensch
m	<i>M</i> us musculus ; Maus
r	<i>R</i> attus norvegicus ; Farbratte
s	<i>A</i> rbacia punctulata ; kurzstacheliger Purpurseeigel
x	<i>X</i> enopus laevis ; glatter Krallenfrosch

TABELLE 3: VORSÄTZE FÜR PROTEINE BEZÜGLICH IHRES URSPRUNGSORGANISMUS

1 EINLEITUNG

1.1 DIE MITGLIEDER DER TGF- β -PROTEINSUPERFAMILIE

Der TGF- β -Proteinsuperfamilie (engl.: Transforming Growth Factor β = umbildende Wachstumsfaktoren Kategorie β) sind viele signalisierende Proteine zugehörig, die in unterschiedlichen Organismen der Vertebraten und Invertebraten und dort in vielen Geweben und Entwicklungsstadien unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Die Zuordnung der, ausschließlich in den Extrazellulärraum sekretierten, Mitglieder zu dieser Familie erfolgt durch ein weitestgehend konserviertes charakteristisches Cystin-Knoten-Motiv mit sechs oder acht intramolekular verbrückten Cysteinen, das annähernd allen Vertretern dieser Gruppe über alle untersuchten Spezies hinweg gemein ist (Daopin *et al.*, 1992; Griffith *et al.*, 1996; Hinck *et al.*, 1996; Scheufler *et al.*, 1999). Zur Veranschaulichung dieser im Laborversuch homodimeren Proteine wird das Bild zweier umschlungener linker Hände herangezogen, wobei die zentrale $3\frac{1}{2}$ -Umdrehungen große α -Helix α_1 der einen Handfläche auf den antiparallelen β -Strängen des jeweils anderen Handballens ruht (s. Abbildung 1B). Verbunden werden beide Monomere in der Regel durch eine intermolekulare Cystinbrücke über den jeweils siebten bzw. neunten Cysteinrest (Daopin *et al.*, 1992; Griffith *et al.*, 1996). Ausnahmen bilden hier GDF-3, -9, -9b/BMP-15 sowie Lefty-1 und Lefty-2, denen jeweils das die intermolekulare Disulfidbrücke ausbildende Cystein fehlt (Jones *et al.*, 1992a; Dube *et al.*, 1998; Oulad-Abdelghani *et al.*, 1998; Levine & Brivanlou, 2006). In seltenen Fällen sind in Invertebraten auch biologisch relevante Heterodimere aus definierten unterschiedlichen TGF- β -Familienmitgliedern bekannt (Cheifetz *et al.*, 1987; Schmid *et al.*, 2000; Shimmi *et al.*, 2005).

Trotz eines homologen Cystinknotens und Ähnlichkeiten in der Sekundärstruktur werden andere Wachstumsfaktoren wie NGF (eng.: Nervous Growth Factor = nervöser Wachstumsfaktor), PDGF (engl.: Platelet-Derived Growth Factor = Aus Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor) oder VEGF (engl.: Vascular Endothelial Growth Factor = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) ob ihrer Divergenz, unterschiedlichen Signalweiterleitung über Rezeptortyrosinkinasen sowie abweichender Architektur zwar dem gleichen Ursprung, nicht jedoch der Gruppe der TGF- β -Proteinfamilie, zugeschrieben (McDonald *et al.*, 1991; Haniu *et al.*, 1993; Joukov *et al.*, 1997).

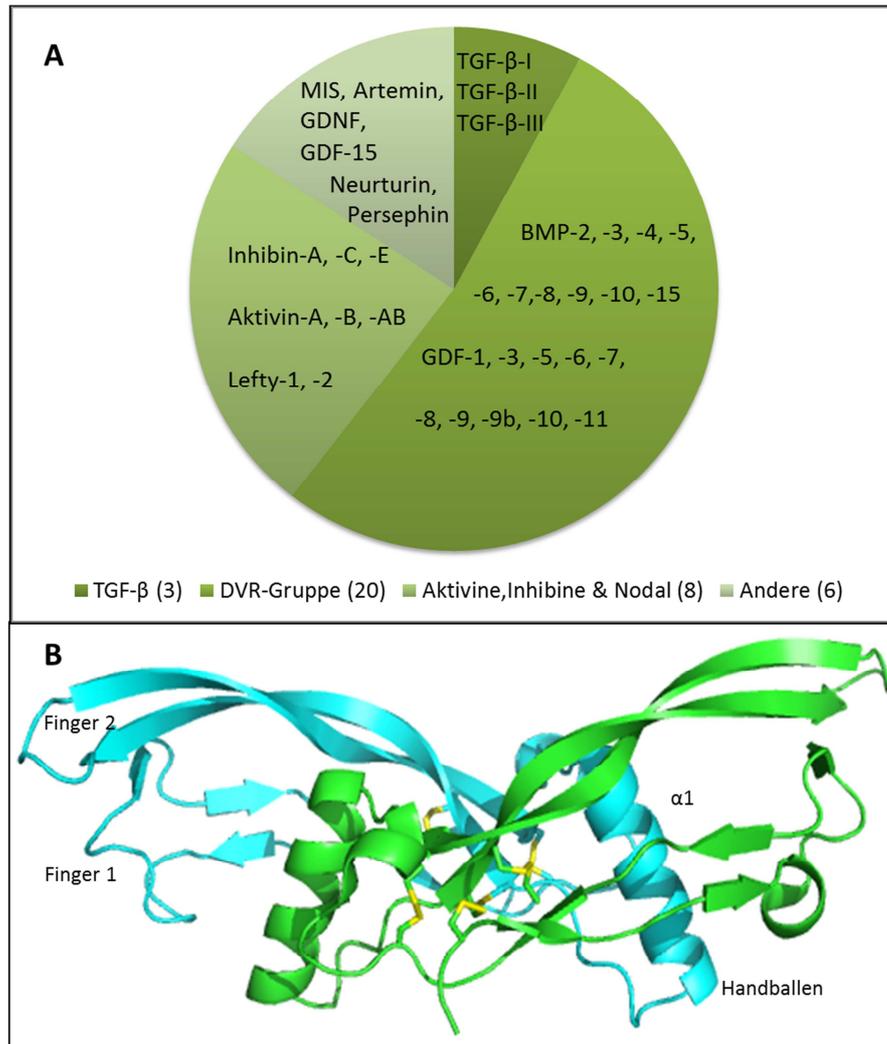


ABBILDUNG 1: DIE LIGANDEN DER TGF-B-FAMILIE

A Schematische Einteilung der im Menschen vorkommenden Vertreter der TGF- β -Superfamilie in die vier Unterfamilien. Die Zuordnung der einzelnen Kreissegmente ist der Legende zu entnehmen. In Klammern angegeben ist die jeweilige Anzahl der Mitglieder der entsprechenden Familie. Die DVR-Gruppe (*decapentaplegic and vg-1-related*) wurde erstmals im Übersichtsartikel von Karen M. Lyons und Kollegen erwähnt (Lyons *et al.*, 1991). **B** Bänderdarstellung des homodimeren BMP-2 stellvertretend für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie. In hellblau und grün sind die beiden Monomere dargestellt. Die Beschriftung wichtiger Bestandteile erfolgte anhand der hellblauen Untereinheit. Dargestellt sind in Gelb die drei intramolekularen sowie die vierte intermolekulare Disulfidbrücke. Die Bänderdarstellung wurde mit PyMol anhand der veröffentlichten PDB-Datei 2H62 erstellt (Weber *et al.*, 2007).

Die Einordnung der verschiedenen Mitglieder in jeweils eine der vier Untergruppen erfolgt auf der Basis phylogenetischer und wirksspezifischer Vergleiche der einzelnen Mitglieder untereinander. Sequenz- und Strukturvergleiche zeigen, dass unterschiedliche Gruppen vermutlich aus anderen hervorgegangen sind und die Gruppenstärke dadurch, womöglich abhängig vom jeweiligen Zeitpunkt der Abspaltung und bereits erfolgten Diversifikationen innerhalb einer Untergruppe, sehr stark variiert (Übersichtsartikel: Hinck, 2012). Die Kleinste der vier Untergruppen, TGF- β , umfasst lediglich fünf Proteine (TGF- β -I, -II und -III in allen

Vertebraten sowie cTGF- β -IV aus Huhn und xTGF- β -V aus dem Krallenfrosch), deren Diversität zum vermuteten Ursprung bereits sehr stark ist (Derynck *et al.*, 1985; de Martin *et al.*, 1987; Derynck *et al.*, 1988; Jakowlew *et al.*, 1988; Kondaiah *et al.*, 1990). Phylogenetisch weiter entfernt ist nur die Gruppe, unter der weitere entfernte Mitglieder der TGF- β -Superfamilie wie GDNF (engl.: *Glial-Cell-line Derived Neurotropic Factor*) oder MIS/AMH (engl.: *Müllerian Inhibiting Substance/Anti-Müllerian hormone*) zusammengefasst wurden. Hingegen wird die zweite Gruppe der Activine, Inhibine und Nodal als verbindendes Element zwischen TGF- β und der Gruppe mit den mit aktuell 16 meisten bekannten Mitgliedern, den knochenmorphogenetischen Proteinen (engl.: *Bone Morphogenetic Protein*; BMP) und Größen-/Differenzierungs-Wachstumsfaktoren (engl.: *Growth Differentiation Factor*; GDF) betrachtet. (s. Abbildung 1A) Dieser Gruppe ist auch das erste entdeckte Mitglied der Superfamilie zuzuordnen. Bereits 1965 transferierte Marshall R. Urist dekalzifizierte Extrakte aus Knochen verschiedener Lebewesen in das Muskelgewebe lebender Tiere und beobachtete Knochenwachstum in der Nähe der Injektionsstelle (Urist, 1965) bevor 19 Jahre später erstmals aus 10kg Rinderknochen 20 μ g bovines BMP-2 isoliert werden konnte (Urist *et al.*, 1984). Sechs Jahre zuvor wurde bereits TGF- β -I aus dem Überstand der mit Sarcomaviren infizierten Mauszelllinie 3T3 extrahiert (Todaro & De Larco, 1978), ehe die erste rekombinante Expression von BMP-2 und BMP-3a als Vertreter der TGF β -Superfamilie in COS-1-Zellen gelang (Wozney *et al.*, 1988).

Die größte bekannte Anzahl an Vertretern findet sich im humanen Proteom. Dort sind dem aktuellen Stand nach 37 Proteine (s. Abbildung 1A) dieser Familie zuzuordnen. Orthologe finden sich über viele bekannte Modellorganismen unterschiedlicher Komplexität hinweg, wengleich auch nicht zu jedem Familienmitglied und jeder Funktion. Mitunter werden mehrere Aufgaben von einem Protein übernommen oder die Wirkweise ist bislang noch unverstanden. Ebenso werden artspezifische Aufgaben, speziell in der Embryogenese, von Vertretern der TGF- β -Superfamilie übernommen, die es so in anderen Tieren nicht gibt. Oftmals sind aber Aufgabe und Wirkungsweise unter den Orthologen über die evolutionäre Entwicklung einem gemeinsamen, konservierten Ursprung zuzuordnen.

Proteine der TGF- β -Superfamilie werden als Vorläuferproteine exprimiert (Lawrence *et al.*, 1984). Sie bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid, einem daran anschließenden Proproteinanteil und einer reifen Domäne. In dem vorläufigen Zustand verweilen sie oftmals

gebunden oder ungebunden in der Zelle als sogenannte latente Komplexe, bis sie durch die von *Furin-type*-Proteasen geschnittenen, zymogenen SPCs (*Subtilisin-like-Protein-Convertase*) oder Integrine verdaut und dadurch aktiviert werden. (Gentry & Nash, 1990; Dubois *et al.*, 1995; Munger *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2006) Proproteine von BMP-2/-4 und GDF-5, translatiert über ein alternatives Startcodon *downstream* der SPC-Erkennungssequenz R-X-X-R wurden, abseits der bekannten Prozessierung durch SPCs, aktiv transloziert in den Nukleus gefunden. Ihre dortige Funktion und ob noch weitere Proproteine diesen Weg gehen können, ist allerdings bislang unklar. (Felin *et al.*, 2010) Für manche TGF- β -Mitglieder scheint der Proproteinanteil unterstützend bei der Faltung zu wirken (Gray & Mason, 1990). Aber auch nach dessen proteolytischer Abspaltung des N-terminalen Bereichs fallen diesem mitunter Aufgaben zu: So wirken die abgetrennten Prodomänen von TGF- β -I, -II und -III sowie von Myostatin/GDF-8 und GDF-11/BMP-11 inhibitorisch auf die reife Form. (Thies *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2005) Dabei dimerisiert der größere N-terminale Bereich zum LAP (*latency-associated peptide*), welches den ebenfalls dimerisierten kleineren C-terminalen Teil bindet, inaktiviert und dessen Durchlauf in der Zelle unterstützt (Miyazono *et al.*, 1988; Sha *et al.*, 1989; Gentry & Nash, 1990). Wird dieser inaktive, heterotetramere kleine latente Komplex sekretiert, so kann er von spezifischen Bindeproteinen, die mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind, über eine Disulfidbrücke zwischen Bindeprotein und LAP zum großen latenten Komplex verbunden werden. Dieser Latenz genannte regulatorische Effekt sorgt für einen großen Vorrat an TGF- β -Protein, das bei Bedarf schnell und in großen Mengen vom LAP gelöst und dadurch aktiviert werden kann. (Olofsson *et al.*, 1992; Taipale *et al.*, 1994) Dies kann im Fall von TGF- β -I durch Proteolyse (Lyons *et al.*, 1988), Deglykosylierung der drei N-Glykosylierungsstellen des LAP (Miyazono & Heldin, 1989), oder niedrige pH-Werte, die in der Nähe von nekrotischem Gewebe oder sich umbildenden Knochen auftreten (Lawrence *et al.*, 1985; Jullien *et al.*, 1989), geschehen.

1.2 DIE ROLLE DER TGF-B-SUPERFAMILIE IN DER EMBRYOGENESE

So wenig sich die Vertreter der TGF- β -Superfamilie in ihrem Aufbau unterscheiden; ihre Aufgaben im adulten Organismus sind sehr mannigfaltig und hochspezifisch. Gerade für die Untergruppe der BMPs wird deren Benennung aufgrund ihrer zunächst entdeckten Funktion, der Induktion des Knochenwachstums, nicht deren vollständigem Wirkspektrum während der Embryogenese und im adulten Lebewesen gerecht. Neben ihrer osteoinduktiven

Wirkung (gilt allerdings nicht für alle BMP-Mitglieder) sind sie weiterhin an der Knorpelbildung (Leboy *et al.*, 1997), dem Erhalt und der Reparatur beschädigter Knochenmatrix (Nogami & Oohira, 1984), der Weiterentwicklung des Nervensystems (Perides *et al.*, 1994), Induktion der Zellteilung in bestimmten Geweben (Li *et al.*, 1996), Zelldifferenzierung (Paralkar *et al.*, 1992), Chemotaxis (Fiedler *et al.*, 2002) und Apoptose (Ganan *et al.*, 1996) beteiligt.

Nicht nur im adulten Tier, sondern gerade in verschiedenen, teils sehr frühen Stadien, steuern Mitglieder der TGF- β -Familie grundsätzliche Aufgaben im sich ausdifferenzierenden Lebewesen. Der Mechanismus ist dabei vermutlich auf einen einzelnen mehrzelligen Vorgängerorganismus zurückzuführen. Dieser wurde in verschiedenen evolutionären Nachfolgern adaptiert und zum Teil für analoge Prozesse, aber auch für sehr spezielle artspezifische Entwicklungen angepasst. So wirkt BMP-4 im Wirbeltier ventralisierend, sein Ortholog Decapentaplegic (Dpp) in der Taufliege *Drosophila melanogaster* aber dorsalisierend (Jones *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1992b). Dieser Unterschied liegt jedoch nicht an den unterschiedlichen Signalen: Ersetzt man in Eiern der Taufliege die kodierende Sequenz von dDpp durch das Gen für xBMP-4, so übernimmt es den dorsalisierenden Effekt von dDpp und es entwickeln sich normale Fliegen (Padgett *et al.*, 1993). Umgekehrt induziert die Injektion von dDpp mRNA in jede Blastomere des 8-zelligen Froschembryos die Bildung von ausschließlich ventralem Mesodermgewebe (Holley *et al.*, 1995). Der Wirkmechanismus ist über die diverse Entwicklung zwischen Gliedertieren und Wirbeltieren gleich geblieben. Der Unterschied im Signal liegt in der Begrifflichkeit. Der Entwicklungsbiologe definiert als ventral diejenige Seite, auf der der Mund liegt. Jener ist über Jahrmillionen der Entwicklung beim Wirbeltier weg vom zentralen Nervenlängsstrang in der Wirbelsäule gewandert, welcher für die Achsenumkehrung und die vermeintliche Signalumkehrung sorgt (Arendt & Nubler-Jung, 1994).

Bereits in frühen Embryonalstadien sind Vertreter der TGF- β -Superfamilie an entscheidenden Prozessen der Entwicklung beteiligt. Maternale mRNA ebenso wie das inaktive Proprotein von xVg-1 (engl.: *Vegetalising Factor 1* = vegetalisierender Faktor 1), einem Mitglied der TGF- β -Superfamilie aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis*, ist in der vegetativen Eiregion zu finden (Weeks & Melton, 1987). Die Spaltung und Aktivierung des inaktiven Proproteins erfolgt erst nach der Rindenrotation, die die benötigten Proteasen

zuführt, woraufhin der Spaltung folgend die Induktion dorsalen Mesoderms stattfindet (Thomas & Moos, 2007). Durch diese initiale räumliche Trennung kann die zeitabhängige Entwicklungsfolge gesteuert werden, obwohl in diesem Stadium noch kaum eigene Proteinsynthese im Ei stattfindet. Versuche, die mRNA von xVg-1 in die animale Polkappe zu injizieren, zeigten keinen Erfolg (Tannahill & Melton, 1989). Die Gabe von rekombinantem reifen xVg-1 in die isolierte animale Polkappe resultiert ebenso in einem Embryoniden mit vollständiger Achsenorganisation wie die Gabe von Hybrid-mRNA aus der Sequenz des reifen Teils von xVg-1 fusioniert mit einem Proproteinanteil eines intrinsischem Gewebeproteins (Thomsen & Melton, 1993; Kessler & Melton, 1995). Wie bei vielen biologischen Vorgängen bestimmt ein Konzentrationsgradient die verschiedenen Prozesse. Hohe Konzentrationen des xVg-1 Orthologs cVg-1 induzieren im Hühnerembryo dorsales Mesoderm, während niedrigere Konzentrationen das hierzu abgewandte ventrale Mesoderm bilden (Seleiro *et al.*, 1996). Eine ähnliche Wirkung, nur zu einem späteren Zeitpunkt, erzielt ausschließlich im Ei gebildetes cActivin in den Polkappen. Hohe Konzentrationen führen zur Ausbildung von Chorda und Muskelgewebe, niedrigere Konzentrationen hingegen ausschließlich zur Muskelbildung im Mesoderm. (Smith, 1987; Green *et al.*, 1992; Piepenburg *et al.*, 2004) Angrenzendes epidermales Ektoderm sondert während der Bildung des Neuralrohrs cBMP-4 und -7 in die Neuralplatte ab, was diesen Bereich dorsalisiert (Liem *et al.*, 1995). Nach dem Schluss des Neuralrohrs wird cDorsalin-1 exprimiert, welches selbst einen Signalgradienten ausbildet und an der dorsalen Musterbildung beteiligt ist (Basler *et al.*, 1993). Ein weiterer Gradient des cVg-1-Homologs xDerrière ist mitunter an der Mesoderm- und Musterbildung der anterior-posterioren Achse im früheren Midblastulastadium (4096 Zellen) des Froschembryos, ab Beginn der zygotischen Transkription, beteiligt (Sun *et al.*, 1999a). cBMP-4 wirkt, ebenso wie dessen humanes Ortholog hBMP-4 in den Fingerzwischenräumen apoptotisch. Bei Wasservögeln ist dessen Expression weniger stark, so dass hier Schwimnhäute zurückbleiben. (Zou & Niswander, 1996)

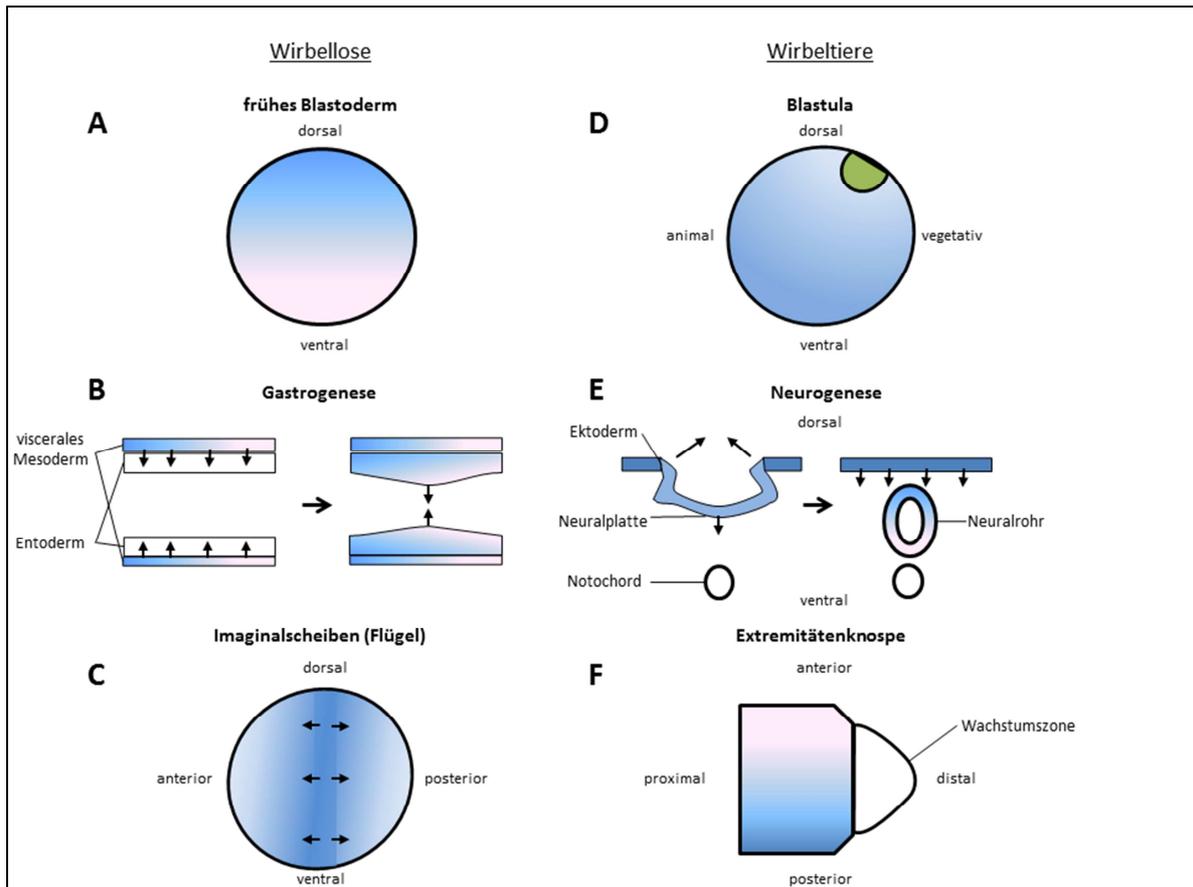


ABBILDUNG 2: EINFLUSS VON TGF-B-PROTEINEN AUF DIE ENTWICKLUNG VERSCHIEDENER GEWEBE IN WIRBELLOSEN UND WIRBELTIEREN

Das Schema zeigt verschiedene schematisierte Gewebe aus Wirbellosen (A-C) und Wirbeltieren (D-F) zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. **A** Abgebildet ist das frühe Blastoderm. Der Farbverlauf symbolisiert den Verlauf des dDPP-Gradienten, welcher die Dorsoventralachse definiert. Zu einem späteren Zeitpunkt wird die versiegende Expression von dDPP redundant durch den BMP-Faktor dScrew ersetzt, welches abgeschwächt die gleichen Effekte erzielt. Der Ausfall eines der beiden Faktoren kann vom jeweils anderen kompensiert werden. In **Abbildung B** ist die Gaströgenese gezeigt. Die Transkription von *dpp* wird im einschichtigen viszeralem Mesoderm von dUltrathorax aktiviert. dDpp wird sekretiert und aktiviert im Entoderm *labial*, was zur Einschnürung des Darms führt. **C** Distale Draufsicht einer Flügelimaginalseibe. Im posterioren Kompartiment wird *hedgehog* exprimiert. Trifft dHedgehog auf Zellen der anterioren Hälfte, so wird dort die Expression von dDpp induziert, welches in beide Kompartimente sezerniert wird und so zur Musterbildung der Imaginalseibe beiträgt. **D** Schematisierte Ansicht einer schematisierten Blastula von *Xenopus laevis*. xBMP-4 wird in der gesamten Blastula exprimiert. Der Spemann-Organisator, hier in grün dargestellt, sezerniert die BMP-Antagonisten xChordin und xNoggin, welche die ventralisierende Wirkung von xBMP-4 unterbinden wodurch die Dorsoventralachse definiert wird. **E** Schematisiert dargestellt ist die Neurogenese im Huhn. Das einschichtige Ektoderm bildet cBMP-4 und cBMP-7. Ektoderm, das unter dem Einfluss von BMP-4 und BMP-7 steht, bildet Epidermiszellen. Das Ektoderm der künftigen Neuralplatte ist den BMP-Antagonisten cChordin und cNoggin ausgesetzt, die vom die Neuralleiste entlang wandernden Spemann-Organisator gebildet und abgegeben werden und die Wirkung von cBMP-4 und cBMP-7 negieren. Dadurch bildet sich Neuroektoderm, welches sich zum Neuralrohr einstülpt. Auf das Neuralrohr wirken zwei Proteingradienten aus unterschiedlichen benachbarten Geweben: Das dem Neuralrohr aufliegende Ektoderm bildet weiterhin cBMP-4 und cBMP-7, welche auf der dorsalen Seite in das Neuroektoderm einwandern und nicht mehr von Faktoren des weiter gewanderten Organisators inhibiert werden. Aus dem ventral liegenden Notochord diffundiert cSonic Hedgehog durch die Bodenplatte des Neuralrohrs in selbiges. Die beiden Gradienten liefern eindeutige Positionssignale zur Differenzierung unterschiedlicher Neuronentypen im Neuroektoderm. **F** In der abgebildeten Extremitätenknospe zeigt der Farbverlauf außerhalb der Wachstumszone den Gradienten von mBMP-4, der wichtige Positionsinformationen zur korrekten Entwicklung der zu formenden Extremität liefert.

In der Taufliege baut ins Zytoplasma des Mesoderms im synzytialen Blastoderm entlassenes Zellkern-permeables dDorsal einen von ventral nach dorsal gerichteten Gradienten auf, bevor die Zellmembranen eingezogen werden und eine Signalweiterleitung via Diffusion im Zytoplasma nicht mehr möglich ist (Roth *et al.*, 1989). Hier wird auf eine Signalübertragung mittels ins Zytosol sezerniertem dDpp, dem Homolog von hBMP-2/-4 in *Drosophila*, gewechselt, welche eine Signalweitergabe über membranständige Rezeptoren bewirken kann (Ray *et al.*, 1991; Wharton *et al.*, 1993). dDorsal reprimiert die dDpp-Expression konzentrationsabhängig und verhindert seine dorsalisierende Wirkung (Padgett *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1993). Gebildet im viszeralem Mesoderm, reguliert dDpp die Darmentwicklung durch Diffusion ins benachbarte Entoderm (Immergluck *et al.*, 1990). In der weiteren Entwicklung wirkt dDpp als Morphogen an der Ausbildung von Positionssignalen in den Imaginalscheiben der Beine (Campbell *et al.*, 1993), der Augen (Heberlein *et al.*, 1993), des Gehirns (Kaphingst & Kunes, 1994) und der Flügel (Lecuit *et al.*, 1996) mit.

Mensch	Taufliege
BMP-2	Decapentaplegic
BMP-4	Decapentaplegic
BMP-5	Glass bottom boat 1/60A
BMP-6	Glass bottom boat 2
BMP-7	Screw
BMP-8	Glass bottom boat 3
Aktivin	Alp34B/Dawdle
GDF-8	Myoglianin
---	Maverick

TABELLE 4 TGF- β -ORTHOLOGE IN MENSCH UND TAUFLIEGE

Weitere Orthologe bekannter humaner TGF- β -Familienmitglieder in der Taufliege sind dGlass bottom boat-1 (d60A)/-2/-3 (Doctor *et al.*, 1992; Wharton *et al.*, 1999; Wotton *et al.*, 2013), dScrew (Arora *et al.*, 1994), dMyoglianin (Lo & Frasch, 1999), dActivin-like-protein 23B (dAlp23B)/dDawdle (Parker *et al.*, 2006) und das bislang keinem Ortholog zuzuordnende dMaverick (Nguyen *et al.*, 2000). Orthologe für *hbmp-9* und *hbmp-10* wurden zwar nicht im Genom der Taufliege, wohl aber im Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* und der Honigbiene *Apis mellifera* gefunden (Van der Zee *et al.*, 2008). (s. Tabelle 4)

Im Säugetier sind TGF- β -Proteine ebenfalls und zu vergleichbaren Entwicklungsstadien an der Embryogenese beteiligt. In der Neuralleiste der Ratte induziert rBMP-2 die Differenzierung von Neuronen, ebenso der Lunge und des Herzens. rTGF- β -1 induziert an

gleicher Stelle die Bildung glatter Muskulatur (Bitgood & McMahon, 1995; Shah *et al.*, 1996). Die Expressionsmuster von *r-bmp-2*, *-4* und *-6* überlappen weitestgehend. So können sie im mesenchymalen Nachbarbereich von sich zu Haaren, Schnurrhaaren, Schleimhäuten, Zähnen, Darm, Harnblase und der Harnröhre umbildendem Epithel nachgewiesen werden (Bitgood & McMahon, 1995). mBMP-7 induziert die Bildung der Nephronen im Nierenmesenchym (Woolf & Cale, 1997). Aus Versuchen mit Gendelektionsmäusen werden weitere BMP-abhängige Beteiligungen an Entwicklungsprozessen sichtbar (s. Tabelle 5).

Gen	Viabilität	fertil	Phänotyp	Quelle
<i>bmp-2</i>	pränatal letal	-	- Mißbildungen in Amnion und Chorion - Fehlentwicklung des Herzens	Zhang & Bradley (1996)
<i>bmp-3</i>	wildtypisch	ja	- gesteigerte Knochendichte in Netzknochen	Daluiski <i>et al.</i> (2001)
<i>bmp-4</i>	pränatal letal	-	- Fehlentwicklung im Mesoderm und fehlerhafte dorso-ventrale Positionierung	Winnier <i>et al.</i> (1995)
<i>bmp-5</i>	wildtypisch	ja	- Fehlbildungen am Schädelknochen und im axialen Skelett - Gewebefehlbildungen in Lunge, Leber, Harnblase, Darm und Uterus	Kingsley <i>et al.</i> (1992)
<i>bmp-6</i>	wildtypisch	ja	- Reduzierte Verknöcherung des Brustbeins	Solloway <i>et al.</i> (1998)
<i>bmp-7/op-1</i>	postnatal letal (1d)	-	- Verdoppelung des Innenfingers am Hinterlauf - verringerter Habitus - fehlerhafte Augenentwicklung - verkleinerte Nieren mit kaum Nephronen	Jena <i>et al.</i> (1997)
<i>bmp-8b</i>	wildtypisch	nein	- fehlerhafte Spermatogenese	Ying <i>et al.</i> (2000)
<i>bmp-9</i>	wildtypisch	ja	- kein auffälliger Phänotyp	Ricard <i>et al.</i> (2012)
<i>bmp-10/gdf-2</i>	pränatal letal	-	- fehlerhafte Herzentwicklung - Halbierte Herzschlagfrequenz	Chen <i>et al.</i> (2004)
<i>myostatin/gdf-8/bmp-11</i>	wildtypisch	ja	- Massenverdoppelung der gestreiften Muskulatur durch Hyperplasie	McPherron <i>et al.</i> (1997)
<i>gdf-7/bmp-12</i>	wildtypisch	ja (w)/nein (m)	- fehlerentwickelte Samenblase	Settle <i>et al.</i> (2001)
<i>gdf-6/bmp-13</i>	wildtypisch	ja	- Fehlentwicklung in Gelenken, Knorpel und Bandapparat der Hand- und Fußgelenke, im Mittelohr und der Nähte des Schädels	Settle <i>et al.</i> (2003)
<i>gdf-5/bmp-14</i>	wildtypisch	ja	- kurze Extremitäten - verformte Knochen und Gelenke im Brustbereich - verringerte Anzahl an Fingergliedern - veränderte Sehnen	Mikic <i>et al.</i> (2001)
<i>gdf-9</i>	wildtypisch	nein (w)/ ja (m)	- fehlerentwickeltes Ovar und Meiosedefekte bei der Oogenese	Dong <i>et al.</i> (1996)
<i>gdf-9b/bmp-15</i>	wildtypisch	ja	- verringerte Fertilität (27%) der Weibchen durch geringe Fehlentwicklungen im Ovar	Yan <i>et al.</i> (2001)
<i>mis/amh</i>	wildtypisch	ja (w)/nein (m)	-Pseudohermaphrodite Männchen	Behringer <i>et al.</i> (1994)

TABELLE 5: ÜBERSICHT ÜBER EFFEKTE BEKANTER MURINER GENDELEKTIONS MUTANTEN

Wie gezeigt wurde ist die Regulation verschiedener Entwicklungen und Musterbildungen während der Embryogenese also aus einem gemeinsamen Ursprung entstanden, über viele unterschiedliche Arten des Tierreichs konserviert und wurde auch für spezielle Bedürfnisse weiterentwickelt. Versuche, entsprechende Orthologe in Gewebe oder in Embryonen einer anderen Art zu transferieren, können induzierte Fehlfunktionen korrigieren und/oder die Funktion des im Wildtyp zuständigen Genprodukts vollständig abbilden (Padgett *et al.*, 1993; Ransick & Davidson, 1993; Sampath *et al.*, 1993).

1.3 DIE REZEPTOREN DER TGF-B-PROTEINSUPERFAMILIE

Die Signalübertragung für sezernierte Liganden aus dem Extrazellulärraum ins Zellinnere, wo die Transkription responsiver Gene erfolgt, findet bei allen Liganden der TGF- β -Proteinfamilie über membranständige Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren statt, die auf der Basis charakteristischer Merkmale in Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren unterteilt werden. Eine Ausnahme bilden hier die zum Teil GPI-verankerten (Glykophosphatidylinositol) GDNF/Neurturin-Rezeptoren (Klein *et al.*, 1997; Sanicola *et al.*, 1997). Alle sonstigen TGF- β -Rezeptoren bestehen alle aus einem kurzen Extrazellulärteil, einem einzelnen, die Membran einfach durchspannenden Transmembranteil (*single span transmembrane domain*) und einem charakteristischen Kinase-beinhaltenen Intrazellulärteil. Die Einteilung der bislang zwölf bekannten Rezeptoren erfolgt ob ihres Aufbaus, ihrer Bindungsstelle an den Liganden sowie ihres Zeitpunkts der Rekrutierung in den heterohexameren signalisierenden Komplex. Dieser besteht aus einem dimerisierten Liganden und je zwei Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu den Activin-bindenden Typ-II-Rezeptoren (*activine-receptor-like-kinase*) werden die aktuell sieben bekannten Typ-I-Rezeptoren auch mit Alk-1 bis Alk-7 bezeichnet (ten Dijke *et al.*, 1993). Alternative Bezeichnungen sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Rezeptor	andere Bezeichnungen	Quelle
Alk-1	ACVRL-1, TSR-I	Attisano <i>et al.</i> (1993)
Alk-2	ACVRLK-2, ACTR-I	Attisano <i>et al.</i> (1993)
Alk-3	BMPR-IA, ACVRLK-3	ten Dijke <i>et al.</i> (1993)
Alk-4	ACVR-IB, ActR-IB	ten Dijke <i>et al.</i> (1993)
Alk-5	ACVRLK-4, TGFBR-I, TGF β R-I	Franzén <i>et al.</i> (1993)
Alk-6	BMPR-IB, BR1B	ten Dijke <i>et al.</i> (1994)
Alk-7	ActR-IC, ACVR-IC	Tsuchida <i>et al.</i> (1996)

TABELLE 6: TYP-I-REZEPTOREN DER TGF-B- SUPERFAMILIE

Die verbleibenden fünf Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren werden der Untergruppe der TGF- β -Typ-II-Rezeptoren zugeordnet. Dabei handelt es sich um den als ersten Vertreter entdeckten ActR-II (Mathews & Vale, 1991) sowie ActR-IIB (Attisano *et al.*, 1992), TGF β R-II (Lin *et al.*, 1992), AMHR-II (Baarends *et al.*, 1994) und BMPR-II (Kawabata *et al.*, 1995).

Rezeptor	Domäne	X-Ray/NMR	Auflösung [Å]	komplexiert mit	PDB-ID	Artikel (sofern vorhanden)
Alk-1	ECD	NMR		---	2LCR	Mahlawat <i>et al.</i> (2012)
	ECD	X-Ray	3,36	BMP-9/ActR-IIB	4FAO	Townson <i>et al.</i> (2012)
	ICD	X-Ray	2,65	LDN-193189	3MYO	---
Alk-2	ECD	X-Ray	2,35	FKBP12, Dorsomorphin	3H9R	Chaikuad <i>et al.</i> (2012)
	ICD	X-Ray	2,56	LDN-213844	4BGG	---
	ICD	X-Ray	2,42	K00135	4DYM	---
	ICD	X-Ray	2,15	2-Aminopyridin-Inhibitor	3MTF	---
	ICD	X-Ray	2,00	K00507	3OOM	---
	ICD	X-Ray	1,82	LDN-193189	3Q4U	Sanvitale <i>et al.</i> (2013)
Alk-3	ECD	X-Ray	1,85	BMP-2/ActR-IIB	2H62	Weber <i>et al.</i> (2007)
	ECD	NMR		---	2K3G	Klages <i>et al.</i> (2008)
	ECD	X-Ray	2,28	GDF-5	3QB4	Nickel <i>et al.</i> (2011)
Alk-5	ECD	NMR		---	2L5S	Zuniga <i>et al.</i> (2011)
	ICD	X-Ray	1,70	GW855857	3HMM	Gellibert <i>et al.</i> (2009)
Alk-6	ECD	X-Ray	2,10	GDF-5	3EVS	Kotzsch <i>et al.</i> (2009)
ActR-II	ECD	X-Ray	3,30	BMP-7	1LX5	Greenwald <i>et al.</i> (2003)
ActR-IIB	ECD	X-Ray	1,85	BR1A/BMP-2	2H62	Weber <i>et al.</i> (2007)
	ECD	X-Ray	2,30	Aktivin	1S4Y	Greenwald <i>et al.</i> (2004)
	ICD	X-Ray	2,00	Adenin	2QLU	Han <i>et al.</i> (2007)
TGFβR-II	ECD	NMR		---	1PLO	Deep <i>et al.</i> (2003)
	ECD	X-Ray	3,00	TGFβ-III/TGFβR-I	2PJY	Groppe <i>et al.</i> (2008)
	ECD	X-Ray	2,99	TGFβ-I/TGFβR-I	3KFD	Radaev <i>et al.</i> (2010)
BR-II	ECD	X-Ray	1,45	---	2HLQ	Mace <i>et al.</i> (2006)
	ECD	X-Ray	1,20	---	2HLR	Mace <i>et al.</i> (2006)

TABELLE 7: ÜBERSICHT ÜBER 3D-STRUKTURDATEN FÜR REZEPTOREN DER TGF-B-SUPERFAMILIE (ECD: EXTRAZELLULARDOMÄNE, ICD: INTRAZELLULÄRE DOMÄNE, IN DER REGEL NUR DIE KINASEDOMÄNE)

Bislang wurden die Raumstrukturen zahlreicher intra- wie extrazellulärer TGF-β-Rezeptordomänen im ungebundenen oder im Liganden-gebundenen Zustand aufgeklärt (s. Tabelle 7). Dabei bestätigt ein Vergleich der 3D-Strukturen der extrazellulären Domänen eine bislang nur anhand von Sequenzvergleichen von Greenwald und Kollegen aufgestellte Theorie, wonach alle Rezeptoren in ihrem starren, von fünf Cystin-Brücken und der konservierten Drei-Finger-Toxin-Faltung fixierten Kern sehr ähnlich sind (Greenwald *et al.*, 1999). Dieses Tertiärstrukturmotiv wurde ursprünglich in Ionenkanal-blockierenden Kardiotoxinen entdeckt (Rees & Bilwes, 1993; Bilwes *et al.*, 1994). Ihre zum Teil überlappende Ligandenspezifität erlangen die Typ-I-Rezeptoren vorwiegend durch ihre in Anordnung und Länge sehr diversifizierten Schleifenregionen.

Typ-I-Rezeptoren bestehen aus einem 92 (Alk-7) bis 129 (Alk-3) Aminosäuren langen Liganden-bindenden Extrazellulärteil (ECD), dessen Kern aus den charakteristischen hoch-konservierten zehn intramolekular verbrückten Cysteinen besteht. Die extrazellulären Domänen haben untereinander außerhalb des Disulfidverbrückungsmusters jedoch nur eine geringe Sequenzidentität. Die Liganden binden den Typ-I-Rezeptor mittels des sogenannten

wrist-Epitops (Handballenepitop, s. Abbildung 1B). Die Transmembrandomäne (TM), welche die Membran durchspannt, besteht aus 21 (Alk-7) bis 24 (Alk-3) Aminosäuren. Im Zellinneren schließt daran die 354 (Alk-6) bis 363 (Alk-1) Aminosäuren lange Intrazellulärdomäne (ICD) an. Diese kann in drei Bereiche unterteilt werden: (1) an eine variable Linkerregion schließt die für Typ-I-Rezeptoren typische, 30 Aminosäuren lange, (2) GS-Box an, die ein konserviertes Motiv (TTSGSGSGLP) beinhaltet und die Phosphorylierungsstellen für die Kinase der Typ-II-Rezeptoren stellt. (Wrana *et al.*, 1994b) (s. Abbildung 3B) Diese Phosphorylierungen der GS-Box des Typ-I-Rezeptors aktivieren die an dieses Motiv C-terminal anschließende bi-lobale (3) Kinase (Wrana *et al.*, 1994a; Huse *et al.*, 1999). Die Deletion der GS-Box oder deren etwa 40 Aminosäurereste lange und auf Sequenzebene sehr variable Verbindung zur Transmembrandomäne inhibiert die Signaltransduktion, wohingegen die Mutation einzelner Aminosäuren die Kinaseaktivität je nach Position erhöhen oder ebenfalls vollständig zum Erliegen bringen können: der Austausch der Reste des zentralen Motivs T185 SGSGSG der GS-Box von Alk-5 zu VVA(A)(A) inhibiert die TGF- β -I-induzierte Signaltransduktion ebenso wie T200V oder T204V vollständig, während VV oder AA ebenso wie der Einzelaustausch S189A diese nur leicht verringern. Die Mutationen S187A und S191A steigern nach Zugabe von TGF- β -I hingegen das weitergegebene Signal und die Mutation T204D führt zu einem Liganden-unabhängigen konstitutiv aktiven Alk-5. (Feng *et al.*, 1995; Wieser *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996).

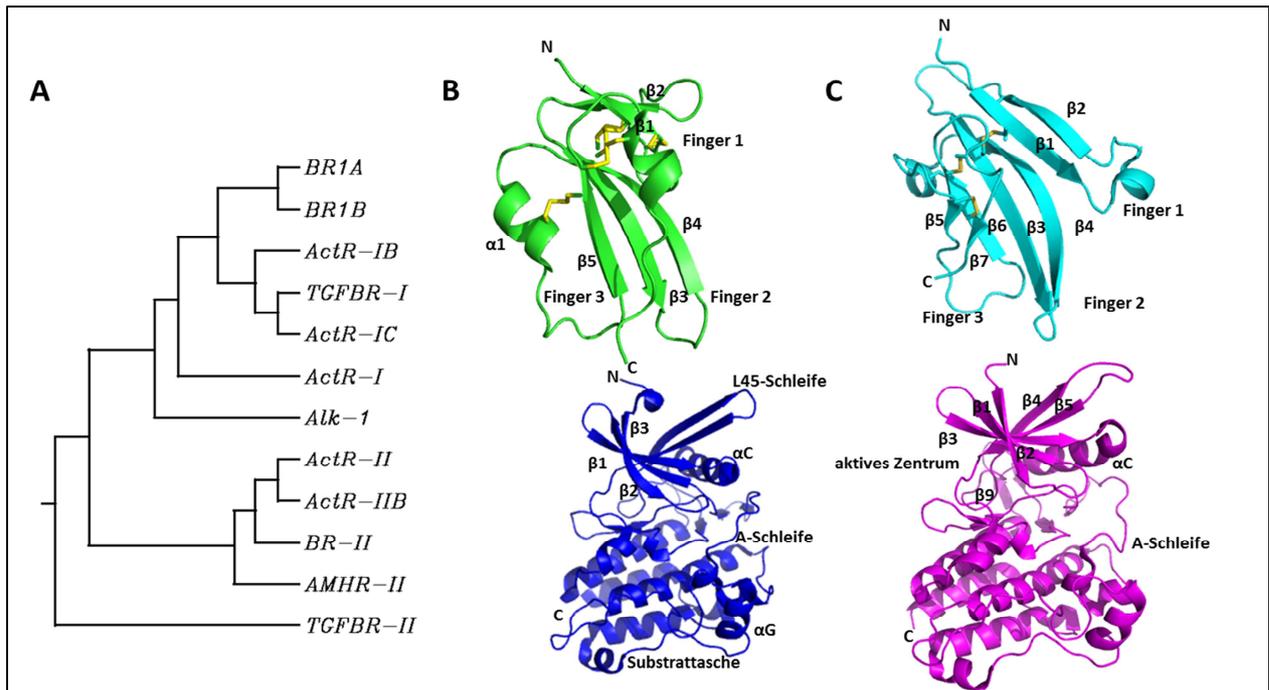


ABBILDUNG 3: 3D-STRUKTUREN DER EXTRA- UND INTRAZELLULARDOMÄNEN VON TYP-I- UND TYP-II-REZEPTOREN DER TGF- β -SUPERFAMILIE

A Phylogenetische Analyse für die Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren basierend auf einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der extrazellulären Domänen (erstellt mit dem Programm ClustalW) **B** Die Strukturen für BR1A-ECD (grün) und ActR-I-ICD (dunkelblau) in der Bänderdarstellung als typische Vertreter der Typ-I-Rezeptoren. Die Nummerierung der Sekundärstrukturelemente ist der Graphik zu entnehmen. Die fünf charakteristischen Disulfidbrücken sind in Gelb dargestellt. In der Abbildung der Intrazellulardomäne sind die für Typ-I-Rezeptoren typische Aktivierungsschleife (A-Schleife), die L45-Schleife und die Substratbindetasche der Kinasedomäne gesondert hervorgehoben. **C** Die Bänderdarstellung der 3D-Strukturen von ActR-II-B-ECD (hellblau) und ActR-IIB-ICD (Magenta) als typische Vertreter der Typ-II-Rezeptoren. Die Bezeichnung der Sekundärstrukturbereiche ist angegeben. Zu sehen sind die charakteristischen drei Finger der ECD sowie die fünf Cystinbrücken in Gelb. Das aktive Zentrum der konstitutiv aktiven intrazellulären Kinase ist hervorgehoben. Alle Bänderdarstellungen wurden mit PyMol anhand von veröffentlichten PDB-Dateien erstellt (PDB-IDs: 2H62 (BR1A-ECD und ActR-IIB-ECD) (Weber *et al.*, 2007), 3Q4U (ActR-I-ICD) und 2QLU (ActR-IIB-ICD)(Han *et al.*, 2007)).

Die TGF- β -Typ-II-Rezeptoren sind in ihrem Grundaufbau den Typ-I-Rezeptoren sehr ähnlich. Die 116 (ActR-II) bis 144 (TGF- β -R-II) Aminosäuren lange Extrazellulardomäne weist ebenfalls das Drei-Finger-Toxin-Motiv und zehn Cysteine als Architekturgrundmotiv auf. Eine Ausnahme bildet hier mit zwölf Cysteinen TGF- β -R-II, der den geringsten Verwandtschaftsgrad zu allen anderen Rezeptorktodomänen aufweist (s. Abbildung 3A). So bindet dieser als einziger Vertreter der Typ-II-Rezeptoren auch nicht wie üblich am sogenannten *knuckle*-Epitop (Fingergelenk), sondern an den Fingerspitzen des Liganden (Hart *et al.*, 2002). C-terminal an die Transmembrandomäne anschließend folgt die bi-lobale Intrazellulardomäne mit der konstitutiv aktiven Serin-/Threonin-Kinase. Diese ist in zwei Unterdomänen unterteilt: der kleinere N-terminale Bereich besteht aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt und einer kurzen α -Helix. Verbunden wird diese mit

der größeren, α -helikalen Region durch eine Gelenkregion, die auch die ATP-Bindestelle formt. Die Aktivierungsschleife unterscheidet sich wesentlich von der der Typ-I-Rezeptoren. Eine im Vergleich zu Typ-I-Rezeptoren fehlende Salzbrücke Lys217-Glu230 belässt die Aktivierungsschleife der Typ-II-Kinase permanent in einem Konformationszustand, der mit dem der aktivierten Schleife der Typ-I-Rezeptoren vergleichbar ist (s. Abbildung 3C). Möglicherweise wird hierdurch die dauerhafte Aktivität der Kinase garantiert. (Han *et al.*, 2007)

1.4 DER MECHANISMUS DER SIGNALTRANSDUKTION IN DER TGF- β -PROTEINSUPERFAMILIE

In Abwesenheit des zugehörigen Liganden im Extrazellularraum befinden sich die BMP-Typ-I-Rezeptoren BR1A und BR1B entweder im monomeren (70%) oder im homodimeren (30%) Zustand. Der spezifische BMP-Typ-II-Rezeptor BR-II ist dagegen ausschließlich als Monomer auf der Zelloberfläche zu finden. (Gilboa *et al.*, 2000) Die TGF- β -Rezeptoren TGF β R-I und -II kommen hingegen nur im homodimerisierten Zustand auf der Zelloberfläche vor (Henis *et al.*, 1994; Gilboa *et al.*, 1998). Desweiteren wurden heterooligomerisierte, sogenannte PFCs (*pre-formed complexes*), bestehend aus einer variablen Anzahl Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, in verschiedenen Zelltypen gefunden und nachgewiesen. (Ventura *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1995; Wells *et al.*, 1999) In der Häufigkeit ihres Auftretens unterscheiden sich diese Komplexe abhängig von den beteiligten Rezeptoren: so ist die prozentuale Beteiligung von Rezeptoren an PFCs im Vergleich zur Gesamtmenge auf der Zelle bei Rezeptoren, die der BMP und GDF-vermittelten Signalweiterleitung zugeschrieben werden (Typ-I: BR1A und BR1B; Typ-II: BR-II), höher, als dies bei Rezeptoren der TGF- β -I-, -II- und -III-vermittelten Signaltransduktion (Typ-I: TGFBR-I; Typ-II: TGFBR-II) zu beobachten ist (Gilboa *et al.*, 2000). In beiden Fällen kann die Komplexierungsrate durch Zugabe des entsprechenden Liganden gesteigert werden. Untersuchungen bezüglich der Rolle der PFCs *in vivo* zeigen eine Aktivierung des alternativen p38-MAPK-Signalwegs sowie eine flexiblere Regulation und Differenzierung der Signalweiterleitung über den heterohexameren Liganden-gebundenen Komplex (Hassel *et al.*, 2003).

Finden sich Ligand, Typ-I- sowie Typ-II-Rezeptoren, an der Membran zu einem wahrscheinlich heterohexamer aufgebauten Komplex zusammen, so beginnt mit dem Liganden-induzierten Kontakt der intrazellulären Bereiche die Signalübertragung vom Zelläußeren ins Cytoplasma (Wrana *et al.*, 1994a; Yamashita *et al.*, 1994). Die konstitutiv

aktive Kinase des Typ-II-Rezeptors transphosphoryliert hierbei Serin-/Threonin-Reste in der konservierten GS-Box des jeweiligen Typ-I-Rezeptors (Franzen *et al.*, 1995). Dadurch ergeben sich konformationelle Umlagerungen, die sich auf die sogenannte L45-Schleife des Typ-I-Rezeptors (s. Abbildung 3B) auswirken und die Zugänglichkeit der Phosphorylierung zu den R-SMADs (*receptor-regulated small mothers against decapentaplegic*) bestimmen (Feng & Derynck, 1997; Lo *et al.*, 1998). Es existieren zwei unterschiedliche Gruppen von R-SMADs, die abhängig von der Zugänglichkeit ihrer sogenannten L3-Schleife (s. Abbildung 4B) für den im Komplex beteiligten Typ-I-Rezeptor selektiert werden. SMAD-1/-5/-8 werden von den für die DVR-Gruppe rekrutierten Alk-1/-2/-3 und -6 angesteuert. SMAD-2/-3 werden von der Gruppe der Activine/Inhibine und Nodal sowie TGF- β über Alk-4/-5/-7 phosphoryliert. (Liu *et al.*, 1996; Yingling *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Kretschmar *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997) Ein Austausch der L45-Schleife zwischen den beiden Gruppen resultiert in der Rekrutierung der gegenteiligen SMAD-Gruppe (Armes *et al.*, 1999).

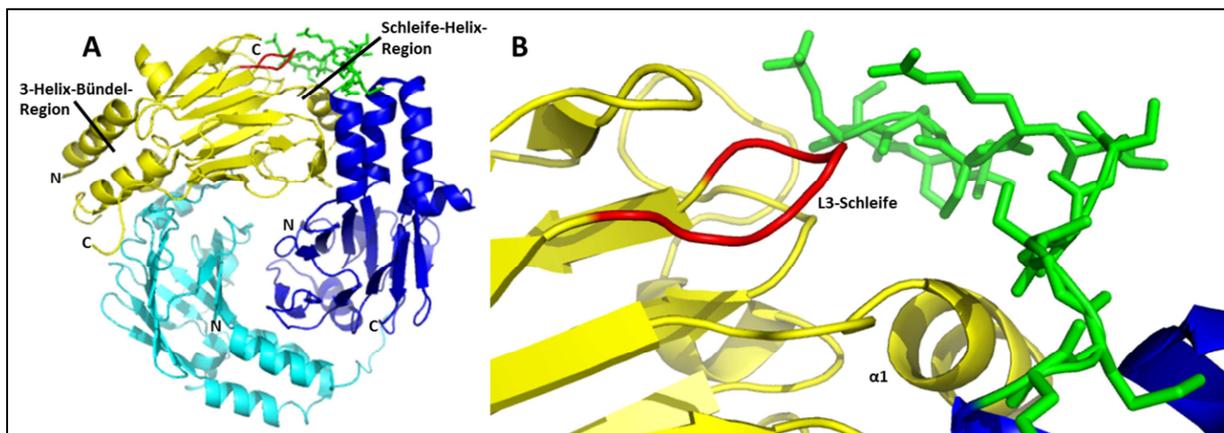


ABBILDUNG 4: KRISTALLSTRUKTUR DES HETEROTRIMEREN KOMPLEXES AUS SMAD2 UND SMAD4

A Bänderstruktur der C-terminalen Linker- und MH-2-Domänen von SMAD-2 (hell- und dunkelblau) sowie der von SMAD-4 (gelb). Abgebildet ist der heterotrimeren Komplex aus zwei SMAD-2- und einem SMAD-4-Molekül. Das antiparallele zentrale β -Faltblatt wird C-terminal von der sogenannten Schleife-Helix-Region bestehend aus drei Schleifen und der α 1-Helix flankiert. N-terminal der Faltblätter liegt die drei-Helix-Bündel-Schleifenregion, an die, verbunden über eine Schleifenregion, die in dieser Struktur nicht gezeigte DNA-bindende MH-1-Domäne anschließt. Die Beschriftungen beziehen sich auf die in Gelb dargestellte SMAD-4-Struktur. **B** Vergrößerte Darstellung der Schleife-Helix-Region von SMAD-4 in Gelb und der das phospho-Serin beinhaltende C-terminale Bereich der Schleifenregion von SMAD-2 aus der Übersichtsdarstellung aus Abbildung **A**. Die das SSXS-Motiv beinhaltenden Seitenketten der Schleifenregion sind grün eingefärbt und als *ball-and-stick*-Modell dargestellt. In rot ist die L3-Schleife von SMAD-4 gezeigt. Beide Abbildungen wurden mit PyMol anhand der veröffentlichten PDB-Datei mit der PDB-ID 1U7F erstellt (Chacko *et al.*, 2004).

Ein am konservierten SSXS-Motiv, das N-terminal der MH-2-Domäne (*Mad homology domain* 2) liegt, phosphoryliertes Homodimer aus zwei R-SMAD-Proteinen bindet nun entweder vor oder nach Translokation in den Nukleus über die MH-2-Domäne an SMAD-4, ein Co-SMAD

(*common-mediator-SMAD*) (Wu *et al.*, 2001; Chacko *et al.*, 2004). Weiterhin weisen R- und Co-SMADs typischerweise noch eine Prolin-reichen Schleifenregion und einer MH-1-Domäne auf (s. Abbildung 4A). Der heterotrimere Komplex aus R- und Co-SMADs transloziert in den Nukleus, wo er die Transkription BMP- oder Activin/TGF- β -responsiver Gene alleine oder mit Co-Aktivatoren gemeinsam reguliert. (Lagna *et al.*, 1996) Da jedoch die Affinität von isolierten SMAD-Proteinen zu SMAD-responsiven DNA-Elementen über die MH-1-Domäne sehr niedrig ist, findet zumeist eine Interaktion und nachfolgende Aktivierung mit einem hochaffinen DNA-Bindeprotein statt (Shi *et al.*, 1998). (s. Abbildung 5A) Die MH-1-Domäne hat zum einen die Fähigkeit, über eine β -Schleife DNA zu binden und unterbindet zum anderen die MH-2-vermittelte Trimerisierung (Kim *et al.*, 1997). Wird das SXSS-Motiv eines SMADs phosphoryliert, so erlischt diese inhibierende Funktion (Macias-Silva *et al.*, 1996). Wird die MH-1-Domäne allerdings durch eine einfache DNA-Bindedomäne ersetzt, so bleibt das SMAD-Protein unabhängig von der Phosphorylierung permanent aktiv (Liu *et al.*, 1996).

Neben der gängigen SMAD-unterstützten Signalweiterleitung können weitere, SMAD-unabhängige, Signalwege aktiviert werden. Bislang konnte eine alternative Signaltransduktion von TGF- β -Proteinen über PAK2, (*p21-activated-kinase*), Ras und rho-like GTPase, wodurch MAP-Kinasen (*Mitogen-activated-protein*) wie p38, p44, ERK-1 und -2 (*extracellular-regulated kinase*) und SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase*) aktiviert werden, nachgewiesen werden (Mulder & Morris, 1992; Hartsough & Mulder, 1995; Hartsough *et al.*, 1996; Atfi *et al.*, 1997; Frey & Mulder, 1997; Wilkes *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2004). Im Fall von SMAD-1 ist die initiale Weiterleitung des TGF- β -Signals über MAPK sogar notwendig für dessen Aktivierung (Yue *et al.*, 1999; Hough *et al.*, 2012). Ebenfalls andere, SMAD-unabhängige, Signalwege beschreiten BMP-2, BMP-6 und TGF- β -1 mit dem MEK/ERK-Signalweg sowie TGF- β -1 mit der Aktivierung von PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) über die Phosphorylierung von Proteinkinase B (Bakin *et al.*, 2000; Barneda-Zahonero *et al.*, 2009; Dore *et al.*, 2009; Surachetpong *et al.*, 2009; Hough *et al.*, 2012).

1.5 PROMISKUITÄT UND SIGNALMODULATION DER TGF-B-SIGNALTRANSDUKTION

Ausgehend von einem signalisierenden, membranären Komplex bestehend aus einem dimeren Liganden und jeweils einem Typ-I- und Typ-II-Rezeptor-Paar stehen nach bisherigem Kenntnisstand 37 Liganden im humanen Proteom nur sieben Typ-I und fünf Typ-

II-Rezeptoren zur Rekrutierung zur Verfügung. Eine Spezifität der weiterzuleitenden Signale erscheint ob der geringen Rezeptorvarianz auf den ersten Blick schwer, scheint aber dennoch möglich.

Ligand	Typ-I-Rezeptor	Typ-II-Rezeptor	SMAD
TGF- β -I, -II, -III	T β R-I	T β R-II	SMAD-2,-3
Aktivine	ActR-IB, T β R-I	ActR-II, ActR-IIB	SMAD-2,-3
Nodal	ActR-IB, ActR-IC	ActR-II, ActR-IIB	SMAD-2,-3
BMPs & GDFs	Alk-1, ActR-I, BR1A, BR1B	ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II	SMAD-1,-5,-8
GDF-8, -9, -11, BMP-3	ActR-IB, T β R-I	ActR-II, ActR-IIB	SMAD-2,-3
MIS/AMH	BR1A, BR1B	AMHR-II	SMAD-1,-5,-8

TABELLE 8: MÖGLICHE SIGNALISIERENDE KOMPLEXE DER TGF-B-SIGNALWEITERLEITUNG

Rezeptoren sowie Liganden haben jeweils einen ähnlichen Aufbau, wodurch Liganden mehr als einen Typ-I- oder Typ-II-Rezeptor binden können, wie es auch für Rezeptoren möglich ist, ganze Gruppen von unterschiedlichen Liganden zu rekrutieren und somit eine hohe Promiskuität zu erreichen (Übersichtsartikel: Mueller & Nickel, 2012) (s. Tabelle 8). Neben der Zusammensetzung des transmembranären Komplexes spielt möglicherweise auch die unterschiedlich starke Affinität zwischen Ligand und Rezeptorpaar eine Rolle bei der Unterscheidung des Signals. Im Fall von ActR-II und ActR-IIB, die beide sowohl Vertreter aus der BMP/GDF- wie der Gruppe der Activine, Inhibine und Nodal binden können, erfolgt die Bindung des Liganden durch die Einbeziehung unterschiedlicher Hauptbindungs-determinanten, was in einer variablen Affinität zwischen unterschiedlichen Bindepartnern und der Rekrutierung unterschiedlicher Typ-I-Rezeptoren resultiert. Durch die höhere Affinität des Liganden zum Rezeptor sinkt die notwendige Ligandenkonzentration für die Signalweitergabe. Der signalisierende Komplex findet sich in beiden Fällen zusammen. (Weber *et al.*, 2007) Im Fall von BMP-6 konnte gezeigt werden, dass die posttranslationale Glykosylierung als Hauptbindungs-determinante für die Bindung des Typ-I-Rezeptors ActR-I fungiert und so möglicherweise bei der Verwendung unterschiedlicher Typ-I-Rezeptoren beiträgt. Nicht-glykosyliertes BMP-6 ist nur in der Lage die Typ-I-Rezeptoren BR1A oder BR1B zu binden, während N-glykosyliertes BMP-6 (Modifizierungsstelle Asn73) auch mit ActR-I wechselwirken kann. (Saremba *et al.*, 2008)

Die Ligand-Rezeptor-Affinität kann weiterhin auch von externen Mediatoren beeinflusst werden. So wird die Bindung von TGF- β -1, -2 und -3 zu TGF β R-II und Inhibin und Mitgliedern der BMP-Untergruppe zu Typ-II-Rezeptoren vom membranverankerten Typ-III-Rezeptor

Betaglycan moduliert (Andres *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2000; De Crescenzo *et al.*, 2001; Wiater & Vale, 2003; Kirkbride *et al.*, 2008). Jedes Monomer dieses im rekombinant exprimierten Zustand nicht-kovalent homodimerisierten Glykoproteins besteht aus einer knapp 800 Aminosäuren langen Extrazellulardomäne, einer einfachen Transmembrandomäne und einem sehr kurzen intrazellulären Bereich, der mit einer C-terminalen PDZ-Bindedomäne und einer Phosphorylierungsstelle, aber ohne Kinasedomäne ausgestattet ist (Vilchis-Landeros *et al.*, 2001). Der Bereich außerhalb der Zelle unterteilt sich in eine TGF- β -1, -2 und -3-bindende N-terminale sogenannte E-Domäne (*Endoglin-like*), die durch eine Proteaseschnittstelle in der C-terminal anschließenden Schleifenregion abgespalten werden kann. Daran anschließend liegt eine weitere, membrannahe Bindestelle für TGF- β und Inhibin, die sogenannte U-Domäne (*Uromodulin-like*). (Lopez-Casillas *et al.*, 1994) Die erste entdeckte Funktion von Betaglycan, nämlich die Bindung und Präsentation von Liganden gegenüber deren eigentlichen Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren (Andres *et al.*, 1991), wurde durch spätere Arbeiten erweitert und noch nicht vollständig geklärt. Neben eigener Signalaktivität durch den intrazellulären Bereich treten verschiedene Liganden gleichzeitig um die Bindung zu Betaglycan zueinander in Konkurrenz. Dadurch wird die notwendige Ligandenkonzentration im Extrazellularraum zur Aktivierung der Signalweiterleitung durch gesteigerte Affinität des Ligand-Betaglycan-Komplexes zu den signalisierenden Rezeptoren gesenkt. Gleichzeitig wird so die Aktivität von anderen sezernierten Liganden unterdrückt. (Wang *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 2000; Farnworth *et al.*, 2006) Wird der extrazelluläre Bereich jedoch durch Proteasen von der Membran entlassen (Betaglycan Δ C), so kehrt sich die Wirkung um. Fortan wirkt dieser inhibitorisch auf freie Liganden, da er seine Affinität zu ihnen durch den Verlust der Verankerung nicht einbüßt. (Lopez-Casillas *et al.*, 1994)

Weitere ähnlich fungierende Faktoren sind die Co-Rezeptoren Endoglin (Cheifetz *et al.*, 1992), Cripto (Yeo & Whitman, 2001) und die BMP-spezifischen Co-Rezeptoren der RGM-Familie (*repulsive guidance molecules*) (Babitt *et al.*, 2005; Babitt *et al.*, 2006).

1.6 INHIBITOREN DER TGF-B-SUPERFAMILIE

Ebenso, wie die Signalweiterleitung durch Modulatorproteine gefördert werden kann (s. 1.5), so kann diese mitunter auch durch die gleichen Effektoren unterbunden werden. Der BMP-spezifische Co-Rezeptor Rgm-c stellt in seiner über einen Glycosylphosphatidylinositol-Rest membran-verankerte Form einen positiven Mediator der BMP-Signalkaskade dar, wirkt allerdings bei Verlust des Lipidankers fortan als Antagonist von BMP-2 und -6 (Nili *et al.*, 2010). Gerade im Fall von durch den Extrazellulärraum verschiedener Gewebe und Zellverbände diffundierenden Substanzen ist es notwendig, deren Wirkung auf die gewünschten Zielgewebe zur gewünschten Zeit zu kanalisieren und in anderen Geweben zu unterbinden. Insbesondere zur Bildung von Gradienten, wie bereits in Punkt 1.2 beschrieben wurde, sind Konzentrationsgradienten für Positionssignale, aber auch für bei Morphogenen erwarteten unterschiedlichen Signalen durch Über- oder Unterschreitung eines Schwellenwertes unerlässlich. Die Signalkette sollte daher an jedem beliebigen Punkt inhibitorisch reguliert werden können.

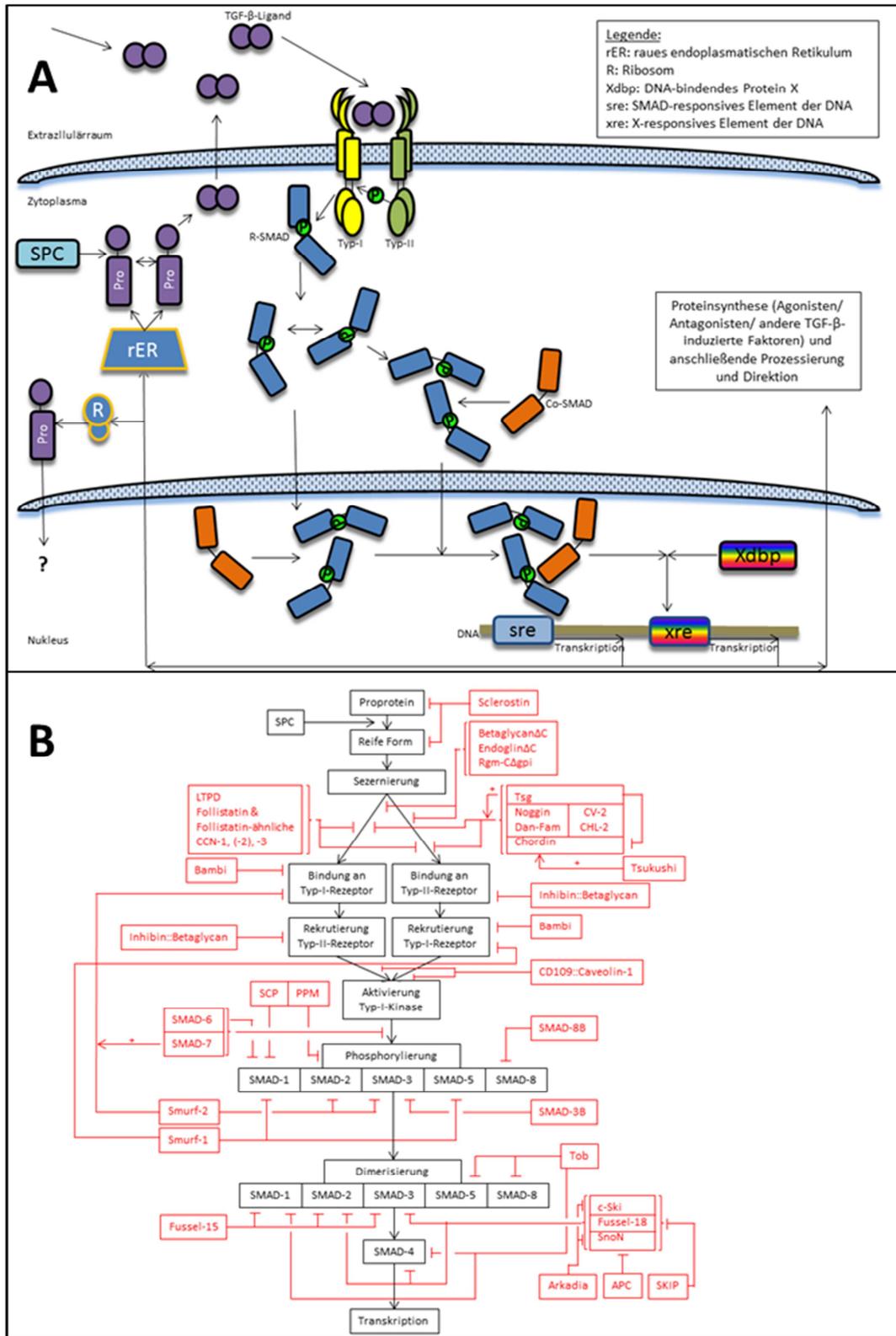


ABBILDUNG 5: SIGNALINHIBITION DES TGF-β-SIGNALWEGS

A Schematische Darstellung des TGF-β-Signalwegs vom Extrazellulärraum über das Zytoplasma bis hin zur Transkription im Nucleus. Proteine sind schwarz, Organellen gelb und DNA-Elemente blau umrandet. Phosphorylierungen sind als schwarz umrandeter grüner Kreis mit einem P gekennzeichnet. Die Bedeutung der verwendeten Abkürzungen ist der Legende zu entnehmen. **B** Schematisierte Darstellung des TGF-β-Signalwegs in schwarz. Inhibitoren sind rot mit der jeweiligen Verbindung zu ihrem Wirkort eingefügt.

1.6.1 MODULATION DER SIGNALTRANSDUKTION VON MITGLIEDERN DER TGF- β -SUPERFAMILIE DURCH EXTRAZELLULÄRE ANTAGONISTEN

Die TGF- β -vermittelten Signalweitergabe wird durch die sezernierten Liganden initiiert. Deren Bindung an membranständige Rezeptoren kann durch verschiedene Cystein-reiche Proteine verhindert werden, die den fünf Gruppen (1) Noggin, der (2) Chordinfamilie, (3) Twisted Gastrulation (Tsg), (4) der CCN-Familie ([Akronym der ersten drei entdeckten Mitglieder]) und der (5) Dan-Familie (*Differential screening-selected gene aberrative in Neuroblastoma*) durch Sequenzvergleiche erhaltene Sequenzhomologien zugeordnet werden können (Vitt *et al.*, 2001).

Das BMP-Modulatorprotein Noggin wird im Embryo während der Gastrulation und der Neurulation (s. 1.2) sowie BMP-induziert im adulten Lebewesen in Osteoblasten und Chondrozyten exprimiert (Gazzerro *et al.*, 1998; Pathi *et al.*, 1999). Möglicherweise dient die BMP-induzierte Expression als negative Rückwirkungsschleife dem Schutz knochen- und knorpelbildender Zellen vor starker BMP-Signalaktivität. Dabei bindet das als Homodimer sezernierte Noggin freie Liganden mit sehr hoher Affinität und verhindert durch sterische Blockade die Bindung an dessen Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren (Groppe *et al.*, 2002).

Die Chordin-Familie besteht aus mehreren Mitgliedern, deren gemeinsames Merkmal CR-Domänen (*cystein-rich*) oder auch von-Willebrandt-Faktor Typ-C-Domänen (VWC) sind (Garcia Abreu *et al.*, 2002). Eine direkte Bindung von BMPs findet in allen Mitgliedern der Chordin-Familie über bestimmte CR-Domänen statt: In Chordin wird dies durch die CR-Domänen CR-1 und CR-3 (Larrain *et al.*, 2000), in Crossveinless-2 (CV-2) durch CR-1 (Zhang *et al.*, 2008) und in Chordin-like-Protein-2 (CHL-2) durch CR-1 und CR-3 (Zhang *et al.*, 2007) erreicht. Das Expressionsmuster des namensgebenden Mitglieds der Chordin-Familie ist dem von Noggin im Embryo sehr ähnlich, wo beide vom Spemann-Organisator freigesetzt werden (s. 1.2). Chordin bindet hochaffin an BMP-2, -4 und -7 und blockiert durch Interaktion mit den Rezeptorbindeepitopen die Bindung der BMPs an die signalisierenden Rezeptoren (Piccolo *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2007). Im Huhn wurde ein die Inhibition durch Chordin unterstützender Faktor entdeckt - das Glykoprotein Tsukushi, welches zusammen mit Chordin und BMP-4 einen heterotrimeren Komplex ausbildet, dessen inhibitorische Wirkung auf die DVR-vermittelte Signalübertragung die von Chordin alleine übersteigt (Ohta *et al.*, 2004). Die Chordin-vermittelte Inhibition von BMP wird durch proteolytische

Prozessierung/Spaltung von Chordin durch die Zink-Metalloprotease BMP-1 (auch als Tolloid bekannt) aufgehoben, da nach Spaltung von Chordin gebundenes BMP wieder freigesetzt wird. (Piccolo *et al.*, 1997). Die gesteigerte, knocheninduzierende Aktivität durch Behandlung mit BMP-1/Tolloid führte zu der anfänglich falschen Zuordnung dieser Metalloprotease zur Gruppe der knochenmorphogenischen Proteine (Wozney *et al.*, 1988). Da die Bindung von Chordin an BMPs zudem deren Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen stark erhöht, kann Chordin BMP im Komplex über weitere Strecken transportieren und so weitreichende BMP-Wirkungen entfalten. Ungebundenes BMP zeigt eine weniger starke Diffusion im Embryo als im Chordin-gebundenen Zustand. Diese Eigenschaft unterstützt den Aufbau von Reservoirs mit BMPs ebenso wie für die Entwicklung wichtigen BMP-Gradienten auch über nicht-BMP-sezernierendes Gewebe. Die sich dann an Orten ohne BMP-Synthese entfaltende BMP-Wirkung wird häufig als pro-BMP-Eigenschaft von Chordin beschrieben. (Eldar *et al.*, 2002)

Tsg nimmt eine ambivalente Rolle in der BMP-Signalmodulation ein. Es besitzt eine N-terminale Domäne, mit der BMP gebunden werden und sich dadurch eine antagonistische Wirkung ähnlich Chordin zeigen kann. Das C-terminale Motiv ist keiner anderen Gruppe extrazellulärer Antagonisten zuzuordnen. (Oelgeschlager *et al.*, 2003) Die C-terminale Domäne von Tsg ist für die Bindung von Tsg an BMP-Chordin-Komplexe verantwortlich. Die Bildung dieser ternären BMP-Chordin-Tsg-Komplex erhöht zunächst die inhibitorische Wirkung von Chordin (Chang *et al.*, 2001). Andererseits erleichtert Tsg im Komplex mit BMP und Chordin die proteolytische Spaltung von Chordin durch die Metalloprotease BMP-1/Tolloid, wodurch die Bindung von Chordin an BMPs geschwächt wird und BMP freigesetzt wird. Der oben erwähnte Transport von BMP durch Chordin und die erhöhte Löslichkeit führen dann zu der als Pro-BMP-Aktivität bekannte Wirkung von Chordin, so dass das Zusammenspiel der vier Proteine hier einen komplexen Regulationsmechanismus darstellt, der weit über die reine Inhibition anderer Antagonisten wie z.B. Noggin hinausgeht. (Larrain *et al.*, 2001)

Die CCN-Protein-Familie besteht aus derzeit sechs bekannten Mitgliedern, denen unter anderem modulatorische Eigenschaften gegenüber der Signalwirkung einzelner Mitglieder der TGF- β -Proteinfamilie zugeschrieben werden. Die in die extrazelluläre Matrix sekretierten Mitglieder bestehen aus vier konservierten Cystein-reichen funktionellen Domänen. Auf eine

N-terminale IGFBP-Domäne (*Insulin-like growth factor binding protein*) folgen eine VWC-Domäne, eine TSP-1-Domäne (*Thrombospondin Typ-1*) und ein C-terminaler Cystein-Knoten (Übersichtsartikel: Bork, 1993). Bislang nachgewiesene Effekte auf die TGF- β -vermittelte Signalweiterleitung sind der VWC-Domäne zuzuschreiben. SPR-Bindestudien zeigen, dass CTFG (*Connective tissue growth factor*) über die VWC-Domäne BMP-2/-4 sowie TGF- β -I bindet. Interessanterweise hat diese Bindung unterschiedliche effektorische Auswirkungen. Im Fall von BMP-2 und -4 blockiert gebundenes CTFG/CCN-2 den Kontakt zu deren Typ-I-Rezeptoren und demzufolge auch die Signalweiterleitung, wohingegen TGF- β -I durch CTFG den zuständigen Rezeptoren präsentiert und die Aktivierungskonzentration für die Signaltransduktion herabgesetzt wird. (Abreu *et al.*, 2002) Cyr-61/CCN-1 (*Cystein-rich protein 61*) bindet direkt TGF- β -I mit inhibitorischer Wirkung auf dessen Signaltransduktion (Borkham-Kamphorst *et al.*, 2014). Nov/CCN-3 (*Nephroblastoma overexpressed gene*) zeigt in Microarray-Untersuchungen transfizierter Zellen inhibitorische Wirkung auf die BMP-2-induzierte Expression von verschiedenen Zielgenen der Osteoblastendifferenzierung durch direkte Interaktion mit BMP-2 (Minamizato *et al.*, 2007). Den verbleibenden drei Vertretern CCN-4, -5 und -6 konnte bisher keine direkte Interaktion mit Liganden der TGF- β -Proteinsuperfamilie nachgewiesen werden.

Die Dan-Familie ist die fünfte Gruppe extrazellulärer Modulatorproteine, die durch Bindung an Mitglieder der TGF- β -Superfamilie deren Aktivität regulieren. Dieser funktionell sehr heterogenen Proteinfamilie werden bis zum heutigen Zeitpunkt die zehn Mitglieder Cerberus (Bouwmeester *et al.*, 1996), Dan (Stanley *et al.*, 1998), Gremlin (Hsu *et al.*, 1998), PRDC (*Protein related to Dan and Cerberus*) (Minabe-Saegusa *et al.*, 1998), Caronte (Yokouchi *et al.*, 1999), USAG-1 (*Uterine sensitization associated gene 1*)/Wise (Simmons & Kennedy, 2002), Sclerostin (Kusu *et al.*, 2003), Coco (Bell *et al.*, 2003), Ectodin (Laurikkala *et al.*, 2003) und Dante (Kato, 2004) zugeordnet. Die einzige Gemeinsamkeit in der Primärstruktur all dieser Proteine ist eine C-terminale Cystein-reiche Domäne mit acht (Sclerostin und USAG-1) bzw. neun Cysteinen. Trotz der Zuordnung zu einer Proteinfamilie sind die Wirkbereiche der Mitglieder, soweit bekannt, unterschiedlich. Sclerostin ist im adulten Organismus am Erhalt des Skeletts beteiligt. Ausschließlich in Knochengewebe gebildet, bindet Sclerostin, ebenso wie USAG-1/Wise, an die Co-Rezeptoren LRP-4, LRP-5 und dessen Homolog LRP-6 (*Low-density lipoprotein-related protein*), unterbindet dadurch die Wnt-induzierte Komplexbildung von LRP und Frizzled und inhibiert so den Wnt/ β -

Catenin-Signalweg (*wingless and int-1*) (Li *et al.*, 2005; Semenov *et al.*, 2005). In Sclerostin-bildenden Osteozyten assoziiert Sclerostin intrazellulär mit BMP-7 als auch seinem Vorläuferprotein und sorgt für dessen Degradation. Die *in vitro* beobachtete niedrige Affinität zu verschiedenen, sekretierten BMPs konnte *in vivo* nicht bestätigt werden. (van Bezooijen *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2010) USAG-1/Wise wird vorwiegend in embryonalem Nierenvorläufergewebe exprimiert und bindet dort Proteine der BMP-Untergruppe, deren Wirkung es antagonisiert (Yanagita *et al.*, 2004). USAG-1/Wise ist überdies das einzige Mitglied der Dan-Proteinfamilie, dem gleichzeitig noch zusätzlich physiologische Relevanz für den Wnt/ β -Catenin-Signalweg erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Es konkurriert mit Wnt-8 um die Bindung zu LRP-6 und aktiviert oder inhibiert so kontextabhängig die Wnt-vermittelte Signalweiterleitung (Itasaki *et al.*, 2003; Lintern *et al.*, 2009). Für korrekte Achsenbildung im Embryo zeigen sich die BMP-bindenden Dan-Proteinfamilienmitglieder Gremlin, Dan und Cerberus, das zusätzlich noch Activin und Nodal bindet, (Hsu *et al.*, 1998) sowie das ebenfalls BMP-bindende Caronte (Rodriguez Esteban *et al.*, 1999) und Coco (Vonica & Brivanlou, 2007), dessen Wirkmechanismus noch unklar ist, zu verschiedenen Zeitpunkten mitverantwortlich. Affinität zu BMPs, nicht aber gegenüber Activin oder TGF- β , konnte außerdem noch dem im Embryo exprimierten PRDC nachgewiesen werden (Sudo *et al.*, 2004). Für die verbleibenden Faktoren Ectodin und Dante existieren noch keine veröffentlichten Funktionsstudien. Soweit bislang erforscht, binden Mitglieder der Dan-Proteinfamilie überwiegend Vertreter der über SMAD-1/-5/-8-signalisierenden Ligandengruppe und Nodal direkt und blockieren dadurch den Kontakt zu den jeweiligen Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren (Hsu *et al.*, 1998; Stanley *et al.*, 1998; Laurikkala *et al.*, 2003). Mit der Veröffentlichung der Röntgenstruktur von PRDC durch die Arbeitsgruppe um Thomas B. Thompson wurde eine Unterteilung der Dan-Proteinfamilie in starke und schwache BMP-Inhibitoren postuliert. Den starken BMP-Inhibitoren werden die dimerisierten PRDC und Dan, sowie Gremlin zugeordnet, deren hohe Affinität gegenüber BMPs aber auch Spezialisierung ausschließlich auf Mitglieder der BMP-Untergruppe vermutlich durch den hydrophoben Kern vermittelt wird. Dieser Kern entsteht im Fall von PRDC durch die Dimerisierung im Kontaktbereich der beiden Cystein-reichen sogenannten Dan-Domänen. (Kattamuri *et al.*, 2012; Nolan *et al.*, 2013) Sclerostin als Vertreter der schwachen BMP-Inhibitoren dimerisiert hingegen nicht, bildet demzufolge nicht den kritischen Kontaktbereich der Dan-Domänen aus und inhibiert BMP-stimulierte

Knochenbildung, ohne die BMP-Signaltransduktion direkt zu beeinflussen. Es interagiert hingegen direkt mit beteiligten Proteinen der Wnt-Signalkaskade, und inhibiert so indirekt die BMP-vermittelte Knochenbildung. (van Bezooijen *et al.*, 2007; Weidauer *et al.*, 2009)

1.6.2 INHIBITION DURCH BLOCKADE DER REZEPTOREN

Wie beschrieben, ist für die große Zahl an unterschiedlichen Liganden eine Vielzahl verschiedener ligandenbindender Inhibitoren notwendig, um hochspezifisch einzelne Ligandensignale zu blockieren. Ein weiterer Mechanismus, die Initiation der Signalkaskade zu verhindern, besteht in der direkten Blockade der wenigen Rezeptoren. Gerade die Typ-II-Rezeptoren stellen mit lediglich fünf Vertretern für die fast 40 TGF- β -Liganden einen Flaschenhals in der Signalvarianz dar. Durch die Blockade eines einzigen Typ-II-Rezeptors, können so viele Aktivatoren oder ganze TGF- β -Subfamilien wirksam inhibiert werden. So verhindert die Blockade des Bindeepitops von ActR-IIB durch nicht signalisierendes BMP-3 in bestimmten Zellen des Froschembryos die ventralisierenden Effekte sowohl von BMP-4 als auch Activin (Gamer *et al.*, 2005). Analog weist Inhibin gebunden an Betaglycan hohe Affinität zu ActR-II und ActR-IIB, den Typ-II-Rezeptoren der Activin-Signalkette, auf, was die Formation des heterohexameren Komplexes für Activeine, aber auch zum Teil Mitglieder der BMP-Subgruppe verhindert (Lewis *et al.*, 2000). Diese können zwar auch BMPR-II rekrutieren, doch Überexpressionsexperimente lassen die Vermutung zu, dass auch dieser Rezeptor von Inhibin-Betaglycan gebunden und für Liganden unzugänglich gemacht werden kann (Wiater & Vale, 2003). CD109, ein Mitglied der GPI-verankerten α 2-Macroglobuline, zeichnet sich durch eine ebenfalls inhibitorische Wirkung auf die TGF- β -I, -II und -III-vermittelte Signalweitergabe aus. CD109 assoziiert mit Caveolin-1 und wird dadurch in sogenannte Caveolen dirigiert. (Finsson *et al.*, 2006). Caveolen sind Sonderformen von *lipid rafts*, denen die Akkumulation von signalaktiven Transmembranproteinen, die Endozytose von Rezeptoren und die Modulation von Signalketten zugeschrieben werden. (Übersichtsartikel: Parton & Simons, 2007) Lokalisierungsversuche zeigen eine Anhäufung von SMAD-7, das seinerseits die E3-Ubiquitinligase Smurf-2 (*Smad ubiquitination regulatory factor for SMAD-2*) rekrutiert, in Caveolen auf der Membraninnenseite (Di Guglielmo *et al.*, 2003). SMAD-7 ist in der Lage, aktivierten TGF β R-I zu binden, und ihn der Degradation durch assoziiertes Smurf-2 zuzuführen (Ebisawa *et al.*, 2001). Die Lokalisierungsversuche von Di Guglielmo und Kollegen zeigten weiterhin eine Assoziation des SMAD-2/-3-begünstigenden Faktors SARA (*SMAD anchor for receptor activation*) mit PtdIns-3(P)-EEA-1-

positiven Endosomen (*Phosphatidyl inositol 3' phosphate-enriched early endosome antigen-1*), wohin membranständige Zielproteine Clathrin-abhängig transportiert werden können (Tsukazaki *et al.*, 1998). Von der Präsenz modulatorischer Proteine hängt also ab, ob der aktivierte TGF- β -Komplex sein Signal in das Zellinnere weiterreichen kann oder Ubiquitin-abhängig degradiert wird. CD109 bindet die TGF- β -Rezeptoren I und II und wirkt sich positiv auf die Bindung zu deren Liganden aus. Der vorgeschlagene Inhibitionsmechanismus sieht vor, dass der heteromere Komplex aus CD109, TGF- β , TGF- β R-I und/oder TGF- β R-II durch die Assoziation von CD109 zu Caveolin-1 in Caveolen dirigiert und dort proteolytisch abgebaut wird, ohne dass eine Signaltransduktion ins Zellinnere stattfinden kann. (Bizet *et al.*, 2011)

1.6.3 INHIBITION DURCH INHIBITORISCHE SMADS

Neben der Regulation der Signalweiterleitung der TGF- β -Proteinfamilie auf der extrazellulären Seite, kann die Signalkaskade bzw. bestimmte Signalwege intrazellulär direkt an den Kinasedomänen der Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren erfolgen. So kann beispielsweise die Transphosphorylierung der bereits unter Punkt 1.4 beschriebenen R-SMADs aktiv durch deren verwandte inhibitorische SMAD-Faktoren (I-SMAD) verhindert werden. SMAD-6 und -7 sind einem gemeinsamen Ursprung mit R- und Co-SMADs zuzuordnen, besitzen sie doch beide die SMAD-typische C-terminale MH-2-Domäne. Diese Domäne ist für die Bindung an den aktivierten Typ-I-Rezeptor verantwortlich und ihre Anwesenheit in den I-SMAD-Faktoren erlaubt eine Konkurrenz zwischen R- und I-SMADs um die Typ-I-Rezeptorbindestelle. (Hayashi *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 1997) Allerdings fehlt den I-SMAD-Faktoren das C-terminale SSXS-Motiv der Schleifenregion ebenso wie die N-terminale MH-1-Domäne der R-SMADs. Daher können I-SMADs im Gegensatz zu den R-SMAD-Faktoren nicht durch die Typ-I-Rezeptoren phosphoryliert werden und auch nicht zusammen mit dem Co-SMAD SMAD-4 in einen trimeren Komplex rekrutiert werden, so dass hierdurch die Signalweiterleitung ausbleibt. (Nakao *et al.*, 1997) Während SMAD-6 beinahe ausschließlich die BMP- und GDF-vermittelte Signalweiterleitung über BR1A, BR1B und ActR-I unterbindet, inhibiert SMAD-7 zusätzlich dazu die Signaltransduktion durch TGF- β -I, -II und -III über die Bindung an TGF- β R-I (Hanyu *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2007). Einerseits liegt das an einer spezifisch erhöhten Affinität der MH-2-Domäne von SMAD-7 gegenüber BR1A und BR1B, zum anderen konkurriert SMAD-6 mit SMAD-4 um die Bindung an phosphoryliertes SMAD-1, mit dem es einen signalinaktiven SMAD-1-SMAD-6-Komplex bildet (Hata *et al.*, 1998). Weiterhin tritt, in unstimuliertem Zustand an BMP-Typ-I-Rezeptoren gebundenes SMAD-6, bei BMP-4-

vermittelter Komplexierung der Typ-I- und -II-Rezeptoren in räumlichen Kontakt zur BMPRII-assoziierten Methyltransferase PRMT-1 (*Proteine [A]R[ginine] Methyl Transferase 1*). Dadurch wird SMAD-6 an der Seitenkette von Arg74 reversibel methyliert und dadurch vom Rezeptor entlassen, so dass dessen Kinase SMAD-1 und -5 rekrutieren und transphosphorylieren kann. (Xu *et al.*, 2013) Spezifische Inhibition des SMAD-8-vermittelten Signals unterliegt einer zelleigenen Autoregulation. Eine *splice*-Variante von *smad8* ohne das Exon #6 (*expressed region*), welches für die Phosphorylierung notwendige SSXS-Motiv kodiert, SMAD-8B wird gewebeabhängig teilweise anstelle von SMAD-8 transkribiert. SMAD-8B komplexiert sowohl mit SMAD-8 als auch SMAD-4, transloziert allerdings im Komplex nicht in den Nukleus und inhibiert so die Signalweiterleitung über SMAD-8. (Nishita *et al.*, 1999) Ein ähnlicher Mechanismus existiert auch für SMAD-3. Eine um die MH-1-Domäne verkürzte *smad3*-Splice-Variante konkurriert mit SMAD-3 um die Phosphorylierung durch den aktivierten Typ-I-Rezeptor (Kim *et al.*, 2011).

1.6.4 ANDERE INTRAZELLULÄRE INHIBITOREN

Auch nach einer Phosphorylierung der entsprechenden SMADs existieren unterschiedliche Möglichkeiten für eine Signalinhibition innerhalb der Zelle. Die direkte Möglichkeit, den entsprechenden SMAD-Faktor wieder zu deaktivieren, ist die Dephosphorylierung des SSXS-Motivs durch Serin/Threonin-Phosphatasen der SCP- (*Small C-terminal domain phosphatase*) und PPM-Untergruppe (*Protein phosphatase Mg²⁺- or Mn²⁺-dependent*) (Duan *et al.*, 2006; Knockaert *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006). Smurf-1, eine E3-Ubiquitin-Ligase, induziert die (Poly-)Ubiquitinierung und anschließende Degradation von SMAD-1 und -5 durch das Proteasom, bevor diese ihren Platz in der Signalkette einnehmen können (Zhu *et al.*, 1999). Smurf-2 erfüllt diese Funktion in Bezug auf SMAD-2/-3 (Lin *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2011). Sowohl Smurf-1 als auch Smurf-2 rekrutieren weiterhin in den Nukleus transloziertes SMAD-7, schleusen dieses im Komplex zurück ins Zytoplasma und sorgen dort über die SMAD-7-vermittelte Bindung an den Rezeptor für die Degradation von TGFβR-I (Kavsak *et al.*, 2000; Ebisawa *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002). STUB-1 (*STIP-1 homology and U-Box containing protein 1*) ist ebenfalls ein Faktor für den proteasomalen Abbau, kann direkt an SMAD-1/-3/-4 binden und sorgt im Fall von SMAD-3 für dessen Ubiquitin-vermittelte Degradation (Li *et al.*, 2004; Xin *et al.*, 2005).

Als weitere SMAD-bindende Inhibitoren wurden Proteine der Ski-Familie, namentlich c-Ski (cellular-Sloan-Kettering Institute) (Luo *et al.*, 1999), SnoN (Ski-related novel protein N) (Stroschein *et al.*, 1999), Fussel-18 (Functional smad suppressing element on chromosome 18) (Arndt *et al.*, 2005) und Fussel-15 (Arndt *et al.*, 2007), entdeckt. Alle genannten Faktoren deaktivieren den SMAD-Faktor durch Bindung an dessen MH-2-Domäne. Die Zuordnung von Proteinen der Ski-Familie zu den jeweiligen SMAD-Faktoren ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Protein	gebundene SMADs	Quelle
c-Ski	SMAD-2	Akiyoshi, <i>et al.</i> , 1999
	SMAD-3	Sun, <i>et al.</i> , 1999b
	SMAD-4	Wu, <i>et al.</i> , 2002
SnoN	SMAD-2, SMAD-3, SMAD-4	Stroschein, <i>et al.</i> , 1999
Fussel-18	SMAD-2, SMAD-3, SMAD-4	Arndt, <i>et al.</i> , 2005
Fussel-15	SMAD-1, SMAD-2, SMAD-3	Arndt, <i>et al.</i> , 2007

TABELLE 9: SMAD-INTERAKTION VON MITGLIEDERN DER SKI-FAMILIE

Mitgliedern der Ski-Familie wirkt SKIP (Ski-interacting protein) entgegen, indem es die MH-2-Domäne von SMAD-2/-3 für die Bindung der Ski-Proteine sterisch blockiert (Leong *et al.*, 2001). Weiterhin werden verschiedene Mitglieder der Ski-Familie durch Ubiquitinierung deaktiviert. APC (Anaphase promoting complex) bindet an die D-Box (Destruction-Box) der MH-2-Domäne von SMAD-2/-3 gebunden an SnoN und sorgt dadurch für die Ubiquitin-vermittelte Degradation von SnoN (Stroschein *et al.*, 2001). Arkadia, eine E3-Ubiquitin-Ligase, tritt durch Interaktion mit mehreren intrazellulären inhibitorischen Faktoren der TGF- β -vermittelten Signalkaskade als Signalverstärker auf. C-Ski und SnoN sowie SMAD-7 werden direkt von Arkadia gebunden, deren Poly-Ubiquitinierung induziert und anschließend proteosomal abgebaut. (Koinuma *et al.*, 2003; Nagano *et al.*, 2007). Weitere bekannte intrazelluläre Inhibitoren stellen Proteine der Tob-Familie. Tob-1, als am besten untersuchter Vertreter dieser Familie, bindet an die MH-2-Domäne von SMAD-1/-4/-5 und -8 und führt zu einer Translokation der gebundenen, unphosphorylierten SMADs in den Zellkern, vermutlich, um sie räumlich von den aktivierten Kinasen der Typ-I-Rezeptoren zu trennen (Yoshida *et al.*, 2000).

1.7 DER MEMBRANSTÄNDIGE PSEUDOREZEPTOR BAMBI

Die Suche nach zellulären Markern für menschliche Tumore, um diese über Indikatoren einem Stadium zuzuordnen und so geeignete Therapieformen einzuleiten, führte zur Entdeckung des Gens *nma* (Neuromuscular ataxia) (Degen *et al.*, 1996). In den untersuchten

metastasierenden Zelllinien war hierbei der RNA-Spiegel von *nma* im Vergleich zu gesunden Zellen signifikant erniedrigt. Northern Blot Analysen von verschiedenen gesunden Geweben ergaben eine hohe Expression von *nma* in Niere, Knochenmark, Milz und Plazenta, wodurch dessen ausschließliche Beteiligung an maligner Entartung ausgeschlossen werden konnte. Das Gen, welches aus drei Exons und zwei Introns besteht und für ein 260 Aminosäuren langes Protein kodiert, konnte auf Chromosom 10 in Abschnitt p11.2-p12.3 lokalisiert werden. Über Sequenzanalysen konnte eine einzelne Transmembrandomäne vorhergesagt werden, obgleich Aussagen über die eigentliche Funktion zu dieser Zeit noch nicht möglich waren. (Degen *et al.*, 1996) Genauere Untersuchungen am Embryo des Krallenfroschs *Xenopus laevis* zeigten eine Korrelation der Expressionsmuster von xBMP-4 und xBambi, welches eine 83%ige Sequenzidentität zum humanen Ortholog Nma (welches daraufhin auch als hBambi bezeichnet wird) aufweist (Onichtchouk *et al.*, 1999). Ein identisches Muster konnte ebenfalls in der Maus für mBMP-4 und mBambi nachgewiesen werden (Grotewold *et al.*, 2001). Die extrazelluläre Domäne von hBambi zeigt 53% Sequenzhomologie zum extrazellulären Teil des Typ-I-Rezeptors hBR1A, wohingegen der intrazelluläre Bereich im Vergleich zu den BMP Typ-I-Rezeptoren deutlich verkürzt ist, und keine für Typ-I-Rezeptoren charakteristische Kinasedomäne besitzt. Transfektions- und Stimulationsversuche in verschiedenen Zelllinien mit BMP-2 und Activin sowie Co-Immunopräzipitation deuteten auf eine Inhibition der BMP- und Activin-Signalweiterleitung durch eine direkte Blockade aller Typ-I- (außer ActR-I) und der Typ-II-Rezeptoren ActR-II und TGF β -II durch Bambi hin. Interessanterweise konnte keine Bindung von BMP-2 und TGF β -I an Bambi beobachtet werden, obwohl die Rezeptortodomäne Homologie zu dem BMP-Typ-I-Rezeptor BR1A aufweist. (Onichtchouk *et al.*, 1999) Bindung von Bambi an die Rezeptoren des kanonischen Wnt-Signalwegs Frizzled-5 und LRP-6 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wobei Bambi hier agonistisch auf den wnt/ β -Catenin-Signalweg wirkt (Lin *et al.*, 2008). Um die Bedeutung von Bambi für BMP- und Activin-vermittelte Signale im Gesamtorganismus abschätzen zu können, wurde ein Mausmodell erstellt, in dem Bambi systematisch deletiert wurde. Diese Bambi *knockout* Maus zeigt jedoch überraschenderweise keinen auffälligen Phänotyp; homozygote Nachkommen waren zudem lebensfähig und fertil. Als einige wenige phänotypische Veränderungen konnte eine erhöhte Sensitivität für Schmerz beobachtet werden. Zudem wiesen homozygote weibliche Tiere ein etwa 10% geringeres Gewicht auf, als wildtypische Mäuse. (Chen *et al.*, 2007; Tramullas *et al.*, 2010) Weiterhin bewirkt die

Gendeletion von Bambi eine Veränderung des Endothel. So kommt es in den Nieren durch hypertrophe Zellen und großflächigere Faltungen in den Nierenkörperchen zu einer Schwellung des gesamten Organs. Weitere Untersuchungen der *knockout*-Mäuse in Bezug auf die Wundheilung zeigen, dass Bambi der Endothelbildung und -regeneration entgegenwirkt. (Guillot *et al.*, 2013) Dabei ist der nach einer oberflächlichen Verletzung freigesetzte Faktor CTGF in der Lage, die Expression von Bambi im betroffenen Gewebe anzuregen (Braig *et al.*, 2011). Der genaue Wirkmechanismus für Bambi bei der Wundheilung ist dabei noch nicht geklärt, wobei es allerdings Hinweise gibt, dass die durch TGF β -I, -II und -III-vermittelte Signalweiterleitung über SMAD-1 und -5 sowie über ERK-1/-2 von Bambi reguliert werden (Guillot *et al.*, 2012). Hinweise auf eine Unterdrückung von BMP-Signalen liefert die Beobachtung einer anti-fibrogene Wirkung von Bambi auf TGF- β -induzierte Fibrose, die im Herzmuskel von Bluthochdruckpatienten beobachtet wurde (Villar *et al.*, 2013).

In der jüngsten Zeit wird vermehrt eine Beteiligung von Bambi, positiv wie negativ, an vielen Krankheitsbildern beobachtet. So ist die Genexpression von Bambi in der Raucherlunge (Dromann *et al.*, 2010), bei Eierstockkrebs (Pils *et al.*, 2010) und in Osteosarkomen (Zhou *et al.*, 2013) stark erhöht. Bambi wirkt hier scheinbar als Aktivator und führt dort zu einer gesteigerten Zellproliferation und Migration maligner Zellen. Andererseits konnten Bambi wie bereits beschrieben auch negativ-regulierende Effekte bei der TGF- β -induzierter Fibrose nachgewiesen werden. Ebenso unterdrückt es im Knochenmarkmesenchym die Differenzierung der dort ansässigen Stammzellen zu krebssassoziierten Fibroblasten (CAF) Im Knochenmarkmesenchym wirkt es der Differenzierung der dort ansässigen Stammzellen zu krebssassoziierten Fibroblasten (CAF). Inhibiert man nun diesen TGF- β -vermittelten Effekt durch Transfektion der Zellen mit Bambi, so bieten diese transgenen Zellen ein interessantes Hilfsmittel in der Stammzelltherapie bei verschiedenen Anwendungen wie Knochen- und Knorpelregeneration, Graft-versus-Host-Reaktionen, Morbus Crohn, Augenhornhauterkrankungen oder Myokardinfarkte (Prockop & Oh, 2012; Shangquan *et al.*, 2012).

1.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Bambi, ein Transmembranprotein ohne inhärente Kinaseaktivität, wurde ursprünglich bei der Untersuchung des Expressionsmusters von BMP4 in *Xenopus laevis* entdeckt. Über die Rolle von Bambi ist auf zellulärer Ebene bisher nur wenig bekannt und auch der bisher vorgeschlagene Wirkmechanismus für die Regulation von BMP- und Activin-Signalen wirft Fragen auf. Die extrazelluläre Domäne hat mit seiner Länge und Aminosäuresequenz, insbesondere der charakteristischen Verteilung der acht Cysteinreste eine verblüffende Ähnlichkeit zu den an der BMP- und Activin-Signalweiterleitung beteiligten Typ-I-Rezeptoren. Der intrazellulären Domäne fehlt jedoch die für TGF- β -Rezeptoren typische Serin/Threoninkinase und die relativ kurze Domäne weist auch keine Homologie zu anderen Proteinen auf, so dass über die Funktion des cytoplasmatischen Anteils derzeit keinerlei Aussagen gemacht werden können. Erste Untersuchungen mittels transfizierter Zellen zeigen für hBambi eine inhibitorische Funktion auf die klassischen, durch TGF- β /BMP-induzierten SMAD-vermittelten Signalwege, was aufgrund der fehlenden Kinasedomäne und deren Transphosphorylierungsfunktion in diesem Signalweg logisch erscheint.

Fundierte strukturelle und funktionelle Aussagen über Bambi sind jedoch aufgrund der teils widersprüchlichen Daten und der geringen proteinchemischen Datenmenge hoch spekulativ und dementsprechend groß ist das Interesse an der Untersuchung der genauen Funktionsweise des Proteins.

Da keine Informationen über die Raumstruktur von Bambi verfügbar sind, sollte in dieser Arbeit zunächst *in silico* ein 3D-Homologiemodell der extrazellulären Domäne von Bambi erstellt werden. Um experimentelle proteinanalytische Daten für die Untersuchung des molekularen Wirkmechanismus von Bambi zu erhalten, sollte eine Überexpressions- und Reinigungsstrategie für die extrazelluläre Domäne von hBambi erstellt werden. Ein Ziel war die ausreichende, rekombinante Herstellung von Bambi-ECD, um mittels verschiedener biophysikalischer Methoden *in vitro* Eigenschaften von Bambi aufklären zu können. Hierzu sollten vor allem die – bisher unklaren – Bindungseigenschaften der Bambi Ektodomäne mit BMP-Rezeptoren und Liganden durch proteinchemische Analysen mit isolierten, hochreinen Interaktionspartnern aufgeklärt werden. Mit Hilfe der dann bekannten Bindeeigenschaften sollten dann zellbasierte Versuche, z.B. mit Reporterzelllinien den molekularen Wirkmechanismus von Bambi analysiert werden. Um später strukturelle Analysen für die

Bambi Ektodomäne durchführen zu können, sollte zudem eine bakterielle Expression etabliert und hinsichtlich Proteinausbeute und -reinheit für die Anforderungen einer Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie optimiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Verwendete Chemikalien und Enzyme wurden im Allgemeinen von folgenden Firmen in der höchsten Reinheitsstufe bezogen: 5PRIME, Amersham, Biorad, Biotium, Genaxxon, Peprotech, NEB, Lonza, Thermo Scientific, Pierce, Roth, Fermentas, Macherey-Nagel, Applichem, Sigma Aldrich, Gibco, Biochrom AG, Invitrogen, Merck, Melford, Fluka, Calbiochem, Roche, Melford, Hartenstein und GE.

2.1.2 VERWENDETE VEKTOREN

Vektorname	Eigenschaften	Quelle/Referenz
pET-28a(+)	bakterieller Expressionsvektor. T7/lac-Promotor, die MCS flankierende His ₆ -Tags, der n-terminale davon über Thrombin abspaltbar, Kanamycin-Resistenz	Novagen
pMK-1	Baculovirus-Transfektions- und Expressionsvektor für die Expression in Sf9-basierten Zelllinien basierend auf pBac-3 (Novagen). gp64-Signalsequenz zur Sezernierung, n-terminaler His ₆ -Tag, durch Thrombin abspaltbar, Ampicillin-Resistenz zur Amplifikation in <i>E.coli</i>	Kraich <i>et al.</i> , 2006
pEF6/V5-His B	Überexpressionsvektor für Säugerzellen. hEF-1 α -Promotor, Blasticidin-Resistenz, V5-Epitop c-terminal der MCS gefolgt von einem His ₆ -Tag, Ampicillin-Resistenz zur Amplifikation in <i>E.coli</i>	Invitrogen
pUHD16-1	Vektor zur Transfektionskontrolle in Wirbeltierzellen. Trägt das LacZ-Gen zur Kontrolle der Transfektionseffizienz über β -Galaktosidase, Ampicillin-Resistenz zur Amplifikation in <i>E.coli</i>	Gossen <i>et al.</i> , 1992
BRE-Luc	Reportervektor zum Nachweis der BMP-Responsivität von Wirbeltierzellen über SMAD1/5/8. Luciferase unter der Expressionskontrolle <u>B</u> mp_ <u>r</u> esponsiver <u>E</u> lemente (BRE), Ampicillin-Resistenz zur Amplifikation in <i>E.coli</i>	Korchynskyi <i>et al.</i> , 2002
pET-32a	bakterieller Expressionsvektor. T7/lac-Promotor, die MCS flankierende His ₆ -Tags, der n-terminale davon über Thrombin abspaltbar, dazu n-terminales TRX-Motiv zur Fusion mit dem Zielprotein zur Steigerung der Löslichkeit und Expressionsrate, Ampicillin-Resistenz	Novagen
(CAGA) ₉ -MLP-Luc	Reportervektor zum Nachweis der SMAD2/3-Responsivität von Wirbeltierzellen. Luciferase unter der Expressionskontrolle von neun SMAD3/4-responsiven Elementen aus dem Promotor des humanen <i>pal-1</i> , Ampicillin-Resistenz zur Amplifikation in <i>E.coli</i>	Denkler <i>et al.</i> , 1998

TABELLE 10: VERWENDETE VEKTOREN

2.1.3 BAKTERIENSTÄMME

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsd S _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind 1 sam 7 nin 5])	Novagen
<i>Escherichia coli</i> NovaBlue	end A1 hsd R17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) sup E44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F' [pro A+B+ lacIqZΔM15::Tn10] (TetR ^R)	Novagen
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)	F ⁻ ompT hsd S _B (R _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind 1 sam 7 nin 5]) pLysSRARE (Cam ^R)	Novagen

TABELLE 11: VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME

2.1.4 MEDIEN

Medium	Zusammensetzung
LB Medium	25g/L LB Broth Granulat (Melford), pH auf 7,4 einstellen
SOB-Medium	20g/l Bacto-Trypton 5g/l Bacto-Hefe-Extrakt 0,5g/l NaCl
SOC-Medium	SOB + 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glukose
LB-Agar	7,5g Agar/500mL
DMEM für HEK und C2C12-Zellen	DMEM + GlutaMAX-I 10%(v/v) FCS 1%(v/v) PENSTREP
DMEM für C3H10 T1/2 BreLuc	DMEM + GlutaMAX-I 10%(v/v) FCS 1%(v/v) PENSTREP 0,4%(w/v) G418-Disulfat
DMEM/Ham's 1:1 für ATDC5	DMEM/Ham's F12 1:1 5%(v/v) FCS 1%(v/v) PENSTREP
Insektenzellmedium für Sf9	Insect X-PRESS 5%(v/v) FCS 1%(v/v) PENSTREP
Insektenzellmedium für High5	IPL-41 1%(v/v) Lipid medium supplement 1%(v/v) PENSTREP
Transfektionsmedium HEK	Optimem

TABELLE 12: VERWENDETE MEDIEN

2.1.5 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE

Name	Sequenz
bambi full as	CAACAGGAGTCCAAGCTCAGC
bambi full s	CCTATAAAAATAGGCGTATC
Bambi n pet28 s_2	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
Bambi pMK1as	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
Bambi pMK1s	NNNACTAGTCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGTTTC
Bambi-ECD n pet28a as	NNNGAATTCCGCGTAGAATCGAGGAGACCGAGAGGGTTAGG
Bambi-ECD+BR1A-ICD as	NNNGGATTCGGCCA TGGCGCAGAGCTCCAGCTGCTGCAG
Bambi-ECD+BR1A-ICD s	NNNGATATCGTGCTGCTCACCAAAGGTGAAATTCGATGC
bambi-Seq as	NNNGCGGCCGCTCATACGAATTCAGCTTCCCGTGCCCACT
bambi-Seq s	GCGGTCATTGCCGTGCCAATTGCTGGAGGGCTG
bambi-TM-0 as	CAGCCCTCCAGCAATTGGCACGGCAATGACCGC
bambi-TM-0 s	NNNGGATCCCAAGAACTGGATAGTATGCTTC
bamHI_Bambi s	NNNAAGCTTTTATCATCGAATGCTGCCATCAAAAAAC
BR1A linker for Bambi as_2	NNNGAATTCCGCGTAGAATCGAGGAGACCGAGAGGGTTAGG
BR1A linker für Bambi s	GTGCCAGAGTGGTTTCG
BR1A-ECD as	NNNCCGCGGGCCATTGGAGTCATCCCAATTCGAAAAG
BR1A-ECD s	NNNGAATTCCGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGG
BR1A-ECD+Bambi-ICD as	GGATCCCAGAATCTGGATAGTATGC
BR1A-ECD+Bambi-ICD s	NNNGGATTCATCCTCTGGTGCTAAGGTTACTCC
BR1A-ICD rev	CGAAGTGAATAATAGAGGCTGCAGG
IE1-Promotor	TGGATATTGTTTCAGTTGCAAG
IE1-Terminator	CAACAACGGCCCTCGATA
M fel silent mut Bambi as	CTGCAGCCTCTATTATTCACCTCG
M fel silent mut Bambi s	NNNGGATCCATCCTCTGGTGCTAAGGTTACTCC
pJet fw	NNNGGATCCGGCCATGGCGCAGAGCTCCAGCTGCAG
pJet rev	NNNGCGGCCGCTCAGATTTTTACATCTTGGG
pQE80L3'	ATGTTGGCCCTGAGGAAACATTATTGCAAGAGC
pQE80L5'	CCTCAGGGCCAACATAATAAGCAACACTAAAATC
signal for poly as2	CACGGCAATGACCGCTCGAATGCTGCCATC
signal for poly s	NNNGATATCCAGAATCTGGATAGTATGCTTC
V5 aus PEF6 as_3	NNNGCTAGCATGGTGCTGCTCACCAAAGG
für kinetische PCR:	
bambi_fwd	CACTACAGCTTTCACGGACACC
bambi_rev	CACAGGTCAGACAGCAGTTCTC
beta Actin_fwd	ACTCTTCCAGCCTTCCTTC
beta Actin_rev	ATCTCCTTCTGCATCCTGTC

TABELLE 13: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE

2.1.6 VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Puffer/Lösung	Zusammensetzung
ALP-Assay Lysepuffer	100mM Glycin pH 9,6 1mM MgCl ₂ 1mM ZnCl 1%(v/v) Nonidet™ P40	STE-Puffer	50mM Tris-HCl pH 8,0 375mM Saccharose 1mM EDTA
ALP-Puffer	100mM Tris-HCl pH 9,5 100mM NaCl 5mM MgCl ₂	TAE (50x)	2M Tris-HCl pH 8,0 1M NaOAc 50mM EDTA
Coomassie-Färbelösung	250mL Essigsäure 99% (v/v) 1L Methanol 1,25L ddH ₂ O 6,25g Brilliant Blue R für 2,5L	TBE (10x)	890mM Trisborat 25mM EDTA
DNA-Ladepuffer (6x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylen Cyanol FF 30% (v/v) Glycerin (87% v/v)	TBS	10mM Tris-HCl pH 7,9 150mM NaCl
Lower Tris (4x)	1,5M Tris-HCl pH 8,8 (pH-Wert vor SDS-Zugabe einstellen) 0,4% (w/v) SDS	TBS-T	20mM Tris-HCl pH 7,5 500mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20 0,2% (v/v) Triton X-100
PBS (20x)	800g NaCl 20g KCl 178g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 27g KH ₂ PO ₄ x1H ₂ O pH 6,8 für 5L	Tfbl	30mM Kalium-Acetat pH 5,8 100mM RbCl 10mM CaCl ₂ 50mM MnCl ₂ 15% (v/v) Glycerin (87% v/v)
Proteinprobenpuffer (6x)	7mL Upper Tris (4x) 3mL Glycerin (87% v/v) 1,2mg Bromphenolblau 0,6mL 2-ME (frisch zugeben) für 10mL	TfblI	10mM MOPS, pH 6,5 75mM CaCl ₂ 10mM RbCl 15% (v/v) Glycerin (87% v/v)
SDS-Gel-Entfärber	10 % (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure (99% v/v)	Trypanblaulösung	0,2g Trypanblau 0,36g NaCl für 40mL
SDS-Laufpuffer (10x)	30g Tris-HCl 144g Glycin 10g SDS für 1L	Upper Tris (4x)	500mM Tris-HCl pH 6,7 pH-Wert vor SDS-Zugabe einstellen 0,4% (w/v) SDS

TABELLE 14: VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN

Alle Puffer und Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt und gegebenenfalls zur Sterilisation durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22µm filtriert oder autoklaviert.

2.1.7 VERWENDETE FERTIGANWENDUNGEN

Hersteller	Name	Zweck
5PRIME	PerfectPure RNA Cultured Cell Kit -50	Präparation von RNA aus Zellkultur
ClonTech	X-Fect Transfection Kit	Transfektion von HEK-Zellen
Fermentas	CloneJet PCR Cloning Kit	Klonierung und Amplifikation von DNA-Stücken
Qiagen	Plasmid <i>Plus</i> Mini Kit (100)	Präparation bakterieller DNA
Qiagen	Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit (100)	Präparation bakterieller DNA
Roche	High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Präparation viraler DNA
SLG	HiYield PCR clean-up/Gel Extraction Kit	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelstücken
Thermo Fischer	Phosphatase Substrate Kit	Substrat für die alkalische Phosphataseprobe
Thermo Scientific	SuperSignal West Pico Chemilumineszent Substrate	Substrat für meerrettichperoxidasegekoppelte Antikörper bei WesternBlot
Novagen	BacVector-3000 DNA Kit	Virensinfektion

TABELLE 15: VERWENDETE FERTIGANWENDUNGEN

2.2 METHODEN

2.2.1 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1.1 HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER BAKTERIEN

Medium	Zusammensetzung
LB Medium	25g/L LB Broth granulated (Melford), pH auf 7,4 einstellen
Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Tfbl	30mM Kalium-Acetat pH 5,8 100mM RbCl 10mM CaCl ₂ 50mM MnCl ₂ 15% (v/v) Glyzerin (87% v/v)
TfbII	10mM MOPS, pH 6,5 75mM CaCl ₂ 10mM RbCl 15% (v/v) Glyzerin (87% v/v)

TABELLE 16: VERWENDETE MEDIEN UND PUFFER

Um DNA gezielt in Bakterien einzubringen, werden Bakterien für die Aufnahme von Fremd-DNA durch Behandlung mittels der Rubidiumchloridmethode vorbereitet. Hierfür wird am Vortag eine Übernachtskultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsmarker bei 37°C und 130rpm aus einem Glyzerinstock angeimpft. Im Anschluss werden 100mL LB-Medium mit 1mL der Übernachtskultur des gewünschten *E.coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C und 130rpm bis zu einer OD_{600} von 0,4 inkubiert. Die Bakterienkultur wird dann für

15min in ein Eisbad überführt und nachfolgend für 5min (5000rpm, Eppendorf Centrifuge 5418) pelletiert. In der Folge werden die Bakterien in 40mL TfbI-Puffer aufgenommen und erneut 15min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation (5000rpm, 5min) wird das Bakterienpellet in 4mL TfbII-Puffer resuspendiert, zu jeweils 100µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erhaltenen Aliquots chemisch kompetenter *E.coli* können nun bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert werden.

2.2.1.2 TRANSFORMATION VON DNA IN *E. COLI*

Medien	Zusammensetzung
SOB-Medium	20g/l Bacto-Trypton 5g/l Bacto-Hefe-Extrakt 0,5g/l NaCl
SOC-Medium	SOB + 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glukose

TABELLE 17: VERWENDETE MEDIEN

Für die Transformation werden die tiefgefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10-100ng DNA oder 15µL eines Ligationsansatzes versetzt. Der Reaktionsansatz wird dann für 30min im Eisbad inkubiert. Es erfolgt ein Hitzeshock bei für 45s bei 42°C. Die Bakteriensuspension wird dann mit 300µL erwärmtem SOC-Medium versetzt und der Ansatz anschließend für 45min bei 37°C und 130rpm zur Expression des Resistenzgens inkubiert. Die Bakteriensuspension wird anschließend auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C zur Selektion von erfolgreichen Transformanden inkubiert. (Avery *et al.*, 1944)

2.2.1.3 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
TAE (50x)	2M Tris-HCl pH 8,0 1M NaOAc 50mM EDTA
TBE (10x)	890mM Trisborat 25mM EDTA

TABELLE 18: VERWENDETE PUFFER

Je nach Bedarf kommen zwei unterschiedliche Arten der Agarosegelelektrophorese zur Anwendung. Für die Analyse von PCR-Reaktionen bezüglich Reinheit und Ausbeute werden

TBE-gepufferte Gele verwendet. Hierfür wird 0,5-1,5% (w/v) Roti®Garose Agarose (Roth) mit 1x TBE-Puffer erhitzt und 0,01% (v/v) GelGreen Nucleic Acid Stain (Biotium) vor dem Erkalten zugegeben. Soll DNA aus einer enzymatischen DNA-Spaltungsreaktion oder einer PCR-Reaktion aufgereinigt werden, so wird der TBE-Puffer im oben beschriebenen Ansatz durch TAE-Puffer ersetzt. Für die Agarosegelelektrophorese werden die polymerisierten Gele in eine Gelkammer PerfectBlue (Peqlab) eingesetzt, die Taschen maximal mit der zu untersuchenden Probe beladen, 3-5µL des DNA-Größenstandards MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) in eine freie Tasche gegeben und für die Auftrennung der DNA-Fragmente eine Spannung von 100V für eine Stunde angelegt.

Für die Analyse werden TBE-Gele an einem UV-Transilluminator-System (Intas) photographiert wohingegen TAE-Gele auf einem Blaulicht-Transilluminator, z.B. DR-45M DarkReader (Clare Chemical Research) betrachtet werden, um die gewünschten Banden ohne UV-Lichtschäden aus dem Gel ausschneiden zu können.

2.2.1.4 DIE POLYMERASE-KETTEN-REAKTION

Zutat	Menge
DNA-Matrize	10-50ng
dNTP-Mix (2,5 mM)	1µL
Oligonukleotid 5' (10pM)	1µL
Oligonukleotid 3' (10pM)	1µL
Polymerasepuffer (5x)	10µL
Polymerase	0,25 µL
Wasser	ad 50µL

TABELLE 19: PCR-ANSATZ FÜR MUTAGENESE/AMPLIFIKATION EINES DNA-FRAGMENTS

Für den Transfer von DNA-Fragmenten in andere Vektoren oder der gerichteten Mutagenese von proteincodierenden Abschnitten wurde die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: *polymerase chain reaction*) (PCR) verwendet. In die Reaktion werden ein DNA-Stück aus einer vorherigen PCR oder ein Plasmid als Matrize, zwei Oligonukleotide (komplementär und die gewünschte Mutation enthaltend bei Basenaustauschen nach der Quik-Change™-Methode (Stratagene) bzw. den proteincodierenden Abschnitt flankierend bei Transfers), freie dNTPs und Phusion Polymerase (Fermentas) in einem definierten Volumen an Polymerase-spezifischem Reaktionspuffer eingesetzt (Verhältnis s. Tabelle 19) (Papworth, 1996).

Die Reaktion durchläuft repetitiv die drei Temperaturschritte Denaturierung, Anlagerung und Elongation, die bei einer regulären PCR konstant gehalten bzw. für die Anlagerungstemperatur bei einer *touchdown-PCR* in jedem Zyklus fortlaufend verändert werden. So wird der DNA-Doppelstrang während der Denaturierung in seine komplementären Einzelstränge aufgebrochen, während der Anlagerung die Oligonukleotide an die komplementäre Matrize angelagert und während der Elongation ein zu dieser komplementärer DNA-Strang von der Polymerase, von den angelagerten Oligonukleotiden ausgehend, unter Verwendung der dNTPs synthetisiert. (Mullis *et al.*, 1986)

Wird ein DNA-Transfer in einen anderen Vektor angestrebt, so wird das bei der PCR entstandene Fragment über ein TAE-Gel gereinigt und in den Zwischenvektor pJet1.2 nach Protokoll des Herstellers ligiert. Anschließend wird der Ligationsansatz in *E.coli Novablue*[™] transformiert und positive Klone einer Plasmidpräparation unterzogen und das erhaltene Plasmid im Anschluss hausintern oder bei auswärtigen Dienstleistern (GATC, LGC Genomics) sequenziert. Auf diese Weise können geeignete DNA-Fragmente amplifiziert und für die weitere Verarbeitung gewonnen werden. Im Anschluss werden Zielvektor und Zwischenvektor mit entsprechenden Restriktionsenzymen und spezifischem Puffer 1h bei 37°C verdaut. Der geschnittene Zielvektor wird mit 10U alkalischer Phosphatase (NEB) für 20min bei 37°C dephosphoryliert. In der Folge werden die beiden Ansätze vollständig auf ein TAE-Gel geladen, ausgeschnitten und mit HiYield PCR clean-up/Gel Extraction Kit (SLG) nach Herstellerangaben gereinigt. Anhand des Gels und der Fragmentlänge der DNA-Stücke wird das Mischverhältnis zwischen verdautem Plasmid und einzufügendem DNA-Stück in etwa äquimolar eingestellt und mit T4 Ligase (Fermentas) 1h bei RT ligiert. Nach erfolgter Ligation werden 15µL des Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E.coli NovaBlue*[™] transformiert (siehe 2.2.3). Über eine Kolonien-PCR (siehe 2.2.9) wird erneut vorselektioniert und bei positiven Klonen der korrekte Einbau des fehlerfreien DNA-Fragments über eine Sequenzierung verifiziert.

Im Fall des Basenaustauschs entsteht als Produkt der oben beschriebenen PCR ein vollständiges linearisiertes zirkuläres Plasmid mit zwei Einzelstrangbrüchen, das die Mutation an der gewünschten Stelle trägt. Im weiteren wird der Ansatz mit 10U der Endonuklease DpnI, die spezifisch methylierte DNA, also die Matrize, abbaut, für 1h bei 37°C inkubiert. So verbleibt nur noch die unmethylierte neu synthetisierte DNA, von welcher im

Anschluss 15µL in chemisch kompetente *E.coli NovaBlue™*, die die Einzelstrangbrüche der DNA reparieren, transformiert werden (s. 2.2.1.2).

Von mehreren Klonen wird nun eine Plasmidpräparation durchgeführt und die Plasmide durch Polymerase-Kettenreaktion (Kolonien-PCR) und Sequenzieren auf die erfolgte Mutation überprüft. Korrekt mutierte Plasmide können für die rekombinante Proteinexpression eingesetzt werden.

Schritt	Temperatur in [°C]	Dauer in [s]
Initiale Denaturierung	95	300-600
Denaturierung	95	30-60
Annäherung	55-70*	30-60
Elongation	72	30-300**
finale Elongation	72	120-600
Kühlung	4	∞

20-30
Zyklen

* abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide

** abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNS-Fragments

TABELLE 20: PCR-PROGRAMM FÜR MUTAGENESE/AMPLIFIZIERUNG EINES DNA-FRAGMENTS

2.2.1.5 DIE KOLONIEN-POLYMERASE-KETTENREAKTION (KOLONIEN-PCR)

Zutat	Menge
eine Kolonie	
dNTP-Mix (2,5 mM)	1µL
Oligonukleotid 5' (10pM)	1µL
Oligonukleotid 3' (10pM)	1µL
Taq-Polymerasepuffer (10x)	5µL
Taq-Polymerase	0,25 µL
MgCl ₂	1µL
Wasser	ad 30µL

TABELLE 21: ZUSAMMENSETZUNG EINER KOLONIEN-PCR

Zur Verifizierung von Klonierungen müssen die neu hergestellten Konstrukte bei einem externen Dienstleister sequenziert werden. Hierfür wurden die selektierten Klone zunächst durch einen Kolonien-PCR-Ansatz (s. Tabelle 21) auf das Vorhandensein überprüft.

Es werden das eingebaute DNA-Fragment flankierende Oligonukleotide, die für die Sequenzierung benutzt werden, verwendet. Es ergibt sich ein der bereits beschriebenen PCR ähnliches Programm mit einem verlängerten ersten Denaturierungsschritt, um die Bakterien zu lysieren und ein Freisetzen der DNA zu ermöglichen. Zudem wird im Vergleich zu oben

beschriebener PCR die Elongation verlängert, da die verwendete Taq-Polymerase eine etwa halb so schnelle Synthesegeschwindigkeit besitzt.(s. Tabelle 22)

Im Anschluss wird DNA-Ladepuffer zugegeben, die Proben auf ein TBE-Gel (s. 2.2.1.3) geladen, das Gel ausgewertet und anhand der Ergebnisse geeignete Klone gewählt, die für die Sequenzierung geeignet sind.

Schritt	Temperatur in [°C]	Dauer in [s]
Initiale Denaturierung	95	600-1200
Denaturierung	95	30
Annäherung	55	30
Elongation	72	30-300*
finale Elongation	72	120-600
Kühlung	4	∞



30
Zyklen

* abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNS-

TABELLE 22: KOLONIE-PCR-PROGRAMM

2.2.1.6 HERSTELLUNG VON CDNA FÜR DIE KINETISCHE PCR

Zutat	Menge
extrahierte mRNS	2µg
dNTPs (10 nM)	0,5µL
Oligo-dT-Primer (100µM)	0,4µL
M-MLV RT-Puffer (5x)	2µL
Wasser	ad 10µL

TABELLE 23: ANSATZ FÜR REVERSE TRANSKRIPTION

Um die Anwesenheit und die Anzahl der exprimierten RNA-Kopien von *hbambi* in den für Zellassays verwendeten Zelllinien zu bestimmen, wird die mRNA von jeweils einer Million Zellen mit Hilfe des PerfectPure RNA Cultured Cell Kit -50 nach Herstellerangaben isoliert. Im Anschluss wird mit reverser Transkriptase aus der mRNA eine Intron-freie Erststrang-Einzelstrang-cDNA hergestellt (s. Tabelle 23).

Hierfür wird der Ansatz für zwei Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend 80U MMLV H (-) Point Mutant Reverse Transkriptase (Promega) zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Der erhaltene Reaktionsansatz wird umgehend, wie im Folgenden beschrieben, für die kinetische PCR eingesetzt.

2.2.1.7 DIE KINETISCHE PCR

Zutat	Menge
Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix (Thermo Scientific)	10µL
Oligo-dt-Primer (50µM)	je 0,12µL
cDNA als Matrize aus reverser Transkriptasereaktion (1:20)	2µL
Wasser	ad 20µL

TABELLE 24: ANSATZ FÜR KINETISCHE PCR

Die kinetische PCR (kPCR) kann zur Quantifizierung von DNA verwendet werden. Ein in die DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff kann, eingesetzt in eine kPCR nebst sequenzspezifischer Oligonukleotide, die neu synthetisierte PCR-Produktmenge nach jeder Elongationsphase in Echtzeit quantifizierbar machen. Vergleicht man nun die erhaltenen Produkte mit einer parallel erfolgten kPCR mit Oligonukleotiden für ein ausgewähltes konstitutiv exprimiertes Gen (*housekeeping gene*), so lässt sich auf die ursprüngliche Anzahl Kopien im Verhältnis zum erstellten Standard des *Housekeeping*-Gens rückschließen. (Kubista *et al.*, 2006) In dieser Arbeit wurde die kPCR auch für die Bestimmung des Virentiters bei Virusamplifikationen eingesetzt (s. 2.2.5.2.4). Hierfür wird aus 200µL des Virenüberstands mit Hilfe des High Pure Viral Nucleic Acid Kits (Roche) nach Herstellerangaben die virale DNA extrahiert. Der Standard wurde vorab von Frau Eva-Maria Muth erstellt und regelmäßig überprüft. Zum anderen wird mit Hilfe der kinetischen PCR die Kopienzahl für ein bestimmtes Protein kodierende RNA-Moleküle in einer definierten Zellzahl ermittelt, indem die mRNA isoliert, mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (s. 2.2.1.6) und als Matrize in eine kinetische PCR eingesetzt wird.

Die Versuche wurden an einem Carousel-based LightCycler 2.0 (Roche) durchgeführt. Zu Beginn wird über eine Reaktion mit Temperaturgradient die optimale Schmelztemperatur der Oligonukleotidpaare ermittelt. Ist die optimale Schmelztemperatur der Oligonukleotide bestimmt, so wird die eigentliche kPCR durchgeführt. Die Probenansätze sind Tabelle 24 und der Programmablauf Tabelle 25 zu entnehmen. Die cDNA aus der reversen Transkription wird im Verhältnis 1:20 verdünnt. Dies geschieht, da so die Menge an überführten Oligonukleotiden und reverser Transkriptase aus der vorherigen Reaktion, welche die die nachfolgende PCR-Reaktion hohem Maß stören, klein gehalten wird (Chumakov, 1994).

Schritt	Temperatur in [°C]	Dauer in [s]
Initiale Denaturierung	95	900
Denaturierung	95	15
Annäherung	52-60*	15
Elongation	72	20
Detektion	78	10
Schmelzpunktanalyse	95**	10

40
Zyklen

* abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide

** anschließend Temperaturreduktion von 95-60°C (-0,3°C/s)

TABELLE 25: PROGRAMM DER KINETISCHEN PCR

Im Anschluss an die kinetische PCR erfolgt direkt die Schmelzpunktanalyse zur Überprüfung, ob es sich bei dem erhaltenen PCR-Produkt ausschließlich um das gewünschte spezifische Fragment handelt oder ob sekundäre Nebenprodukte durch eine fehlerhafte Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA entstanden sind. Ist eine Virentiterbestimmung erwünscht, kann hier direkt der Virentiter der untersuchten Probe ermittelt werden.

In der Folge werden die Proben mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein TBE-Gel aufgetragen (s. 2.2.1.3). Ist eine definierte Bande der richtigen Größe zu sehen, so wird mit Hilfe der kinetischen PCR das gewünschte DNA-Stück amplifiziert und die ursprüngliche Kopienzahl kann in Relation zu 10.000 Molekülen des *housekeeping*-Gens β -Aktin bestimmt werden.

2.2.2 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE

2.2.2.1 PRÄPARATIVE PROTEINEXPRESSION IN LB-MEDIUM

Medium	Zusammensetzung
LB Medium	25g/L LB Broth granulated (Melford), pH auf 7,4 einstellen

TABELLE 26: VERWENDETES MEDIUM

Für die Herstellung von rekombinantem Protein, wird das Expressionsplasmid, in welches das gewünschte Gen kloniert wurde, in einen *E.coli* Expressionsstamm transformiert und ausplattiert (s. 2.2.1.2). Die Erstellung der Expressionskultur erfolgt stufenweise. Zunächst wird eine sogenannte Übertagkultur von 3mL Kulturvolumen mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und für mindestens 6h bei 37°C und 130rpm fermentiert. Aus dieser Vorkultur wird nun 1mL in 200mL LB-Medium samt der entsprechenden Menge an Antibiotikum überimpft und über Nacht erneut bei 37°C und 130rpm inkubiert. Am Folgetag

werden nun zwei bis sechs 2,5L-Erlenmeyerkolben (mit Schikanen zur besseren Belüftung) mit bis zu 800mL LB-Medium inklusive der benötigten Menge an Antibiotikum vorbereitet und mit der Übernachtskultur auf eine anfängliche Zelldichte von $OD_{600}=0,1$ inokuliert. Die Bakterienkulturen werden dann bei 37°C und 130rpm fermentiert und im weiteren Verlauf in regelmäßigen Abständen deren optische Dichte bestimmt. Erreicht diese einen Wert von ungefähr $OD_{600}=0,6$, so wird die rekombinante Proteinexpression durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1mM gestartet. Eventuell davon abweichende Werte müssen in Vorversuchen optimiert werden. Die Überexpression wird nach vier Stunden beendet und die Bakterienmasse durch Zentrifugation für 20min (Beckman Coulter, Avanti JE, JA-10, 6.000rpm, 4°C) geerntet. Der Medienüberstand wird verworfen, das Feuchtgewicht des Bakterienpellets bestimmt und dieses bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.2.2 ZELLAUFSCHLUSS UND PRÄPARATION DER EINSCHLUSSKÖRPER

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
STE-Puffer	50mM Tris-HCl pH 8,0 375mM Saccharose 1mM EDTA
Res-Puffer	100mM Tris-HCl pH 8,0 6M GuHCl

TABELLE 27: VERWENDETE PUFFER

Das eingefrorene Zellpellet wird auf Eis aufgetaut und mit 20 Volumenteilen STE-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen wird durch Zugabe einer Spatelspitze Lysozym (Roth) initiiert und die Suspension wird für zehn Minuten im Eisbad inkubiert. Anschließend erfolgt die vollständige Lyse durch Behandlung der Suspension mit Ultraschall unter Kühlung im Eisbad (Bandelin, Sonopuls, 100% Intensität, 30s Puls, 30s Pause, 10min) ehe lösliche und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation für 45min (JLA-16.250, 16.000rpm, 4°C) voneinander abgetrennt werden. Die Ultraschallbehandlung wird mit dem unlöslichen Pellet der Zentrifugation zweimal wiederholt.

In der Folge werden die unlöslichen Bestandteile in STE-Puffer resuspendiert und für 45min (JLA-16.250, 16.000rpm, 4°C) pelletiert. Die Einschlusskörper werden erneut mit STE-Puffer mit 1% (v/v) Triton X-100 (Roth) gewaschen und erneut für 45min (JLA-16.250, 16.000rpm, 4°C) zentrifugiert. Es erfolgt ein weiterer Waschschriff, um das Detergenz Triton X-100 auszuwaschen. Nun wird das Feuchtgewicht der vorliegenden mechanisch aufgereinigten Einschlusskörper bestimmt und die enthaltenen Proteinbestandteile durch Zugabe von fünf

Volumenteilen (w/v) Res-Puffer extrahiert. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation für eine Stunde (JA25.50, 25.000rpm, 4°C) abgetrennt. Das gelöste denaturiert vorliegende Protein kann unter diesen Pufferbedingungen bei RT aufbewahrt werden.

2.2.2.3 RENATURIERUNG DER EXTRAZELLULÄREN DOMÄNE VON HUMANEM BAMBI

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Dialyse-Puffer	50mM Tris-HCl pH 8,0 150mM NaCl
Res-Puffer	100mM Tris-HCl pH 8,0 6M GuHCl
Rück-Puffer	20mM HEPES pH 8,0 300mM NaCl

TABELLE 28: VERWENDETE PUFFER

Für die Renaturierung der denaturiert vorliegenden Proteine wie z.B. der extrazellulären Domäne von hBambi wird die gewünschte Proteinmenge gelöst in Res-Puffer mit 1:1000 (v/v) mit 2-Mercaptoethanol (2-ME) versetzt und die Proteinlösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um Cystinbrücken vollständig zu reduzieren. Im Anschluss wird die Proteinlösung unter Rühren in eiskalten Rück-Puffer eingetropft, so dass eine Proteinendkonzentration von 90µg/mL resultiert. Der Rückfaltungsansatz wird nun für 24h unter Rühren bei 4°C inkubiert und im Anschluss zweimal jeweils gegen das zehnfache Volumen Dialyse-Puffer dialysiert. Eventuell entstandenes Präzipitat wird durch Zentrifugation für 45min (JLA-16.250, 16.000rpm, 4°C) pelletiert und verworfen. Der Protein-enthaltende Überstand wird nun direkt der chromatographischen Reinigung unterzogen.

2.2.2.4 CHROMATOGRAPHISCHE TRENNMETHODEN

Um rekombinant hergestellte Proteine von Kontaminationen durch intrinsische Zellbestandteile abzutrennen, wird die Flüssigkeitschromatographie eingesetzt. Hierbei nutzt man verschiedene eindeutige Eigenschaften von Proteinen bezüglich ihrer Ladung, Größe und Hydrophobizität als Alleinstellungsmerkmal gegenüber Verunreinigungen zu deren Separation. Die Chromatographie kann entweder Säulen-gestützt oder im sogenannten Batch-Verfahren erfolgen. Beide Methoden unterscheiden sich grundsätzlich darin, wie die zu reinigende Proteinlösung auf das Chromatographiematerial appliziert wird.

Beim Säulen-gestützten Verfahren befindet sich das jeweilige Chromatographiemedium in einem Säulenkörper, der an ein größtenteils automatisiertes und computergestütztes Kolbenpumpensystem samt Detektoren angeschlossen ist. In dieser Arbeit wurden hierfür die Systeme Biorad Duoflow (Biorad) sowie die beiden Äkta-Systeme Prime und Purifier (beide Amersham) eingesetzt.

Soll Protein aus einem sehr großen Volumen ($\geq 1\text{L}$) extrahiert werden, für das ein pumpengestützter Auftrag sehr zeitintensiv wäre, so wird aus Gründen der Proteinstabilität und Zeitersparnis das sogenannte Batch-Verfahren angewendet. Hierbei wird, abhängig der zu erwarteten Proteinmenge und der spezifischen Bindekapazität das Separationsmedium direkt zur Proteinlösung gegeben und dieses anschließend entweder über schonende Zentrifugation oder Schwerkraftfluss sedimentiert.

2.2.2.4.1 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Ni/Co-Bindepuffer	50mM Tris-HCl pH 8,0 300mM NaCl 20mM Imidazol
Ni/Co-Elutionspuffer	50mM Tris-HCl pH 8,0 300mM NaCl 500mM Imidazol

TABELLE 29: VERWENDETE PUFFER

Für die hier durchgeführte Affinitätschromatographie wurde ein Agarose-basiertes Medium verwendet, an das Ni^{2+} - oder Co^{2+} -Ionen gebunden sind. Zur Verwendung kamen 1mL- oder 5mL-Fertigsäulen (GE Healthcare) oder freies Ni^{2+} -Agarose-Medium His-Buster Nickel Affinity Gel (Amocol). Die Interaktion findet zwischen Medium und dem Zielprotein über eine C- oder N-terminal angefügte Hexahistidin-Peptidsequenz statt, die an die immobilisierten Metallionen auf der Oberfläche des Mediums binden. Das Nickelmaterial wird anschließend mit Ni/Co-Bindepuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine vom Säulenmaterial zu entfernen. In der Folge wird entweder im Fall des Batch-Verfahrens mit Ni/Co-Elutionspuffer in 3mL Elutionsfraktionen bzw. über einen linearen Gradienten von 20mM-500mM im Fall der pumpengestützten Säulenchromatographie mit 1mL Fraktionen eluiert. Von potentiell Protein-enthaltenden Fraktionen wird im Anschluss eine Probe für die SDS-PAGE (s. 2.2.3.1) entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Das Medium kann nach Reinigung in 20% Ethanol gelagert und mehrere Male wieder verwendet und bei nachlassender Bindekapazität nach Herstellerangaben regeneriert werden.

2.2.2.4.2 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE (IEX)

Das der Ionenauschromatographie zu Grunde liegende Prinzip beruht auf der Separation von unterschiedlichen Proteinen ob ihres amphoteren Verhaltens abhängig vom pH-Wert der Lösung (s. Abbildung 6).

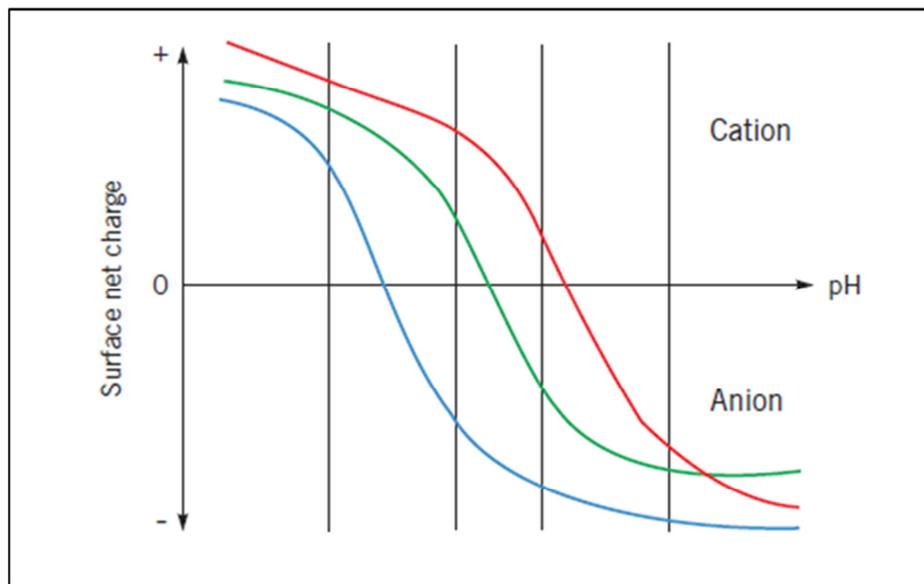


ABBILDUNG 6: THEORETISCHE PROTEINTITRATIONS-KURVEN

Gezeigt ist die Abhängigkeit der Nettoladung von Proteinoberflächen vom pH-Wert der umgebenden Lösung. Der Schnittpunkt der jeweiligen Kurve mit der x-Achse wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet und gibt denjenigen pH-Wert an, bei dem die theoretische Nettogesamtladung des Proteins 0 ist. Bei einem pH-Wert $> pI$ ist das Protein negativ geladen und bindet folglich an positiv geladenes Anionenaustausch-Säulenmaterial. Umgekehrt sorgt ein pH-Wert $< pI$ für die Bindung an negativ geladenes Material eines Kationenaustauschers. Die Graphik dient der Auswahl des zu verwendenden Säulenmaterials und der Pufferkomposition abhängig vom zu reinigenden Protein. Die Abbildung ist dem Handbuch *IEX-Chromatography and Chromatofocusing* von GE Life Sciences (S. 11, Abbildung #2) entnommen. © 2014, General Electric Company – Reproduced by permission of the owner

Da die Komposition der Aminosäureseitenketten auf der Oberfläche für jedes Protein charakteristisch ist, unterscheiden sich Proteine, abhängig vom sie umgebenden pH-Wert des Puffers, hinsichtlich ihrer Bindestärke zu positiv oder negativ geladenem Säulenmaterial und können mit steigender NaCl-Konzentration bei einer definierten Ionenstärke vom Säulenmaterial abgelöst werden.

In dieser Arbeit wurden 1mL SP-Sepharose-FF-Säulen als Kationenaustauscher bzw. 1mL Q-Sepharose-FF-Säulen (beide GE-Healthcare) als Anionenaustauscher eingesetzt. Zur Elution

wurde unter Verwendung des Äkta Prime- oder Purifier-Systems ein linearer Gradient von 50mM bis 2M NaCl verwendet. Die Fraktionierung erfolgte, wenn nicht anders angegeben zu 1mL Fraktionen. Anschließend werden anhand des UV-Elutionsprofils geeignete Fraktionen ausgewählt und wie in Punkt 2.2.12.1 beschrieben Proben entnommen und für die SDS-PAGE aufbereitet.

2.2.2.4.3 REVERSED-PHASE-HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (RP-HPLC)

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
HPLC-Puffer A	0,1% (v/v) TFA
HPLC-Puffer B	100% (v/v) Acetonitril
Proteinprobenpuffer (1x)	7mL Upper Tris (4x) 3mL Glyzerin (87% v/v) 1,2mg Bromphenolblau 0,6mL 2-ME (frisch zugeben) für 60mL

TABELLE 30: VERWENDETE PUFFER

Um Proteine auf eine besonders hohe Reinheitsstufe aufzureinigen und/oder gleichzeitig für eine massenspektrometrische Untersuchung zu entsalzen, wird die Umkehrphase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchgeführt. Die Methode beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine mit einer stationären hydrophoben Phase, die z.B. durch C4-Alkylreste an der Matrix der verwendeten Kieselgelsäulen erzeugt werden. So können Proteine mit höherer Polarität der Oberfläche bei geringeren Konzentrationen eines apolaren Lösungsmittels von der Matrix gelöst werden, während Proteine mit hohen Anteilen an apolaren Oberflächen hingegen sehr hohe Lösungsmittelkonzentrationen benötigen. Aufgrund ihrer sehr kleinen Partikelgröße ergibt sich eine hohe Trennschärfe, so dass sich die RP-HPLC außerdem hervorragend eignet, um die Reinheit und die Homogenität eines Proteins im Detail zu analysieren. Verwendet wurden eine 1mL Jupiter 5u C4 300A-Säule für analytische bzw. eine 10mL Jupiter 10u C4 300A-Säule (beide Phenomenex) jeweils inklusive Vorsäule für präparative Chromatographien.

Für die Durchführung am Biorad Duoflow-FPLC-System wird die zu untersuchende Proteinprobe mit 0,1% (v/v) TFA versetzt, in eine Injektionsschleife geladen, auf eine mit

HPLC-Puffer A äquilibrierte Säule gepumpt und diese anschließend bis zum Erreichen der Basislinie UV_{280} mit HPLC-Puffer A gespült. Um die gebundenen Proteine von der stationären Phase zu eluieren, wird ein linearer Gradient über 10-20 Säulenvolumen HPLC-Puffer B angelegt und Fraktionen zu 1mL Volumen gesammelt. Alle Trennläufe finden bei einer konstanten Flussrate von 0,5mL/min statt.

Anhand des UV-Absorptionsprofils des Chromatogramms werden proteinenthaltende Fraktionen ausgewählt und von diesen Proben für eine SDS-PAGE aufbereitet und untersucht. Hierfür werden die Proben nicht wie beschrieben behandelt, da der Anteil an Acetonitril die Dichte der Proben verringert und so das Beladen der Geltaschen unmöglich macht. Zudem ist durch die in den Proben vorhandene Trifluoressigsäure der pH der Probe als auch das Laufverhalten der Proteine im Gel beeinträchtigt. Daher werden den zu untersuchenden Fraktionen jeweils 50 μ L entnommen, bei -80°C eingefroren und die Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Anschließend wird das gefriergetrocknete Protein in 25 μ L Proteinprobenpuffer (1x) aufgenommen und zur Neutralisation des pH-Wertes mit 3 μ L 1M Tris-HCl pH 8.0 versetzt und anschließend ein SDS-Gel damit beladen.

Ausgewählte Fraktionen werden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung mittels einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 (Christ) gefriergetrocknet und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

2.2.3.1 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE)

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Lower Tris (4x)	1,5M Tris-HCl pH 8,8 (pH-Wert vor SDS-Zugabe einstellen) 0,4% (w/v) SDS
Proteinprobenpuffer (6x)	7mL Upper Tris (4x) 3mL Glyzerin (87% v/v) 1,2mg Bromphenolblau 0,6mL 2-ME (frisch zugeben) für 10mL
SDS-Laufpuffer (10x)	30g Tris-HCl 144g Glyzin 10g SDS für 1L
Upper Tris (4x)	500mM Tris-HCl pH 6,7 pH-Wert vor SDS-Zugabe einstellen 0,4% (w/v) SDS

TABELLE 31: VERWENDETE PUFFER

Um Proteine in Gemischen detektieren und charakterisieren zu können, wird eine Auftrennung des Gemischs mittels Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970). Dadurch können Aussagen über das apparente Molekulargewicht und die Reinheit der aufgetragenen Proteine getätigt werden. Die Porengröße der SDS-Gele wird durch Variation des Polyacrylamid-Gehalts und somit des Vernetzungsgrades je nach Bedarf bei deren Herstellung eingestellt (s. Tabelle 32).

Trenngel	10%	12%	15%
Rotiphorese 29:1 in mL	2,5	3	4
4x Lower in mL	2,5	2,5	2,5
87%(v/v) Glyzerin in mL	2	2	2
Wasser in mL	3	2,5	1,5
40%(w/v) APS in µL	15	15	15
TEMED in µL	15	15	15
Sammelgel	4%		
Rotiphorese 29:1 in mL	0,5		
4x Upper in mL	1,25		
Wasser in mL	3,2		
40%(w/v) APS in µL	15		
TEMED in µL	15		

TABELLE 32: REZEPT FÜR JE ZWEI SDS-GELE

Hierfür werden je zwei gereinigte Glasplatten pro Gel in eine BioRad-Gelgieß-Apparatur eingesetzt, die Trenngellösung eingegossen und bis zu deren Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach Entfernen des Isopropanols wird das polymerisierte Trenngel mit der oben angegebenen Sammelgellösung überschichtet und ein Kamm für die Probestaschen eingefügt. Ist auch die Polymerisation des Sammelgels erfolgt, wird das/werden die Gele in eine Mini PROTEAN Tetra Cell-Laufkammer (BioRad) eingespannt und mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet. Jeweils 50µL der zu untersuchenden Probe werden mit 10µL 6x Proteinprobenpuffer versetzt. Die Proben werden anschließend bei 95°C für fünf Minuten gekocht und anschließend in die Probestaschen des Gels geladen. Die Bindung des denaturierenden Detergenz SDS an Proteine erfolgt proportional zu deren Molekulargewicht. Die negative Ladung des gebundenen Detergenz übersteigt dabei die intrinsische Ladung des Proteins. Dodecylsulfat bewirkt eine vollständige Entfaltung und somit Linearisierung der Peptidkette. Optional zugesetztes 2-Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken. (Abbas, 1991)

Sofern nicht anders beschrieben, sind sämtliche Gele, die in dieser Arbeit abgebildet sind, bezüglich ihres Polyacrylamidgehalts zwölfprozentig und die Trennung erfolgte für 45min bei 300V Spannung. Pro Geltasche wurden 5µL Protein-Größenstandard Unstained Protein Molecular Weight Marker (herkömmliche Gele)/PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Western Blot) (beide von Fermentas) oder 15µL Proteinprobe aufgetragen.

2.2.3.2 ANFÄRBUNG VON PROTEINGELEN

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Coomassie-Blau-Färbelösung	250mL Essigsäure 99% (v/v) 1L Methanol 1,25L ddH ₂ O 6,25g Brilliant Blue R für 2,5L
SDS-Gel-Entfärber	10 % (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure (99% v/v)

TABELLE 33: VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN

Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Trenngel für 30min in Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt, ehe der Gelhintergrund mit SDS-Gel-Entfärber so lange entfärbt wird, bis Proteinbanden deutlich zu sehen sind. Die untere Nachweisgrenze für Proteine bei

Verwendung von Coomassieblau-Färbungen liegt in etwa bei 100ng Protein. (Kang *et al.*, 2002)

2.2.3.3 SILBERFÄRBUNG

Lösung	Dauer in s
60mL 50% (v/v) Aceton, 50%(w/v) TCA, 25µL 37% (v/v) Formaldehyd	300
Wasser	3*5
Wasser	300
Wasser	3*5
60mL 50% (v/v) Aceton	300
100µL 10% (w/v) Natriumthiosulfat in Wasser	60
Wasser	3*5
0,8mL 20% (w/v) Silbernitrat, 0,6mL 37% (v/v) Formaldehyd in 60mL Wasser	480
Wasser	5*5
1,2g Natriumcarbonat, 25µL 37%(v/v) Formaldehyd, 25µL 10% (w/v) Natriumthiosulfat in Wasser	30
2% (v/v) Essigsäure	30
Wasser	10

TABELLE 34: ABFOLGE DER INKUBATION DES GELS MIT VERSCHIEDENEN LÖSUNGEN ZUR SILBERFÄRBUNG VON SDS-GELEN

Sollen Proteinbanden mit weniger als 100ng Protein wegen geringer erwarteter Mengen oder zur Überprüfung der Reinheit angefärbt werden, so wird hierfür eine Silberfärbung durchgeführt. Hierfür wird das Gel für die Entwicklung mit jeweils 30mL verschiedener Lösungen versetzt, bis die Banden sichtbar sind (s. Tabelle 34).

2.2.3.4 WESTERNBLOT

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
ALP-Puffer	100mM Tris-HCl pH 9,5 100mM NaCl 5mM MgCl ₂
TBS	10mM Tris-HCl pH 7,9 150mM NaCl
TBS-T	20mM Tris-HCl pH 7,5 500mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20 0,2% (v/v) Triton X-100

TABELLE 35: VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN

Beim Western- oder Immunoblot-Analyse werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine spezifisch über Antikörperbindung an proteineigene Antigene nachgewiesen. Zu diesem Zweck werden die zu untersuchenden Proteinproben zunächst auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. 2.2.3.1). Im Anschluss werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel mit einem SC-REL-SB10 (Roth) bei einer für eine Stunde angelegten Spannung von 100V im Nassblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Auf der Membran werden nach dem Transfer die für den Antikörper unspezifischen Bindestellen mit Blocking Reagent (5PRIME) Blockierlösung abgesättigt, ehe mit einem spezifischen Antikörper das entsprechende Antigen detektiert werden kann (s. Tabelle 36).

Lösung	Dauer in min
TBS-T	3*10
TBS	3*10
Blockierlösung Blocking Reagent (5PRIME)	60
TBS-T	3*10
TBS	3*10
primärer Antikörper 1:2000 in Blockierlösung	60
TBS-T	3*10
TBS	3*10
Sekundärer Antikörper 1:8000 in TBS	30
TBS-T	3*10
TBS	3*10

TABELLE 36: PROTOKOLL DER WASCH- UND INKUBATIONSSCHRITTE FÜR EINE TYPISCHE WESTERNBLOT-ANALYSE

Nach dem abschließenden Waschschrift wird der Blot entwickelt. Wird ein Antikörper mit gekoppelter Meerrettichperoxidase (HRP; engl.: *horse_raddish peroxidase*) verwendet, so werden pro zu entwickelnder Blotmembran jeweils 1mL beider Lösungen des SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) für fünf Minuten bei RT in der Dunkelkammer zugegeben und der Blot geschwenkt. Anschließend wird der Blot in eine Autoradiographiemappe überführt und ein Röntgenfilm AGFA Chronex5 (AGFA) für 1-60 Minuten aufgelegt. Es kommt zu einer Meerrettichperoxidase-vermittelten Chemilumineszenz des Luminols, die den Röntgenfilm an den an den durch den Antikörper besetzten Stellen belichtet. Der belichtete Film wird nun in Entwicklerlösung (Kodak) überführt und anschließend die Lichtempfindlichkeit des Films in Fixiererlösung negiert.

Wird hingegen ein Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase verwendet, so wird die Membran zunächst für zehn Minuten mit ALP-Puffer gewaschen. Anschließend wird 30µL

NBT-BCIP-Lösung (Sigma) mit 10mL ALP-Puffer gemischt und die Membran unter Schwenken so lange bei RT inkubiert, bis deutlich durch Formazanbildung angefärbte Banden sichtbar werden.

2.2.3.5 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN

Aufgereinigte Proteinlösungen unbekannter Konzentration werden mit einem UV-Spektrophotometer Evolution-300 (Thermo Electron Corporation) in einer Glasküvette (Schichtdicke $d = 1\text{cm}$) vermessen. Hierfür wird ein UV-Spektrum im Wellenlängenbereich 250-320nm aufgenommen. Mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes kann mit dem Extinktionswert A_{280} die Proteinkonzentration c [g/L] näherungsweise bestimmt werden:

$$c = A_{280} / (\epsilon_{280} * d)$$

Für linearisierte Proteine theoretisch anhand dem Verhältnis der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zu nicht-Aromaten berechnete Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden durch Eingabe der Aminosäuresequenz in das Internetprogramm ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) berechnet und sind in Tabelle 37 aufgelistet.

Protein	Molare Masse [Da]	Extinktionskoeffizient ϵ_{280} [1/(M*cm)]
Bambi-ECD_2xHis	17895,9	12085
Bambi-ECD_1xHis_Thrombin-verdaut	15956,8	12085
Bambi-ECD_ZK	22204,7	24575
TEV Protease	28350,1	33710
Bambi-ECD_TRX_32_TEV-verdaut	32756,9	38680
Bambi-ECD_TRX_32	22170,6	17585

TABELLE 37: BERECHNETE MOLARE MASSEN UND EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN DER VERWENDETEN PROTEINE

2.2.4 BIOPHYSIKALISCHE METHODEN

2.2.4.1 COMPUTER-GESTÜTZTE ERSTELLUNG EINES HOMOLOGIEMODELLS DER EXTRAZELLULÄREN DOMÄNE VON HBAMBI

Zur Unterstützung der Arbeitshypothese wurde zu Beginn ein 3D-Homologiemodell für die extrazelluläre Domäne von humanem Bambi erstellt. Hierfür wurde zunächst mit verschiedenen Programmen die Aminosäuresequenz auf das Vorhandensein charakteristischer Motive wie z.B. Transmembranelemente überprüft. Im Anschluss wurde die so ermittelte Sequenz des Extrazellularanteils mit potentiellen homologen Sequenzen

mit bekannter Struktur verglichen und die Sequenz mit der höchsten Übereinstimmung ermittelt (ClustalW - <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

In der Folge wurden der Sequenzvergleich und die Strukturdaten für das Sequenzhomolog in das Programm SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org>) eingelesen und mit dem Programm automatisiert ein Homologiemodell erstellt. Dieses initiale Modell wurde nachfolgend mit Hilfe des Programms Quanta (Accelrys) und die dort integrierten Programmmodule manuell überarbeitet und so weit optimiert, bis keine in der Natur unmöglichen Strukturen mehr vorhanden sind.

2.2.4.2 ANALYTISCHE GELFILTRATION

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Gelfiltrationspuffer	50mM Tris-HCl pH 8,0 300mM NaCl

TABELLE 38: VERWENDETER PUFFER

Bei der Gelfiltration handelt es sich um eine Größenausschlusschromatographie. Die Auftrennung erfolgt anhand der unterschiedlichen Permeation gelöster Proteine durch ein poröses Trägermaterial abhängig von deren Stokes-Radius, der sich bei globulären Proteinen annähernd direkt proportional zu ihrer Größe verhält (Winzor, 2003). So wandern kleinere Moleküle häufiger durch die taschenartigen Poren der Matrix, da mehr Poren ausreichender Größe hierfür zur Verfügung stehen, während für größere Proteine weniger ausreichend große Taschen in der Säulenmatrix vorhanden sind. Dadurch ist die Durchlaufgeschwindigkeit kleinerer Proteine durch das Medium verringert und sie treten später aus der Säule aus, als große Moleküle, die die Matrix weniger verzögert und somit mit größerer Durchlaufgeschwindigkeit passieren können.

In dieser Arbeit wurde eine Superdex 75 16/60 *prep grade* Gelfiltrationssäule (Amersham) an einem Äkta Purifier-System verwendet. Die zu untersuchende Proteinlösung wird über Nacht gegen Gelfiltrationspuffer dialysiert und anschließend mittels Ultrafiltration (5000xg, 4°C) unter Verwendung eines Vivaspin-4 Zentrifugenkonzentrators auf 1-5mL aufkonzentriert. Die Probe wird in eine entsprechende Injektionsschleife überführt, auf die in Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1mL/min gepumpt. Von der Elution werden kontinuierlich Fraktionen zu 1,5mL genommen, bis alle Proteine die Säule durchlaufen haben.

2.2.4.3 KALIBRIERUNG EINER GELFILTRATIONSSÄULE

Mit Hilfe der Gelfiltration lassen sich Aussagen über den Oligomerisierungsgrad eines Proteins treffen. Hierfür wird ein Gemisch von Proteinen bekannter Größe hergestellt und über eine Säule mit bekannter Säulenbettgröße gegeben. Wird nun der jeweilige Elutionszeitpunkt V_e , Totvolumen der Säule V_0 und das Gesamtvolumen V_t in Beziehung gesetzt, so lässt sich für jedes Protein der effektive Verteilungszeitpunkt K_{av} nach folgender Formel bestimmen:

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

Sind alle K_{av} -Werte berechnet, so werden diese gegen die logarithmierten Molekulargewichte der einzelnen Proteine aufgetragen und die Punkte mittels einer Regressionsgerade verbunden. Aus deren Geradengleichung lässt sich über die gemessenen K_{av} -Werte der zu untersuchenden Proteine unter der Annahme einer globulären Architektur deren apparentes Molekulargewicht berechnen und mit dem theoretisch berechneten des Monomers (s. 2.2.3.5) vergleichen. Der Quotient aus beiden ergibt den Oligomerisierungsgrad O des nativen Proteins.

2.2.4.4 MASSENSPEKTROMETRIE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
ESI-Puffer	50% (v/v) Ethanol 1% (v/v) Essigsäure

TABELLE 39: VERWENDETER PUFFER

Mit Hilfe der Massenspektrometrie lassen sich Homogenität, Zusammensetzung und das Vorhandensein eventueller Cysteinverbrückungen von aufgereinigten Proteinen überprüfen.

In dieser Arbeit wurde hierfür die Methode der Elektronenspray-Ionisations(ESI)-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Apex II-Fourier-Transform-Ionencycloresonanz (FITCR)-Massenspektrometer (Bruker) angewendet. Hierfür werden ca. 50µg gefriergetrocknetes Protein in ESI-Puffer aufgenommen und in einer Apollo Elektronenspray-Elektronenquelle ionisiert. Die Messungen wurden von Dr. Werner Schmitz vom Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

2.2.4.5 SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE MITTELS CIRCULARDICHROISMUS(CD)-SPEKTROSKOPIE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
CD-Messpuffer	50mM K ₃ PO ₄ , pH 7,2

TABELLE 40: VERWENDETER PUFFER

CD-Messungen nutzen die optische Aktivität von Molekülen. Peptidbindungen absorbieren abhängig der zugrunde liegenden Sekundärstruktur das aus zwei gleichwertigen zirkularpolarisierten Komponenten bestehende Licht und absorbieren diese (links- wie rechtsdrehend) unterschiedlich stark. Die beiden Lichtstrahlen können über eine Pockelszelle separiert und dadurch getrennt voneinander gemessen werden (Greenfield, 2006). Addiert man nun beide zuvor einen Kreis beschreibenden Vektoren nach Probendurchtritt, so ergibt sich eine Ellipse. Die Elliptizität θ dient als Maßstab für die optische Aktivität der Probe. Die molare Elliptizität pro Aminosäurerest θ_{MRW} [deg cm² d mol⁻¹] und die Molare Elliptizität $[\theta]$ [deg cm² d mol⁻¹] werden nach den folgenden Gleichungen berechnet:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta M}{10 c d N}$$

$$[\theta] = \frac{\theta M}{10 c d}$$

- θ_{MRW} molare Elliptizität pro Aminosäurerest [deg cm² d mol⁻¹]
- $[\theta]$ Molare Elliptizität [deg cm² d mol⁻¹]
- θ Elliptizität [mdeg]
- M molekulare Masse des untersuchten Proteins [g mol⁻¹]
- c Proteinkonzentration [mg mL⁻¹]
- d Schichtdicke der verwendeten Küvette [cm]
- N Anzahl der Aminosäuren des untersuchten Proteins

Die Beziehung zwischen der molaren Elliptizität pro Aminosäurerest θ_{MRW} und der Differenz der molaren Absorption von links und rechts polarisiertem Licht $\Delta\epsilon$ [cm⁻¹ M⁻¹] ist in folgender Gleichung angegeben:

$$\Delta\epsilon = \frac{[\theta]_{MRW}}{3298}$$

Verrechnet man die erhaltenen Werte, so lassen sich nach Dekonvolution Anteil und Art der Sekundärstruktur eines Proteins ermitteln und untereinander vergleichen. Dies geschieht durch Abgleich mit bekannten charakteristischen Spektren von Sekundärstrukturelementen. (Kelly *et al.*, 2005)

Die zu messenden Proteine werden über Nacht in CD-Messpuffer dialysiert und mit einem Vivaspin-4 Zentrifugenkonzentrator (Sartorius stedim) auf eine Konzentration von ungefähr 10µM aufkonzentriert. Die Messung wurde mit einem Cirkulardichroismusspektrometer Jasco-J810 durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1mm. Die Messung erfolgte im Wellenlängenbereich zwischen 190nm und 260nm mit einer Monochromatorbreite von 0,5nm. Weiterhin wird eine Messung nur mit Messpuffer durchgeführt, deren CD-Spektrum bei der Auswertung von den Proteinspektren subtrahiert wird. Ausgewertet wurden die Spektren mit der Software DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/apply.shtml>).

2.2.4.6 DIE OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZSPEKTROSKOPIE

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
HBST500	10mM HEPES pH 7,4 500mM NaCl 0,005% (v/v) TWEEN-20 3,4mM EDTA
Regenerationspuffer	4M MgCl ₂

TABELLE 41: VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN

Unter Zuhilfenahme der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (engl.: *SPR-Spectroscopy (surface plasmon resonance spectroscopy)*) können Protein-Protein-(oder allgemein Biomolekül-) Interaktionen in Echtzeit beobachtet und deren Bindungskinetik analysiert werden. Verwendet wurde ein ProteOn XPR36 (BioRad) System mit der Steuerungs- und Auswertungssoftware ProteonManager 3.0. Für die Immobilisierung eines der Interaktionspartner wurden in dieser Arbeit ausschließlich GLC-Chips (Biorad) verwendet. Das Kernelement dieser Chips besteht aus einem lichtleitenden Prisma mit einer aufgetragenen dünnen Goldschicht in der Kretschmann-Anordnung (Kretschmann, 1971). Auf einer dünnen Metalloberfläche ist eine Alginatschicht aufgebracht, die mit Hilfe des ProteOn Amine Coupling Kit (BioRad) für die Bindung von zu untersuchenden Proteinen in bis zu sechs unterschiedlichen Spuren aktiviert wird. Der potentielle Bindepartner wird nun in unterschiedlichen Verdünnungen bei konstanter Flussrate lotrecht über die mit dem zu untersuchenden Liganden beladene Oberfläche geleitet. Durch das Prisma wird nun von der

Unterseite stetig ein konstanter Lichtstrahl eingeleitet, der an der Grenzfläche der Goldschicht zur Flusszelle sowohl reflektiert wird, als auch ein Oberflächenplasmon anregt. Die Resonanzeigenschaften des Plasmons, also die Stärke der Anregung sowie dessen Ausbreitung sind vom Brechungsindex der an der Goldschicht anliegenden Umgebung abhängig; im Fall der GLC-Chips also von der Zusammensetzung des umgebenden Puffers und der Beladung der Chipoberfläche. (Gordon & Swalen, 1977)

Da der Messpuffer stets gleich ist, hängt die Änderung des Brechungsindex ausschließlich von den gebundenen bzw. immobilisierten Proteinen auf der Oberfläche ab. Dieser Unterschied im Brechungsindex kann nun anhand des reflektierten Strahls in der Photozelle detektiert, quantifiziert und die Massenzunahme, also Protein-Protein-Interaktionen bestimmt werden. (Khilko *et al.*, 1993) Diese Zunahme wird in einem Sensogramm in *resonance/response units* [RU] (engl. Resonanzeinheiten) über den zeitlichen Verlauf ausgegeben.

Der Verlauf einer typischen SPR-Kurve unterteilt sich in Assoziations-, Äquilibrium- und Dissoziationsphase. Aus diesen kann die Assoziations- k_{on} bzw. Dissoziationsrate k_{off} berechnet werden. Der reziproke Quotient aus beiden ergibt die apparente Dissoziationskonstante K_D . Dabei wird keine absolute Dissoziationskonstante bestimmt, da bei der Messung keine physiologischen und nativen zellulären Bedingungen vorliegen. Die Methode der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie ist dahingehend limitiert, dass Artefakte das Ergebnis verändern können. So beeinflussen mögliche ionische Effekte der Kopplungsoberfläche sowie die Immobilisation von nativ sezernierten Faktoren die errechnete K_D . Ebenso unterscheiden sich die räumliche Dichte und die Zugänglichkeit von auf dem Biosensor immobilisierten, membranständigen Proteinen von deren nativem Zustand. Weiterhin kann die Zugänglichkeit von Bindestellen durch die Kopplung sterisch blockiert sein. Alle diese Faktoren führen dazu, dass nur apparente Dissoziationskonstanten bestimmt werden können, die aber untereinander ebenso wie die Assoziations- und Dissoziationskonstanten in Relation gesetzt werden können. Dabei erfolgt während der ersten beiden oben genannten Phasen die Zugabe des Analyten über die betrachtete(n) Spur(en). In der Äquilibriumphase liegen Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht. In der Dissoziationsphase wird der Biosensor ausschließlich mit Messpuffer überspült, damit

die gebundenen Proteine entsprechend ihrer Dissoziationsrate aus der Bindung entlassen werden.

Überschreitet die Assoziationsrate $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ oder die Dissoziation verläuft schneller als 10^{-2} s^{-1} , so lässt sich die apparente Gleichgewichtskonstante K_D nicht, wie oben beschrieben, zuverlässig aus den kinetischen Ratenkonstanten bestimmen, sondern muss aus der konzentrationsabhängigen Gleichgewichtsbindung des Analyten ermittelt werden. Hierbei ergibt sich unter der (eventuell vereinfachenden) Annahme einer Langmuir'schen 1:1-Bindung der Quotient aus maximaler RU multipliziert mit der jeweiligen Analytkonzentration und der Summe aus dieser und der K_D der RU_{eq} -Wert des Gleichgewichts.

Für die Messungen werden die Spuren eines Chips mit den zu untersuchenden Liganden in einer Dichte von 500 bis 1000RU gemäß Herstellerangaben des ProteOn Amine Coupling Kits beladen. Dabei wird das Verhältnis der Lösungen NHS:EDC:Wasser 1:1:6 gewählt. Eine unbeladene Spur dient bei der Auswertung der Messdaten für die Subtraktion sogenannter *bulk face* Effekte, die durch unspezifische Wechselwirkung des Analyten mit der Chipoberfläche oder durch sogenannte Puffersprünge (Änderung des Brechungsindex bei Wechsel der Perfusionslösung) auftreten können.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgten sämtliche in dieser Arbeit dargestellten Interaktionsmessungen unter Verwendung von HBST500 und mit einer Flussrate von $50 \mu\text{L}/\text{min}$. Ausgenommen hiervon sind die Regeneration der einzelnen Flusszellen mit Regenerationspuffer, Leermessungen und Beladung der Chipoberfläche. Diese erfolgen mit einer Flussrate von $100 \mu\text{L}/\text{min}$. Die Sensortemperatur betrug in allen Fällen 25°C .

2.2.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.5.1 STERILES ARBEITEN

Die in dieser Arbeit verwendete Sterilbank Steril GARD III Advance (The Baker Company) wurde mittels UV-Bestrahlung und vertikalem Luftstrom keimfrei gehalten und für mindestens zehn Minuten vor Gebrauch bestrahlt. Mehrweggefäße und -pipetten sowie hitzestabile Lösungen wurden für 20min bei 121°C autoklaviert und ausschließlich unter der Sterilbank verwendet. Nicht-hitzestabile Lösungen wurden vor Gebrauch mit einem Filter der Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$ sterilfiltriert. Vor Arbeitsbeginn wurden Hände und Unterarme

mit Sterillium behandelt. Pinzetten, Kolben- und Flaschenhälse wurden vor und nach der Verwendung abgeflammt.

2.2.5.2 INSEKTENZELLKULTUR

2.2.5.2.1 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN INSEKTENZELLKULTUR

Medien	Zusammensetzung
Insektenzellmedium für <i>Sf9</i>	Insect X-PRESS 5%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)
Insektenzellmedium für <i>High5</i>	IPL-41 1%(v/v) Lipid medium supplement 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)

TABELLE 42: VERWENDETE MEDIEN

Als weitere Quelle für rekombinante Proteine wurden neben der Expression in *E.coli* die Insektenzelllinien *Sf9* und *TriEx* (Klone aus einer ursprünglich aus unreifen Ovarien der Puppen des Eulenfalters *Spodoptera frugiperda* gewonnene Zelllinie) (Vaughn *et al.*, 1977) sowie *High5* (aus Ovarien der Aschgrauen Hockereule *Trichoplusia ni* erhaltene Zelllinie) (Wickham *et al.*, 1992) verwendet. Alle drei Zelllinien wachsen in spezifischen Medien (s. Tabelle 42) im einschichtigen Zellrasen in 175cm³ Cellstar PS Liegeflaschen (Greiner bio-one) bei 27°C mit einer ungefähren Doppelungsdauer von 24h. Erreichen die Zellen eine Konfluenz von > 90%, so werden die Zellen mechanisch vom Flaschenboden abgelöst und in neuem Medium auf weitere Flaschen aufgeteilt. Alle drei Zelllinien sind geeignet für die Infektion mit Baculoviren. Bei der Infektion kann ein geeigneter Vektor co-transfiziert und somit die Expression eines auf diesem Vektor kodierten Proteins erzielt werden.

Den einzelnen Zelllinien fallen verschiedene Aufgaben im gesamten Prozess der rekombinanten Proteinexpression zu. So werden mit Hilfe des BacVector-3000 DNA-Kits (Novagen) geeignete Viren für die Expression in *Sf9*-Zellen gebildet und über mehrere Infektionszyklen angereichert und selektioniert wohingegen die Proteinexpression in *TriEx* bzw. *High5*-Zellen erfolgt.

2.2.5.2.2 CO-TRANSFEKTION MIT DEM BACVECTOR-3000-SYSTEM

Mit Hilfe des BacVector-3000 DNA-Kits werden geeignete Viren für die rekombinante Proteinexpression hergestellt. Der Transfervektor wird mit viraler DNA gemischt und die Co-Transfektion gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Hierbei werden jeweils 1 mL *Sf9*-

Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL pro Vertiefung in eine flachbödige 6-Kavitäten-Platte (Greiner bio-one) ausgesät und für 1h bei 27°C bis zur deren Adhäsion inkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen und die nach Herstellerangaben angesetzte Mischung aus viraler DNA und Transfervektor für 4h zu den Zellen gegeben, ehe der Überstand abgesaugt und nach zwei Waschschritten mit 1,5mL frischem Vollmedium ersetzt wird. Die Platte wird nun mit Parafilm M Laborfilm (Bemis Company) verschlossen und in humider Atmosphäre für fünf Tage bei 27°C inkubiert. In dieser Zeit werden Viren gebildet und durch Lyse der Wirtszelle ins Medium abgegeben. Dieser Überstand wird nun zur Isolierung einzelner Viren in einen Plaque-Assay eingesetzt.

2.2.5.2.3 DER PLAQUE-ASSAY

Der Plaque-Assay wird sowohl zur Vereinzelnung/Selektion von Viren aus einem Gemisch als auch zur Virentiterbestimmung verwendet.

Hierfür wird je 1mL *Sf9*-Zellsuspension mit einer Zellzahl von 5×10^5 Z/mL pro Vertiefung in eine 6-Kavitäten-Platte ausgesät und diese bis zu deren Adhäsion bei 27°C inkubiert. In der Folge wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit verschiedenen Virenverdünnungen überschichtet.

Soll mit dem Plaque-Assay der Virentiter bestimmt werden, so werden in den einzelnen Vertiefungen aufsteigende Verdünnungen von 1:1000 bis 1:10.000.000 eingesetzt, wohingegen sich die Virenverdünnungen in den einzelnen Kavitäten nach einer Co-Transfektion zwischen 1:10 bis 1:10 000 bewegen. Nach einer Stunde Inkubation bei 27°C wird der Überstand abgesaugt und pro Vertiefung durch 1mL erwärmter autoklavierter SeaPlaque-Agarose (Lonza) (2,7% w/v) 1:1 gemischt mit Vollmedium ersetzt. Nach dem Erkalten wird die Platte mit Parafilm M Laborfilm versiegelt und für vier Tage bei 27°C und humider Atmosphäre inkubiert.

Um den Plaque-Assay zu entwickeln, werden nun je 1mL 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Lösung (1mg/mL) in jede Vertiefung gegeben und die Färbung abgewartet. Das gelb-gefärbte MTT wird in Zellen mit Stoffwechselaktivität im endoplasmatischen Retikulum sowie den Mitochondrien zu einem violetten Formazan verstoffwechselt (Mosmann, 1983). Da die Zellen adhärent und die Viren durch die Agarose ebenfalls in ihrer Ausbreitung fixiert sind, wird an infizierten Stellen im Zellrasen kein

Formazan gebildet und es findet folglich keine Färbung statt. Diese Plaques werden nun für eine Titerbestimmung ausgezählt und der Titer unter Berücksichtigung der Virenverdünnung berechnet.

Wird der Plaque-Assay für die Vereinzelnung von Viren nach einer Co-Transfektion (2.2.5.2.2) verwendet, so kann an der Stelle eines Plaques mit einer sterilen Pipettenspitze eingestochen und das Agarosestück in frisches Medium überführt werden. Nach einer einstündigen Inkubation bei 27°C und Abzentrifugieren der Agarose wird der Überstand in die erste Virusamplifikation eingesetzt.

2.2.5.2.4 VIRUSAMPLIFIKATION

Die Virusamplifikation (VA) dient der schrittweisen Erhöhung der Virenzahl. So werden die ersten beiden VAs in einer Sechs-Kavitäten-Platte durchgeführt, in die je 5×10^5 *Triex*-Zellen in 1mL frischem Medium gegeben und bis zur Adhäsion bei 27°C inkubiert werden. Anschließend wird das Medium durch 1mL Virenlösung ersetzt und die Platte in humider Atmosphäre bei 27°C für vier Tage gelagert. Daraufhin wird der Überstand mit den neu gebildeten Viren abgenommen, die Zellen abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, 5min, 4°C, 5000rpm) und erneut wie bereits beschrieben in eine neue Sechs-Kavitäten-Platte mit den Konditionen der ersten VA überführt und wieder für vier Tage inkubiert. Nach den vier Tagen wird von jeder Vertiefung eine Probe genommen, für die SDS-PAGE aufbereitet, mit einem Westernblot (s. 2.2.3.4) die Stärke der Proteinexpression überprüft und der Virenstock mit der größten Proteinexpression für die weiteren VAs gewählt.

Die dritte VA findet in einer 175cm³-Liegeflasche statt. Dort werden 25mL Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL ausgesät und die Virensuspension nach erfolgter Adhäsion der Zellen für vier Tage bei 27°C zugegeben. Der Überstand wird in sterile 50mL-Röhrchen überführt, gelöste Zellen und Zelltrümmer abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, 5min, 4°C, 5000rpm) und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Währenddessen wird über einen Plaque-Assay (s. 2.2.5.2.3) oder kinetische PCR (s. 2.2.1.5) der Virentiter bestimmt.

Für alle folgenden VAs werden *Triex*-Zellen in Suspensionskultur in 2,5L-Flaschen (Greiner Bio-one) verwendet. Diese werden zu einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/mL in maximal 350mL pro Flasche eingesetzt und mit einer MOI (multiplicity of infection; engl. für:

Verhältnis Virus:Insektenzelle) von 0,1 mit der vorrangegangenen VA infiziert und für vier Tage bei 27°C in einem Rollinkubator eingestellt. Abschließend wird die Zellsuspension in sterile 50mL-Röhrchen überführt, die Zellen und unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, 5min, 4°C, 5000rpm) und verworfen, der Virentiter bestimmt und die Virensuspension bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.5.2.5 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN HIGHFIVE-ZELLEN

Wurden in ausreichender Menge Viren mit einem Titer von mindestens $1 \cdot 10^7$ Viren/mL hergestellt, so werden *High5*-Zellen mit einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL in frischem Medium im gewünschten Expressionsvolumen angesetzt und Viren mit einer MOI von 5-10 zugegeben. Der Ansatz wird so auf 2,5L-Flaschen aufgeteilt, dass das jeweilige Gesamtvolumen 350mL nicht überschreitet, um für ausreichend Luftzufuhr zu sorgen. Die Flaschen werden für 3-4 Tage bei 27°C in einem Rollinkubator inkubiert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (Ja-10, 6000rpm, 4°C, 20min) und der Überstand zweimal gegen den für die chromatographische Reinigung benötigten Puffer ü.N. dialysiert.

2.2.5.3 MURINE UND HUMANE ZELLEN

2.2.5.3.1 ZELLHALTUNG IN DAUERKULTUR

Medien	Zusammensetzung
DMEM für <i>HEK</i> und <i>C2C12</i> -Zellen	DMEM + GlutaMAX-I 10%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)
DMEM für <i>C3H10 T1/2</i> BreLuc	DMEM + GlutaMAX-I 10%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza) 0,25%(v/v) Geneticin-418-Disulfat-Fertiglösung (50mg/mL) (Roth)
DMEM/Ham's 1:1 für <i>ATDC5</i>	DMEM/Ham's F12 1:1 5%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)

TABELLE 43: VERWENDETE MEDIEN

Die murinen Zelllinien *ATDC5*, *C2C12* und *C3H10 T1/2* sowie die menschlichen Zellen *HEK Ad293* (*HEK*) wurden unter sterilen Bedingungen in Zellkulturflaschen in Dauerkultur über ca. 20-30 Passagen gehalten. Die Passagierung erfolgte bei einer Konfluenz von 60-80% mit 3mL 1x Trypsin (0,5% (w/v))/EDTA (0,2% (w/v))-Lösung (Biochrom AG).

ATDC5-Zellen sind murine Chondrozyten, welche die extrazelluläre Matrix des Knorpels bilden und aufrechterhalten (Tare *et al.*, 2005). Stimulation mit BMP-2 induziert Chondrogenese, was unter anderem zu erhöhter Bildung alkalischer Phosphatase führt (Nakamura *et al.*, 1999).

C2C12-Zellen sind ein Subklon der murinen Myoblastenlinie *C12*, die sich während kontinuierlicher BMP-2-Stimulation zu Osteoblasten, reich an alkalischer Phosphatase, differenzieren (Yaffe & Saxel, 1977; Blau *et al.*, 1983; Katagiri *et al.*, 1994).

C3H10T1/2-Zellen sind multipotente embryonale Mesenchymzellen aus der Maus, die sich ebenfalls, wie *C2C12*-Zellen unter BMP-2-Einwirkung der Chondrogenese unterziehen (Denker *et al.*, 1999). Die hier verwendete Zelllinie ist stabil mit dem BRELuc-Reporterplasmid transfiziert (Korchynskyi & ten Dijke, 2002).

HEK Ad293-Zellen sind Derivate der embryonalen menschlichen Nierenzelllinie *HEK 293*, die mit adenoviraler Typ-5-DNA transformiert wurden (Graham *et al.*, 1977). Diese Derivate zeichnen sich durch eine höhere Adhärenzneigung an Oberflächen aus, was deren Handhabung in Versuchsabläufen die adhärent wachsende Zellen erfordern, stark vereinfacht.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Medien spezifischer Zusammensetzung (s. Tabelle 43). Dabei wird dem Medium Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 5% (v/v) bei *ATDC5* und 10% (v/v) bei *C2C12*, *C3H10T1/2* und *HEK Ad293*, sowie 1% (v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza) beigemischt. Im Fall der stabil mit dem BRELuc-Reporterplasmid transfizierten *C3H10T1/2*-Zellen wird zusätzlich noch 0,25% (v/v) Geneticin-418-Disulfat-Fertiglösung (50mg/mL) (Roth), ein Neomycin-Sulfatanalog, als Selektionsmarker beigegeben, um den Verbleib der transfizierten DNA in den Zellen zu gewährleisten. Alle verwendeten Zelllinien wachsen im einschichtigen Zellrasen und werden bei 37°C, 5% Kohlendioxidanteil und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.5.3.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG MITTELS TRYPANBLAUFÄRBUNG

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Trypanblaulösung	0,2g Trypanblau 0,36g NaCl für 40mL

TABELLE 44: VERWENDETE LÖSUNG

Die Zellzahl wird bestimmt, indem 20µL Zellsuspension mit 80µL Trypanblaulösung versetzt werden. Unter dem Lichtmikroskop werden alle vier Felder einer Neubauerzählkammer ausgezählt, das Ergebnis gemittelt und mit dem Faktor 10.000 der Neubauerkammer und dem Verdünnungsfaktor verrechnet und somit die Zellzahl pro mL bestimmt.

2.2.5.3.3 TRANSIENTE TRANSFEKTION HUMANER ZELLEN

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PBS (20x)	800g NaCl 20g KCl 178g Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O 27g KH ₂ PO ₄ ×1H ₂ O pH 6,8 für 5L
Medien	Zusammensetzung
Hungermedium für HEK-Zellen	DMEM + GlutaMAX-I 0,1% (v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)
Vollmedium für HEK-Zellen	DMEM + GlutaMAX-I 10%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)

TABELLE 45: VERWENDETE PUFFER UND MEDIEN

Die Zellen werden am Tag vor der Transfektion mit 1x Trypsin (0,5% (w/v))/EDTA (0,2% (w/v))-Lösung (Biochrom AG) abgelöst, ausgezählt (s. 2.2.5.3.2) und je 50.000 Zellen pro Kavität in eine 24-Kavitäten-Platte in Vollmedium ausgesät.

Am Folgetag wird das Medium durch Opti-MEM Medium (Invitrogen) ersetzt und die Zellen für vier Stunden bei 37°C, 5% Kohlendioxidanteil und 85% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Währenddessen werden, falls nicht anders angegeben, 200ng zu transfizierendes Expressionsplasmid, 100ng BRELuc Vektor sowie 50ng LacZ-Vektor pUHD16-1 zur Überprüfung der Transfektionseffizienz pro Ansatz in 25µL Opti-MEM vermischt. Weiterhin

werden vor Beginn der Transfektion je 25µL Opti-MEM pro zu transfizierendem Kavität mit X-Fect (Clontech) (0,3µL pro 1µg DNA) angesetzt und die beiden Ansätze gemischt, um für zehn Minuten bei Raumtemperatur Mizellen aus Polymer und DNA auszubilden, ehe 50µL des Ansatzes pro Kavität zugegeben wird.

Am nächsten Tag wird erneut das Medium entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für 24h durch Hungermedium ersetzt.

Anschließend werden die zu untersuchenden Stimulanzen in Hungermedium für sechs Stunden zugegeben, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 100µL pro Kavität Reporter Assay Lyse Buffer (Promega) versetzt. Zur Zelllyse werden die Zellen für wenigstens 15min bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

2.2.5.4 DURCHGEFÜHRTE NACHWEISE UND PROBEN

2.2.5.4.1 NACHWEIS DER EXPRESSIONSINDUKTION DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
ALP-Assay Lysepuffer	100mM Glycin pH 9,6 1mM MgCl ₂ 1mM ZnCl
PBS (20x)	800g NaCl 20g KCl 178g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 27g KH ₂ PO ₄ x1H ₂ O pH 6,8 für 5L
Medien	Zusammensetzung
Hungermedium für <i>ATDC5</i> -Zellen	DMEM/Ham's F12 1:1 2%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)
Hungermedium für <i>C2C12</i> -Zellen	DMEM + GlutaMAX-I 2%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)
Vollmedium für <i>ATDC5</i> -Zellen	DMEM/Ham's F12 1:1 5%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)
Vollmedium für <i>C2C12</i> -Zellen	DMEM + GlutaMAX-I 10%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza)

TABELLE 46: VERWENDETE PUFFER UND MEDIEN

Vollziehen *C2C12*- und *ATDC5*-Zellen die Chondrogenese, so geht damit eine Steigerung der Expression von alkalischer Phosphatase einher.

Es werden 7000 Zellen pro Kavität in entsprechendem Vollmedium in eine 96-Kavitätenplatte ausgesät und für 24h inkubiert. Anschließend wird das Vollmedium abgezogen, mit PBS gewaschen, durch entsprechendes Hungermedium ersetzt und die Zellen für 4h inkubiert. Währenddessen werden die zu untersuchenden Effektoren/Inhibitoren in den gewünschten Verdünnungen in Hungermedium angesetzt und nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS für 48h zugegeben.

Zur Überprüfung der Zellviabilität wird pro Vertiefung 10 μ L Cell Proliferation Reagent WST-1 aus dem WST1-Kit-Premix Cell Proliferation Assay System (TaKaRa) hinzu pipettiert und für 2h bei 37°C, 5% Kohlendioxidanteil und 85% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Hierbei wird das stabile Tetrazoliumsalz WST-1 auf der Oberfläche lebendiger Zellen zu farbigem löslichen Formazan reduziert. Die an einem Mikrotiterplattenphotometer Multiskan Acent (Thermo Electron Corporation) bei 450nm gemessene Absorption korreliert direkt mit der Viabilität der Zellen im Napf und wird zur Normierung der Daten der alkalischen Phosphataseprobe eingesetzt.

Im Folgenden wird der Überstand abgesaugt, die Zellen gewaschen und für 30min bei Raumtemperatur mit je 100 μ L/Vertiefung ALP-Assay-Lysepuffer versetzt, bevor die Platte bei -80°C eingefroren wird, wo sie bis zur weiteren Verwendung verbleibt.

Zur histochemischen Untersuchung der alkalischen Phosphataseaktivität, werden je 20 μ L des Zelllysats pro Vertiefung in eine neue weißwandige 96-Napf-Platte überführt und 100 μ L des nach Herstellerangaben angesetzten Puffers aus dem Phosphatase Substrate Kit (Thermo Fischer) zugegeben, 2-10min bei RT inkubiert und am Mikrotiterplattenphotometer Multiskan Ascent die Absorption bei 405nm gemessen.

2.2.5.4.2 DIE REPORTERGEN-LUZIFERASE-AKTIVITÄTSPROBE

Medien	Zusammensetzung
Hungermedium für <i>C3H10 T1/2</i> BreLuc	DMEM + GlutaMAX-I 2%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza) 0,25%(v/v) Geneticin-418-Disulfat-Fertiglösung (50mg/mL) (Roth)
Vollmedium für <i>C3H10 T1/2</i> BreLuc	DMEM + GlutaMAX-I 10%(v/v) FKS 1%(v/v) PENSTREP-Mix 10 000U/mL (Lonza) 0,25%(v/v) Geneticin-418-Disulfat-Fertiglösung (50mg/mL) (Roth)

TABELLE 47: VERWENDETE MEDIEN

Im Fall der *C3H10T1/2*-Zellen werden diese bis einschließlich der Lyse mit je 100µL des Lysepuffers des Luciferase Assay Systems (Promega) wie die Zellen für die ALP-Probe behandelt. Platten mit lysierten Zellen werden bei 37°C für eine halbe Stunde aufgetaut, ehe 20µL des Lysats in eine neue weißwandige 96-Kavitäten-Platte überführt werden. An einem Mikrotiterplattenluminometer Luminoskan Ascent (Thermo Electron Corporation) werden pro Vertiefung 20µL Substrat des Luciferase Assay Systems (Promega) zugegeben und nach einer Minute das emittierte Licht [LU] (LU=engl.: *light units*, es erfolgt eine Mittelung aus zehn Einzelmessungen) bei 480nm gemessen.



ABBILDUNG 8: SEQUENZANALYSE HBAMBI

Gezeigt sind Sequenzanalysen von hBambi. **A** Abgebildet ist die Aminosäuresequenz von hBambi. Die einzelnen Domänen sind den Sequenzanalyseprogrammen SignalP 3.0 und TMPred entsprechend eingefärbt. Es ergeben sich Bereiche für Signalpeptid (blau), Extrazellulärteil (schwarz), Transmembranteil (rot) und Intrazellulärteil (Flieger). **B** Dargestellt ist der mit ClustalW 1.83 durchgeführte Aminosäuresequenzvergleich zwischen der extrazellulären Domäne des Typ-I-BMP-Rezeptors BR1A und der potentiellen hBambi-ECD. Darunter befindet sich die jeweilige Bewertung (*= Übereinstimmung; := funktionskonservierter Austausch; .= marginal konservierter Austausch). In Rot hervorgehoben sind die in beiden Sequenzen enthaltenen jeweils zehn Cysteinreste.

Die ausgewählte Sequenz wurde nun in das Programm ClustalW 1.83 (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) eingelesen und Sequenzabgleiche mit den Sequenzen bekannter Rezeptoren, die an der BMP-Signalkaskade beteiligt sind, durchgeführt. In die Bewertung der Sequenzabgleiche fließen verschiedene Merkmale mit ein: die Anzahl und Lage der Cysteine, die Homologie in einzelnen Sequenzbereichen sowie konservierte Schlüsselmerkmale, die sich daraus ergeben. Die beste Übereinstimmung von knapp 44% Sequenzhomologie aller Ektodomänen der Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren konnte dabei im Sequenzvergleich mit der extrazellulären Domäne des humanen Typ-I-Rezeptors BR1A erzielt werden. (s. Abbildung 8B)

Nun wurden die Aminosäuresequenz der potentiellen ECD von hBambi, der Abgleich zwischen hBambi-ECD und BR1A-ECD sowie der 3D-Datensatz der Kristallstruktur von BR1A (PDB-ID: 1REW) (Keller *et al.*, 2004) in das Programm SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org>) übertragen und mit Hilfe dieses Programms automatisiert ein erstes näherungsweise Homologiemodell auf Basis der Strukturdaten von BR1A-ECD von der Ektodomäne von hBambi erstellt (s. Abbildung 9A).

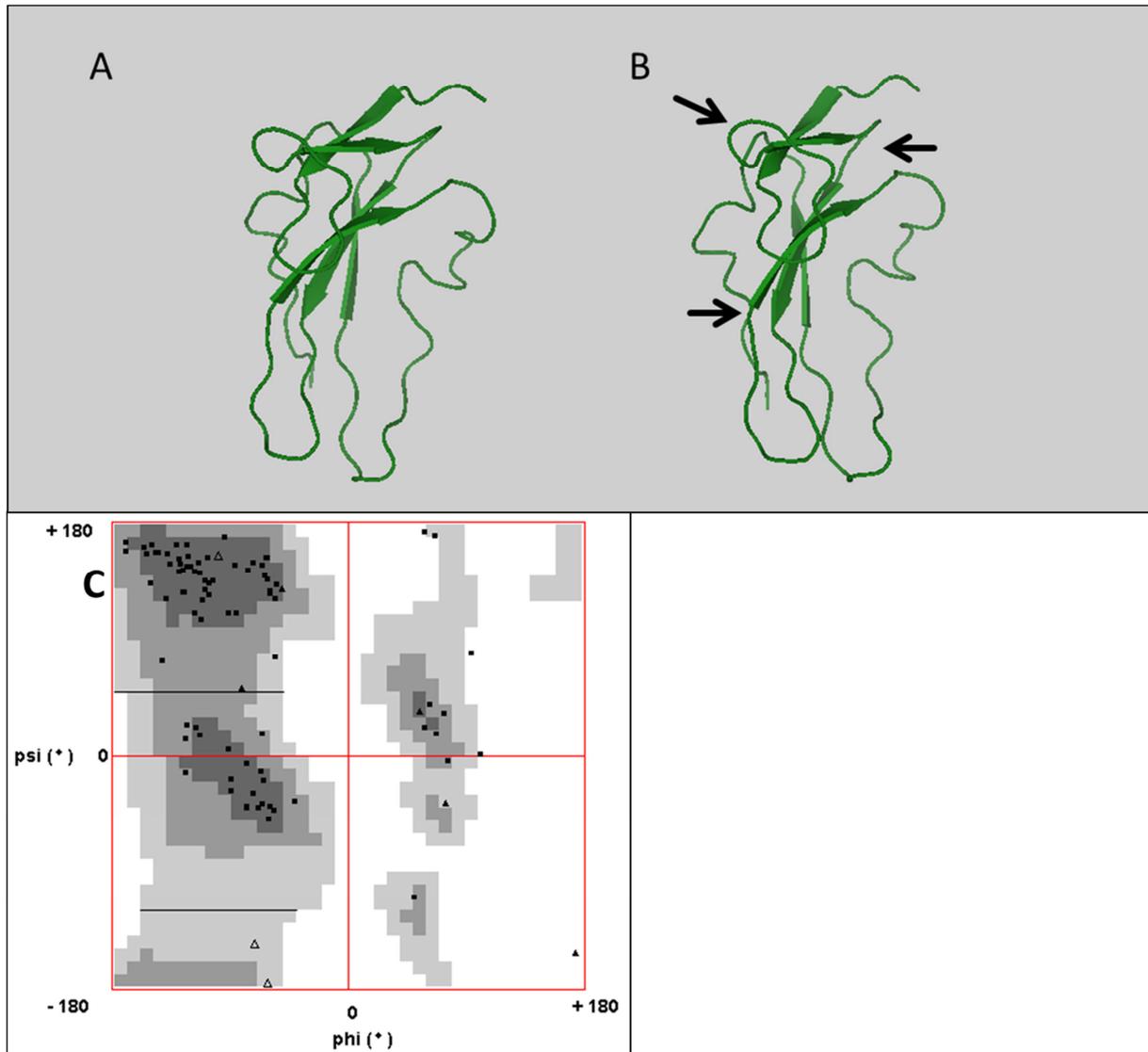


ABBILDUNG 9: MIT SWISS-MODEL ERSTELLTES 3D-HOMOLOGIEMODELL FÜR DIE EXTRAZELLULÄRDOMÄNE VON HBAMBI

Gezeigt ist die Hauptkette des hBambi-ECD-Modells in der Bänderdarstellung **A** nach der automatischen Erstellung durch SWISS-Model und **B** nach der manuellen Optimierung mit dem Softwarepaket Quanta2008. Die schwarzen Pfeile zeigen die Proteinregionen, in denen manuell das initiale Strukturmodell verändert wurde. **C** Ramachandran-Analyse für das 3D-Strukturmodell von hBambi. Aufgetragen sind die ψ -Hauptkettentorsionswinkel [°] gegen die ϕ -Torsionswinkel [°]. Glycine sind als schwarze Dreiecke, Proline als nicht-gefüllte Dreiecke dargestellt. Schwarze Quadrate symbolisieren alle anderen Aminosäurereste. Dunkelgraue Flächen geben die energetisch bevorzugten Winkelkombinationen wider, graue bzw. hellgraue Bereiche stellen zusätzlich erlaubte bzw. energetisch ungünstige, aber erlaubte Bereiche dar. Weiße Flächen signalisieren stereochemisch/energetisch verbotene Bereiche.

Als Fixpunkt in der Struktur wurden die in beiden Domänen befindlichen jeweils zehn Cysteine, die im Fall von BR1A intramolekulare Brücken ausbilden, gewählt. Da die Cysteine im Homologiemodell an ähnlichen Positionen lagen, wurde das gleiche Verbrückungsmuster angenommen und das erstellte Modell mit dem Programm Quanta2008 unter dieser Annahme manuell verfeinert, bis Entfernung und Lage der Cysteine untereinander eine Verbrückung ermöglichen würden. Nach erfolgter Konformitätsprüfung des Modells durch das Quanta-Erweiterungsmodul ProteinHealth wurde einer Ramachandranalyse (Ramachandran *et al.*, 1963) mit Hilfe des Programms Ramachandran Plot 2.0 (<http://dicsoft1.physics.iisc.ernet.in/rp/>) durchgeführt.

Nach durchlaufenen Kontrollen wurde das Modell als Basis für die weitere Herangehensweise verwendet.

3.2 KLONIERUNG UND REKOMBINANTE EXPRESSION VON HBAMBI-ECD AUS E. COLI

Zur Expression der wie oben bestimmten (s. 3.1) Ektodomäne von hBambi wurde die entsprechende Gensequenz in den Expressionsvektor pET28a(+) (Novagen) mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *nhel* und *xhoI* kloniert (s. 2.2.1.4). Das Expressionskonstrukt umfasst nun N-terminal eine mittels der Endopeptidase Thrombin abspaltbare Hexahistidinsequenz sowie eine zweite C-terminale, nicht proteolytisch entfernbare Hexahistidin-Peptidsequenz (His₆-Tag). (s. Abbildung 10A)

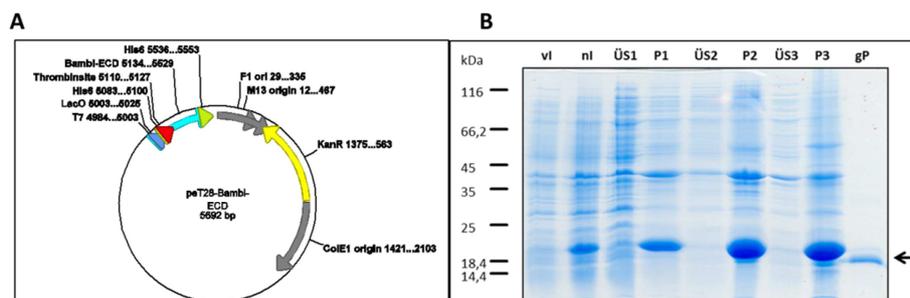


ABBILDUNG 10: ÜBEREXPRESSION HBAMBI-ECD IN E. COLI

Abgebildet sind **A** die Vektorkarte des modifizierten Ursprungsvektors pET-28b (Novagen). In die Klonierungskassette (MCS) wurde die Gensequenz für *hbambi-ECD* eingefügt (s. Abbildung 41). **B** SDS-PAGE-Analyse der Expression von hBambi-ECD in *E. coli*. Am linken Rand sind die apparenten Molekulargewichte in kDa zu sehen; der schwarze Pfeil gibt die zu erwartende Größe des exprimierten Proteins wieder. Im Zelllysate vor (vl) und nach Induktion (nl) ist auf Höhe des schwarzen Pfeils die zu erwartete Bande für Bambi-ECD zu erkennen. Diese ist über die einzelnen Waschschriffe über unlöslich im Pellet (P1-P3) bis hin zum gelösten Pellet (gP) zu sehen. In den Proben für die Überstände (ÜS1-ÜS3) ist keine Bande für Bambi-ECD zu erkennen, was darauf hindeutet, dass das Protein in Form unlöslicher Einschlusskörper in *E. coli* exprimiert wird.

Der Expressionsvektor pET28-Bambi-ECD wurde mittels Hitzeschocktransformation in den *E.coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert und eine Vorkultur (LB-Kan) mit einer Einzelkolonie der Transformanden angeimpft. Diese wurde in 5L LB-Medium, versetzt mit der entsprechenden Menge Kanamycin, überimpft und diese unter Schütteln bei 130rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,7 bei 37°C inkubiert, ehe die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG für 3h gestartet wurde. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension konnten so ca. 3g Bakterien pro Liter LB-Medium gewonnen werden.

Am Folgetag wurden Zellaufschluss und die Extraktion des Proteins aus den Einschlusskörpern durchgeführt (s. 2.2.2.2). So konnte ca. 0,4g/L hBambi-ECD aus den Einschlusskörpern gewonnen werden. Die SDS-PAGE (s. Abbildung 10B) zeigt eine deutliche Bande auf der erwarteten Laufhöhe nach der Induktion sowohl in der Spur des Zellaufschlusses als auch in den Proben der unlöslichen Bestandteile der Extraktion der Einschlusskörper.

3.3 RÜCKFALTUNG DES HBAMBI PROTEINS UND ANSCHLIEßENDE CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG

Die Renaturierung von hBambi-ECD aus Einschlusskörpern wurde wie beschrieben (s. 2.2.2.3) durchgeführt. Die gewünschte Menge resuspendiertes Protein wurde für eine halbe Stunde unter denaturierenden Bedingungen inkubiert, ehe das Proteingemisch langsam in eiskalten Rückfaltungspuffer zu einer bestimmten Endkonzentration von 90µg/mL überführt wurde. Einer 24-stündigen Rückfaltung folgten zwei zwölfstündige Dialyseschritte gegen jeweils das zehnfache Volumen an Bindepuffer, um die Proteinlösung für die anschließende Affinitätschromatographie vorzubereiten. Unlösliches Protein wurde abzentrifugiert, der Überstand mit 5mL His-Buster Nickel Affinity Gel-Partikel (Amocol) versetzt und der Ansatz für eine Stunde bei 4°C auf einem Rollinkubator inkubiert. Wie unter 2.2.2.4.1 beschrieben, wurde das Nickelmedium über eine Glasfritte filtriert, mit Waschpuffer hinreichend gewaschen und Elutionsfraktionen zu 3mL genommen. In den Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie zeigen sich bei der unten abgebildeten SDS-PAGE-Analyse (s. 2.2.3.1) durchweg Proteinbanden bei dem erwarteten Molekulargewicht von hBambi (s. Abbildung 11).

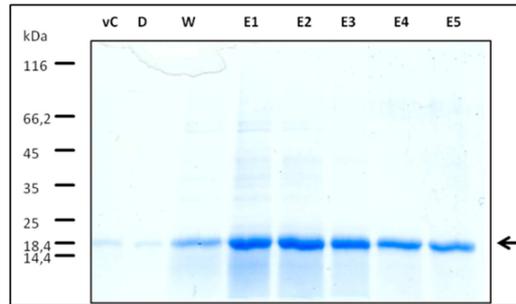


ABBILDUNG 11: SDS-PAGE DER NICKEL-NTA-REINIGUNG VON HBAMBI-ECD AUS *E. COLI*

Am linken Rand der SDS-PAGE sind die apparenten Molekulargewichte des verwendeten Proteingrößenstandards in kDa zu sehen; der schwarze Pfeil zeigt die zu erwartende Größe des gereinigten hBambi-ECD Proteins an. In der Probe des Chromatographieauftrags (vC), im Durchlauf (D) sowie in der Waschfraktion (W) ist auf Höhe des schwarzen Pfeils neben weiteren Banden ungebundenes hBambi-ECD Protein zu erkennen. Mit Imidazol vom Säulenmaterial eluiertes hBambi-ECD Protein konnte in allen untersuchten Elutionsfraktionen (E1-E5) angefärbt werden.

Die proteinenthaltenden Fraktionen E1-E5 wurden vereinigt. Je nach weiterer Verwendung folgte eine zwölfstündige Dialyse des gereinigten hBambi-ECD Proteins gegen das zehnfache Volumen an HBST500 (s. 2.2.4.6) für SPR-Messungen, Gelfiltrationspuffer (s. 2.2.4.2) für die analytische Gelfiltration oder CD-Messpuffer (s. 2.2.4.5) für die CD-spektroskopische Untersuchung. Für längere Aufbewahrung wurde das Protein gegen 20mM HEPES pH7,4; 300mM NaCl dialysiert und in Aliquots von 0,5mL bis zur weiteren Verwendung bei -20°C verwahrt.

Insgesamt konnten aus dem Ansatz von 4,8L LB-Bakterienkultur 10,4mg an gereinigtem hBambi-ECD Protein gewonnen und aufgereinigt werden.

3.4 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DES REKOMBINANT AUS BAKTERIEN ERHALTENEN HBAMBI-ECD PROTEINS

Zur Qualitätssicherung des rekombinant aufgereinigten hBambi-ECD Proteins wurden ca. 500µg mittels Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigtes Protein zur Entsalzung für eine Umkehrphase-HPLC vorbereitet und mit Hilfe einer analytischen 1mL-C4-Säule gereinigt (s. 2.2.2.4.3). Die Proteinprobe wurde mit 0,1% (v/v) TFA angesäuert, auf ein Volumen von 5mL aufgefüllt und hierzu in eine 5mL-Injektionsschleife aufgetragen. Nach erfolgtem Probenauftrag wurde die Säule zunächst mit zehn Säulenvolumen 0,1% (v/v) TFA äquilibriert und das Protein anschließend mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 100% Acetonitril fraktionierend von der Säulenmatrix eluiert. Die auftretende, nahezu idealsymmetrische Absorptionsspitze in den Fraktionen 25mL-28mL konnte über anschließende SDS-PAGE

Analyse hBambi-ECD Protein zugeordnet werden (s. Abbildung 12A+C). Die Proben wurden gefriergetrocknet und massenspektrometrisch vermessen (s. Abbildung 12B).

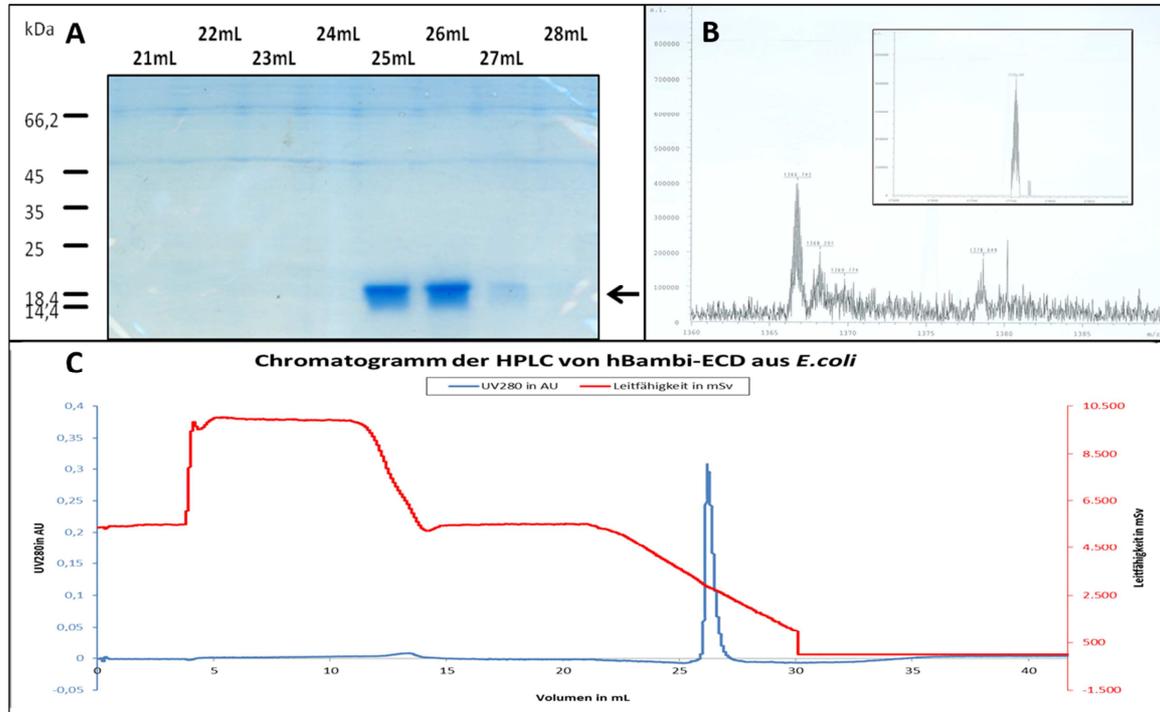


ABBILDUNG 12: HPLC REINIGUNG UND MASSENSPEKTROMETRISCHE KONTROLLE VON HBAMBI-ECD AUS *E. COLI*

A SDS-PAGE-Analyse der RP-HPLC-Aufreinigung von hBambi-ECD aus *E. coli*. Am linken Rand sind die apparenten Molekulargewichte des Proteingrößenstandards in kDa aufgetragen; der schwarze Pfeil zeigt die zu erwartende Größe des gereinigten hBambi-ECD Proteins an. Aufgetragen sind Proben der Fraktionen, die zwischen 21mL und 28mL des Gradienten eluiert wurden. Protein gewünschter Größe konnte in den Fraktionen 25mL bis 28mL mittels SDS-PAGE-Analyse detektiert werden. **B** Das in Fraktion 26mL enthaltene Protein wurde massenspektrometrisch untersucht. Aufgetragen ist das gemessene Signal über dem Quotienten Masse zu Ladung der 13-fach protonierten Werte vor Dekonvolution. Das Spektrogramm nach Dekonvolution ist im selben Bild im verkleinerten Fenster zu sehen. **C** Chromatogramm der RP-HPLC von hBambi-ECD Protein aus *E. coli*. Über dem Laufvolumen in mL sind die UV-Absorption bei 280nm [AU] und die Leitfähigkeit [mSv] aufgetragen. Die Zuordnung der Graphen ist der Legende zu entnehmen. Der Probenauftrag (ca. 5-10mL) sowie der lineare Gradient (ca. 20-30mL) sind am Verlauf der Leitfähigkeit abzulesen.

Die im Gel zu beobachtende auftretende Doppelbande lässt sich auf einen Effekt von nicht vollständig denaturierten hydrophoben Seitenketten im SDS-Gel zurückführen. Zwar sind in den Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse mehrere Massensignale sichtbar. Das Signal mit der größten Intensität ist dem 13-fach protonierten hBambi-ECD Protein ohne Methionin zuzuordnen. Dieses Massensignal ist in der Analyse nach Dekonvolution zu 17755,465 Da bestimmbar. Dies entspricht im Rahmen der Meßgenauigkeit (persönliche Mitteilung, Dr. Werner Schmitz) der aus der atomaren Zusammensetzung und Isotopenverteilung ($C_{755}H_{1176}N_{244}O_{236}S_{14}$) theoretisch berechneten Masse von 17895,9 Da

von hBambi-ECD ohne Methionin. Durch die exakte Massenbestimmung konnte auch die Vollständigkeit der Peptidkette sowie das Vorhandensein von fünf geschlossenen intramolekularen Cystinbrücken bestätigt werden.

3.5 KLONIERUNG UND REKOMBINANTE EXPRESSION VON HBAMBI-ECD AUS Sf9-INSEKTENZELLEN

Da es sich bei der extrazellulären Domäne von hBambi um ein humanes Protein handelt, ist bei dessen Überexpression in nicht-menschlichen Organismen und nach der unter Punkt 3.3 beschriebenen Rückfaltung nicht garantiert, dass es im nativen Zustand vorliegen wird. Gerade eine Renaturierung aus Einschlusskörpern birgt oftmals die Gefahr, dass unnatürlich rückgefaltetes Protein mit „falsch“ geschlossenen Cystin-Verbrückungen gewonnen wird. Weiterhin findet in *E.coli* keine posttranslationale Modifikation rekombinant exprimierter Proteine statt, die oft für die Funktionalität von Proteinen eine wichtige Rolle spielen. Um falsche Interpretationen von Messungen, die mit diesem rekombinanten Protein durchgeführt werden sollten, wurde neben der Expression in *E.coli* das Zielprotein zum Vergleich in *Sf9*-Insektenzellen rekombinant überexprimiert. Wenn beide Formen der extrazellulären Domäne von hBambi in den durchgeführten Folgeexperimenten zu vergleichbaren Ergebnissen führen, liefert dies einen Hinweis darauf, natives Protein hergestellt zu haben. Hierfür wurde die kodierende Gensequenz (s. 3.1) von hBambi-ECD über die daran angefügten Restriktionsschnittstellen *bamHI* und *hindIII* in den baculoviralen Transfektionsvektor pMK-1 kloniert. Strangabwärts der gp64-Signalsequenz, die für die Sekretion des rekombinant exprimierten Proteins in das Medium verantwortlich zeichnet, liegen (strangaufwärts des eingefügten Bereichs) eine Hexahistidinsequenz sowie eine Strep2-Peptidsequenz, die beide durch eine TEV-Proteaseerkennungssequenz proteolytisch abspaltbar sind. Strangabwärts der hBambi-ECD-Gensequenz liegt, über die Endopeptidase Thrombin abspaltbar, jeweils eine Avi- und eine Hexahistidinpeptidsequenz. (s. Abbildung 13).

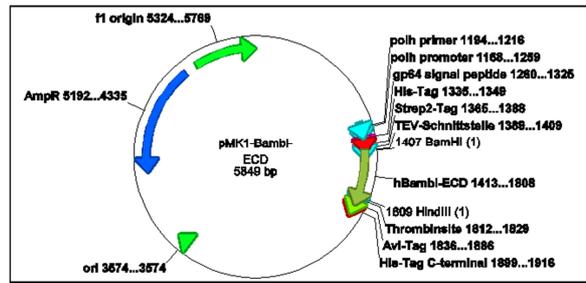


ABBILDUNG 13: VEKTORKARTE DES EXPRESSIONSVEKTORS PMK-1-BAMBI-ECD ZUR EXPRESSION VON HBAMBI-ECD IN INSEKTENZELLEN

Abgebildet ist die Vektorkarte des modifizierten baculoviralen Transfervektors pMK-1. In die Klonierungskassette MCS wurde die codierende Gensequenz von hBambi-ECD eingefügt (s. Abbildung 42).

Hierbei werden jeweils 1 mL Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL pro Vertiefung in eine flachbödige 6-Kavitäten-Platte (Greiner bio-one) ausgesät und für 1h bei 27°C bis zur deren Adhäsion inkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen und die nach Herstellerangaben angesetzte Mischung aus viraler DNA und Transfervektor für 4h zu den Zellen gegeben, ehe der Überstand abgesaugt und nach zwei Waschschritten mit 1,5mL frischem Vollmedium ersetzt wird. Die Platte wird nun mit Parafilm M Laborfilm (Bemis Company) verschlossen und in humider Atmosphäre für fünf Tage bei 27°C inkubiert. In dieser Zeit werden Viren gebildet und durch Lyse der Wirtszelle ins Medium abgegeben. Dieser Überstand wird nun zur Isolierung einzelner Viren in einen Plaque-Assay eingesetzt.

Das erhaltene Plasmid wurde wie unter 2.2.5.2.2 beschrieben in Sf9-Zellen co-transfiziert. Dafür wurden alle Vertiefungen einer 6-Kavitätenplatte mit 1mL Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL ausgesät und nach deren erfolgter Adhäsion am Boden der Vertiefung mit serumfreien Kulturmedium gewaschen. Währenddessen wurden zwei separate Ansätze vorbereitet: 50ng virale DNA wurden mit 250ng des Transfervektors zusammen mit 12,5µL serumfreien Kulturmedium in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt (Ansatz A). Ansatz B enthielt 2,5µL Transfektionsreagenz in 10µL ddH₂O. A und B wurden nun vollständig vermischt und für 15min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Mischung aus viraler DNA und Transfervektor von je 4µL pro Vertiefung auf die mit je 0,7mL frischem, serumfreien Kulturmedium überschichteten Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 27°C im Brutschrank wurden 3mL Vollmedium zugegeben und die Platte für 4-5 Tage bei 27°C zur Bildung rekombinanter Viren inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand mit den rekombinanten Viren abgenommen und über Plaque-Assay (s. 2.2.5.2.3) und WesternBlot mit dem monoklonalen Antikörper Penta His HRP Conjugate (5PRIME) (s.

2.2.3.4) auf ihre Expressionsrate selektioniert. Virenklone mit der höchsten Expressionsrate wurden anschließend in *TriEx*-Zellen amplifiziert und die Zahl der Viren pro mL (VA) stets ermittelt. Hatte die VA einen Titer $>1 \times 10^7$ V/mL in einem Volumen von mindestens 200mL wurde eine präparative Proteinexpression in *HighFive*-Zellen mit einem Verhältnis von Viren:Zellen=5:1 gestartet und die viral transduzierten Zellen für vier Tage bei 27°C im Rollinkubator inkubiert. Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert und der Protein-enthaltende Überstand über Nacht gegen das zehnfache Volumen 20mM Tris-HCl pH 8.0; 300mM NaCl als Vorbereitung für die Metallchelat-Affinitätschromatographie dialysiert.

3.6 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG VON PROTEIN AUS

ZELLKULTURÜBERSTAND

Da bei einer Überexpression in Insektenzellen das Protein in einer relativ niedrigen Proteinkonzentration (≤ 10 mg pro Liter Medium) und in einem sehr großen Volumen (> 1 L) vorliegt, wurde für den ersten Aufreinigungsschritt das sogenannte *Batch*-Verfahren angewandt. Hierbei wurde in Dialysepuffer äquilibrierte His-Buster Nickel Affinity Säulenmaterial (Amocol) (2mL einer 50%-igen Suspension) zu dem dialysierten Zellüberstand gegeben und die Suspension für 1h bei 4°C auf einem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Suspension über einer Econo-Glasfritte (Biorad) abfiltriert und das Säulenmaterial ausgiebig mit 20mM Tris-HCl pH 8.0, 300mM NaCl, 20mM Imidazol gewaschen. Im Anschluss wurde das an das Säulenmaterial gebundene Protein mit jeweils 5mL Elutionspuffer (20mM Tris-HCl pH 8.0, 300mM NaCl, 500mM Imidazol) eluiert und die Proteinlösung zur Entfernung von eventuell miteluierten Nickelionen (=bleeding-Effekt) sofort mit EDTA zu einer Endkonzentration von 1mM versetzt. In der Folge wurden von jeder Fraktion Proben genommen, aufbereitet und auf ein SDS-Gel aufgetragen, um deren Proteingehalt und Reinheit zu bestimmen (s. Abbildung 14).

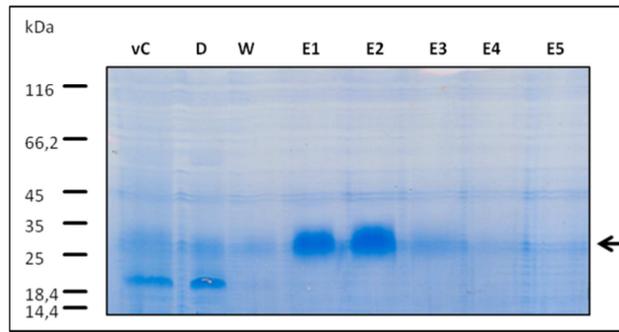


ABBILDUNG 14: SDS-PAGE DER NI-NTA-REINIGUNG VON HBAMBI-ECD AUS *HIGH5*-INSEKTENZELLEN

SDS-PAGE-Analyse der Metallchelate-Affinitätschromatographie-Aufreinigung von hBambi-ECD aus *HighFive*-Zellen. Am linken Rand sind die apparenten Molekulargewichte des Proteingrößenstandards in kDa aufgetragen; der schwarze Pfeil zeigt die zu erwartende Größe des gereinigten hBambi-ECD Proteins an. In der aufgetragenen Probe des Probenauftrags auf die Säule (vC), im Säulendurchlauf (D) sowie in der Probe der Waschfraktion (W) ist auf Höhe des schwarzen Pfeils neben weiteren Banden ungebundene hBambi-ECD zu erkennen. Mit Imidazol vom Medium kompetitiv verdrängtes hBambi-ECD-Protein konnte in allen untersuchten Elutionsfraktionen (E1-E5) angefärbt werden.

Im Anschluss an die SDS-PAGE-Analyse wurden Zielprotein-enthaltende Fraktionen vereinigt und die Proteinlösung über Nacht gegen das zehnfache 20mM Tris-HCl pH 8,0, 300mM NaCl dialysiert.

3.7 GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE VON HBAMBI-ECD AUS ZELLKULTUR

Die dialysierte Proteinlösung wurde mittels Ultrafiltration mit Hilfe eines Vivaspin-4 Zentrifugalkonzentrators auf ein Volumen von 5mL konzentriert und dann unter Verwendung einer Superdex 75 16/60 prep grade Gelfiltrationssäule (Amersham) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min nach ihrer Größe separiert. Es wurden Fraktionen zu 1,5mL genommen. Anhand des UV-Absorptionsprofils (s. Abbildung 15A) wurden die Protein-enthaltenden Fraktionen ausgewählt und von diesen Proben (50µL) für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen.

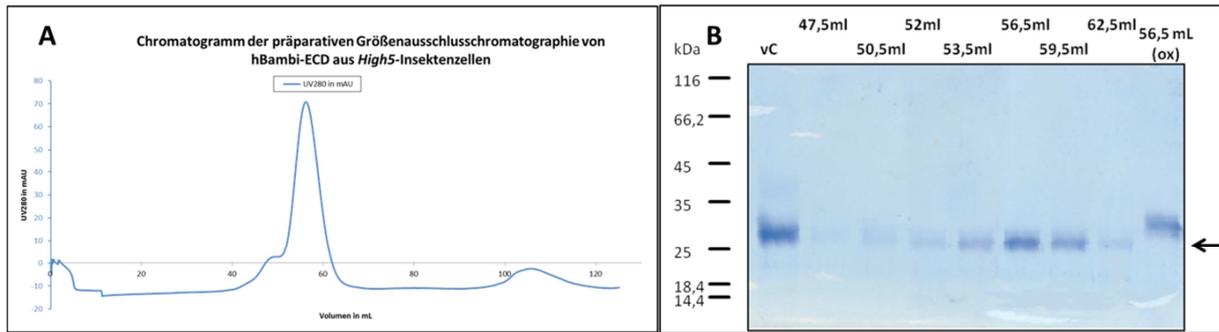


ABBILDUNG 15: GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE VON HBAMBI-ECD AUS HIGHFIVE-INSEKTENZELLEN

A Chromatogramm einer semipräparativen Gelfiltration von hBambi-ECD aus *HighFive*-Insektenzellen. Über dem Laufvolumen in mL ist die UV-Absorption bei 280nm [mAU] aufgetragen. **B** SDS-PAGE-Analyse der Größenausschlusschromatographie von hBambi-ECD aus *HighFive*-Insektenzellen. Am linken Rand sind die apparenten Molekulargewichte des Proteingrößenstandards in kDa zu sehen; der schwarze Pfeil markiert die zu erwartende molekulare Größe des gereinigten Proteins an. Aufgetragen sind die Elutionsproben der Fraktionen, die zwischen einem Laufvolumen von 47,5mL bis 62,5mL von der Gelfiltrationssäule eluiert wurden. Diese Proben wurden unter reduzierenden Laufbedingungen, d.h. mit 2-ME-haltigem SDS-Probenpuffer aufbereitet. Zusätzlich wurde eine Probe der Fraktion bei 56,5mL Elutionsvolumen unter oxidierenden SDS-PAGE-Laufbedingungen aufgetragen. Hier zeigt das Elutionsprofil das Hauptmaximum für die Protein-spezifische UV280-Absorption.

Anhand der SDS-PAGE wurden die Fraktionen, welche hBambi-ECD-Protein in hinreichender Reinheit und Konzentration enthielten, bestimmt und ausgewählt. Das monomere hBambi-ECD-Protein (Reste V21-A152 inklusive zweier Hexahistidinpeptidsequenzen) wurde bei etwa 52 bis 62,5mL Laufpuffer (entspricht 43-51% der Säule oder einer molaren Masse von ca. 50kDa) von der Superdex 75 prep grade HR16/60 eluiert und lag nach Analysen mittels SDS-PAGE-Analyse relativ rein vor. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen das etwa zwanzigfache Volumen 20mM HEPES pH 7,4, 300mM NaCl dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Aufgrund des unerwartet frühen Elutionszeitpunktes des hBambi-ECD-Proteins von der Gelfiltrationssäule gab es Grund zur Annahme, hBambi-ECD könnte, bei einer theoretisch berechneten molaren Masse von 22204,7Da (s. 2.2.3.5), als dimeres Protein vorliegen. Eine SDS-PAGE-Analyse ähnlich des vorherigen Reinigungsschrittes (s. 3.6) unter reduzierenden Bedingungen würde diese Betrachtung nicht zulassen. Aus diesem Grund wurde eine Probe aus der Fraktion der maximalen UV₂₈₀-Absorption (56,5mL) unter oxidierenden Bedingungen aufbereitet. Die sichtbare Proteinbande der Probe dieser Fraktion ist bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 30kDa zu beobachten und ist deutlich diffuser als die unter reduzierenden Bedingungen sichtbaren Proteinbanden der anderen Fraktionen. Die geringere Laufstrecke aller Proteinproben und dem daraus zu folgernden erhöhten Molekulargewicht resultiert womöglich aus dem Effekt, den die beiden angefügten

Hexahistidinpeptidsequenzen auf das Laufverhalten von Proteinen haben können. Denaturierte Proteinproben einer SDS-PAGE-Analyse lagern für gewöhnlich abhängig ihrer spezifischen Ladungen der Aminosäureseitenketten SDS-Moleküle in einem relativ konstanten Verhältnis zu ihrer Ladung, die dadurch weitestgehend maskiert wird, an. Die positive Ladung von Histidinen, die in einem angefügten Hexahistidinpeptid lokal geballt auftritt, sorgt für eine unverhältnismäßig starken Verschiebung des Masse zu Ladungs-Verhältnisses und kann zu vermeintlich erhöhten apparenten Molekulargewichten in der SDS-PAGE-Analyse führen. Dieser Effekt ist hier im Fall von hBambi-ECD-Protein aus *HighFive*-Zellen ob der zwei angefügten Hexahistidinsequenzen bei allen Proteinproben zu beobachten. Weiterhin ist es bekannt, dass glykosylierte Proteine an ihren Glykosylierungen SDS sehr ungleichmäßig aufnehmen und dadurch die beobachteten angefärbten Proteine eher diffus erscheinen. Dies ist ebenfalls bei allen Proteinproben der SDS-PAGE zu beobachten und wirkt sich womöglich bei der unter oxidierenden Bedingungen aufbereiteten Probe noch stärker aus, da diese nicht wie die anderen Proben durch ein Reduktionsmittel entfalten und bei 95°C denaturiert wurde. Dadurch können vereinzelte geladene Seitenketten der Aminosäuren verborgen und für SDS nicht zugänglich sein, was ebenfalls Einfluss auf das Laufverhalten haben kann, da das Protein im SDS-Gel nicht so stark negativ geladen wäre und folglich die Wandergeschwindigkeit in Richtung der Anode kleiner wäre als bei den vollständig entfaltenen Proteinproben der anderen Fraktionen. In jedem Fall ist das apparente Molekulargewicht von ca. 30kDa für ein dimeres hBambi-ECD-Protein zu klein, da dieses selbst ohne die beschriebenen Effekte bei mindestens 45kDa liegen müsste.

Aus einem Liter Insektenzellkultur konnte so etwa 1,2 mg hBambi-ECD-Protein gewonnen werden. Eine massenspektrometrische Analyse des aufgereinigten Proteins wurde mit dem so erhaltenen rekombinanten Proteinmaterial durchgeführt. Für die notwendige Entfernung des in der Probe enthaltenen Salzes wurden 0,5mg Protein wie unter 2.2.16 beschrieben mit Hilfe einer analytischen C4-HPLC-Säule (s. 2.2.2.4.3) weiter gereinigt, gefriergetrocknet und dann massenspektrometrisch von Dr. Werner Schmitz vermessen. Dabei konnte kein eindeutiger, der Probe zuzuordnender Massenausschlag identifiziert werden. Der Grund hierfür sind vermutlich nicht einheitliche posttranslationale Glykosylierungen, die zu leichten Masseunterschieden unter den Proteineinheiten der Probe führen. Dadurch entstehen viele kleine Masseausschläge und eine Bestimmung der molaren Masse des hBambi-Proteins war

nicht möglich. Das rekombinant hergestellte Protein wurde daraufhin Aktivitätstests und biophysikalischen Analysen unterzogen, um über dessen biologische und proteinchemische Funktionalität auf eine korrekte Expression zu schließen.

3.8 PROTEINCHARAKTERISIERUNG

3.8.1 ANALYTISCHE GELFILTRATION VON hBAMBI-ECD ZUR BESTIMMUNG DES OLIGOMERISIERUNGSGRADES

Da die Beobachtungen bei der Größenausschlusschromatographie von hBambi-ECD-Protein aus *HighFive*-Zellen (s. 3.7) eine dimere Natur von hBambi-ECD nicht ausschließen lassen und die Arbeiten von Onichtchouk *et al.* von einer Dimerisierung des extrazellulären Anteils von Bambi-ECD ausgehen (Onichtchouk *et al.*, 1999), sollte der Oligomerisierungsgrad von hBambi-ECD-Protein mittels analytischer Gelfiltration bestimmt werden.

Die analytische Gelchromatographie wurde wie unter 2.2.14 beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde für die Säule zunächst unter den später verwendeten Laufbedingungen mit Proteinen bekannter Größe ein Referenzlauf vorgenommen (s. Tabelle 48).

Protein	Elutionsvolumen V_e in mL	K_{AV}	MW in KDa
Conalbumin (Huhn)	51,55	0,189	75
Carboanhydrase (Kuh)	67,29	0,368	29
Ribonuklease A (Kuh)	81,82	0,545	13,7
Aprotinin (Kuh)	104,35	0,811	6,5
hBambi-ECD (<i>E. coli</i>)	70,59	0,41	27,54

TABELLE 48: VERWENDETE EICHPROTEINE FÜR DIE ANALYTISCHE GELFILTRATION

Das Elutionsprofil ist in Abbildung 16A dargestellt. Die K_{AV} -Werte der Proteine konnten berechnet werden, indem man das jeweilige Elutionsvolumen V_e zusammen mit dem Säulenvolumen V_t (120 mL) und dem Ausschussvolumen V_0 (44,74 mL) in die angegebene Formel (s. 2.2.4.3) einsetzt wurde. Anhand der Laufzeiten und der Eigenschaften der Säule ergibt sich die in Abbildung 16B gezeigte Kalibriergerade.

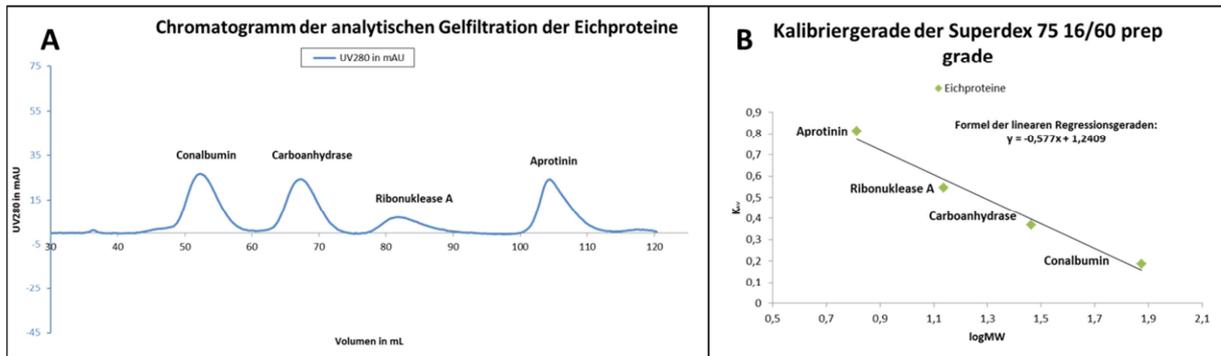


ABBILDUNG 16: EICHUNG DER ANALYTISCHEN GELFILTRATIONSSÄULE SUPERDEX 75 16/60 PREP GRADE

Gezeigt ist **A** der Bereich des Chromatogramms, in dem die vier verwendeten Eichproteine eluieren. Aufgetragen ist die Absorption bei 280nm UV280 [mAU] über dem Elutionsvolumen V [mL]. Die jeweiligen Absorptionsmaxima konnten den verwendeten Proteinen zugeordnet werden. **B** Aufgetragen ist der aus dem Elutionsvolumen V_e errechnete Wert K_{av} über dem bekannten logarithmierten theoretischen Molekulargewicht.

Nach linearer Regression ergab sich für das Verhältnis zwischen spezifischem Molekulargewicht M_w und dem relativen Elutionsvolumen K_{AV} an der verwendeten Gelfiltrationssäule Superdex 75 16/60 *prep grade* folgender Zusammenhang: $K_{av} = -0,577x + 1,2409$

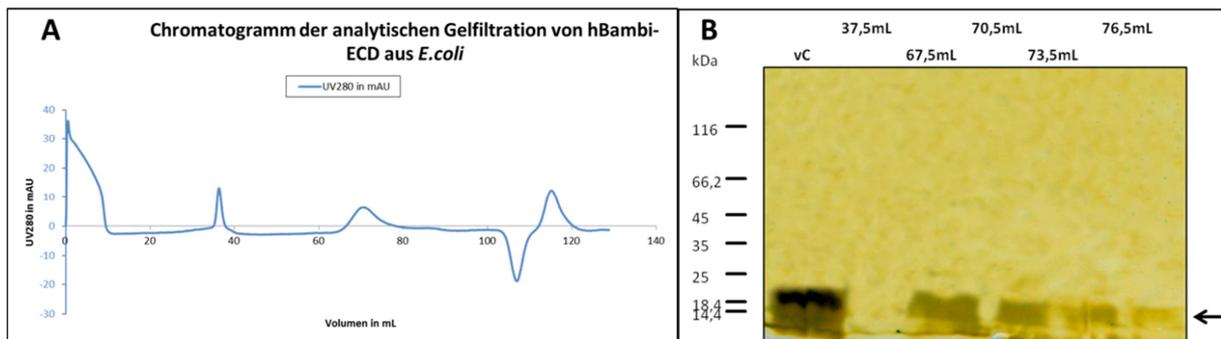


ABBILDUNG 17: ANALYTISCHE GELFILTRATION VON HBAMBI-ECD AUS *E. COLI*

Abgebildet ist **A** das Chromatogramm des Laufs von hBambi-ECD aus *E. coli*. Aufgetragen ist die Absorption bei 280nm UV280 [mAU] über dem Elutionsvolumen V [mL] des Laufs. **B** SDS-PAGE-Analyse der Proben des sensorischen Ausschlags um 70mL. Am linken Rand ist sind die apparenten Molekulargewichte des verwendeten Proteingrößenstandards in kDa zu sehen; der schwarze Pfeil markiert die zu erwartende Größe des Proteins hBambi-ECD. Sowohl in der SDS-PAGE-Probe des Probenauftrags (vC) als auch in den Elutionsfraktionen im Bereich von 67,5mL bis 76,5mL konnte eine Proteinbande angefärbt werden, welche die für hBambi-ECD erwartete molekulare Größe aufweist.

Anschließend wurde das rekombinant aus *HighFive*-Insektenzellen erhaltene rekombinante hBambi-ECD-Protein unter den gleichen Bedingungen auf die Säule aufgetragen und der Elutionszeitpunkt (70,59mL) bestimmt (s. Abbildung 17A+B).

Durch Einsetzen des Elutionszeitpunktes in die oben angegebene Formel lässt sich das spezifische Molekulargewicht entsprechend des hydrodynamischen Radius von hBambi-ECD-Protein mit $M_w = 27540 \text{ Da}$ ermitteln. Der Quotient aus den experimentell bestimmten und theoretisch berechneten Molekulargewichten kann dann Aufschluss über den Grad der Globularität und/oder den Oligomerisierungsgrad O geben.

$$O = 27540 \text{ Da} / 17896 \text{ Da} = 1,54$$

Es ergibt sich annähernd ein Wert von 1,54. Der ermittelte Wert lässt zunächst keinen klaren Schluss auf den Oligomerisierungsgrad zu, da er zwischen dem Wert für ein Monomer (1) und dem eines Dimers (2) liegt. Die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades mittels analytischer Gelchromatographie geht jedoch von ideal globulären Proteinen aus, die in diesem Fall nicht zu erwarten sind. hBambi-ECD ist die Ektodomäne eines membranständigen Proteins, d.h. der extrazelluläre Anteil sollte für eine vermutete Interaktion mit Proteinen des Extrazellularraums möglichst weit in diesen hineinreichen, um eine bessere Zugänglichkeit zu garantieren. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass die C-terminale Primärstruktur von Bambi auf einen nicht gefalteten Bereich hindeutet. Daher ist von einem relativ in die Länge gezogenen Protein mit einem unverhältnismäßig hohen Stokes-Radius im Vergleich zur Länge der Peptidkette auszugehen. Aus diesem Grund kann sich der Wert für den Oligomerisierungsgrad O im Fall eines monomeren Charakters des untersuchten Proteins in Richtung des Dimers verschieben. Gegen eine Dimerisierung der Ektodomäne von Bambi sprechen weiterhin die gerade Anzahl der Cysteine, die eine intermolekulare homodimere Disulfidverbrückung ausschließen. Weiterhin belegen in dieser Arbeit durchgeführte SPR-Bindestudien, dass keine spezifische Bindung zwischen Ektodomänen von Bambi zu beobachten ist (s. 3.9.2). Sollte tatsächlich ein Dimer vorliegen, wäre der bestimmte Wert des Oligomerisierungsgrades O eines annähernd ideal globulären Proteins in jedem Fall ≥ 2 . Da der Wert 2 nicht erreicht wurde und ob der Ähnlichkeit der Primärstruktur zu Typ-I-Rezeptoren, die alle im monomeren Zustand vorliegen, ist von einem monomeren, nicht globulären Zustand der Ektodomäne von Bambi auszugehen.

3.8.2 VERGLEICHENDE SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE VON HBAMBI-ECD-PROTEINEN MITTELS CD-SPEKTROSKOPIE

Um zu überprüfen, ob das in unterschiedlichen Organismen (*E.coli* und *HighFive*) exprimierte hBambi-ECD-Protein eine ähnliche Proteinfaltung aufweist, wurde eine Analyse mittels

Circulardichroismus durchgeführt. Im Fall von Protein, das aus Einschlusskörpern aus *E.coli* renaturiert wird, kann nicht garantiert werden, dass die Renaturierung zu nativ gefaltetem Protein führt und intramolekulare Cystin-Verbrückungen zwischen den „richtigen“ Cysteinen stattfinden. Aus diesem Grund wurde für beide Extrazellulardomänen jeweils ein CD-Spektrum aufgenommen. Anhand dieser CD-Spektren kann der jeweilige Sekundärstrukturanteil der Proteinprobe ermittelt und somit verglichen werden. Alle CD-Spektren wurden bei identischen Bedingungen wie beschrieben (s. 2.2.4.5) aufgenommen. Hierzu wurden die verwendeten Proteine vorab im identischen Puffer (50mM K_3PO_4 , pH 7,2) dialysiert und anschließend mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Das für die Messung eingesetzte hBambi-ECD-Protein aus der Rückfaltung nach bakterieller Überexpression (s. 3.3) wies eine Konzentration von 1,05mg/mL auf und das hBambi-ECD-Protein aus *HighFive*-Zellen (s. 3.7) 0,55mg/mL. Nach Abzug der Leermessung ergaben sich die in Abbildung 18A+B gezeigten Spektren.

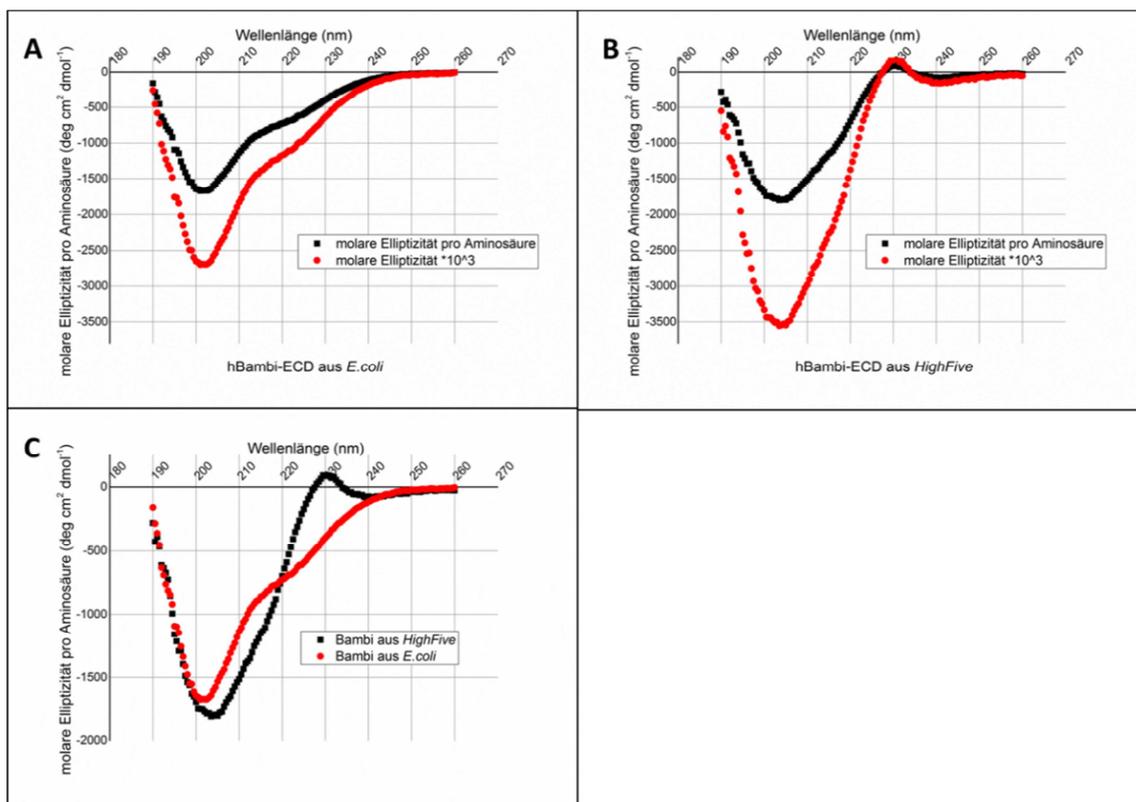


ABBILDUNG 18: CD-SPEKTROSKOPISCHE VERMESSUNG VON REKOMBINANTER HBAMBI-ECD AUS UNTERSCHIEDLICHEN ORGANISMEN

Abgebildet sind die CD-Spektren von hBambi-ECD aus **A** *E.coli* und **B** *HighFive*-Insektenzellen. Aufgetragen sind jeweils die molare Elliptizität pro Aminosäure Θ_{MRW} [$\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$] (schwarz) und die molare Elliptizität $[\Theta]$ [$\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$] (rot) über der Wellenlänge λ [nm] über einen Bereich von 190-260nm. Die Messungen wurden bei 10°C in 0,5nm-Schritten aufgenommen und eine vorab erfolgte Leermessung abgezogen. Abbildung C zeigt die beiden überlagerten molaren Elliptizitäten pro Aminosäure Θ_{MRW} [$\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$] beider vermessener Proteine.

Im Anschluss wurden die erhaltenen Messdaten in das webbasierte Programm DichroWeb eingelesen. Die Auswertung und Gewichtung der Daten erfolgte mittels der Programme CONTIN (Einstellungen: 190-260nm; 1nm Schritte; Set 4; *scaling factor*=1,0) (Van Stokkum *et al.*, 1990) und K2D (Einstellungen: 190-260nm; 1nm Schritte; *scaling factor*=1,0) (Andrade *et al.*, 1993). Es ergaben sich die in Tabelle 49 gezeigten Aufteilungen zwischen den unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen.

Auswertung	Protein	α -helikal (in %)	β -Faltblatt (in %)	<i>random coil</i> (engl.: zufällig gewunden) (in %)
CONTIN-Auswertung	hBambi-ECD aus <i>E.coli</i>	4,3	42,3	53,4
	hBambi-ECD aus <i>HighFive</i> -Zellen	4,3	43,5	52,2
K2D-Auswertung	hBambi-ECD aus <i>E.coli</i>	10	45	45
	hBambi-ECD aus <i>HighFive</i> -Zellen	9	47	44

TABELLE 49: SEKUNDÄRSTRUKTURELEMENTE DER UNTERSUCHTEN PROTEINE NACH AUSWERTUNG DER CD-DATEN

Die erhaltenen Ergebnisse beider Auswertungsprogramme liefern mitunter unterschiedliche Ergebnisse. Im K2D-Programm ergibt sich bei beiden vermessenen Proteinproben ein doppelt so hoher α -helikaler Anteil als im CONTIN-Programm der entsprechenden Probe, das diese Bereiche eher einer zufälligen Anordnung zuweist. Beide Proteine aus unterschiedlichen Expressionssystemen ähneln sich in ihrer Sekundärstrukturzusammensetzung dahingehend, dass sie zu großen Teilen aus zufällig angeordneten Schleifen bestehen und einen hohen β -Faltblatt-Anteil besitzen. Vergleicht man allerdings die beiden molaren Elliptizitäten pro Aminosäure, dann zeigen sich Unterschiede. So hat das aus der Renaturierung gewonnene Protein einen leichten negativen Ausschlag auf Höhe von 220nm, was den erhöhten α -helikalen Anteil gegenüber dem Protein aus Insektenzellkultur erklärt. Dieses zeigt bei einer Wellenlänge von 230nm einen leichten positiven Ausschlag im Vergleich zur Proteinprobe aus *E.coli*, was den erhöhten β -Faltblatt-Anteil in beiden Auswertungen erklärt. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass das aus der Renaturierung gewonnene Protein womöglich nicht vollständig oder in Teilen inkorrekt gefaltet ist und sich so verschiedene Sekundärstrukturelemente detektieren lassen.

Die Circular dichroismus-Analyse beider Proteine ergab eine sehr ähnliche Sekundärstruktur-Zusammensetzung. Ob jedoch bei der Renaturierung aus Einschlusskörpern aus *E.coli*

tatsächlich natives Protein gewonnen werden konnte, musste nach dieser Messung anhand von Bindestudien und Aktivitätstests noch weiter untersucht werden.

3.9 AKTIVITÄTSNACHWEIS UND SUCHE VON BINDEPARTNERN VON hBAMBI-ECD MIT HILFE DER OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZSPEKTROSKOPIE

3.9.1 VERGLEICHENDER AKTIVITÄTSTEST VON hBAMBI-ECD AUS UNTERSCHIEDLICHEN EXPRESSIONSSYSTEMEN

Zunächst wurde die Affinität der unterschiedlich erhaltenen Bambi-ECD-Proteine zu BMP-2 mittels Plasmonresonanzspektroskopie getestet. Hierfür wurde BMP-2 als Ligand auf einem mit ECD/NHS/H₂O im Verhältnis 1:1:6 aktivierten GLC-Chip in einer Dichte von etwa 600RU (Resonanz/Response unit, 1RU=1pg/mm²) immobilisiert und der Biosensor anschließend mit rekombinantem BR1A-ECD-Protein auf seine Bindeeigenschaften getestet. Die Affinität von BR1A-ECD für BMP-2 bei Verwendung dieses Biosensorchips lag mit k_{on-}/k_{off} -Werten von $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $2,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und einer daraus ermittelten Dissoziationskonstante K_D von 36nM im Rahmen bekannter Literaturwerte bei gleicher Messanordnung (k_{on-}/k_{off} $5\text{-}6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. einer K_D von 30nM (Kotzsch *et al.*, 2008)). Das jeweilige hBambi-ECD-Protein wurde in sechs verschiedenen Analytkonzentrationen beginnend mit 1µM absteigend in log2-Verdünnungen über den Chip geleitet. Die Assoziationsphase betrug 240s, die Dissoziationsphase 250s. (s. Abbildung 19)

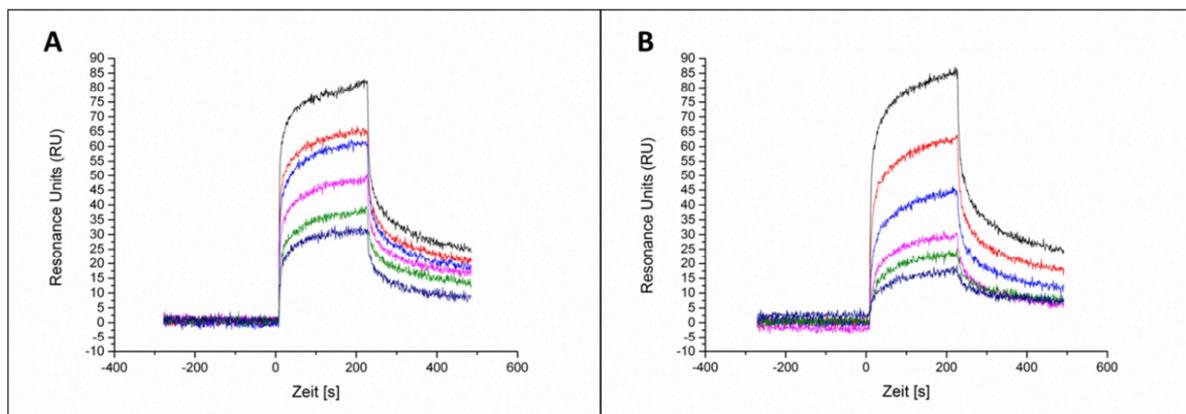


ABBILDUNG 19: SENSOGRAMME DER INTERAKTION ZWISCHEN BMP-2 UND hBAMBI-ECD-PROTEIN, WELCHES AUS ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN ORGANISMEN REKOMBINANT HERGESTELLT WURDE

Über die Zeit aufgetragen sind die Sensogramme für hBambi-ECD-Protein als Analyt an immobilisiertes BMP-2 (Konzentrationen: 1µM (schwarz), 500nM (rot), 250nM (blau), 125nM (rosa), 62,5nM (grün) und 31,25nM (dunkelblau) von (A) hBambi-ECD aus *E.coli* und (B) hBambi-ECD aus *HighFive*-Insektenzellkultur. Der Zeitpunkt der Injektion des Analyten wurde als Nullpunkt (t) festgesetzt.

Nach Abzug der unbeladenen Referenzspur konnte für beide Proteine eine spezifische Bindung an BMP-2 nachgewiesen werden. Die grundsätzliche Aktivität konnte somit für hBambi-ECD-Protein sowohl aus *E.coli* als auch aus *HighFive*-Zellen belegt werden. Beide Proteine zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf. Dieser zeigte allerdings nicht das erwartete Profil einer monophasischen 1:1-Bindung, bei der ein Analyt unabhängig von anderen Bindungen genau einen Liganden an genau einer Bindestelle bindet. Der Kurvenverlauf der Assoziations- sowie der Dissoziationsphase ist biphasisch. Das bedeutet, dass einer Phase der schnellen Assoziation/Dissoziation jeweils eine langsame Phase folgt. Anhand der Kontrollmessungen mit BR1A-ECD-Protein, die einen monophasischen Kurvenverlauf zeigen, muss das Problem der Biphasizität in diesem Fall von Bambi ausgehen. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass Bambi an zwei unterschiedliche Stellen von BMP-2 bindet, wobei eine davon mit der Kopplungsstelle von BMP-2 mit dem Biosensor teilweise überlappt und somit der Zugang zu dieser erschwert oder eingeschränkt ist. Eine weitere Erklärung für den biphasischen Kurvenverlauf wäre eine unterschiedliche bzw. nicht vollständige Faltung der Ektodomäne von Bambi, die während der Renaturierung von Protein aus *E.coli*-Einschlusskörpern entstehen können. Da aber mit Protein aus Insektenzellkultur, bei dem von einer korrekten und homogenen Faltung auszugehen ist, ebenfalls biphasische Kinetiken erhalten wurden, ist eine Erklärung des beobachteten Phänomens nicht möglich. Deshalb konnte die Auswertung über das Langmuir'sche Modell in diesem Fall nicht angewendet werden. Stattdessen erfolgte die Auswertung über das *Heterogeneous Analyt*-Modell. Hierbei handelt es sich um einen Auswertungs-Algorithmus bei dem von einem heterogenen Analyten an mehreren Bindestellen ausgegangen wird, bei dem die erste Bindung an den Liganden strukturelle Umlagerungen in dessen Sekundärstruktur zur Folge hat. Diese Umlagerungen beeinflussen die Bindung des zweiten Analyten, so dass das aufgenommene Sensogramm die Summe aus zwei unterschiedlichen Einzelbindungen beschreibt. Da es sich bei BMP-2 um ein dimeres Protein mit zwei „gespiegelten“ Oberflächen handelt und Rezeptorektodomänen im Verhältnis 2:1 an ein BMP-2-Protein binden, wurde diese Art der Auswertung gewählt. Eine Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D über eine Gleichgewichtsbestimmung (K_{eq}) wurde zur Kontrolle ebenfalls durchgeführt, wenngleich der Gleichgewichtszustand nicht vollständig erreicht wurde.

Analyt	Bindungsaffinität mit BMP-2-Protein			
	k_{on} [1/Ms] $\times 10^3$	k_{off} [1/s] $\times 10^{-3}$	K_D^* in nM	K_{eq}^{**} in nM
hBambi-ECD aus <i>E.coli</i>	65 ± 26	2,9 ± 0	45 ± 15	76 ± 17
hBambi-ECD aus <i>HighFive</i>	40 ± 30	3,2 ± 0,8	80 ± 27	110 ± 25

*) K_D ermittelt über die Auswertung *heterogeneous analyt* der Software ProteOn Manager 3.0

**) K_{eq} ermittelt über die Auswertung der Gleichgewichte zwischen Assoziation und Dissoziation des Analyten über den Konzentrationen der verwendeten Analytlösungen

TABELLE 50: GEMESSENE AFFINITÄTEN VON HBAMBI-ECD AUS *E.COLI* UND SF9 AN BMP-2

Beide hBambi-ECD-Proteine wurden von BMP-2 gebunden, was auf eine gelungene rekombinante Herstellung aus zwei unterschiedlichen Überexpressionssystemen schließen lässt. Die Berechnung der Bindungsaffinität erfolgte anhand des *heterogeneous analyt*-Modells, welches ob der unbekanntenen Bindungsstelle(n) von hBambi-ECD-Protein an BMP-2 noch nicht als verifiziert angesehen werden kann. Gerade die Kontrollmessung mit der Ektodomäne von BR1A, die über ein Langmuir-1:1-Modell (mit zwei voneinander unabhängigen Bindungsstellen an BMP-2) ausgewertet werden konnte, ließ im Fall von hBambi-ECD ebenfalls eine 1:1-Bindung erwarten. Ob der vorhandenen Sequenzhomologie zur Ektodomäne von BR1A wurden für hBambi-ECD ähnliche Werte wie für die Bindungskonstanten an BMP-2 erwartet. Der unterschiedliche, biphasische Kurvenverlauf in der Assoziationsphase sowie die sehr schnelle Dissoziation unterscheiden sich doch sehr stark vom verwendeten Referenzprotein. Für eine bessere Charakterisierung der Bindung zu Vertretern der BMP-Signalkaskade waren in der Folge noch weitere Versuche mit anderen Bindepartnern notwendig.

Beide Protein-Varianten verhalten sich jedoch, bezüglich ihrer berechneten K_{on} bzw. K_{off} -Werte ähnlich, aber nicht gleich. Beide ermittelten K_D -Werte liegen im Bereich von ungefähr 100nM und stimmen jeweils sehr gut mit den erhaltenen K_{eq} -Werten aus der Gleichgewichtsbestimmung überein. Untereinander unterscheiden sich die K_D -Werte ungefähr um den Faktor zwei, wobei hBambi-ECD-Protein aus *E.coli* schneller an BMP-2 bindet, aber eine ähnliche Dissoziationsgeschwindigkeit aufweist. Für weitere Bindungsstudien wurde ob der größeren zu erwartenden Menge und der einfacheren Herstellung ausschließlich renaturiertes Protein aus Einschlusskörpern von *E.coli* verwendet.

3.9.2 INTERAKTIONSANALYSE ZWISCHEN hBAMBI-ECD UND EKTODOMÄNEN VON TYP-I- UND II-REZEPTOREN

Nachdem die Aktivität von rekombinant hergestelltem hBambi-ECD-Protein im vorhergehenden Versuch (s. 3.9.1) bestätigt wurde, sollten Interaktionsstudien mit in der Literatur beschriebenen Proteinen durchgeführt werden. hBambi wurde von Onichtchouk *et al.* als Inhibitor der Signalweitergabe von verschiedenen TGF- β -Proteinen identifiziert. Transfektions-, Stimulations- sowie Co-Präzipitationsversuche zeigten eine direkte Blockade aller Typ-I-Rezeptoren (außer ActR-I) sowie der Typ-II-Rezeptoren ActR-II und TGF β R-II durch Bindung von hBambi an den jeweiligen Extrazellulärteil dieser membranständigen Rezeptoren. Weiterhin sollte die im Extrazellulärraum beobachtete und vermittelte Dimerisierung von hBambi bestätigt und quantifiziert werden. (Onichtchouk *et al.*, 1999) Da diese Bindungen bislang nur absolut bestätigt wurden, sollten verschiedene Ektodomänen von Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren als Liganden auf einem GLC-Chip immobilisiert und die Bindung von hBambi-ECD-Protein quantifiziert werden. Hierfür wurden die Ektodomänen von ActR-IB, ALK-7, TGFR-I, BMPR-II, BR1A sowie die Ektodomäne von hBambi und das im nativen Zustand über einen Lipidanker auf der Zellmembran befestigte Inhibitorprotein hRgm-b auf der Chipoberfläche mit 500-800RU immobilisiert (s. 2.2.4.6). Im Anschluss wurde deren Aktivität mit je einem bekannten Bindepartner getestet und erfolgreich bestätigt.

Anschließend wurde hBambi-ECD-Protein in einer Konzentrationsreihe von 1 μ M in absteigenden log₂-Verdünnungen über die einzelnen Spuren des Chips perfundiert. Als Positivkontrolle wurde die Interaktion von hBambi-ECD mit BMP-2 detektiert.

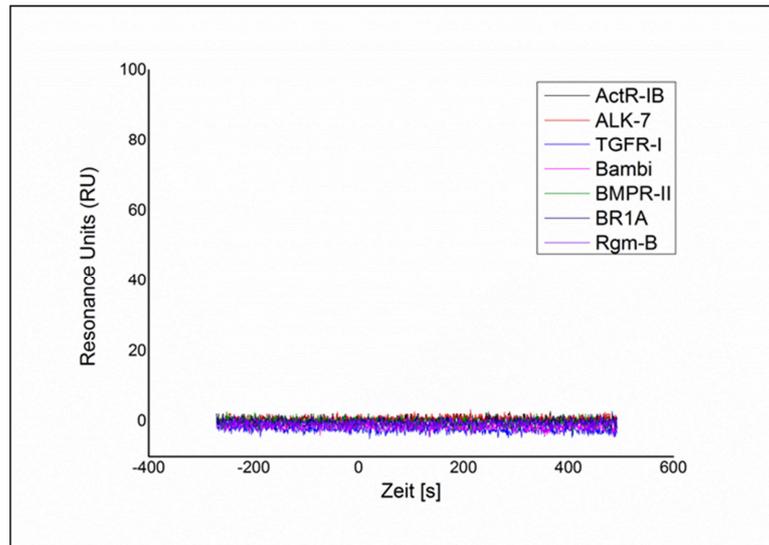


ABBILDUNG 20: SPR-SENSOGRAMME EINER MÖGLICHEN INTERAKTION VON TGF- β -REZEPTOREKTODOMÄNEN UND HBAMBI-ECD-PROTEIN

Aufgetragen sind beispielhaft die Interaktion der jeweiligen Rezeptorektodomänen mit 250nM hBambi-ECD. Der Zeitpunkt der Analyt-Injektion wurde als Nullpunkt (t) festgesetzt.

Die Aktivität der eingesetzten Ektodomänen nach deren Kopplung auf die Oberfläche des Biosensors konnte, sofern ein entsprechender TGF- β - bzw. BMP-Bindepartner verfügbar war, bestätigt werden. Das Protein hBambi-ECD zeigte jedoch entgegen der Literaturaussagen keinerlei Affinität an die verwendeten extrazellulären Proteinteile. Sollte Bambi wie in der Literatur beschrieben (Onichtchouk *et al.*, 1999), direkt mit den TGF- β -/BMP-Rezeptoren interagieren und so die BMP-Signalaktivität unterbinden, so findet diese Bindung nicht auf der Zelloberfläche über Kontakt mit den liganden-bindenden Extrazellulärdomänen der Rezeptoren statt.

3.9.3 *IN VITRO* INTERAKTIONSANALYSE ZWISCHEN HBAMBI UND ACTIVINA

In der Literatur wurde von Onichtchouk und Kollegen (Onichtchouk *et al.*, 1999) beschrieben, dass Bambi entsprechend seinem Namen neben BMP-Liganden auch Activin antagonisieren kann. Da dies auch, wie in dieser Arbeit für BMP-Liganden gezeigt, über eine direkte Bindung an Activin selbst erfolgen könnte, wurde eine analoge Interaktionsanalyse mittels SPR durchgeführt, um zu klären, ob die Signalinhibition eventuell über die Bindung des externen Liganden stattfindet. Hierfür wurde ActivinA, hergestellt von Dionys Weber, in einer Dichte von etwa 500RU mittels direkter Aminokopplung wie zuvor beschrieben (s. 2.4.6) auf einem GLC-Sensorchip immobilisiert. Die Bindeaktivität des Activin-Liganden wurde durch eine SPR-Interaktionsmessung mit dem an ActivinA hochaffin bindende Rezeptorektodomäne von ActR-IIb erfolgreich nachgewiesen. Die gemessene Dissoziations-

konstante (K_D) lag mit etwa 33nM im Bereich bekannter Literaturwerte (K_D (ActivinA – ActR-IIB)= 65nM) (Weber *et al.*, 2007).

Im Anschluss an die Überprüfung der Bindeaktivität wurde hBambi-ECD über die mit ActivinA beschichteten Flusszellen geleitet. Die Assoziationsphase betrug 240s, die Dissoziationsphase 250s. (s. Abbildung 21)

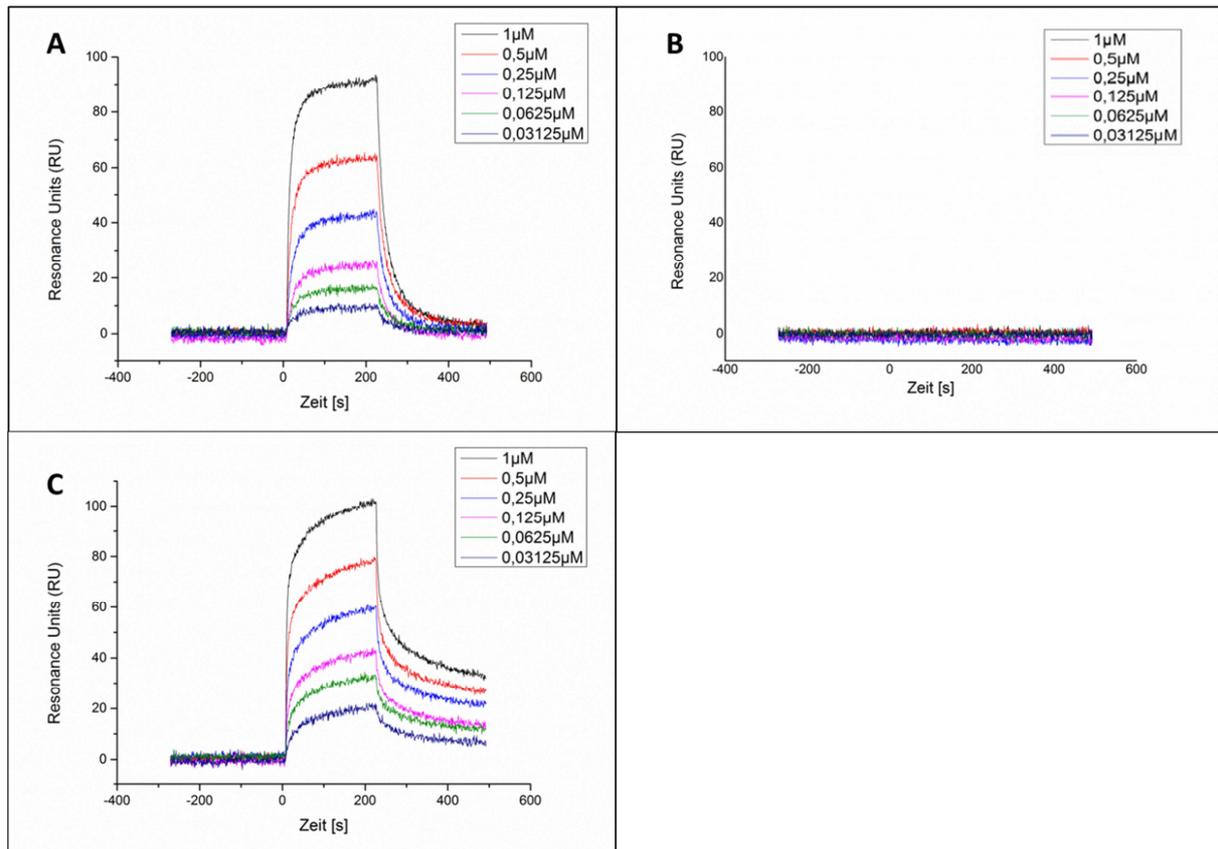


ABBILDUNG 21: SENSOGRAMME DER SPR-INTERAKTIONSANALYSE VON HBAMBI-ECD UND HUMANEM ACTIVINA

Über die Zeit aufgetragen sind die Sensogramme der Verdünnungen des Analyten: 1µM (schwarz), 500nM (rot), 250nM (blau), 125nM (rosa), 62,5nM (grün) und 31,25nM (dunkelblau) von (A) ActR-IIB über ActivinA, (B) hBambi-ECD über ActivinA und (C) hBambi-ECD über BMP-2. Die Abbildungen A und C sind die Kontrollmessungen. Der Zeitpunkt der Injektion des Analyten wurde als Nullpunkt (t) festgesetzt.

Die Sensogramme zeigen, dass die Aktivität des verwendeten ActivinA durch die bekannte Bindung an ActR-IIB (Mathews & Vale, 1993) bestätigt werden konnte (s. Abbildung 21A). Ebenso fiel die Überprüfung der Aktivität von hBambi-ECD durch die in vorangegangenen Experimenten nachgewiesene Bindung an BMP-2 positiv aus (s. Abbildung 21C). Die in den Arbeiten von Onichtchouk aufgestellte Behauptung, Bambi würde durch direkte Bindung ActivinA antagonisieren, konnte trotz der unabhängig voneinander nachgewiesenen Aktivität beider verwendeter Proteine nicht bestätigt werden (s. Abbildung 21B). Die in der

publizierten Studie beobachtete Inhibition muss demzufolge auf einem anderen Weg geschehen.

3.9.4 BINDUNGSSPEZIFITÄT DER EKTODOMÄNE VON BAMBİ FÜR LIGANDEN DER BMP-SUBFAMILIE

Wie oben gezeigt (s. 3.9.2), konnte mittels *in vitro* SPR-Messungen keine direkte Interaktion zwischen Rezeptortodomänen und hBambi-ECD beobachtet werden. Somit stellen die gezeigten Daten den in der Literatur postulierten Mechanismus einer Blockade der BMP-Signalweiterleitung durch direkte Bindung von Bambi an die Rezeptoren in Frage. Da allerdings eine Hemmung der BMP-Signalaktivität durch Bambi eindeutig belegt ist und die strukturelle Homologie von Bambi mit Typ-I-Rezeptoren auch eine Interaktion mit den BMP-Liganden vermuten lässt, wurden eine Reihe von TGF- β -Liganden auf ihre Bindung an Bambi überprüft. Hierzu wurden diese, wie beschrieben, mit einer Dichte von jeweils etwa 500RU auf einem GLC-Sensorchip immobilisiert und deren Bindeaktivität zunächst mit bekannten Bindepartnern (in der Regel Rezeptortodomänen) überprüft (s. Tabelle 51).

Ligand	getestet mit	Bindungsaffinität mit Referenzprotein			Literaturwert K _D in nM	Quelle
		k _{on} [1/Ms]x10 ³	k _{off} [1/s]x10 ⁻³	K _D * in nM		
BMP-2	BR1A	115 ± 7	5,7 ± 0	4,9 ± 3	0,9	Keller <i>et al.</i> (2004)
BMP-3a	---	---	---	---	---	---
BMP-4	BR1A	77 ± 11	1,8 ± 0	237 ± 90	47	Hatta <i>et al.</i> (2000)
BMP-5	---	---	---	---	---	---
BMP-6	BR1A	13 ± 2	4,6 ± 0	345 ± 150	67,2	Allendorph <i>et al.</i> (2007)
BMP-7/OP-1	BR1A	59 ± 5	3,8 ± 0	64 ± 6	1680	Allendorph <i>et al.</i> (2007)
BMP-10/GDF-2	ActR-IIB	---	---	636 ± 106 (eq**)	20,7	Townson <i>et al.</i> (2012)
BMP-15/GDF-9b	BMPR-II	---	---	301 ± 44 (eq**)	unbekannt	---
GDF-5/BMP-14	BR1A	72 ± 1	4,9 ± 0	68 ± 8	21,5	Kleinschmidt <i>et al.</i> (2013)
GDF-6/BMP-13	BR1A	46 ± 1	6,6 ± 0	145 ± 51	1,7	Berasi <i>et al.</i> (2011)
GDF-7/BMP-12	BR1A	60 ± 6	3,6 ± 0,3	60 ± 50	3,4	Berasi <i>et al.</i> (2011)
Myostatin/GDF-8	ActR-IIB	---	---	351 ± 61 (eq**)	93,5	Sako <i>et al.</i> (2010)
MIS/AMH	---	---	---	---	---	---
TGFB-II	---	---	---	---	---	---
TGFB-III	---	---	---	---	---	---

*) K_D ermittelt über die Auswertung *heterogeneous analyt* der Software ProteOn Manager 3.0

**) K_{eq} ermittelt über die Auswertung der Gleichgewichte zwischen Assoziation und Dissoziation des Analyten über den Konzentrationen der verwendeten Analytlösungen

TABELLE 51: VERGLEICHENDE AUFLISTUNG VON REFERENZMESSUNGEN MIT LITERATURWERTEN

Anhand der Referenzmessungen konnten für die meisten verwendeten Liganden deren Bindeaktivität nachgewiesen werden. Alle Messungen wurden, so weit nicht anders angegeben, über das Langmuir-1:1-Modell ausgewertet. Große Unterschiede zwischen den so erhaltenen Affinitäten und den zum Vergleich herangezogenen Literaturwerten können

durch die nicht uniforme Kopplung auf der Chipoberfläche oder die unterschiedlichen Messverfahren zurückgeführt werden.

Für die Messung der Interaktion der humanen Bambi-Ektodomäne mit den TGF- β -Liganden wurde das hBambi-ECD-Protein in log₂-Verdünnungsstufen beginnend mit 1 μ M über den mit Ligandenproteinen beladenen Biosensor geleitet.

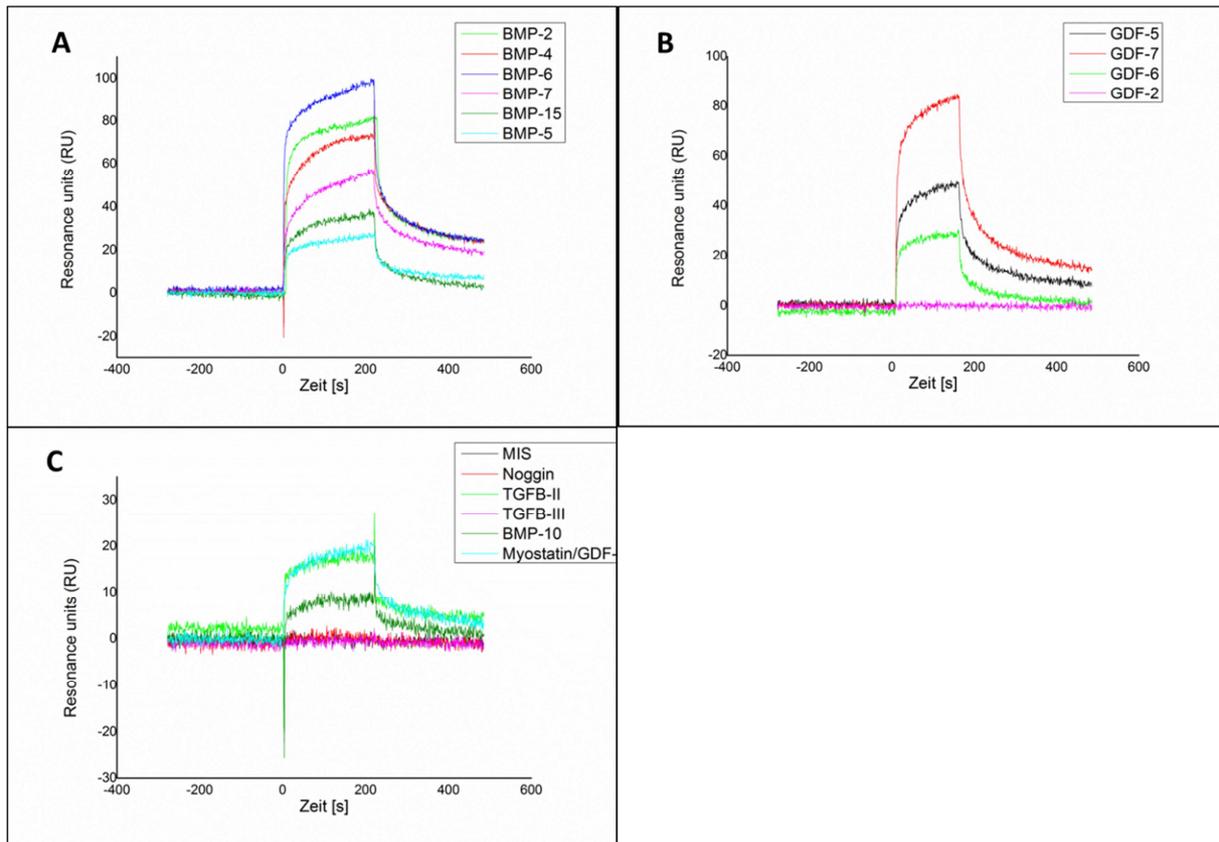


ABBILDUNG 22: SPR-INTERAKTIONSANALYSE ZWISCHEN DER EKTODOMÄNE VON HBAMBI UND LIGANDEN DER TGF β -SUPERFAMILIE

Aufgetragen sind beispielhaft die Interaktion der jeweiligen TGF- β -Liganden mit 250nM hBambi-ECD. Der Zeitpunkt der Analyt-Injektion wurde als Nullpunkt (t) festgesetzt. Alle Werte wurden aus einem Experiment mit sechs unterschiedlichen Konzentrationen erhalten.

Wie in Tabelle 52 gezeigt ist, konnte für verschiedene TGF- β -Liganden und der Ektodomäne von hBambi eine hochaffine Interaktion gemessen und die Bindeaffinität durch Auswertung der Bindungskinetik der SPR-Daten quantifiziert werden. Die Dissoziationskonstante K_D [M] wurde aus den Assoziations- (k_{on} [$M^{-1}s^{-1}$]) und Dissoziationsgeschwindigkeiten (k_{off} [s^{-1}]) anhand folgender Formel berechnet.

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Da einige Sensogramme einen biphasischen Kurvenverlauf aufweisen und die Dissoziationsgeschwindigkeit sehr hoch war, wurde zur Kontrolle die Affinität auch aus der dosisabhängigen Massenlagerung an die Sensoroberfläche (K_{eq}) bestimmt. Hierfür wurden vom Auswertungsprogramm folgende Formeln verwendet:

$$K_{eq} = \frac{R_{max} [A]}{K_D + [A]}$$

$$\text{für } [A] \gg K_D \rightarrow K_{eq} = R_{max}$$

$$\text{für } [A] \ll K_D \rightarrow K_{eq} = \frac{R_{max} [A]}{K_D}$$

K_{Eq}	dosisabhängige Massenlagerung [M]
R_{max}	maximale Anlagerung [RU]
R_{eq}	Anlagerung im Gleichgewicht ($k_{on}=k_{off}$) [RU]
K_D	Dissoziationskonstante [M]
[A]	Proteinkonzentration des Analyten [$mg\ mL^{-1}$]

Vergleicht man die so auf unterschiedliche Weise erhaltenen Affinitäten (K_D und K_{eq}), so unterscheiden sie sich mitunter stark voneinander. Der K_{eq} -Wert ist zumeist viel höher als der Wert der Dissoziationskonstante K_D . Der Grund dafür könnte sein, dass bei manchen Messungen der Gleichgewichtszustand, in dem die Menge an dissoziierendem Analyten vom Liganden gleich der Menge der assoziierenden Analyten ist. Die Nettoauf- und -abnahme sind in diesem Zustand gleich null. Aus diesem Grund genügen die K_{eq} -Werte nur einer ungefähren Orientierung.

Ligand	gemessene Bindungsaffinität mit hBambi-ECD-Protein			
	k_{on} [1/Ms] $\times 10^3$	k_{off} [1/s] $\times 10^{-3}$	K_D * in nM	K_{eq} ** in nM
BMP-2	76 ± 5	2,9 ± 0,8	38 ± 16	76 ± 17
BMP-3a	---	---	k.B.***	k.B.***
BMP-4	767 ± 56	14 ± 4	19 ± 7	241 ± 56
BMP-5	723 ± 38	42 ± 5	58 ± 13	120 ± 59
BMP-6	1800 ± 750	13 ± 3	7	185 ± 38
BMP-7/OP-1	143 ± 47	3,9 ± 2	27 ± 4	151 ± 22
BMP-10/GDF-2	---	---	k.B.***	k.B.***
BMP-15/GDF-9b	15 ± 4	34 ± 24	2666 ± 600	3870 ± 2870
GDF-5/BMP-14	172 ± 19	32 ± 2	186 ± 10	156 ± 42
GDF-6/BMP-13	135 ± 3	61 ± 6	451 ± 20	237
GDF-7/BMP-12	165 ± 17	44 ± 1	266 ± 58	111 ± 38
Myostatin/GDF-8	7600 ± 3800	1900 ± 330	250 ± 87	196 ± 22
MIS/AMH	---	---	k.B.***	k.B.***
TGFB-II	---	---	k.B.***	k.B.***
TGFB-III	---	---	k.B.***	k.B.***

*) K_D ermittelt über die Auswertung *heterogeneous analyt* der Software ProteOn Manager 3.0

**) K_{eq} ermittelt über die Auswertung der Gleichgewichte zwischen Assoziation und Dissoziation des Analyten über den Konzentrationen der verwendeten Analytlösungen

***) keine Bindung meßbar

TABELLE 52: AFFINITÄTEN DER EKTODOMÄNE VON HBAMBI ZU VERSCHIEDENEN LIGANDEN DER TGF- β -SUPERFAMILIE

Allen so erhaltenen Interaktionsdaten zu den hier verwendeten TGF- β -Liganden weisen als gemeinsames Merkmal eine sehr schnelle Assoziation (k_{on}) und eine ebenfalls sehr schnelle Dissoziation (k_{off}) auf. Die ermittelten jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D lassen einen interessanten Zusammenhang erkennen. So bindet die Ektodomäne von Bambi ausschließlich an Liganden, die über BR1A und/oder BR1B als Typ-I-Rezeptor signalisieren. Innerhalb dieser Gruppe fällt noch eine weitere Besonderheit auf. So ist die Bindung zur Untergruppe mit BMP-2 und -4 sowie der Proteingruppe um BMP-5,-6 und -7 am stärksten. Mitglieder der über BR1A und BR1B-signalisierenden Gruppe der GDFs (mit GDF-5,-6 und -7) zeigen ebenfalls deutliche, spezifische Bindung im nanomolaren Bereich an Bambi. Die Messung von Bambi mit BMP-15 sowie GDF-8/Myostatin sind sehr fehlerbehaftet und sind wenig aussagekräftig. Andere untersuchte Liganden der TGF- β -Protein-Superfamilie wie TGF- β -I und -II sowie GDF-2 und BMP-3a zeigen keinerlei Bindung an Bambi. Der Nachweis der Bindung von Bambi an über BR1A- und BR1B-signalisierende Liganden liefert einen Hinweis auf einen möglichen Mechanismus der Einflussnahme von Bambi auf die BMP-vermittelte Signalweiterleitung an. Es scheint, als sei die Ähnlichkeit auf Primärstrukturebene zu BR1A und BR1B auch in der Möglichkeit der Bindung an die jeweiligen Liganden begründet. Allen gemessenen Affinitäten gemein sind eine jeweils sehr hohe k_{on} und k_{off} -Rate. Die k_{on} -Rate ist

z.B. im Fall von BMP-2 verglichen zu dessen bekanntem Bindepartner, der Ektodomäne von BR1A ca. zweimal so hoch, wohingegen die Dissoziation (k_{off}) von Bambi von BMP-2 ungefähr 20x schneller verläuft (Keller *et al.*, 2004). Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass hBambi-ECD auf der Ebene der Liganden Einfluss auf die BMP-Signalkaskade nimmt. Um die Bindung von Bambi an BMP-2 genauer zu untersuchen, sollten SPR-Bindestudien mit Bindungsmutanten von BMP-2 weiteren Aufschluss über diese Bindung ermöglichen.

3.9.5 AFFINITÄTSMESSUNGEN MIT BINDUNGSMUTANTEN VON BMP-2

Da die hier erhaltenen *in vitro* Bindedaten auf einen völlig anderen Wirkmechanismus als den in der Literatur beschriebenen Mechanismus der direkten Interaktion von Bambi mit den BMP-Typ-I-Rezeptoren hindeuten, wurde versucht, die Interaktion der Ektodomäne von Bambi mit TGF- β -Liganden strukturell näher zu untersuchen. Das auf der ähnlich zu BMP-Typ-I-Rezeptoren beruhende 3D-Modell für die Bambi Ektodomäne suggeriert einen ähnlichen Interaktionsmechanismus für die Bambi-BMP-Ligand-Wechselwirkung. Daher wurde mit in der Arbeitsgruppe vorhandenen BMP-2-Varianten getestet, ob diese Rezeptorbindungs-defizienten BMP-2-Proteine ebenfalls eine veränderte Wechselwirkung mit der Bambi Ektodomäne aufweisen.

Ligand	Effekt	Quelle
BMP-2 wt	---	Keller <i>et al.</i> (2004)
BMP-2 L100K N102D	erhöhte Affinität zu ActR-II und ActR-IIb	Weber <i>et al.</i> (2007)
BMP-2 L51P	keine Affinität zu Typ-I-Rezeptoren	Keller <i>et al.</i> (2004)
BMP-2 L51P A34D	keine Affinität zu Typ-I- und stark verringerte Affinität zu Typ-II-Rezeptoren	Keller <i>et al.</i> (2004) Kirsch <i>et al.</i> (2000)

TABELLE 53: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN BMP-2 BINDUNGSMUTANTEN UND DEREN EIGENSCHAFT

Verschiedene Bindungsmutanten von BMP-2 sollten zeigen, ob einzelne Aminosäureaustausche, die Auswirkungen auf die Interaktion zu BMP-Rezeptoren haben, auch die Bindung von hBambi-ECD beeinflussen. Hierfür wurden drei BMP-2-Mutanten sowie eine BMP-2 Wildtyp (s. Tabelle 53) wie beschrieben (s. 2.2.4.6) auf einem GLC-Sensorchip immobilisiert.

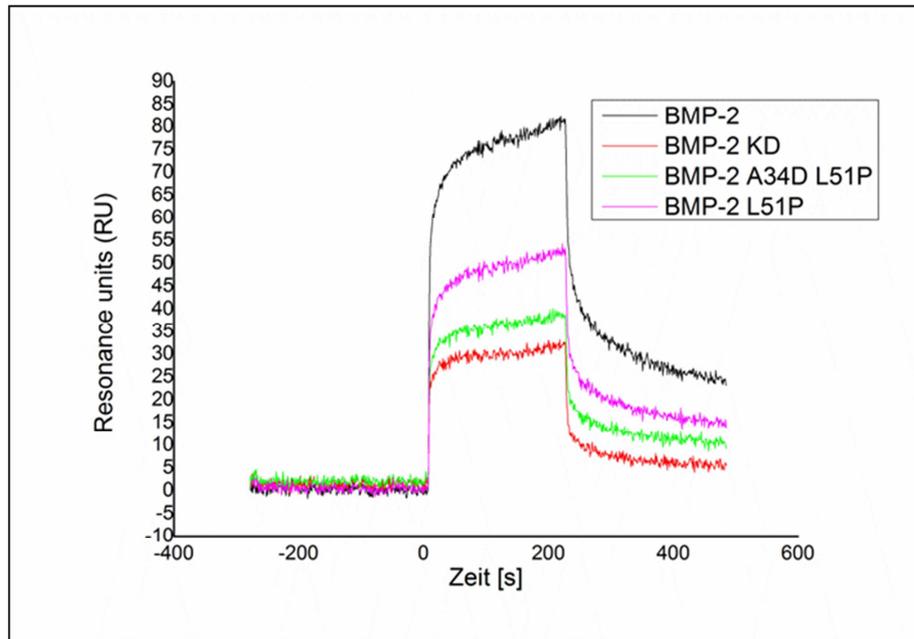


ABBILDUNG 23 SPR-INTERAKTIONSANALYSE ZWISCHEN DER EKTODOMÄNE VON HBAMBI UND VARIANTEN VON BMP-2

Aufgetragen sind beispielhaft die Interaktion der jeweiligen BMP-2-Varianten mit 250nM hBambi-ECD. Der Zeitpunkt der Analyt-Injektion wurde als Nullpunkt (t) festgesetzt.

Die Affinitäten der Ektodomäne von hBambi zu den hier verwendeten BMP-2-Mutanten zeigen keine signifikant unterschiedlichen Werte im Vergleich mit wildtypischem BMP-2. So liegt die berechnete dosisabhängige Massenlagerung K_{eq} bei allen vier vermessenen BMP-2-Varianten im Bereich zwischen 30-70nM. Ebenfalls in ähnlichen Bereichen liegen die Werte für k_{on} und k_{off} . (s. Tabelle 54).

Ligand	Bindungsaffinität mit hBambi-ECD-Protein			
	k_{on} [1/Ms] $\times 10^3$	k_{off} [1/s] $\times 10^{-3}$	K_D^* in nM	K_{eq}^{**} in nM
BMP-2	54 ± 12	$1,3 \pm 0$	24 ± 8	34 ± 8
BMP-2 L100K N102D	35 ± 7	$4,6 \pm 0,3$	131 ± 41	59 ± 18
BMP-2 L51P	49 ± 6	$4,6 \pm 0,3$	94 ± 50	43 ± 14
BMP-2 L51P A34D	93 ± 13	$3,3 \pm 0,2$	35 ± 15	69 ± 18

*) K_D ermittelt über die Auswertung *heterogeneous analyt* der Software ProteOn Manager 3.0

**) K_{eq} ermittelt über die Auswertung der Gleichgewichte zwischen Assoziation und Dissoziation des Analyten über den Konzentrationen der verwendeten Analytlösungen

TABELLE 54: AFFINITÄTEN DER EKTODOMÄNE VON HBAMBI ZU VERSCHIEDENEN VARIANTEN VON BMP-2

Der anhand des 3D-Strukturmodells des extrazellulären Anteils von hBambi vermutete, ähnliche Interaktionsmechanismus zu BR1A ist mit den erhaltenen Werten weder zu bestätigen noch abzulehnen. Gerade die Stelle der Anlagerung von hBambi-ECD-Protein am BMP-2-Molekül sollte in weiteren, zellbiologischen Experimenten weiter untersucht und nach Möglichkeit bestimmt werden. Festzuhalten bleibt durch die hier durchgeführten

Interaktionsmessungen allerdings, dass die an der Bindung von BR1A beteiligten Seitenketten der hier verwendeten Punktmutanten von BMP-2 wenig bis gar keinen Einfluss auf die Bindung zwischen hBambi-ECD-Protein und BMP-2 haben und sich die Bindung, falls sie an ähnlicher Stelle erfolgt, nicht über die gleichen Hauptbindungs determinanten erfolgt.

3.10 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITEN

3.10.1 DOSISABHÄNGIGE INHIBITION DES BMP-2-SIGNALS IM ZELLULÄREN KONTEXT DURCH DIE EKTODOMÄNE VON HBAMBI

Aus den SPR-Messungen geht hervor, dass hBambi-ECD-Protein BMP-2 bindet (s. 3.9). Ist die Bindestelle an ähnlicher Stelle zu der der Typ-I- oder Typ-II-Rezeptoren, so findet eine Kompetition um freies BMP-2 statt. Genauere Aussagen über die Stelle der Bindung am Liganden konnten ebenso wenig wie die Auswirkung der Bindung auf die Signalweiterleitung getroffen werden. Die Frage, ob die Bindung der löslichen Ektodomäne von hBambi an einen TGF- β -Liganden dessen signalinduzierende Wirkung beeinträchtigt, sollte in kompetitiven Stimulationsversuchen mit den BMP-responsiven Zelllinien *ATDC5*, *C2C12* und *C3H10T1/2* BRELuc geklärt werden. Da zunächst die Wirkung der löslichen Ektodomäne im Zellversuch getestet wurde und somit eine direkte Einflussnahme auf intrazelluläre Signalkaskaden sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann, wurde auch in diesem Versuchsansatz eine BMP-hemmende Wirkung für Bambi erwartet. Als Ansatz wurde die dosisabhängige Bildung der alkalischen Phosphatase nach externer Zugabe von BMP-2 zu Grunde gelegt, welche nach Literaturdaten durch eine BMP-abhängige Aktivierung des MAP-Kinasesignalwegs gebildet wird (Katagiri *et al.*, 1994). Die biologische Aktivität und Auswirkung von Bambi wurde in den beiden Zelllinien *ATDC5* und *C2C12* untersucht. Als zweiter Ansatz wurde die BMP-abhängige Aktivierung des SMAD-1/-5/-8-Signalwegs analysiert. Hierzu wurde die stabil mit einem Luziferase-Reportergen transfizierte Zelllinie *C3H10T1/2* BRELuc für die Nachweisreaktion eingesetzt, die dosisabhängig Luziferase nach Zugabe von BMP-2 bildet (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2006).

Die Auswertung der dosisabhängigen Inhibition erfolgte anhand der Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} . Da es sich bei dem Stimulator (BMP-2) und dem Inhibitor (hBambi-ECD) um lösliche Faktoren handelt, variiert der IC_{50} -Wert abhängig von deren eingesetzter Konzentration. Eine allgemeine Aussage über die Bambi-vermittelte Inhibition ist daraus nicht abzuleiten, da abhängig von den eingesetzten Konzentrationen die

Menge an freiem, signalaktivem BMP-2, welches an die Oberflächenrezeptoren der Zellen binden kann, variiert. Aus diesem Grund wurde die inhibitorische Konstante K_i , die eine absolute Aussage über das kompetitive reversible inhibitorische Potential der löslichen Ektodomäne von Bambi auf die BMP-2-vermittelte Stimulation zulässt, nach einer für Oberflächenrezeptoren angepassten Cheng-Prusoff-Gleichung nach Lazareno und Birdsall berechnet (Lazareno & Birdsall, 1993).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[BMP-2]}{EC_{50}(BMP-2)}}$$

K_i	inhibitorische Konstante in [nM]
IC_{50}	über sigmoidale Regression experimentell bestimmte inhibitorische Stärke von hBambi-ECD in [nM]
[BMP-2]	eingesetzte Konzentration von BMP-2 in [nM]
$EC_{50}(BMP-2)$	experimentell ermittelte Konzentration von BMP-2 bei 50% der maximal gemessenen Signalaktivität ohne Inhibitor in [nM]

Umso niedriger der Wert der inhibitorischen Konstante K_i ist, desto größer ist der antagonistische Effekt auf die inhibierte reversible Reaktion, der von dem untersuchten Inhibitor ausgeht.

Bei *ATDC5*-Zellen handelt es sich um eine embryonale murine Karzinom-Knorpelzelllinie, die verschiedene Differenzierungsstadien durchläuft. Auf den ersten prä-chondrogenen Zustand folgen das Stadium der proliferierenden Chondrozyten sowie ein hypertropher und kalzifizierender Zustand der Chondrozyten. Erreichen die Zellen durch den Stimulus von BMP-2 und dessen Bindung an endogene Typ-I- (BR1A) und Typ-II-Rezeptoren (BMPRII) den hypertrophen Zustand, so geht mit dieser letzten Differenzierungsstufe ein Anstieg der alkalischen Phosphatase einher, die in diesem Versuch korrelierend für die Stärke des BMP-2-Stimulus gemessen wird. (Shukunami *et al.*, 1998)

ATDC5-Zellen wurden hierfür, wie unter 2.2.5.4.1 beschrieben, ausgesät und nach 24h für 72h mit unterschiedlichen Konzentrationen hBambi-ECD und einer konstanten Konzentration von 10nM BMP-2 versetzt.

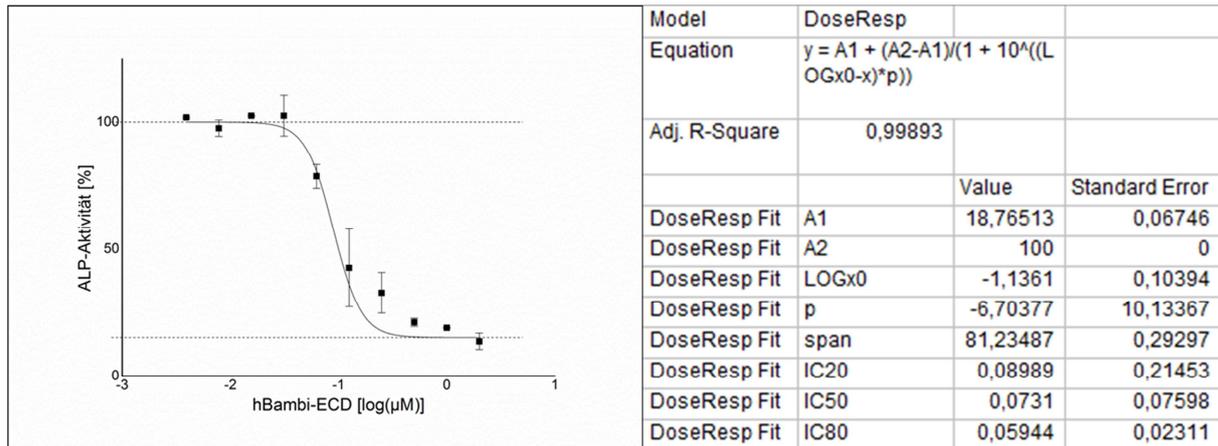


ABBILDUNG 24: HEMMUNG DER BMP-INDUZIERTEN ALP-EXPRESSION DURCH DIE LÖSLICHE EKTODOMÄNE VON HBAMBI IN ATDC5-ZELLEN

Gegen die normalisierte Aktivität der in den Zellkulturüberstand sezernierten alkalischen Phosphatase in % ist die logarithmierte Konzentration in μM des exogen zugegebenen hBambi-ECD-Proteins aufgetragen. Die obere Linie spiegelt den Mittelwert ($n=10$) der maximal erreichten ALP-Aktivität und somit die Maximalstimulation bei Stimulation durch 10nM BMP-2 ohne gleichzeitige Zugabe von Bambi wider. Die untere Linie zeigt die mittlere ($n=10$) Hintergrundexpression von ALP in ATDC5-Zellen ohne BMP-2-Zugabe. Um den Einfluss unterschiedlicher Zellproliferation auf die Messwerte auszuschließen, wurden die Messwerte durch Bestimmung der Zellzahl mittels Cell Proliferation Reagent WST-1 (TaKaRa) normiert. Die Linie zeigt die dosisabhängige sigmoidale Regression mit fixiertem Maximalwert A2. Die gezeigten Daten wurden in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

Da sich die eingesetzten Zellen beim Ansetzen des Versuchs im Wachstum befanden, kann nicht garantiert werden, dass in jeder Vertiefung der Platte stets gleich viele lebende Zellen mit in die Messung eingehen und somit das Ergebnis verfälscht worden wäre. Aus diesem Grund wurde mittels Cell Proliferation Reagent WST-1 (TaKaRa) direkt vor der ALP-Bestimmung wie vom Hersteller angegeben ein Viabilitätstest durchgeführt und mit den erhaltenen Werten die Messergebnisse der anschließenden ALP-Messung auf die Zahl lebendiger Zellen normalisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe von $2\mu\text{M}$ hBambi-ECD-Protein das durch 10nM BMP-2 induzierte Signal komplett inhibiert werden konnte und die gemessene ALP-Aktivität auf Höhe des Hintergrundsignals liegt. Geringe Konzentrationen von hBambi-ECD-Protein (z.B. 16nM) zeigen keinen messbaren Einfluss auf die ALP-Bildung. Die ermittelten Messwerte liegen auf Höhe des maximalen Signals, das durch alleinige Zugabe von 10nM BMP-2 erzielt werden konnte. Die mittlere effektive Inhibitionskonstante IC_{50} (Halbhemmkonzentration eines Hemmstoffs, die benötigt wird, um die Aktivität eines bestimmten Substrats einer bestimmten Konzentration um 50% zu senken) wurde näherungsweise über einen nichtlineare sigmoidale Regression (Fit: DoseResp; Software

Origin 9.0) mit fixierten Asymptoten A1 (minimale Signalstärke=15%) und A2 (maximale Signalstärke=100%) zu $91\text{nM} \pm 0\text{nM}$ ermittelt (s. Abbildung 24).

Zum weiterführenden Nachweis der zellbiologischen Aktivität des rekombinant hergestellten hBambi-ECD-Proteins wurde ein ähnlich konzipierter Versuch in *C2C12*-Zellen durchgeführt. *C2C12*-Zellen sind eine murine prämyoblastische Mesenchymzelllinie, die sich spontan zu Myoblasten differenzieren kann. Durch die Stimulanz von BMP-2 differenzieren sich diese Zellen allerdings zu Osteoblasten mit einhergehender ALP-Freisetzung. Der Unterschied zwischen der Induktion der Chondrogenese von *ATDC5*-Zellen und der Osteoblastenbildung von *C2C12*-Zellen liegt in den angesteuerten Signalwegen. Die Differenzierung zu Osteoblasten aus *C2C12*-Zellen erfolgt ausschließlich über den SMAD-1/-5-Signalweg, wohingegen die Bildung chondrogener Zellen aus *ATDC5*-Zellen neben der Aktivierung des SMAD-1/-5-Signalwegs noch weitere, indirekt aktivierte Signalwege benötigt. (Fujii *et al.*, 1999) Aus diesem Grund kann das aus *ATDC5*-Zellen erhaltene Ergebnis die direkte inhibitorische Wirkung von hBambi-ECD-Protein auf den SMAD-Signalweg nicht eindeutig belegen. Lässt sich die beobachtete Inhibition allerdings in *C2C12*-Zellen reproduzieren, so kann der direkte regulatorische Einfluss der löslichen Ektodomäne von Bambi auf den SMAD-Signalweg durch Quantifizierung eines Seitenprodukts der ausgelösten Differenzierung (ALP) belegt werden. Es ist zu erwarten, dass die einzusetzende Konzentration des Antagonisten zur Halbierung des durch BMP-2 erzielten Effekts niedriger als im Versuch mit *ATDC5*-Zellen liegt, da sich dort das SMAD-vermittelte Signal nicht alleine für die Differenzierung und somit die ALP-Freisetzung verantwortlich zeigt.

Erneut wurde die Aktivität von BMP-2 über den ALP-Nachweis bestimmt. Hierfür wurde, wie bei den *ATDC5*-Zellen zuerst eine Dosiskurve mit verschiedenen BMP-2-Konzentrationen von 0-300nM erstellt und eine geeignete Konzentration, bei der sich Veränderungen der Signalstärke am stärksten auswirken würden, bestimmt. So erfolgte der Kompetitionsnachweis bei einer festgelegten BMP-2-Konzentration von 10nM und verschiedenen hBambi-ECD-Mengen von 2 μM in log₂-Verdünnungen wie unter 2.2.5.4.1 beschrieben.

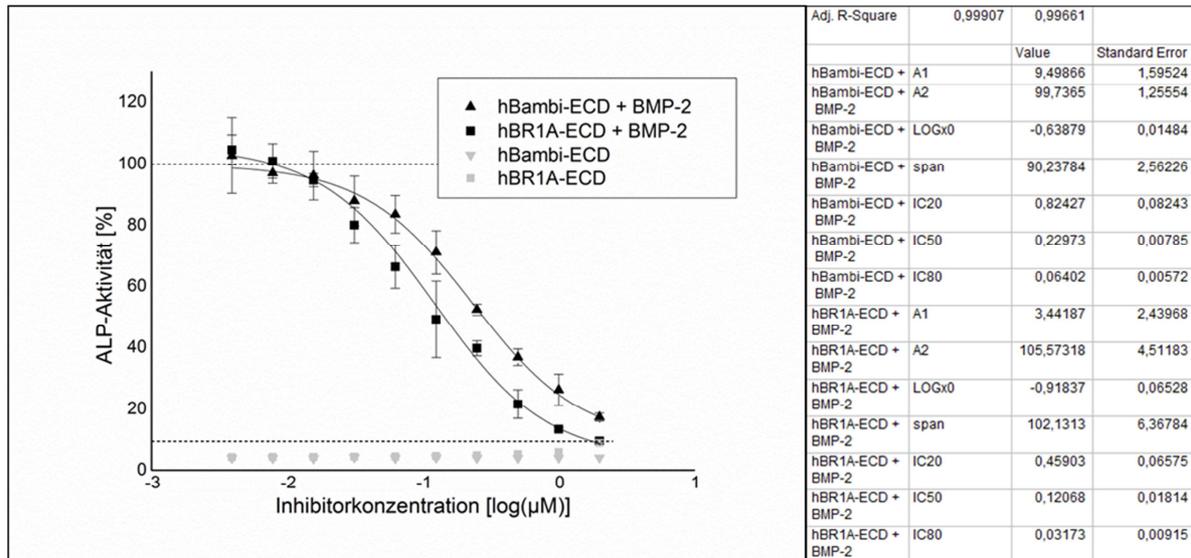


ABBILDUNG 25: HEMMUNG DER BMP-INDUZIERTEN ALP-EXPRESSION DURCH DIE LÖSLICHEN EKTODOMÄNEN VON HBAMBI UND BR1A IN C2C12-ZELLEN

Gegen die normalisierte Aktivität der in den Zellkulturüberstand sezernierten alkalischen Phosphatase in % ist die logarithmierte Konzentration in μM des exogen zugegebenen hBambi-ECD-Proteins aufgetragen. Die obere Linie spiegelt den Mittelwert ($n=10$) der maximal erreichten ALP-Aktivität und somit die Maximalstimulation bei Stimulation durch 10nM BMP-2 ohne gleichzeitige Zugabe von Bambi wider. Die untere Linie zeigt die mittlere ($n=10$) Hintergrundexpression von ALP in C2C12-Zellen ohne BMP-2-Zugabe. Um den Einfluss unterschiedlicher Zellproliferation auf die Messwerte auszuschließen, wurden die Messwerte durch Bestimmung der Zellzahl mittels Cell Proliferation Reagent WST-1 (TaKaRa) normiert. Die Linie zeigt die dosisabhängige sigmoidale Regression mit fixiertem Maximalwert A2. Die gezeigten Daten wurden in einer Dreifachbestimmung ermittelt und über einen WST-1-Nachweis nach Herstellerangaben auf eine einheitliche Zellzahl normiert.

Da sich die eingesetzten Zellen beim Ansetzen des Versuchs im Wachstum befanden, kann nicht garantiert werden, dass in jeder Vertiefung der Platte stets gleich viele lebende Zellen mit in die Messung eingehen und somit das Ergebnis verfälscht worden wäre. Aus diesem Grund wurde mittels Cell Proliferation Reagent WST-1 (TaKaRa) direkt vor der ALP-Bestimmung wie vom Hersteller angegeben ein Viabilitätstest durchgeführt und mit den erhaltenen Werten die Messergebnisse der anschließenden ALP-Messung auf die Zahl lebendiger Zellen normalisiert.

Ähnlich der Hemmung in ATDC5-Zellen konnte mit 10nM BMP-2-induzierte Stimulation der ALP-Expression auch in C2C12-Zellen durch Zugabe hBambi-ECD-Protein in einer Konzentration von $2\mu\text{M}$ annähernd komplett inhibiert werden. In einem Vergleichsversuch wurde die Hemmung durch die lösliche Ektodomäne des hochaffinen BMP-Typ-I-Rezeptors BR1A untersucht. Auch hier konnte durch Zugabe von $2\mu\text{M}$ hBR1A-ECD die durch BMP-2 induzierte ALP-Aktivität komplett inhibiert werden (s. Abbildung 25). Der Wert der mittleren effektiven Inhibition (IC_{50}) wurde, ähnlich wie im Fall des ALP-Nachweises der ATDC5-Zellen,

über eine nichtlineare sigmoidale Regression, in diesem Fall ohne fixierte Asymptoten zu $230\text{nM} \pm 8\text{nM}$ (hBambi-ECD) bzw. $121 \pm 18\text{nM}$ (hBR1A-ECD) berechnet.

C2C12-Zellen weisen eine endogene Expression von BMP- und GDF-Faktoren auf. Dies kann beobachtet werden, da sowohl die lösliche hBambi- als auch die hBR1A-Ektodomäne selbst keine chondrogene Differenzierung in der Zelllinie auslösen. Eine exogene Zugabe beider Ektodomänenproteine ohne gleichzeitige Verabreichung von BMP-2 führen zu einem Absinken der ALP-Aktivität unterhalb des gemessenen Signals im unstimulierten Zustand, was darauf hindeutet, dass unter diesen Bedingungen die beiden Proteine endogene Faktoren neutralisieren, die sich für das ALP-Hintergrundsignal verantwortlich zeigen.

Neben den erwähnten Zelllinien ATDC5 und C2C12 wurde als dritte Zelllinie C3H10T1/2-Zellen verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine pluripotente Fibroblastenzelllinie aus Mausembryonen, die sich zu Zellen der Muskeln, des Fettgewebes, des Knorpelgewebes, aber auch unter Einwirkung von exogenen BMP-Faktoren zu knochenbildenden Osteoblasten differenzieren können (Katagiri *et al.*, 1990). Ein direkter Nachweis der BMP-Stimulanz wäre durch Messung der während der Differenzierung erfolgenden ALP-Expression wie in C2C12-Zellen auch möglich, doch würde dieser Nachweis wieder nicht das SMAD-1/-5/-8-vermittelte Signal direkt in die Zelle und den Zellkern quantifizieren, sondern nur dessen hochregulierende Auswirkung auf die Expression eines endogenen Proteins. Aus diesem Grund wurden C3H10T1/2-Zellen in der Arbeitsgruppe von Peter ten Dijke mit dem BRELuc-Plasmid stabil transfiziert. Das Plasmid kodiert für eine *Renilla*-Luziferase, die strangabwärts von sogenannten *bmp-responsive elements* (BRE) eingefügt wurde. Diese Promotoren werden direkt über den BMP-stimulierten SMAD-1/-5/-8-Signalweg angesteuert. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, direkt und ohne Einflussnahme von anderen sekundären Signalwegen die Menge an BMP-2-aktivierten SMADs, die im Zellkern ankommen, zu messen und somit den signalhemmenden Effekt der Ektodomäne von hBambi auf die BMP-induzierte Stimulation zu quantifizieren. Kann eine Inhibition der Signalstärke einer BMP-responsiven Zellantwort auch noch auf einen anderen Signalweg als den ALP-Nachweis, induziert durch Differenzierung der Zellen, gezeigt werden, kann von einer direkten Bindung von hBambi-ECD an den Induktor und somit die unmittelbare Beeinträchtigung der Signaltransduktion ausgegangen werden.

C3H10T1/2-Zellen wurden wie beschrieben (s. 2.2.5.4.2) ausgesät und anschließend für einen Zeitraum von drei Tagen einer konstanten Konzentration von 10nM BMP-2 stimuliert und dessen Wirkung mit einer steigenden Konzentration (Maximalwert 0,5 μ M, log₂-Verdünnungsreihe) von hBambi-ECD-Protein inhibiert.

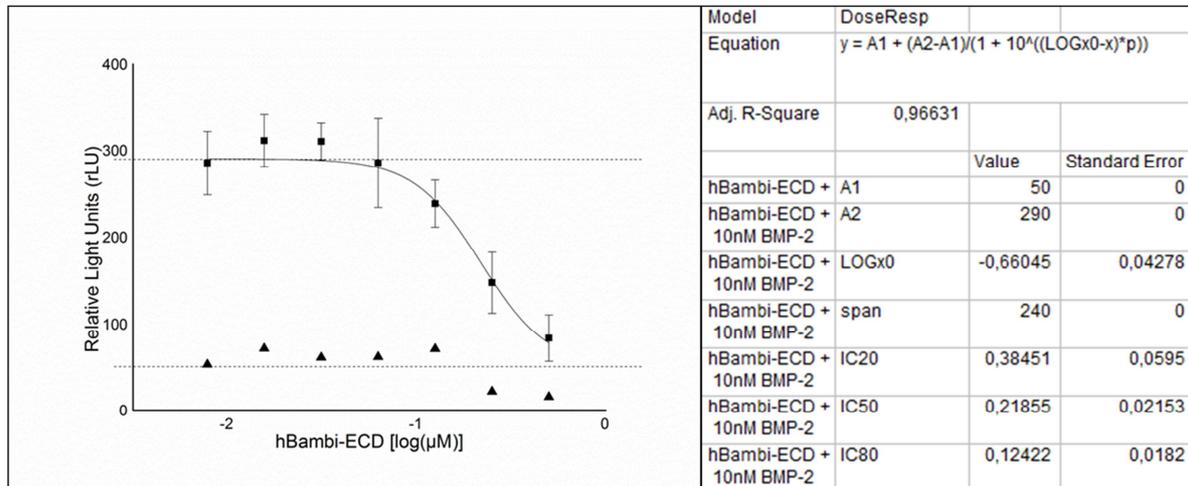


ABBILDUNG 26: DOSISABHÄNGIGE HEMMUNG DER BMP-2-INDUZIERTEN EXPRESSION VON LUZIFERASE DURCH DIE EKTODOMÄNE VON HBAMBI IN *C3H10T1/2*-ZELLEN

Gegen das normalisierte Lichtsignal der *Renilla*-Luziferase in rLU ist die logarithmierte Konzentration in μ M des exogen zugegebenen hBambi-ECD-Proteins aufgetragen. Die obere Linie spiegelt den Mittelwert (n=10) des maximal erreichten Luziferase-Lichtsignals und somit die Maximalstimulation bei Stimulation durch 10nM BMP-2 ohne gleichzeitige Zugabe von hBambi wider. Die untere Linie zeigt die mittlere (n=10) Hintergrundexpression der Luziferase in *C3H10T1/2*-Zellen ohne BMP-2-Zugabe. Um den Einfluss unterschiedlicher Zellproliferation auf die Messwerte auszuschließen, wurden die Messwerte durch Bestimmung des Proteingehalts des Zelllysats mittels Bradford-Reagenz normiert. Die Linie zeigt die dosisabhängige sigmoide Regression mit fixierten Maximal- (A2) und Minimalwerten (A1). Die gezeigten Daten wurden in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

Die in diesem Ansatz beobachtete Hemmung der durch BMP-2-induzierten SMAD-Aktivität durch die lösliche Ektodomäne von hBambi stimmt mit der Hemmung der ALP-Expression gemessen in *C2C12*-Zellen weitgehend überein. So inhibieren 0,5 μ M hBambi-ECD die BMP-2-induzierte Luziferasebildung nahezu vollständig und eine Konzentration von 62nM hBambi-ECD-Protein und weniger haben keinen messbaren Einfluss auf die durch 10nM BMP-2 induzierte Luziferase-Expression. Der Wert der mittleren effektiven Inhibition (IC₅₀) wurde, ähnlich wie im Fall des ALP-Nachweises auf *C2C12*-Zellen, über eine nichtlineare sigmoide Regression mit fixierten Asymptoten zu 219nM \pm 2nM berechnet. (s. Abbildung 26) Dabei konnte der IC₅₀-Wert aus der ALP-Messung (229nM) bestätigt werden.

Zelllinie	IC ₅₀ in [nM]	K _i in [nM]
ATDC5	73	43
C2C12	230	102
C3H10T1/2	219	82

TABELLE 55 WERTE DER INHIBITORISCHEN KONSTANTE K_i FÜR DIE EKTODOMÄNE VON HBAMBI GEGENÜBER BMP-2

Die nach der Cheng-Prusoff-Gleichung berechneten jeweiligen Werte für die inhibitorische Konstante K_i für die Ektodomäne von Bambi gegenüber BMP-2 belegen die inhibitorische Wirkung der Ektodomäne von hBambi, die sich in der direkten Bindung des BMP-Liganden begründet (s. Tabelle 55). hBambi-ECD-Protein bindet BMP-2 und konkurriert mit endogenen Oberflächenrezeptoren der BMP-Signalkaskade um freies BMP-2 und verhindert so die Bildung des signalaktiven, heterohexameren Komplexes. Dadurch wird die Aktivierung der SMAD-1/-5/-8-vermittelten Signaltransduktion gehemmt. Vergleicht man die K_i löslicher hBambi-Ektodomäne mit der K_i der löslichen Ektodomäne von BR1A auf C2C12-Zellen, die sich zu einer Konzentration von 54nM bestimmen lässt, so ist die hemmende Wirkung von Bambi auf den BMP-2-Stimulus in etwa nur halb so stark.

3.10.2 EXPRESSIONSANALYSE VON BAMBI IN VERWENDETEN ZELLINIEN MITTELS KINETISCHER PCR

Vorangegangene Experimente haben gezeigt, dass BMP-Proteine von Bambi gebunden werden können. Es liegt also die Vermutung nahe, dass Bambi biologische Relevanz für BMP-responsive Zellen zu haben scheint. Bei den in den in Punkt 3.10.1 verwendeten Zelllinien handelt es sich um Zellen, denen diese Relevanz zu Eigen ist. Mittels qPCR sollte untersucht werden, ob diese Zellen im unstimulierten Zustand endogenes Bambi bilden und wenn ja, wie sich die Menge an Bambi im Vergleich zum Expressionslevel der BMP-spezifischen Rezeptoren verhält.

Hierfür wurde, wie unter 2.2.11 beschrieben, verfahren. Verwendet wurden die Oligonukleotidpaare *bambi_fwd/bambi_rev* zur Amplifikation eines 106bp langen Fragments sowie zur Normalisierung über β -Aktin das Paar *beta Actin_fwd/beta Actin_rev*, womit ein 171bp-Fragment angereichert werden sollte. Da ein DNA-Stück der Länge 1000bp etwa eine Masse von 1fg hat und 910 Molekülen [molec] entspricht (Melanie Papenfuß, persönliche Mitteilung), ergibt 1fg β -Aktin-Amplifikat etwa 5300molec bzw. 1fg Bambi-Amplifikat etwa 8600molec.

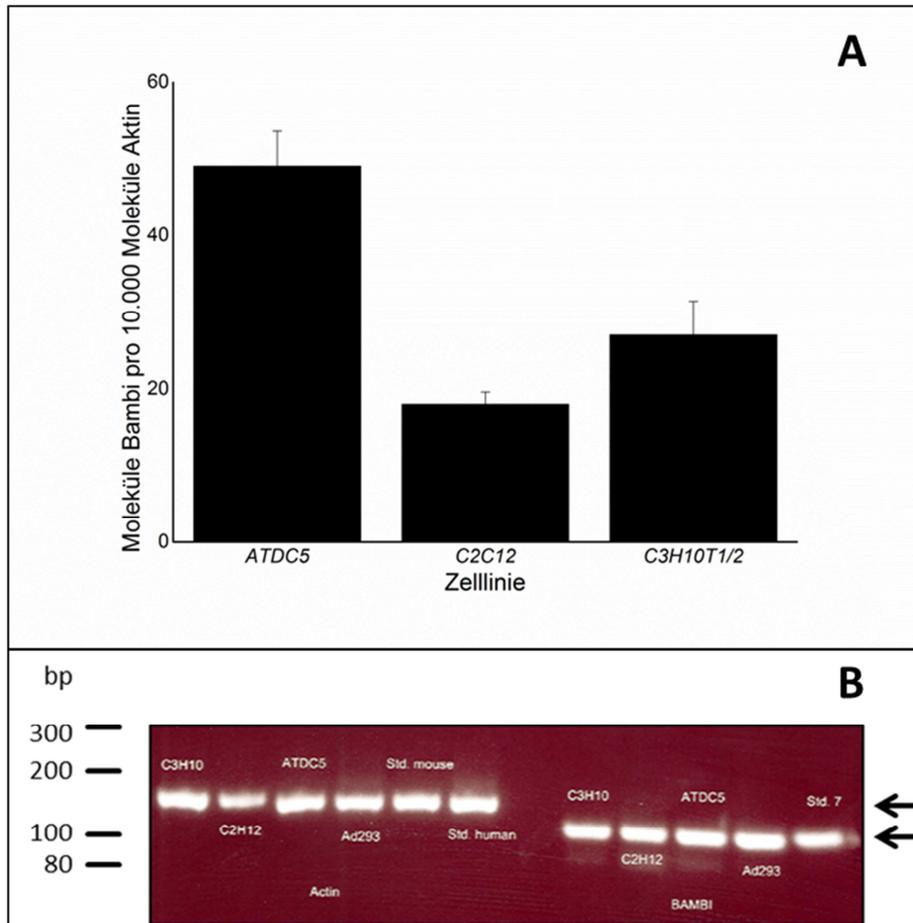


ABBILDUNG 27: QPCR VERSCHIEDENER ZELLINIEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER BAMB1-EXPRESSION IM UNSTIMULIERTEN ZUSTAND

A Im Balkendiagramm sind über den entsprechenden Zelllinien die Mittelwerte für Bambi-Moleküle pro 10.000 Moleküle β -Aktin aus sechs unabhängigen Messungen aufgetragen. **B** Links neben dem Agarosegel sind die Fragmentgrößen des verwendeten Molekulargewichtstandards in bp abgebildet. Die Pfeile geben die zu erwartende Größe der beiden in der PCR-Nachweisreaktion amplifizierten DNA-Fragmente für β -Actin und Bambi wider. Der obere der beiden Pfeile zeigt die Laufhöhe von β -Actin (171bp) und der untere Pfeil die Laufhöhe des amplifizierten Bambi-Stücks (106bp). Die für die DNA-Matrize verwendete Zelllinie ist in der Abbildung angegeben.

Pro Zelllinie wurden jeweils sechs unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt und gemittelt (s. Abbildung 27A und 8.4). In jeder Reaktion konnte beinahe ausschließlich das zu erwartende Amplifikat der richtigen Größe hergestellt und nachgewiesen werden. Unterhalb der DNA-Bande für das Fragment von Bambi konnte eine geringe Menge eines weiteren PCR-Produkts beobachtet werden. (s. Abbildung 27B) Die erhaltenen Ergebnisse sind in Bezug auf eine absolute Aussage über die Anzahl an Bambi auf der Zelloberfläche der verwendeten Zelllinien nicht in Relation zu setzen, da die Expression des verwendeten Referenzproteins β -Actin in C2C12-Zellen sehr stark variiert (Hildyard & Wells, 2014) und zu den anderen untersuchten Zelllinien keine Daten in der Literatur vorliegen. Als Ergebnis dieses Experiments bleibt demzufolge festzuhalten, dass in den in dieser Arbeit verwendeten BMP-

responsiven Zelllinien selbst im unstimulierten Zustand eine definierte Menge Bambi, ebenso wie BR1A (Akiyama *et al.*, 1997), exprimiert wird. Ob sich Bambi, wie zum Beispiel BR1A, in *lipid rafts* im Bereich oder als Teil der PFCs vorliegt, kann bislang nur vermutet werden. Auch über die Rolle, die Bambi im unstimulierten Zustand einnimmt, kann bisher nur spekuliert werden. So könnte Bambi als eine Art Schutzmechanismus vor der Aktivierung der BMP-vermittelten Signalkaskade, die von einer niedrigen Konzentration Aktivator fälschlicherweise ausgelöst werden würde wirken. Ebenso ist eine gegenteilige Funktion denkbar, wonach Bambi agonistisch auf die BMP-Signaltransduktion wirkt und geringe Mengen BMP an der Zelloberfläche durch Bambi „eingefangen“ und in der Nähe der BMP-assoziierten Rezeptoren akkumuliert. Weiteren Aufschluss über die Rolle von Bambi im zellulären Kontext sollten Transfektions- und Stimulationsversuche geben, die im folgenden Punkt beschrieben werden.

3.10.3 TRANSFIZIERTE BAMBI-CHIMÄREN BEEINFLUSSEN DIE TGF- β -INDUZIERTE SIGNALWEITERLEITUNG

3.10.3.1 KLONIERUNG CHIMÄRER KONSTRUKTE AUS HBAMBI UND DEM HUMANEN BMP-REZEPTOR IA

Aus den bisher beschriebenen SPR-Bindestudien mit rekombinant hergestellter löslicher Ektodomäne von Bambi ließen sich Affinität dieser zu über BMP-Rezeptor-IA und -IB-signalisierenden Liganden der TGF- β -Proteinfamilie nachweisen. In beschriebenen Experimenten mit BMP-responsiven Zellen erzeugte die Zugabe von hBambi-ECD eine Signal-hemmende Wirkung auf den BMP-2-vermittelten exogenen Stimulus auf *ATDC5-/C2C12-* und *C3H10T1/2* BRELuc-Zellen. Aus beiden Versuchen können die biologisch relevante Bindung an BMP-2 und die antagonistische Aktivität der Ektodomäne von hBambi abgeleitet werden. Beide Experimente fanden allerdings mit trunkiertem Bambi statt und ließen die eigentliche Natur von hBambi als Transmembranprotein mit Kontakt ins Zytoplasma außen vor. Die Auswirkung der Bindung von BMP-2 im Extrazellulärraum auf zelluläre Vorgänge konnte ebenso wenig bewertet werden wie die Rolle des intrazellulären Anteils von Bambi. Weiterhin konnte zwar in den durchgeführten SPR-Versuchen die Bindung von ActivinA durch die Ektodomäne von Bambi ausgeschlossen werden – dennoch ist es durchaus möglich, dass Bambi als volle Länge Protein bzw. der zytoplasmatische Anteil durchaus die ActivinA-Signalkaskade beeinflusst.

Aus diesem Grund sollten transiente Transfektions- und Stimulationsexperimente mit verschiedenen Konstrukten, die für unterschiedlich zusammengesetzte Domänen von hBR1A und/oder hBambi kodieren, durchgeführt werden. Als Zelllinie wurde die leicht zu transfizierende humane Zelllinie *HEK ad293* (HEK) ausgewählt, da diese endogen über alle notwendigen Rezeptoren für eine Signalweiterleitung der beiden zu verwendenden Stimuli BMP-2 und ActivinA verfügt. Als Transfektionsvektor wurde der Vektor pEF6 B V5 His (Invitrogen) ausgewählt, da dieser eine gut zu transfizierende Größe, gewünschte Tag-Peptidsequenzen und für alle Sequenzen geeignete Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen in der Klonierungsstelle (MCS) bot. Über PCR (s. 2.2.1.4) und anschließenden Restriktionsverdau über die Schnittstellen *kpnI* und *bamHI* wurde N-terminal das Signalpeptid von *hbambi* eingebaut. In der Folge wurde eine weitere V5-Peptidsequenz strangabwärts des neuen Signalpeptids, aber gleichzeitig strangaufwärts der geplanten Insertionsstelle der Chimärenkonstrukte über die Schnittstellen *speI* und *ecorV* integriert. Dieser war für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente nicht von Bedeutung, sollte aber die Konstrukte für später durchzuführende Zellsortierungsexperimente mittels Durchflusszytometrie geeignet machen. Der neu entstandene Basis-Vektor für alle chimären Konstrukte wird in der Folge als pEF6B V5 signal bezeichnet (s. Abbildung 28).

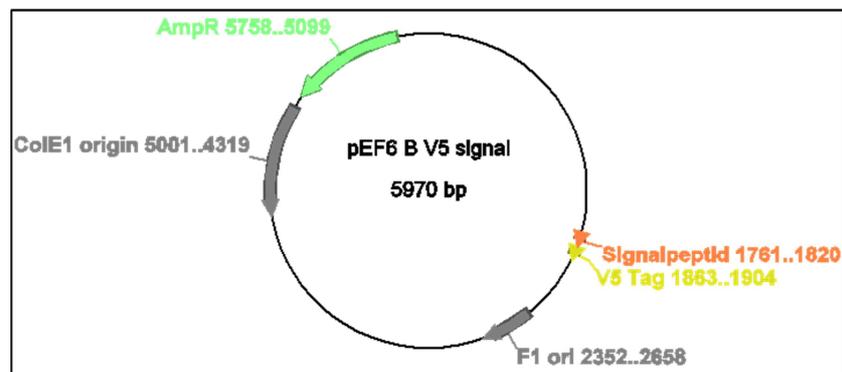


ABBILDUNG 28: VEKTORKARTE DES AUSGANGSVEKTORS DER CHIMÄRENKONSTRUKTE ZUR TRANFEKTION IN HEK-ZELLEN

Gezeigt ist die schematisierte Vektorkarte des veränderten Ursprungsvektors pEF6B V5 His a (Invitrogen). Strangaufwärts der Klonierungsstelle (MCS) wurden das Signalpeptid von hBambi sowie ein V5-Tag zur Expression auf der Zelloberfläche eingefügt.

Die verschiedenen Chimären zwischen hBambi und hBR1A umfassten folgende Konstrukte (s. Abbildung 29):

- hBambi volle Länge (Bambi full): mit diesem Konstrukt sollte die Auswirkung wildtypischem Bambis auf die untersuchten Signalwege unter Stimulanz mit BMP-2 oder ActivinA aufgezeigt werden
- hBambi-ECD, seiner zugehörigen Transmembrandomäne und dem Intrazellulärteil von BR1A (Bambi-ECD-BR1A-ICD): hiermit sollte der Bereich von BMP-2, an den sich die Ektodomäne von hBambi anlagert, näher untersucht werden. Wenn das erstellte 3D-Homologiemodell von hBambi-ECD die Realität widerspiegelt und BMP-2 von Bambi analog zu BR1A gebunden wird, so wäre die angefügte Typ-I-Kinasedomäne im Zytoplasma möglicherweise korrekt orientiert. Kann sich der signalaktive Komplex bilden in dem die Chimäre den Platz des Typ-I-Rezeptors einnehmen und diesen vollständig mimikrieren?
- Der Extrazellulärteil von hBR1A kombiniert mit der Transmembrandomäne und dem intrazellulären Bereich von hBambi (BR1A-ECD-Bambi-ICD): diese Chimäre wurde aus zwei Gründen ausgewählt. Zum einen sollte ein Vergleich mit dem Konstrukt Bambi-full ermöglicht werden. Ist der durch die Transfektion auftretende Effekt bei Stimulation mit BMP-2 vergleichbar oder nicht. Zum zweiten sollte diese Chimäre in Stimulationsversuchen mit ActivinA eingesetzt werden, um den Effekt des intrazellulären Anteils von Bambi auf die Signalkaskade zu beobachten, da der extrazelluläre Anteil von BR1A für diesen Signalweg keine Rolle spielt.
- Der Extrazellulärteil mitsamt Transmembrandomäne von hBambi ohne intrazellulärem Anteil (Bambi-TM-0): diese Chimäre sollte zum Vergleich mit dem Konstrukt Bambi full dienen und Aussagen über den intrazellulären Anteil und dessen Effekt auf beide verwendete Liganden ermöglichen.

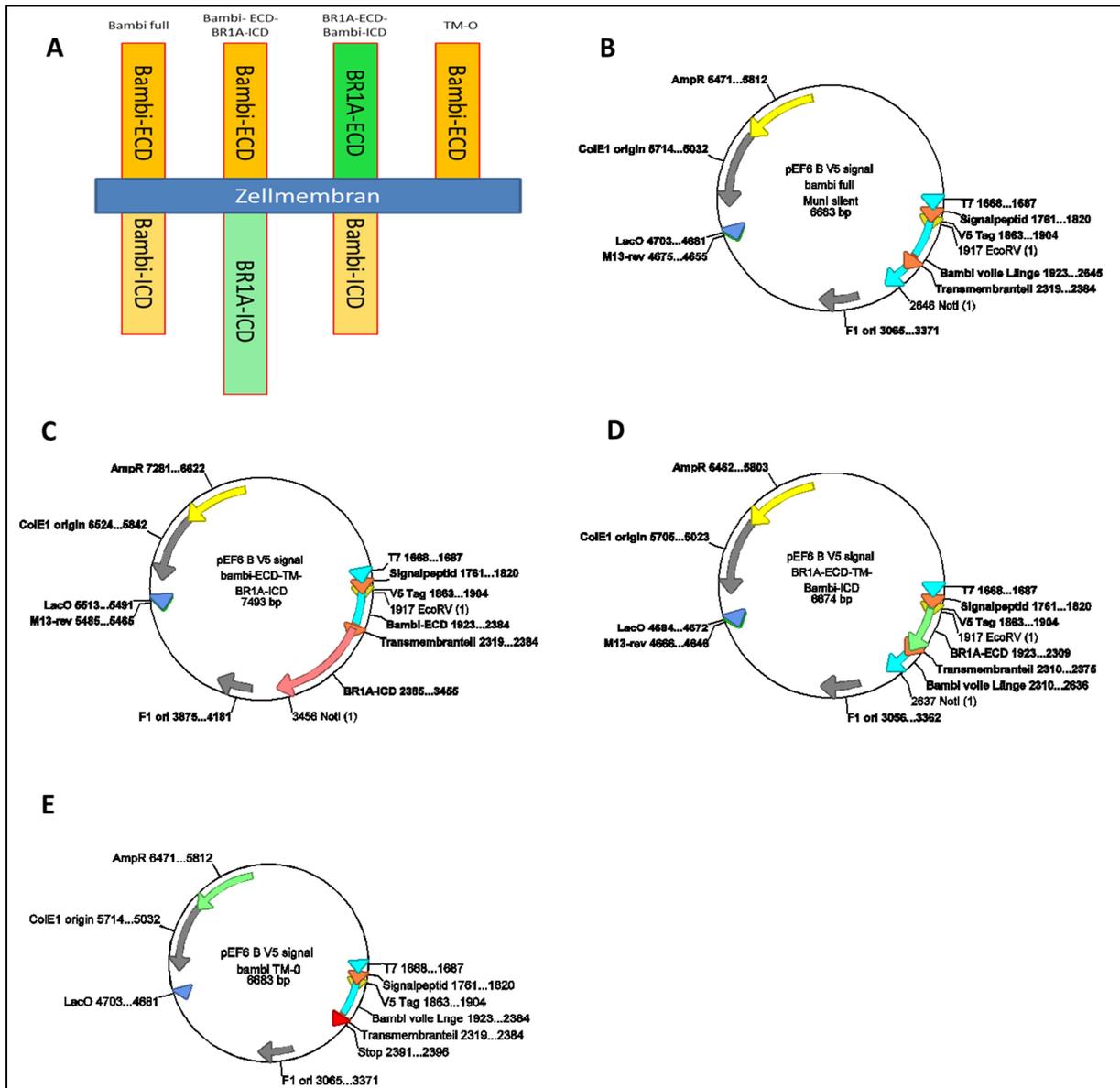


ABBILDUNG 29: SCHEMATISIERTE KONSTRUKTE UND EXPRESSIONSVEKTOREN DER CHIMÄREN ZUR TRANSFEKTION IN HEK-ZELLEN

Gezeigt sind (A) die schematische Darstellung der verschiedenen chimären Konstrukte, die für die Transfektion in *HEK*-Zellen eingesetzt wurden. Die weiteren Abbildungen zeigen die Anordnung der eingefügten Sequenzen in den Basisvektor pEF 6B V5 signal: bambi-full (s. Abbildung 44) (B), Bambi-ECD-BR1A-ICD (s. Abbildung 46) (C), BR1A-ECD-Bambi-ICD (s. Abbildung 47) (D) und Bambi-TM-0 (s. Abbildung 45) (E).

Die beschriebenen Chimären wurden über eine zweistufige PCR im Zwischenvektor pJet1.2 aus dem CloneJet Cloning Kit (Fermentas) zusammengefügt und nach positiver Sequenzierung über die beiden Restriktionsschnittstellen *ecorV* und *notI* in den Transfektionsvektor pEF6B V5 signal eingeführt. Daraus resultierten die in Abbildung 29B-E gezeigten Konstrukte, deren korrekte Ligation per Sequenzierung überprüft wurde und die fortan in die Transfektion der *HEK*-Zellen eingesetzt wurden.

3.10.3.2 DER TRANSFIZIERTE WILDTYP VON hBAMBI HAT AGONISTISCHES WIE AUCH ANTAGONISTISCHES POTENTIAL AUF DIE STIMULATION DURCH LIGANDEN

Zur Messung der Wirkung von wildtypischem Bambi wurden die *HEK*-Zellen wie unter 2.2.5.3.3 beschrieben mit verschiedenen Mengen pEF6B Bambi-full transient transfiziert. Dabei wurden 0-800ng Vektor pro Reaktionsansatz verwendet. Um die Expression auf einheitliche DNA-Mengen zu normalisieren, wurden Ansätze mit DNA des Leervektors aufgefüllt. Zusätzlich wurde eine einheitliche Menge pUHD16-1 zur Kontrolle der Transfektionseffizienz sowie BRELuc bzw. $(CAGA)_3$ -MLP-Luc für den Luziferase-Nachweis co-transfiziert.

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für 24h in Hungermedium kultiviert. Um die Auswirkung von Bambi auf den zu untersuchenden Signalweg (SMAD 1/5/8 bzw. SMAD 2/3) zu untersuchen, wurden die Zellen mit 15nM BMP-2 bzw. 50nM ActivinA für 6h versetzt, ehe die Zellen lysiert und Substrat für die Luziferase zugegeben wurde.

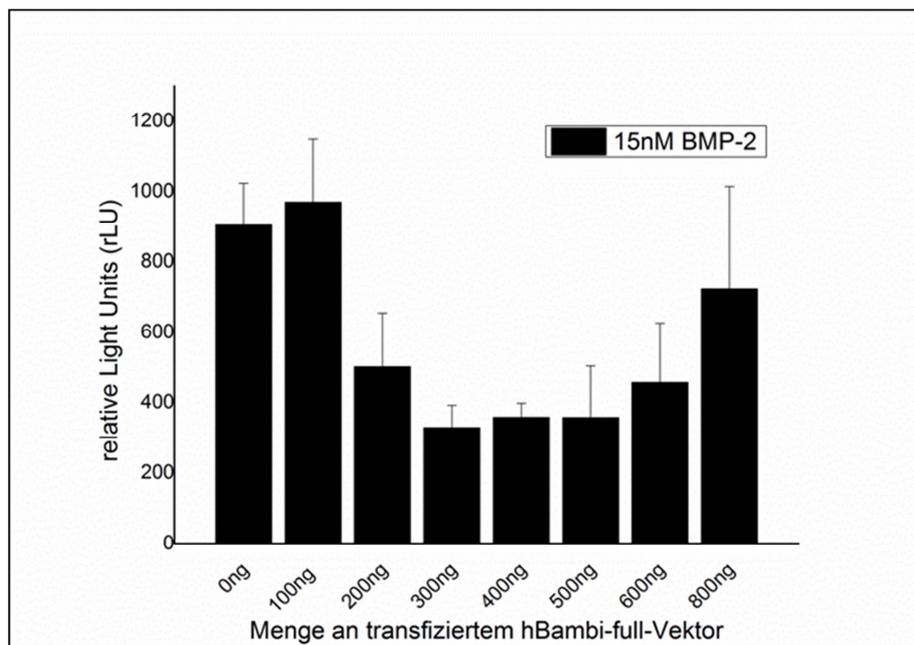


ABBILDUNG 30: GEMESSENE LUZIFERASEAKTIVITÄT NACH STIMULATION DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN MIT BMP-2

Gegen die gemessenen relativen Lichteinheiten (rLU) sind die jeweiligen Konzentration an transfiziertem Vektor pEF 6B V5 signal hBambi-full aufgetragen. Die gemessenen absoluten Lichteinheiten (LU) wurden über einen Bradford-Test auf die Proteinmenge der lysierten Zellen normalisiert und über einen β -Galaktosidase-Nachweis die Transfektionseffizienz mit einberechnet. Alle Werte wurden aus einer Vierfachbestimmung gemittelt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von hBambi in *HEK*-Zellen den durch BMP-2-Gabe stimulierten Signalweg beeinflusst. Dabei sind die erzielten Effekte abhängig von der transfizierten Menge an Transfektionsvektor und somit offenbar von der

exprimierten Menge Bambi in der Zellmembran. Betrachtet man den Reaktionsansatz mit 100ng Transfervektor, so scheint eine geringe Menge Bambi leicht agonistisch auf die BMP-2-Signalweiterleitung zu wirken. Die gemessene Luziferase-Aktivität war leicht erhöht. In Anbetracht der Ergebnisse aus SPR-Messungen (s. 3.9.4) scheint die schnelle Dissoziation von BMP-2 von der Ektodomäne dazu zu führen, dass signalaktiver Ligand in der Nähe der Zelloberfläche akkumuliert wird und der Rekrutierung durch endogenen Typ-I-Rezeptor in höherem Maß verfügbar gemacht wird. Dieses Ergebnis überrascht, da aus der Literatur bislang nur von einer inhibitorischen Wirkung von Bambi auf die BMP-2-vermittelte Signalweiterleitung ausgegangen wird. In veröffentlichten Studien von Onichtchouk und Kollegen wurde allerdings keine Messreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, sondern nur bei einem festen Wert gemessen, wodurch die hier beobachtete Differenzierung in agonistische und antagonistische Effekte nicht möglich war (Onichtchouk *et al.*, 1999). Höhere Mengen von 300-500ng an transfiziertem Vektor führten zur erwarteten Signalverringering, die auf 1/3 der gemessenen Signalstärke der Leertransfektion ohne transfiziertes Bambi sinkt. Bei sehr hohen Konzentrationen von transfiziertem Bambi konnten erhöhte Werte und demzufolge eine Verringerung der Inhibition durch Bambi beobachtet werden. (s. Abbildung 30)

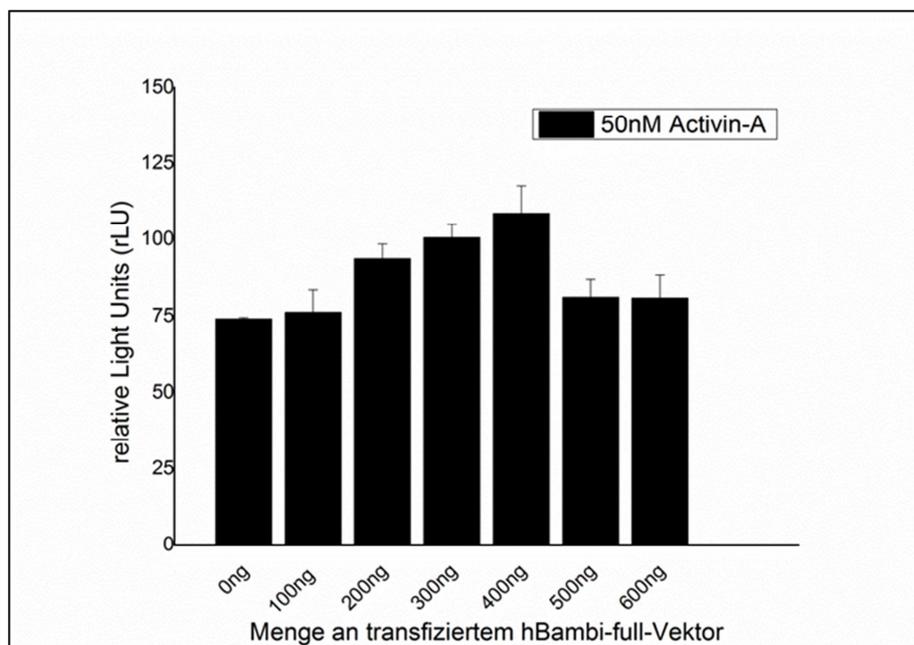


ABBILDUNG 31: GEMESSENE LUZIFERASEAKTIVITÄT NACH STIMULATION DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN MIT ACTIVINA

Gegen die gemessenen relativen Lichteinheiten (rLU) sind die jeweiligen Konzentration an transfiziertem Vektor pEF 6B V5 signal hBambi-full aufgetragen. Die gemessenen absoluten Lichteinheiten (LU) wurden über einen Bradford-Test auf die Proteinmenge der lysierten Zellen normalisiert und über einen β -Galaktosidase-Nachweis die Transfektionseffizienz mit einberechnet. Alle Werte wurden aus einer Vierfachbestimmung gemittelt.

Eine Überexpression von hBambi in *HEK*-Zellen hat keinen inhibitorischen Einfluss auf die von ActivinA-initiierte Signalweiterleitung, wie sie in der Literatur postuliert wird. Die dort erzielten Ergebnisse zeigen, dass injizierte Bambi-RNA zu einer Inhibition des ActivinA-induzierten Signals führt und trunkiertes Bambi (Bambi Δ N), also ohne Ektodomäne, die inhibierende Wirkung von endogenem Bambi unterbindet. Die Autoren schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass der intrazelluläre Anteil von Bambi an endogenes Bambi bindet und dessen Wirkung dadurch negiert. (Onichtchouk *et al.*, 1999)

Zwar sind die gemessenen Luziferase-Werte bei einer Transfektion von 200-400ng im Vergleich zur Leertransfektion leicht erhöht, doch sind die Auswirkungen weit weniger drastisch zu sehen, als im Fall der BMP-2-Stimulation. Da der extrazelluläre Teil von hBambi weder mit ActivinA und dessen Wirkrezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren kann (s. 3.9.2f), bleibt die Möglichkeit einer Interaktion zwischen der ICD von hBambi mit Teilnehmern im Zellinneren und in deren Folge eine Einflussnahme auf den SMAD-2/-3 vermittelten Signalweg. Die Literaturmeinung, nämlich dass Bambi hemmend auf die ActivinA-vermittelte Signalweiterleitung wirkt, konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden. Der beobachtete Effekt zeigt, soweit möglich, das Gegenteil. Bambi scheint in bestimmten Konzentrationen das ActivinA-vermittelte Signal zu verstärken. Ob die intrazelluläre Domäne tatsächlich den ActivinA-Stimulus durch seine angeblich deaktivierende Wirkung auf endogenes Bambi zeigt oder ob der beobachtete Effekt über einen sekundären oder gänzlich alternativen Signalweg erfolgt, kann sich in einem folgenden Experiment mit chimären Varianten von Bambi zeigen. Die Chimäre BR1A-ECD-Bambi-ICD verfügt über eine für die ActivinA-Signalkaskade nicht relevante Ektodomäne und müsste sich gemäß der Literatur wie trunkiertes Bambi (Bambi Δ N) verhalten und die erzielten Ergebnisse von Onichtchouk und Kollegen entweder bestätigen oder widerlegen.

3.10.3.3 TRANSFIZIERTE CHIMÄRE REZEPTOREN OFFENBAREN DIE BINDESTELLE VON BAMBI AN BMP-2

Erste Transfektionsversuche von wildtypischem Bambi enthüllten dessen Auswirkung auf BMP-2- bzw. ActivinA-vermittelte Signalkaskaden. Dabei zeigten die Ergebnisse im Fall von BMP-2 ein ambivalentes Verhalten von Bambi. Eine niedrige Konzentration des angeblichen Inhibitors zeigte einen die Stimulation des SMAD-1/-5/-8-Signalwegs unterstützenden Effekt, wohingegen eine höhere Expression zur in der Literatur postulierten Inhibition des selbigen führte. Im Fall der ActivinA-induzierten Stimulation des SMAD-2/-3-vermittelten Signals ließ

sich diese nicht wie in der Literatur beschriebenen Experimenten bestätigen (s. 3.10.3.2). Um zu differenzieren, welche Bereiche von Bambi sich für welche Beobachtung verantwortlich zeigen und ob bislang angestellte Vermutungen und Interpretationen zutreffend sind, wurden verschiedene Rezeptorchimären kloniert (s. 3.10.3.1).

Dabei waren im Fall des SMAD-1/-5/-8-Signalwegs, der von BMP-2 adressiert ist, mehrere Fragen zu untersuchen: geht die durch Bambi in höheren Transfektionskonzentrationen beobachtete Inhibition ausschließlich von der BMP-2-bindenden Ektodomäne aus oder wird der Effekt in Anwesenheit des intrazellulären Teils verstärkt (Bambi full vs. Bambi-TM-0)? Wie verändert sich der inhibitorische Effekt, wenn der extrazelluläre Anteil von Bambi durch den von BR1A ersetzt wird (Bambi full vs. BR1A-ECD-Bambi-ICD)? Verliert der Typ-I-Rezeptor seine Fähigkeit zur Bildung des signalaktiven heterohexameren Komplexes, wenn dessen extrazelluläre Domäne mit der von Bambi ersetzt wird oder ist die Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD ein funktioneller Typ-I-Rezeptor, der in *lipid rafts* einwandert und dort an der Bildung von PFCs beteiligt sein kann?

Auch hinsichtlich des durch ActivinA-adressierten SMAD-2/-3-Signalweges sollten verschiedene Fragestellungen anhand der im Folgenden beschriebenen Versuche untersucht werden: Ist die von Onichtchouk und Kollegen postulierte inhibitorische Wirkung mit Einzelkomponenten von Bambi nachzuweisen? Wenn ja, welcher Teil von Bambi zeigt sich dafür verantwortlich (Bambi full vs. BR1A-ECD-Bambi-ICD; Bambi-TM-0)? Kann die agonistische Wirkung von trunkiertem Bambi (Bambi Δ N) auf das gemessene Signal beobachtet werden (BR1A-ECD-Bambi-ICD vs. Mock)?

Um den Einfluss von intra- und extrazellulären Domänen von hBambi gezielt zu untersuchen, wurden die in Punkt 3.10.3.1 beschriebenen Konstrukte zu 200ng zusammen mit je 50ng pUHD16-1 und 50ng BRELuc bzw. (CAGA)₉-MLP-Luc pro Reaktionsansatz in HEK-Zellen transient transfiziert (s. 2.2.5.3.3). So wurde die extrazelluläre Domäne mit der intrazellulären Kinasedomäne von BR1A kombiniert (Bambi-ECD-BR1A-ICD), sowie umgekehrt, der intrazelluläre Anteil mit der ECD von BR1A zusammengeführt (BR1A-ECD-Bambi-ICD). Weiterhin wurde eine der sich in der Zelle befindliche Teil von hBambi abgetrennt (Bambi-TM-0).

Nach erfolgter Transfektion und durchlaufener Hungerphase wurde für jeweils 6h 20nM BMP-2 bzw. 50nM ActivinA zugegeben und mit den Zellen wie vorher beschrieben verfahren.

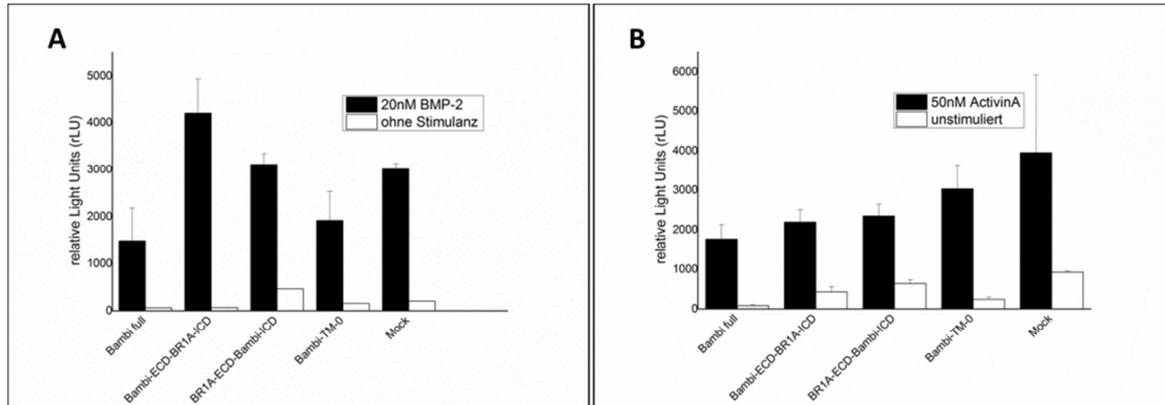


ABBILDUNG 32: GEMESSENE LUZIFERASEAKTIVITÄT NACH STIMULATION DER MIT CHIMÄREN KONSTRUKTEN TRANSFIZIERTEN HEK-ZELLEN MIT BMP-2 BZW. ACTIVINA

Gegen die gemessenen relativen Lichteinheiten (rLU) sind die jeweiligen chimären Vektoren aufgetragen. Die Stimulation erfolgte mit **A** 20nM BMP-2 bzw. **B** 50nM ActivinA. Die gemessenen absoluten Lichteinheiten (LU) wurden über einen Bradford-Test auf die Proteinmenge der lysierten Zellen normalisiert und über einen β -Galaktosidase-Nachweis die Transfektionseffizienz mit einberechnet. Alle Werte wurden aus einer Vierfachbestimmung gemittelt.

In der Untersuchung des Einflusses von Bambi auf die BMP-2-aktivierte SMAD-1/-5/-8-Signaltransduktion haben die transfizierten Chimären alle unterschiedlichen Einfluss auf das gemessene Lichtsignal relativ zur Leertransfektion (Mock). So kann die durch Bambi full erreichte Inhibition aus einer vorrangegangenen Messung bestätigt werden (s. 3.10.3.3). Bambi-ECD-BR1A-ICD steigert die ursprüngliche Signalstärke um ca. 25%, was darauf hindeutet, dass die Bindungsstelle an BMP-2 vergleichbar mit der Bindungsstelle des extrazellulären Teils des BMP-Typ-I-Rezeptors BR1A zu sein scheint. Die Möglichkeit besteht, dass die Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD in den signalaktiven Komplex rekrutiert werden könnte und dort wildtypisches BR1A als funktioneller Typ-I-Rezeptor ersetzt. Dadurch würde die intrazelluläre Typ-I-Kinase korrekt orientiert und für die konstitutiv aktive Typ-II-Kinase als Substrat zugänglich liegen und könnte so die Transphosphorylierung des SMAD-1/-5/-8-Signalweges weitergeben. In diesem Experiment würde sich also die Erhöhung der Lichtintensität darauf begründen, dass zusätzlicher, aktiver Typ-I-Rezeptor transfiziert und exprimiert wurde.

Auf den ersten Blick hat die Transfektion von BR1A-ECD-Bambi-ICD keinen merklichen Einfluss auf den gemessenen Lichtwert, was ob der postulierten dominant negativen

Eigenschaft von Kinase-defizientem BMP Rezeptor 1A auf die BMP-2-vermittelte Signalweiterleitung verwundert (Namiki *et al.*, 1997). Von einer gewissen Hemmung wurde ob der bekannten Bindung der extrazellulären Domäne von BR1A an BMP-2 ausgegangen. Aus diesem Grund überrascht das hier beobachtete Ergebnis umso mehr. Da der intrazelluläre Anteil dieser Chimäre keinerlei Kinase-Funktion erfüllt, müsste diese Chimäre ein biologisch inaktiver Pseudorezeptor sein. Warum offenbar kein den BMP-2-Signalweg antagonisierender Effekt zu beobachten ist, ist schwer zu erklären. Womöglich ist es der exprimierten Chimäre nicht möglich, in *lipid rafts*, wo sich ein definierter Anteil an Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren vor und nach der Bindung eines Liganden zu PFCs zusammenfinden (Hassel *et al.*, 2003), einzuwandern. Ebenfalls möglich scheint, dass Bambi sich als alternativer Rezeptor in bislang unbekannte oder in der Literatur nicht assoziierte Signalwege einbringt und diese durch die intrazelluläre Domäne, deren Funktion noch nicht geklärt ist, ansteuert.

Der Wert von Bambi-TM-0 liegt in etwa im Bereich von Bambi full, was so zu erwarten war. Im Fall der BMP-2-vermittelten Signaltransduktion geht die inhibitorische Aktivität von Bambi auf diesen Vorgang demnach ausschließlich vom extrazellulären Anteil durch die Bindung an BMP-2 aus.

Bei der Stimulation mit ActivinA ist kein Effekt deutlich ablesbar. Zwar unterscheiden sich die gemessenen Werte der mit Chimären transfizierten Zellen leicht von den Leertransfektanden, doch ist die Messung auch sehr fehlerbehaftet. Bringt man die Balken von unstimulierter und stimulierter Messung eines jeweiligen Konstrukts in Relation, so lässt sich kein klarer Einfluss von Bambi full ablesen. Da alle anderen Reihen in etwa das gleiche Niveau aufweisen, eine Überexpression von funktionellem Protein stattfindet und vorherige Erhebungen (s. 3.10.3.2) keinen inhibierenden Effekt von Bambi-full auf die Signaltransduktion von ActivinA zu haben scheinen, kann davon ausgegangen werden, dass auch einzelne Komponenten von hBambi, extra- wie intrazellulär, keine messbare Auswirkung auf die SMAD-2/-3-vermittelte Signaltransduktion haben (s. Abbildung 32B).

3.10.3.4 TRANSFEKTIONSVERSUCHE MIT EINEM ANTIKÖRPER GEGEN DIE EKTODOMÄNE VON BR1A OFFENBAREN DIE BINDESTELLE VON BAMBI AN BMP-2

Nachdem der unterschiedliche Einfluss von den verwendeten Chimären auf die Signalkaskade von BMP-2 in *HEK*-Zellen nachgewiesen wurde, sollte die Wirkweise von hBambi noch genauer spezifiziert werden. Zwar konnte in vorangegangenen Versuchen die Bindung von BMP-2 an Bambi nachgewiesen werden, aber genauere Information über die Stelle der Bindung war noch nicht verfügbar. Gerade die in Punkt 3.10.3.3 beobachtete Erhöhung des gemessenen Luziferase-Signals bei Transfektion der Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD und anschließender Stimulation mit BMP-2 lieferte einen Hinweis auf die Natur der Bindung von Bambi an BMP-2. Die Ektodomäne von Bambi (Bambi-TM-0) selbst zeigte in den in Punkt 3.10.3.3 ebenso wie wildtypisches Bambi (Bambi full) nachweislich keine stimulierende Wirkung auf den SMAD-1/-5/-8-Signalweg. Der agonistische Effekt von Bambi-ECD-BR1A-ICD muss folglich durch den intrazellulären Bereich mit der Typ-I-Kinase zurückzuführen sein. Die Vermutung liegt nahe, dass die Bindung von BMP-2 durch die Ektodomäne von Bambi im Extrazellulärraum dafür sorgt, dass die Chimäre anstelle eines endogenen Typ-I-Rezeptors in den aktiven Komplex rekrutiert werden kann und die Kinasedomäne korrekt orientiert an der Typ-II-Kinase angelagert wird. In der Folge kann die Transphosphorylierung stattfinden und die Signaltransduktion findet statt. Die Idee des hier beschriebenen Versuchs ist, die Zugänglichkeit für BMP-2 zu endogenem BR1A mit Hilfe des Antikörpers AbD1556 (AbD Serotec) zu beeinträchtigen und somit den messbaren Effekt auf die Signaltransduktion durch die transfizierte Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD zu verstärken. Der Antikörper erkennt das Bindeepitop der Ektodomäne von BR1A und inhibiert sterisch die Bindung von BMP-2 an BR1A-ECD, da beide Bindeepitope sich stark überlagern. Eine Inhibition erfolgt dosisabhängig. (Harth *et al.*, 2010)

Es wurden initial *HEK*-Zellen mit Leervektor, BRELuc und pUHD16-1 transient transfiziert und in einer Verdünnungsreihe die IC_{50} von AbD1556 mit 20nM BMP-2 zu einer Konzentration von 60nM bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Anschließend erfolgte die Transfektion neu ausgesäter *HEK*-Zellen mit den Chimären wie beschrieben. Diese wurden für 6h mit 20nM BMP-2 und 60nM AbD1556 bzw. ohne Stimulanz inkubiert, ehe sie lysiert und der Luziferase-Nachweis wie beschrieben durchgeführt wurde.

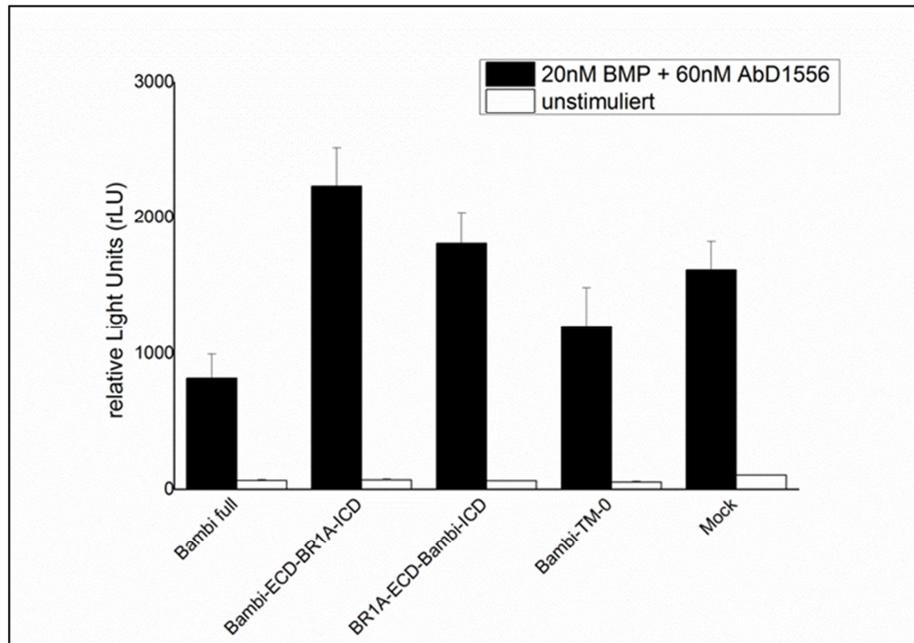


ABBILDUNG 33: GEMESSENE LUZIFERASEAKTIVITÄT DER MIT CHIMÄREN KONSTRUKTEN TRANSFIZIERTEN HEK-ZELLEN NACH ZUGABE VON BMP-2 UND ABD1556

Gegen die gemessenen relativen Lichteinheiten (rLU) sind die jeweiligen chimären Vektoren aufgetragen. Die Stimulation erfolgte mit 20nM BMP-2 unter Zugabe von 60nM AbD1556. Die gemessenen absoluten Lichteinheiten (LU) wurden über einen Bradford-Test auf die Proteinmenge der lysierten Zellen normalisiert und über einen β -Galaktosidase-Nachweis die Transfektionseffizienz mit einberechnet. Alle Werte wurden aus einer Vierfachbestimmung gemittelt.

Vergleicht man den gemessenen Wert nach Normalisierung zwischen dem Versuch mit und ohne den verwendeten Antikörper (s. Abbildung 32A und Abbildung 33), so reduziert sich bei gleichbleibenden Versuchsbedingungen durch den Einsatz des Antikörpers das relative Lichtsignal der Leertransfektion um ungefähr 1000rLU. Ausgehend von diesem gemessenen Wert der Leertransfektion konnten verschiedene Effekte beobachtet werden: So zeigt der im Verhältnis niedrigere Wert bei Bambi full sowie bei Bambi TM-0, dass sich schlicht ein zusätzlicher Inhibitor der Signalweiterleitung in der Membran befindet, der freies BMP-2 bindet, welches durch die Bindung nicht signalaktiv wirken kann. BR1A-ECD-Bambi-ICD stellt zusätzliche Bindepartner für den Antikörper und hält gewisse Mengen davon von endogenem BR1A fern, wodurch etwas mehr signalaktiver heterohexamerer Komplex gebildet werden kann und das gemessene Signal im Vergleich zur Leertransfektion leicht erhöht ist. Die interessanteste Beobachtung ist die stark erhöhte Signalgebung im Fall von Bambi-ECD-BR1A-ICD. (s. Abbildung 33) Hier ist die gleiche Zahl endogener Typ-I-Rezeptoren wie im Fall der Leertransfektion durch den Antikörper blockiert. Dass der gemessene Wert allerdings ca. 30% über dem Wert der leer transfizierten Zellen liegt, muss an der Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD liegen, die die Rolle eines funktionellen Typ-I-Rezeptors übernimmt.

Die Bindestelle von Bambi an BMP-2 muss sich also sehr stark mit dem Bindeepitop von BR1A überlagern, da Bambi-gebundenes BMP-2 der Ektodomäne der Typ-II-Rezeptoren korrekt präsentiert wird und diese zu Bambi-ECD-BR1A-ICD in den Komplex rekrutiert werden.

4 DISKUSSION

Nach seiner Entdeckung als zelluläres Markerprotein für menschliche Tumoren wurde für den Pseudorezeptor Bambi jüngst vermehrt eine Beteiligung an diversen Krankheitsbildern wie z.B. der Raucherlunge, Eierstockkrebs oder Osteosarkomen aufgedeckt. In bereits veröffentlichten Studien wurde Bambi eine inhibitorische Funktion sowohl auf die BMP- als auch Activin-vermittelte Signaltransduktion durch Bindung der entsprechenden extrazellulären Domänen der jeweiligen Rezeptoren zugeschrieben. Diese werden durch die Bindung zu signalinaktiven Komplexen, zu denen der Zugang für die jeweiligen Liganden sterisch blockiert wird. Eine Signalübermittlung bleibt somit aus. (s. 1.7)

In der vorliegenden Arbeit wurde über Sequenzanalysen eine sequenzielle Ähnlichkeit der Primärstruktur zwischen den Ektodomänen von Bambi und denen der Typ-I-Rezeptoren der TGF- β -Proteinfamilie festgestellt. Anhand der 3D-Raumstruktur der extrazellulären Domäne des Typ-I-Rezeptors BR1A gebunden an BMP-2 wurde ein 3D-Homologiemodell für Bambi erstellt (s. 3.1). Weiterhin wurde in Bindestudien mit rekombinant hergestellter Bambi-Ektodomäne (s. 3.2f und 3.5ff) die postulierte Bindung an die Rezeptor-Ektodomänen (s. 3.9.2) sowie an ActivinA (s. 3.9.3) widerlegt und die Bindung an über BR1A- und BR1B-signalisierende Liganden nachgewiesen (s. 3.9.4). Im Zellkulturversuch mit BMP-responsiven Zellen inhibiert die lösliche extrazelluläre Domäne von Bambi durch diese Bindung das BMP-2-vermittelte Signal (s. 3.10.1). In Transfektions- und Stimulationsversuchen wurden Bindungsarchitektur und -stelle von Bambi an BMP-2 näherungsweise bestimmt (s. 3.10.3).

4.1 ERSTELLUNG UND VERIFIZIERUNG EINES *IN SILICO*-HOMOLOGIE-MODELLS DER EKTODOMÄNE VON HBAMBI

Da die molekulare Wirkweise des Pseudorezeptors auf die BMP-Signalkaskade noch unverstanden ist, sollten in dieser Arbeit über Sequenzanalysen, direkte proteinbiochemische Untersuchungen am Protein selbst und biophysikalische Interaktionsmessungen Aufschluss über die biologische Aktivität und die Eingliederung von Bambi in bekannte Signalwirkkaskaden ermittelt werden. Einige mechanistische Vermutungen lassen sich aus der Homologie der Primärsequenz der Ektodomäne von Bambi mit den Typ-I-Rezeptorektodomänen der BMP-Rezeptoren ableiten. Diese Homologie lässt

auf eine ähnliche Raumstruktur der Ektodomänen von Bambi und BMP-Typ-I-Rezeptoren schließen, was für beide Proteine mögliche, ähnliche Bindeeigenschaften vermuten lässt. Ob in der Tat die Rezeptorektodomäne von Bambi *in silico* mit BMP-Liganden interagieren kann, sollte durch eine Homologiemodellierung der Ektodomäne von Bambi untersucht werden.

Hierzu wurde die Primärstruktur von hBambi mit Hilfe von Vorhersageprogrammen analysiert, um so die definierten Bereiche für das Signalpeptid (AS 1-20), den Extrazellulärteil (AS 21-153), die Transmembrandomäne (AS 154-173) sowie den Intrazellulärteil (AS 174-260) zu identifizieren (s. 3.1). Der Fokus lag aufgrund der Kürze des intrazellulären Anteils, der ob seiner Länge keine wie bei Typ-I- oder Typ-II-Rezeptoren typische Kinasedomäne besitzen konnte, auf dem extrazellulären Teil von Bambi.

Sequenzvergleiche (BLAST) gegen die in der Datenbank PDB vorhandenen potentiellen Strukturhomologe zeigten die größte Übereinstimmung für die extrazelluläre Domäne für die Paarung Bambi und BR1A. Daher wurde das in dieser Arbeit verwendete Strukturmodell auf Basis der Struktur der Ektodomäne von BR1A erstellt. Hierzu wurde die gelöste Kristallstruktur von BR1A gebunden an den BMP-Liganden BMP-2 verwendet, um so auch eine mögliche Interaktion von Bambi mit BMP-2 im 3D-Homologiemodell zu simulieren. Ein erstes 3D-Modell wurde mittels einer automatisierten Modellierung unter Verwendung des Computerprogramms SWISS-Model erhalten. Aufgrund einiger Limitationen des Modells, die auf die geringe Sequenzhomologie von doch lediglich 44% zurückzuführen sind, wurde das Modell manuell überprüft und Teilbereiche durch manuelle Optimierung angepasst. Hierzu wurde vor allem die Verbrückung der zehn konservierten Cysteinreste als absolute Vorgabe verwendet und das erstellte Modell unter Beibehaltung aller fünf Disulfidbrücken energetisch verfeinert. Nach Abschluss der Optimierungsarbeiten ergab eine Ramachandranalyse der Hauptkettentorsionswinkel, dass die phi- und psi-Torsionswinkel 65 der 92 Aminosäurereste der Bambi Ektodomäne (72,22%) innerhalb der energetisch günstigsten Regionen zu finden waren. Für 16 Reste (17,78%) und vier (4,44%) Aminosäurereste lagen die Torsionswinkel in günstigen bzw. energetisch erlaubten Bereichen. Lediglich fünf Reste (5,56%) wiesen Hauptkettentorsionswinkel in den energetisch ungünstigen Bereichen auf. Von den 92 Aminosäureresten der Bambi Ektodomäne wiesen 16 Reste (24,62%) Torsionswinkel charakteristisch für α -helikale Bereiche auf und 48 Reste (73,85%) konnten entsprechend ihrer phi-/psi-Torsionswinkel β -

Faltblattbereichen zugeordnet werden. (s. Abbildung 9C) Bei den fünf Aminosäureresten, deren Hauptkettentorsionswinkel energetisch ungünstige Konformationen aufwiesen, handelte es sich um Gly70, Ala15, Ser29, Ser41 und Gln61 (s. Abbildung 34A). Glycinen obliegt in Ramachandranalysen eine Sonderrolle mit erweiterten erlaubten Bereichen, da das Wasserstoffatom am C_{α} im Vergleich zu dem dort in allen anderen Aminosäuren positionierten C_{β} einen viel kleineren van-der-Waals-Radius hat. Dieser schränkt die Drehwinkel weniger stark sterisch ein als alle anderen Seitenketten und gestattet einen größeren Spielraum in diesem Teil der Peptidkette. Aus diesem Grund gibt es für Glycine in Ramachandranalysen keine unerlaubten Bereiche. (Ramakrishnan & Ramachandran, 1965; Lovell *et al.*, 2003) Die Lage von Gly70 befindet sich im angefertigten 3D-Modell am Wendepunkt der Schleifenregion von Finger 3. Diese ist, im Vergleich zur 3D-Struktur der Ektodomäne von BR1A um sechs Aminosäurereste (GTTIP) länger. Aus diesem Grund musste dieser vermutlich flexible Bereich in einem nicht durch die Vorlage abgedeckten Bereich modelliert werden, wodurch ungenaue Hauptkettentorsionswinkel entstehen können (s. Abbildung 34B). Die anderen vier genannten Aminosäuren liegen alle in Schleifenregionen des Modells (s. Abbildung 34A). Diese Schleifenregionen gibt es ebenfalls in der 3D-Struktur von BR1A und auch dort liegen die entsprechenden Reste (Ala15-Gly42; Ser29-Gly57; Ser41-Gly70; Gln61-Lys89) in flexiblen Schleifenregionen, wo eine exakte Modellierung wegen des hohen B-Faktors solch unstrukturierter Bereiche nicht möglich ist. Weiterhin handelt es sich bei drei der vier Pendants um Glycine, die wie weiter oben bereits beschrieben, keinen Einschränkungen in den phi-/psi-Hauptkettentorsionswinkeln unterliegen. Aus diesem Grund sind die vier Aminosäurereste in der Modellstruktur der Ektodomäne von Bambi zwar unnatürlich angeordnet, aber für die aus dem Modell gezogenen Vorstellungen zu vernachlässigen.

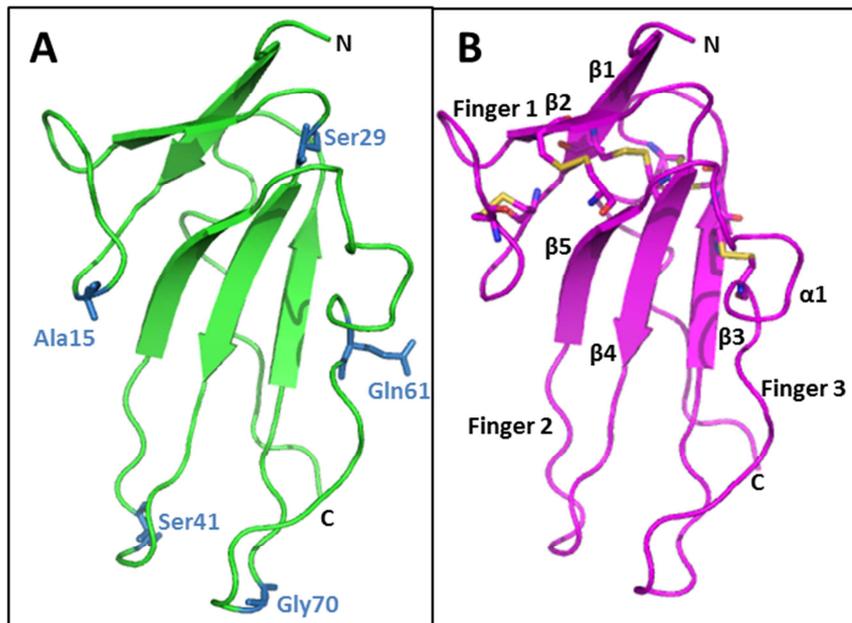


ABBILDUNG 34: 3D-HOMOLOGIEMODELL DER EKTODOMÄNE VON BAMBİ

Es sind zwei Ansichten des Modells von hBambi in der Bänderdarstellung abgebildet. **A** Die Hauptkette des modellierten Bereichs von hBambi-ECD ist in grün dargestellt. Die Aminosäuren, die in der erstellten Ramachandrananalyse unerlaubte phi-/psi-Hauptkettentorsionswinkel aufweisen, sind in blau angezeigt. **B** Die Hauptkette ist in Magenta in der Bänderdarstellung dargestellt. Die fünf intramolekularen Cystinbrücken sind in Gelb angezeigt. Die Beschriftung der Sekundärstrukturelemente ist von der 3D-Struktur der Ektodomäne von BR1A adaptiert. Analog dazu sind die drei Finger der Drei-Finger-Toxinfaltung beschriftet.

Die Übereinstimmung der Ektodomänen von BR1A und Bambi ist aufgrund der niedrigen Sequenzidentität zunächst erstaunlich. So können alle in BR1A vorhandenen Disulfidbrücken auch in der Ektodomäne von Bambi modelliert werden. Größere Anpassungen sind aufgrund der ähnlichen Sequenzzwischenräume nicht notwendig. Deletionen verschiedener Bereiche zur besseren Anpassung des Modells an strukturierte Bereiche in der Vorlage waren ebenso wenig notwendig wie Erweiterungen. Einige Schleifenbereiche wie z.B. zwischen β_1 und β_2 sind in Bambi im Vergleich zu BR1A verkürzt, ohne dass dies jedoch zu einer grundsätzlich veränderten Faltungsarchitektur führt. Die Schleife von Finger 3 fällt in Bambi hingegen um sechs Aminosäuren länger aus. Somit kann für die Ektodomäne von Bambi wie in der Vorlage ebenfalls ein Motiv mit fünf β -Faltblättern erstellt werden und spiegelt somit die für Typ-I-Rezeptoren typische Drei-Finger-Toxin-Faltung mit Cystinknotenmotiv wider. Ebenso konnte der hydrophobe Kern gut modelliert werden. Eine speziellere Betrachtung bedarf die Helix α_1 der Schleife zwischen $\beta_4\beta_5$. Diese bildet sich in BR1A nur im Liganden-gebundenen Zustand aus. Liegt die Ektodomäne von BR1A im ungebundenen Zustand vor, so ist dieser Bereich zwischen den Faltblättern $\beta_4\beta_5$ ungefalteten. (Klages *et al.*, 2008) In dieser Arbeit durchgeführte Experimente belegen eine Bindung von BMP-2 durch die Ektodomäne von

Bambi an einer zur BMP-2-Bindestelle von BR1A analogen Stelle. Im erstellten 3D-Strukturmodell ist eine Konformationsänderung des ungefalteten Bereichs von Bambi an dieser Stelle im BMP-2-gebundenen Zustand denkbar, wurde allerdings nicht modelliert. Die Lage einer eventuellen Helix α_1 wurde in der vorliegenden Abbildung angegeben, aber nicht in der Bänderdarstellung modelliert (s. Abbildung 34B). Ob die Bindung von Bambi an BMP-2 wie die Bindung von BR1A an BMP-2 oder GDF-5 an BR1B ebenfalls durch einen *induced fit*-Mechanismus, also eine Umlagerung und Strukturierung von Schleifenregionen geschieht, kann aus dem Modell ob seiner Limitierung nicht gefolgert werden (Kirsch *et al.*, 2000b; Kotsch *et al.*, 2009).

Unter Berücksichtigung der in den Bindestudien (s. 3.9.3f) gewonnenen neuen Erkenntnisse erscheint eine vergleichende Betrachtung des erstellten Homologiemodells von hBambi-ECD mit der BMP-2-gebundenen Kristallstruktur der Ektodomäne von BR1A notwendig. Bambi bindet BMP-2 (s. 3.9.1), aber nicht ActivinA (s. 3.9.3). Überdies ergibt sich aus den durchgeführten Transfektions- und Stimulationsversuchen mit chimären Rezeptoren, dass Bambi BMP-2 an einer vergleichbaren Stelle wie BR1A binden muss (s. 3.10.3.3). Vergleicht man unter der Annahme der Richtigkeit des Homologiemodells die Bindung von hBambi-ECD an BMP-2 mit den Ergebnissen von Keller *et al.* zur Bindung von BR1A-ECD an BMP-2 auf molekularer Ebene, so fällt das Fehlen einiger wichtiger intermolekularer polarer Bindungen auf (s. Tabelle 56) (Keller *et al.*, 2004).

AS [BR1A]	AS [BMP-2]	AS [Bambi]
T55	D53	k.B.
C77	D53	C49
G82	N59	A54
D84	Y103 *)	T56
Q86	L51	k.B.
Q86	L51	k.B.
D89	W28 *)	A62
S90	V26 *)	k.B.
Q94	S69	k.B.
R97	S69	k.B.

k.B.: keine Bindung

*) : im gleichen Epitop in der anderen BMP-2-Untereinheit

TABELLE 56: INTERMOLEKULARE POLARE BINDUNGEN ZWISCHEN BMP-2 UND BR1A BZW. DEM MODELL VON HBAMBI

Deutlich zu sehen ist, dass BR1A-ECD über mehr zwischenmolekulare Bindungsstellen als Bambi verfügen würde. Dadurch ließe sich die in den SPR-Versuchen bestimmte niedrigere

Affinität zu BMP-2 von Bambi gegenüber BR1A ebenso wie der höhere inhibitorische Effekt der löslichen Ektodomäne von BR1A gegenüber Bambi in den unter Punkt 3.10.1 beschriebenen Stimulationsversuchen mit *C2C12*-Zellen erklären. Vergleicht man die Oberflächenladung des 3D-Homologiemodells von Bambi und der Kristallstruktur von BR1A, so weist die dem BMP-2 zugewandte Seite von BR1A eine im Vergleich deutlich polare Oberfläche als die von Bambi auf (s. Abbildung 36 E+F).

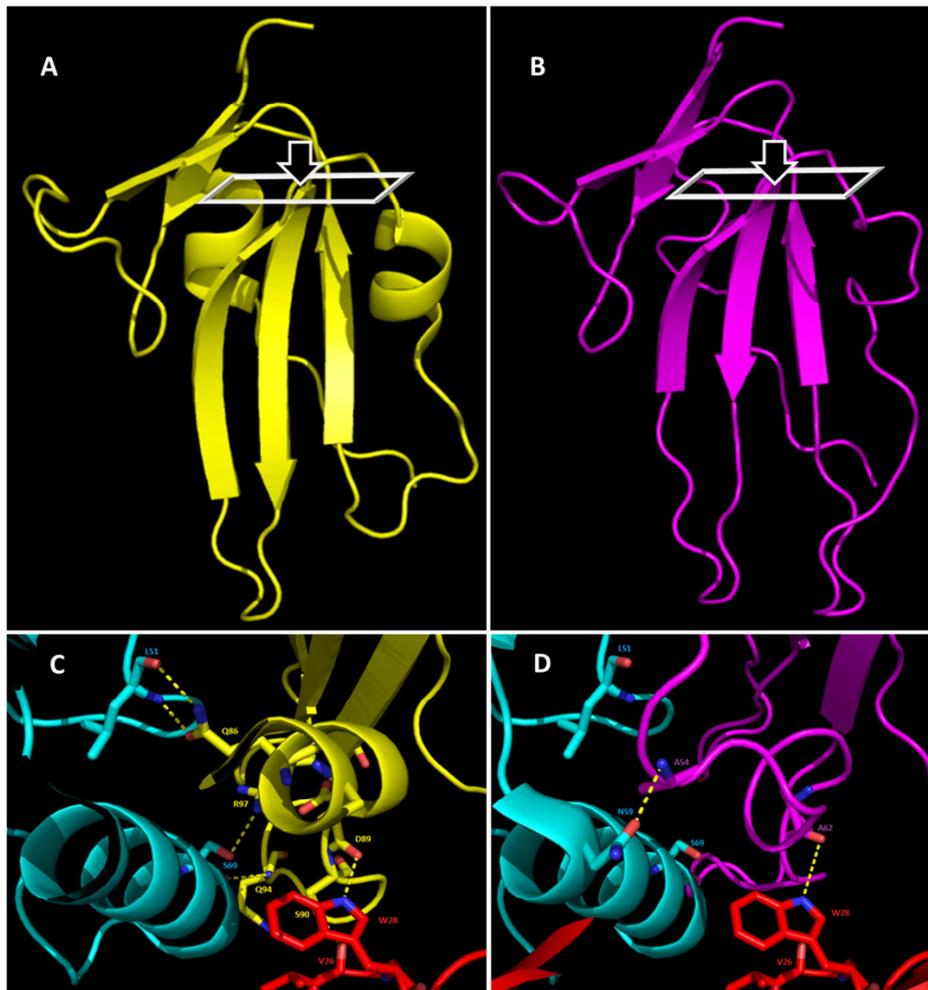


ABBILDUNG 35: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG BR1A-ECD UND HBAMBI-ECD-MODELL AN BMP-2

Es sind die Ektodomänen von BR1A (A) und dem Homologiemodell von hBambi (B) in der Bänderdarstellung abgebildet. Der Blick in den Abbildungen A und B geht auf die im gebundenen Zustand BMP-2 zugewandte Seite des Moleküls. Der schräg stehende Kasten deutet die Blickposition für den jeweiligen Ausschnitt der Bänderdarstellungen C und D an. Abbildung A wurde anhand der veröffentlichten Kristallstruktur mit der PDB-ID 1REW (Keller *et al.*, 2004) und B anhand des Homologiemodells (s. 3.1) erstellt. C & D: Es sind die beiden BMP-2-Untereinheiten in rot und hellblau gezeigt. BR1A-ECD ist gelb und das Modell von hBambi-ECD in Magenta dargestellt. An intermolekularen Bindungen (gelb gestrichelte Linien) beteiligte Aminosäuren sind explizit abgebildet und beschriftet. Alle Abbildungen wurden mit PyMol erstellt.

Gerade Resten von BMP-2 wie L51 oder S69, die essentielle Bindungen zum BMP-Rezeptor ausbilden, fehlt das entsprechende Gegenstück in der Modellstruktur von hBambi. Einerseits

ist dieser Zustand mit der ungenauen Modellierung im Schleifenbereich begründbar, aber insbesondere im Fall von L51 ist der durch das benachbarte Cystein C49 strikt festgelegte Nachbarbereich von Bambi zu unflexibel, um eine geeignete Seitenkette für eine Bindung in den Einflussbereich von L51 zu verschieben. Im Fall von Bambi wäre das Pendant zu Q89 in BR1A die Seitenkette von D51, wodurch BR1A zwei Wasserstoffbrücken zum BMP-2-Molekül ausbildet. Diese Brücken fehlen im erstellten Homologiemodell. Die Raumforderung von Bambi in dieser Region ist im Vergleich zu BR1A weniger stark ausgeprägt. (s. Abbildung 35C+D) Möglicherweise ist das der Grund, weshalb die BR1A-Bindungsmutante BMP-2 L51P dennoch von hBambi gebunden werden kann (s. 3.9.5). Im Fall von BR1A ergibt sich durch die Mutation ein sterischer Konflikt mit der Seitenkette von Q86 (Keller *et al.*, 2004). Dieser tritt im Modell von hBambi nicht auf, da dort ausreichend freier Raum in diesem Bereich vorhanden ist. Das Fehlen dieser definierten Hauptbindungs determinante in Bambi trägt damit unter anderem zur Erklärung der geringer gemessenen Bindungsaffinität von Bambi (ca. 30nM) im Vergleich zu BR1A (ca. 1nM) gegenüber BMP-2 bei (s. 3.9.1). Vergleicht man das Modell von Bambi mit weiteren bekannten Rezeptor-Ligand-Bindungen, so fällt auf, dass weitere für die Bindung wichtige Seitenketten im erstellten Modell kein entsprechendes Äquivalent aufweisen. An Stelle von F66 (BR1B)/ F85 (BR1A), welches zwei Wasserstoffbrücken zu GDF-5 ausbildet, findet sich im Modell von Bambi D58, dessen Seitenkette keine Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Wird F66 zu Alanin mutiert, so macht es eine Bindung von BR1B zu GDF-5 und BMP-2 unmöglich, wohingegen der Austausch F85A in BR1A zu einer Reduzierung der Affinität zu BMP-2 und BMP-4 um den Faktor 15 führt (Hatta *et al.*, 2000; Kotzsch *et al.*, 2009). Einen Unterschied in etwa dieser Größenordnung in den Bindungsaffinitäten zeigen in dieser Arbeit durchgeführte Bindungsstudien (Bambi::GDF-5: 200nM; BR1A::GDF-5: 20nM) (s.3.9.4). Zwar lässt sich der Unterschied in der Bindungsstärke nicht ausschließlich auf das Fehlen einzelner Seitenketten beschränken, doch könnte dies, unter Annahme der Richtigkeit des erstellten Homologiemodells der Ektodomäne von Bambi, eine Erklärung für die durchgängig geringere Bindungsstärke von Bambi für die Liganden im Vergleich zu Messungen mit Typ-I-Rezeptorektodomänen liefern. (s. 3.9.4)

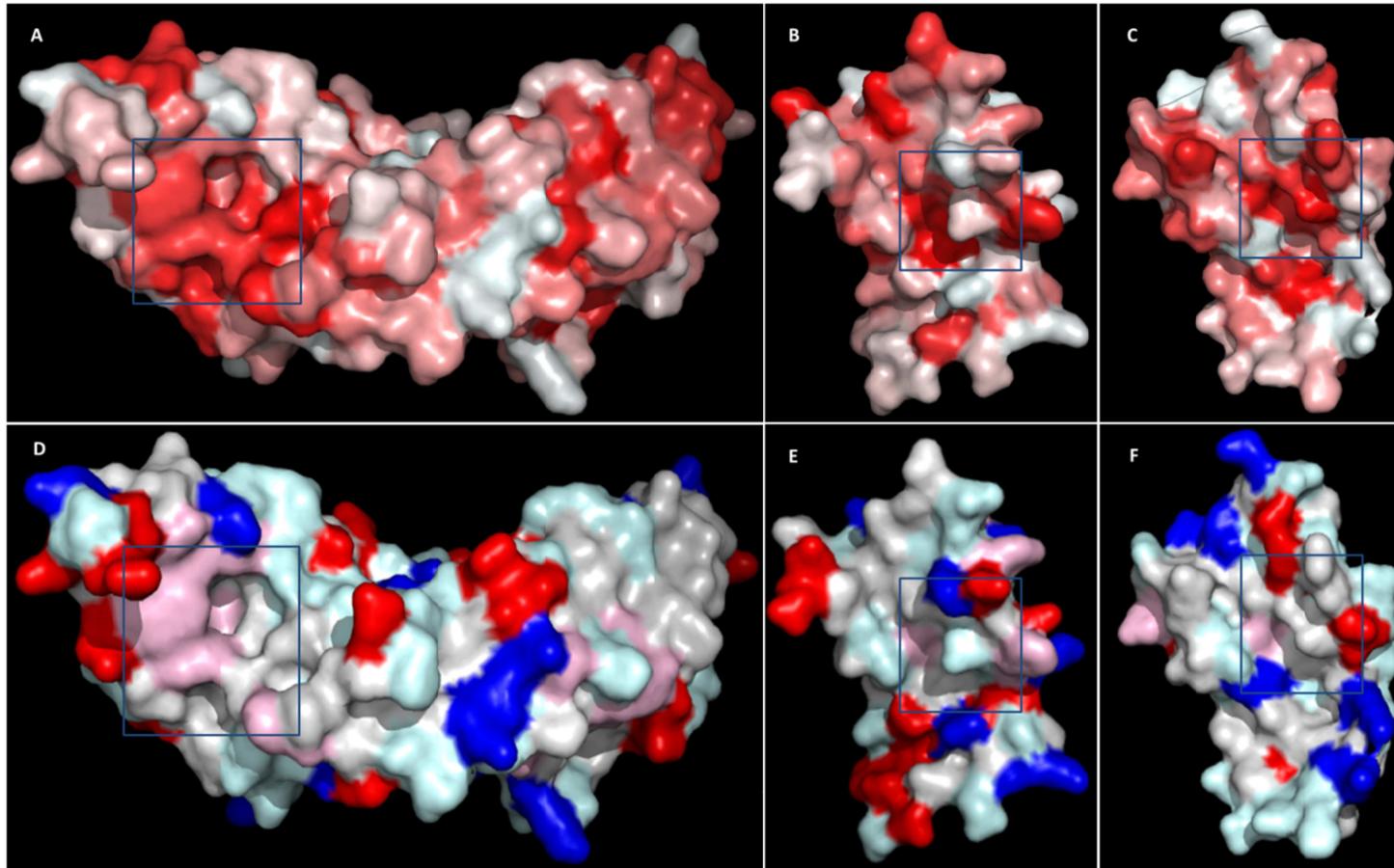


Abbildung 36: OBERFLÄCHENDARSTELLUNG VON DER EKTODOMÄNE VON BR1A, BMP-2 UND DEM HOMOLOGIEMODELL DER EXTRAZELLULÄREN DOMÄNE VON BAMBI

Es wurden Oberflächendarstellungen aus der veröffentlichten 3D-Struktur von BMP-2 (**A** und **D**) gebunden an BR1A (**B** und **E**) (PDB-ID: 1REW) (Keller *et al.*, 2004) und dem in dieser Arbeit erstellten Homologiemodell von Bambi (**C** und **F**) mit PyMol angefertigt. Dabei ist in den Abbildungen **A-C** jeweils das hydrophobe Potential und in den Abbildungen **D-F** die chemischen Ladungseigenschaften der Aminosäuren auf die Oberfläche projiziert. Dabei korreliert die Stärke der Rotfärbung mit der Hydrophobizität der Oberfläche der Abbildungen **A-C**. In den Abbildungen **D-F** sind negativ geladene Bereiche der Oberfläche in rot und positiv geladene Bereiche nach dem Grad der Stärke der Elektrostatik eingefärbt. Neutrale Bereiche sind in leichtem Grauton dargestellt. Das Rechteck umfasst exemplarisch eine der beiden Bindestellen von BR1A an BMP-2 (**A** und **D**), die Bindestelle von BMP-2 an BR1A (**B** und **E**) sowie den aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen vermuteten Bereich der Bindung von BMP-2 an Bambi (**C** und **F**).

Eher ist aus dem Modell anzunehmen, dass die Affinität der Ektodomäne von Bambi sich zu einem großen Teil über polare sowie hydrophobe Bereiche im vermuteten Bindungssepitop begründet. Vergleicht man die bekannte Bindungsfläche von BR1A zu BMP-2 mit dem entsprechend angenommenen Bereich von Bambi aus dem Modell, so fallen Gemeinsamkeiten auf. Dem unpolaren, hydrophoben Bereich im Zentrum der Bindestelle von BMP-2 am sogenannten *wrist*-Epitop, der Bindestelle der Typ-I-Rezeptoren, steht bei BR1A und im Modell von Bambi ein ebenfalls stark hydrophober, vertiefter Bereich gegenüber (s. Abbildung 36 A-C). Umrandet ist dieser Bereich von einem Ring aus geladenen Oberflächen, die in der Modellstruktur von Bambi auch vorhanden, aber in Anzahl und Dichte nicht so stark ausgeprägt sind wie in BR1A (s. Abbildung 36 D-F). (Kirsch *et al.*, 2000b) Versuche mit Liganden, in denen einzelne Hauptbindungs determinanten mutiert wurden, zeigen trotz eines unveränderten Sekundärstrukturmusters und damit einer überwiegend gleichbleibenden Komposition von Ladungen auf der zugänglichen Oberfläche eine langsamere Assoziation sowie eine schnellere Dissoziation, also eine Destabilisierung des Komplexes einhergehend mit einer Reduzierung der Stärke des weitergeleiteten Signals (Hatta *et al.*, 2000). Da für viele biologische Vorgänge die Stabilität des gebildeten Komplexes essentiell für die übermittelte Signalstärke wie auch für seine eventuelle Funktion als Inhibitor sein kann (Pearce *et al.*, 1999; Kotzsch *et al.*, 2009), stellt die Interpretation des Modells in Kombination mit den in dieser Arbeit bestimmten Bindungskonstanten die postulierte Funktion von Bambi als ein reiner Inhibitor der BMP-Signalweiterleitung in Frage. Denkbar wären ebenfalls Rollen als alternativer Rezeptor oder als Co-Rezeptor mit distinkter pro-BMP-Aktivität.

4.2 VERGLEICH DER EXPRESSIONS- UND REINIGUNGSSTRATEGIEN VON hBAMBI-ECD

Um hBambi-ECD hinlänglich zu untersuchen, bedurfte es dessen rekombinanter Herstellung, wobei verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichem Erfolg nachgegangen wurde. Aufgrund der Sequenzhomologie zu den BMP-Typ-I-Rezeptoren und insbesondere BR1A-ECD wurde initial ein analoger Herstellungsansatz als Thioredoxin-Fusionsprotein verwendet, da die Ektodomäne von BR1A bereits erfolgreich mittels eines ähnlichen Herstellungs- und Reinigungsprotokolls aus Bakterien erhalten werden konnte (Kirsch *et al.*, 2000c). Daher wurde die für die BR1A kodierende DNA-Sequenz in pET32-TRX-BR1A-ECD durch die kodierende Sequenz für hBambi-ECD ersetzt. Expressionsversuche sowie unterschiedliche Aufreinigungsstrategien des ebenfalls löslich exprimierten Thioredoxin-Bambi-Fusions-

proteins schlugen jedoch fehl, da die Menge an überexprimiertem, löslichem Protein sehr gering war. Der Großteil von rekombinantem Fusionsprotein lag in bakteriellen Einschlusskörpern vor. Eine mögliche Fehlerquelle liegt eventuell in der unterschiedlichen Primärstruktur von BR1A und Bambi. So ist, basierend auf den vorhandenen Strukturdaten von BR1A dessen N-Terminus relativ flexibel. Der strukturierte Bereich beginnt erst mit Aminosäure 35. Somit existiert zwischen dem Fusionsanteil Thioredoxin und der BR1A-Ektodomäne ein relativ langer Schleifenbereich, der im Expressionskonstrukt für eine ausreichende Distanz zwischen Thioredoxin und dem strukturierten Anteil der Ektodomäne sorgt und somit für eine unabhängige (und somit korrekte) Faltung beider Proteine sorgt. (Kirsch *et al.*, 2000b) In hBambi-ECD fehlt dieser flexible Bereich und sorgt eventuell für eine Fehlfaltung des Proteins. Allerdings konnte selbst durch den Einsatz verschieden langer Schleifenpeptide keine Verbesserung der Ausbeute an löslichem Bambi-ECD-Protein erzielt werden, weshalb die Strategie einer löslichen Expression analog zu der von BR1A-ECD aus *E.coli* nicht weiter verfolgt wurde. (Daten nicht gezeigt)

Daher wurden für die Expression der Ektodomäne von hBambi in Bakterien alternative Strategien entwickelt (s. 3.2) und zudem versucht, natives Protein durch Expression in eukaryotischen Insektenzellen (s. 3.5) zu erhalten. Beide Vorgehensweisen führten nach mehrstufiger Reinigung zu einer für funktionelle Analysen ausreichenden Proteinmenge (2,2mg/L renaturiertes Protein aus *E.coli*-Einschlusskörpern und 1,2mg/L aus viral transfizierter *HighFive*-Insektenzellkultur). Bei der Überprüfung des so rekombinant erzeugten Proteins aus *E.coli*-Einschlusskörpern mittels massenspektrometrischer Analyse konnte das zu erwartende, theoretisch aus der Primärstruktur berechnete Molekulargewicht ebenso wie fünf geschlossene Cystin-Verbrückungen bestätigt werden (s. 3.4). Bei hBambi-ECD-Protein aus Expression in Insektenzellen war eine massenspektrometrische Analyse aufgrund von heterogenen posttranslationalen Modifikationen des rekombinanten Proteins nicht möglich (Busconi & Michel, 1995) (s. 3.7). Die Analyseprogramme NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) und NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) weisen für die extrazelluläre Domäne von hBambi auf die mögliche Präsenz einer N-Glykosylierung und mehreren potentiellen O-Glykosylierungen hin (s. 8.2). So konnte das auf Basis der Primärstruktur berechnete Molekulargewicht von 22204,7 Da nicht direkt bestätigt werden, da zu viele unterschiedliche Signale im massenspektrometrischen Sensogramm gemessen wurden und jeweils nicht

zweifelsfrei einem Masse/Ladungs-Verhältnis zugeordnet werden konnten. Somit war für das aus eukaryotischer Expression erhaltene Protein keine Aussage über Degradation oder die Anzahl von Disulfidbrücken möglich.

Weiterführend wurde zur Beantwortung der Fragestellung, ob beide aus unterschiedlichen Quellen rekombinant erhaltene Proteine strukturell identisch sind, daher mit beiden Proteinen eine Analyse mittels Circular dichroismus-Spektroskopie durchgeführt. Vergleicht man die aufgenommenen Spektren, so fällt die unterschiedlich starke Intensität auf. Diese ist in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen begründet. Die aufgenommenen Spektren sind sich ähnlich, aber nicht gleich. Abhängig von der gewählten Auswertungssoftware weisen die vermessenen Proteine ungefähr zur Hälfte eine ungefaltene Sekundärstruktur auf. Die andere Hälfte teilt sich, je nach Auswertung, zu 5-10% α -helikaler und ungefähr 40-45% β -Faltblattstruktur auf. Dabei zeigt das aufgenommene Spektrum der Probe mit renaturiertem Protein aus *E.coli* einen negativen Ausschlag bei 220nm, was einen leicht erhöhten α -helikalen Anteil im Vergleich zum Protein aus Insektenzellkultur bedeutet. Gleichzeitig weist die Sekundärstruktur von hBambi-ECD-Protein aus Insektenzellkultur einen im Vergleich erhöhten β -Faltblatt-Anteil auf, was sich aus dem positiven Ausschlag bei 230nm erschließt. (s.3.8.2) Nimmt man die Erkenntnisse aus beiden Circular dichroismus-Spektren zusammen, so lässt sich daraus schließen, dass in beiden Expressionssystemen Proteine mit ähnlicher, aber nicht gleicher Sekundärstruktur gewonnen wurden.

Im Aktivitätsnachweis am SPR ließen sich mit beiden Proteinen vergleichbare Ergebnisse erzielen. Die K_{on} -/ K_{off} -Raten waren bei beiden Varianten nahezu identisch (s. Tabelle 50) und unterschieden sich nur um den Faktor 2, wobei hBambi-ECD aus *E.coli* den niedrigeren KD-Wert lieferte. Die KD-Werte konnten zu $45 \pm 15 \text{ nM} / 76 \pm 17 \text{ nM}$ (Eq) (Protein aus *E.coli*) bzw. $80 \pm 27 \text{ nM} / 110 \pm 25 \text{ nM}$ (Eq) (Protein aus *HighFive*-Insektenzellen) bestimmt werden. Glykosylierungen scheinen zudem für die Bindung von hBambi-ECD an BMP-2 keine Rolle zu spielen: so lassen sich mit renaturiertem, durch *E.coli* unprozessiertem Protein die gleichen Ergebnisse erzielen wie mit atypisch glykosylierter hBambi-ECD aus infizierten Insektenzellen. Auffällig für beide Proteine ist ein biphasischer Kurvenverlauf im SPR-Experiment, der so nicht zu erwarten, jedoch reproduzierbar war. Im Fall des renaturierten Proteins aus *E.coli* wäre zum Teil nicht vollständig gefaltetes Protein eine hinreichende Erklärung für diesen Effekt. Da allerdings das Protein aus Zellkultur, bei dem von einer

korrekten Faltung und struktureller Uniformität auszugehen ist, den gleichen Kurvenverlauf aufweist, ist dieser Effekt nicht zu erklären.

Trotz unterschiedlicher Ergebnisse in der Circular dichroismus-Analyse deuten die durchgeführten SPR-Bindestudien mit beiden Proteinen darauf hin, dass aus beiden Expressions- und Reinigungsstrategien funktionelles Protein gewonnen werden konnte. Für alle weiteren Experimente in dieser Arbeit wurde fortan, ob der größeren zu erwartenden Ausbeute und der günstigeren Kultivierung, ausschließlich rekombinant hergestelltes Protein aus *E.coli* verwendet.

4.3 INTERAKTIONSANALYSEN ZEIGEN KEINE BINDUNG DER EKTODOMÄNE VON hBAMBI MIT REZEPTOREKTODOMÄNEN DER TGF- β -SIGNALWEITERLEITUNG

Daten aus veröffentlichten Studien zeigen eine direkte Bindung von Bambi an alle Typ-I-Rezeptoren außer ActR-I sowie an die Typ-II-Rezeptoren TGF β R-II und ActR-II auf der Basis von Immunopräzipitationen. Hierbei wurde postuliert, dass TGF β R-I hier direkt mit dem extrazellulären Anteil von Bambi interagiert und so die Liganden-induzierte Komplexierung mit TGF β R-II unterbunden wird. (Onichtchouk *et al.*, 1999) Da diese Bindung bislang nur absolut und *in vivo*, wo mögliche sekundäre Faktoren das Ergebnis beeinträchtigen können, nachgewiesen wurde, sollte diese Aussage *in vitro* mit ausschließlich den beiden potentiellen Bindepartnern belegt und gleichzeitig die Stärke der Bindung ermittelt werden. Mögliche, die Bindung forcierende zelluläre Faktoren sind bei dieser Art der Messung ebenso absent wie die jeweiligen intrazellulären Domänen. Eine Beteiligung dieser an der Bindung wurde allerdings bei der Interpretation der Ergebnisse der veröffentlichten Studie von den Autoren ausgeschlossen. Um die Interaktion zwischen der Ektodomäne von Bambi und den extrazellulären Domänen der BMP-Rezeptoren unter definierten und isolierten Bedingungen nachweisen zu können, wurden SPR-Messungen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst verschiedene Rezeptorektodomänen wie beschrieben auf einem GLC-Biosensor immobilisiert, deren Bindung zu bekannten TGF- β -Liganden überprüft und anschließend Bambi als Analyt in verschiedenen Konzentrationen perfundiert. Selbst in der höchsten Konzentration von 1 μ M konnte hierbei keine spezifische Bindung von hBambi-ECD an Typ-I (ActR-IB, ActR-IC, TGF β R-I und BR1A) oder Typ-II-Rezeptoren (BR-II) sowie an die extrazellulären Bereiche von hBambi oder den BMP-spezifischen Co-Rezeptor Rgm-b beobachtet werden (s. 3.9.2). Die von Onichtchouk und Kollegen beobachtete Homo-

oligomerisierung von hBambi wird zumindest nicht durch eine homomere Interaktion im Extrazellulärraum induziert. Extrazellulär trunkiertes Bambi konnte direkt mit wildtypischem Bambi co-präzipitiert werden und unterband dessen inhibitorische Wirkung auf den TGF- β -Signalweg (Onichtchouk *et al.*, 1999).

Ein Hinweis, dass Bambi auf der Ebene der Rezeptoren und nicht der Liganden wirkt, wurde vor allem aus der Wirkung von co-exprimiertem Bambi auf konstitutiv aktiven Formen von BR1A, BR1B, Alk-1, ActR-I, TGF β R-I und ActR-IB erhalten, da Bambi auch die Aktivität dieser Rezeptoren hemmt und so eine Beeinflussung der Bindung des Liganden für die Hemmung der Signalaktivität gar nicht erforderlich ist (Onichtchouk *et al.*, 1999). Da die Transphosphorylierung der nachgeschalteten R-SMADs (s. 1.4) durch die intrazelluläre Kinase des Typ-I-Rezeptors in diesem Fall ohne die Bildung des signalaktiven Komplexes aus Ligand, Typ-I- sowie Typ-II-Rezeptor erfolgt, muss die intrazelluläre Domäne von Bambi für die beobachtete Signalinhibition durch direkte Bindung an die Kinasedomäne des Rezeptors zuständig sein.

Ein interessantes Experiment zur Aufklärung, wie die beobachtete Hemmung der Signalweiterleitung an den Kinasedomänen durch die intrazelluläre Domäne von Bambi von statten gehen könnte, wäre ein Transphosphorylierungsexperiment mit radioaktiv markiertem ATP. Zu beobachten wäre, ob Bambi die Phosphorylierung direkt an der Kinase aufnimmt oder ob es schlicht den Kontakt zwischen R-SMAD und intrazellulärer Domäne des Rezeptors sterisch blockiert. Eine Analyse der Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne von hBambi mit NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) ergibt drei potentielle Phosphorylierungsstellen: (1) Der Tyrosinrest an Position 196 könnte durch eine Tyrosinkinase modifiziert werden, die sich allerdings nicht aus den vorhandenen Serin-/Threoninkinasen der BMP-Rezeptoren ergeben kann. Zwei weitere potentielle Phosphorylierungsstellen erscheinen in diesem Zusammenhang interessanter: (2) Ser203 und (3) Ser220 sind zwei Serinreste, die direkt von der Serin-/Threonin-Kinase der Typ-I-Rezeptoren modifiziert werden könnten. Ob Phosphorylierung allerdings stattfindet und entweder die kanonische SMAD-Signalkaskade stoppt, oder ob dadurch alternative Signalwege angesteuert werden, kann nach aktuellem Stand noch nicht bewertet werden. (s. 8.1)

4.4 BAMBI HAT KEINERLEI DIREKTEN EINFLUSS AUF ACTIVINA, MÖGLICHERWEISE ABER AUF SEINE SIGNALWEITERLEITUNG

Neben der Inhibition der BMP-vermittelten Signalweiterleitung wurde Bambi in bereits veröffentlichten Studien ebenso eine hemmende Funktion in Bezug auf die Activin-induzierte Signaltransduktion zugeschrieben. Versuche in dieser Arbeit haben gezeigt (s. 3.9.2), dass dieser inhibitorische Einfluss nicht, wie postuliert, durch Bindung an extrazelluläre Rezeptoren erfolgen kann. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass die Ektodomäne, analog zu BMP-Liganden, ebenfalls den Signalstimulus Activin durch direkte Bindung am Kontakt mit den Rezeptorektodomänen hindern würde. In den zugehörigen Interaktionsstudien mittels SPR konnte jedoch keine Affinität für die Interaktion von hBambi-ECD-Protein mit ActivinA detektiert werden (s. 3.9.3). Da die Rezeptorbindung für ActivinA jedoch unabhängig bestätigt werden konnte, deutet dies klar darauf hin, dass Bambi nicht direkt mit dem Liganden ActivinA wechselwirken kann. Weiterhin ist in der Literatur belegt, dass Bambi nur einen der beiden an der Activin-Signalweiterleitung beteiligten Typ-II-Rezeptoren (nur ActR-II und nicht ActR-IIB) bindet (Onichtchouk *et al.*, 1999). Folglich ist von einer Einflussnahme von Bambi auf den Activin-Signalweg im extrazellulären Bereich nicht auszugehen. Vor dem Hintergrund, dass jedoch in der Literatur eine Hemmung der ActivinA-induzierten Signalkaskade durch Bambi berichtet wurde, wirft dies die Frage auf, mit welchem molekularen Mechanismus Bambi die ActivinA-Signalaktivität zu unterbinden vermag. Eine Möglichkeit wäre hierbei, dass die Hemmung vom intrazellulären Anteil von Bambi ausgeht. In einer veröffentlichten Studie von Yan und Kollegen wird beschrieben, dass Bambi zusammen mit SMAD-7 kooperativ mit TGF β R-I einen ternären Komplex bildet und so die TGF β R-I-vermittelte Transphosphorylierung von SMAD-3 verhindert (Yan *et al.*, 2009). Da ActivinA über seine zugehörigen Rezeptoren ebenfalls die SMAD-2/-3-vermittelte Signalweiterleitung ansteuert, wäre eine analoge Wirkweise zu der beschriebenen Beobachtung ebenfalls denkbar. Eine weitere Möglichkeit der Hemmung des ActivinA-vermittelten Signalwegs wäre keine direkte, sondern eine indirekte inhibitorische Einflussnahme durch Bambi. Da in früheren Versuchen von Onichtchouk die Immunopräzipitation und Auswertung von Aktivitätsnachweisen erst 20h nach Stimulation erfolgte, also Stunden nach dem Start von etwaiger induzierter Proteinsynthese, ist die Option einer indirekten Einflussnahme von hBambi auf die ActivinA-vermittelte Signalweiterleitung über noch unbekannte Signalwege durchaus denkbar (Chen *et al.*, 1998).

Um diesen zweiten Weg der ActivinA-Inhibition zu analysieren, wurde in zwei unabhängigen Stimulationsversuchen mit *HEK*-Zellen eine mögliche direkte Einflussnahme überprüft: (1) Es wurden Transfektions- und Stimulationsexperimente mit den erstellten chimären Konstrukten, in denen jeweilige Anteile von BR1A keine für ActivinA verwendbare Zielstruktur bieten und exklusiv der Einfluss des Bambi-Anteils untersucht werden konnte, durchgeführt. Weder in den Versuchen mit BR1A-Bambi-Chimären noch in Versuchen mit trunkiertem Bambi (TM-0) bzw. wildtypischem Bambi (Bambi full) konnte eine signifikante Änderung der gemessenen ActivinA-vermittelten Stimulanz beobachtet werden (s. 3.10.3.3). (2) Es wurden weiterhin verschiedene Mengen von wildtypischem Bambi (Bambi full) transient transfiziert und die Zellen im Anschluss mit 50nM ActivinA gleichermaßen stimuliert (s. 3.10.3.2). Die Auswertung der Luziferasereaktion zeigt ein proportional zur transfizierten DNA-Menge ansteigendes Signal. Die höchste gemessene Luziferaseaktivität von 133% (im Verhältnis zur Transfektion mit Leervektor) wird bei einer transfizierten DNA-Menge von 400ng erreicht. Höhere Mengen führen zu keiner weiteren Verbesserung, sondern zum Rückgang der gemessenen rLU auf den Wert der Nulltransfektion. (s. Abbildung 31) Dabei bleibt festzuhalten, dass bei beiden Versuchen nur qualitative Untersuchungen mit einer einheitlichen Konzentration von ActivinA durchgeführt wurden. Es kann also keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob Bambi einen direkten Effekt auf den Liganden ActivinA hat. Bei einer echten Dosis-Wirkkurve bei unterschiedlichen ActivinA-Konzentrationen verglichen mit Kompetitionsversuchen mit löslicher Ektodomäne von ActR-IIb, die einen inhibitorischen Effekt auf die ActivinA-Signalweiterleitung durch Bindung an den Liganden hat, könnten die direkte Einflussnahme von Bambi auf ActivinA endgültig ausgeschlossen werden. Da in SPR-Bindestudien allerdings keine Bindung zwischen ActivinA und der Ektodomäne von Bambi beobachtet werden konnte (s. 3.9.3), wurden diese Versuche in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Betrachtet man nun beide oben beschriebenen Versuche, so ist eine konkrete Beeinflussung der ActivinA-vermittelten Signalweiterleitung durch Bambi oder Teile davon nicht klar ersichtlich. Folgt man Versuch (2) und interpretiert die Ergebnisse einer Einflussnahme auf den Signalweg bei sehr hoher Konzentration von Bambi in der Membran der Zielzellen, so muss das Zielprotein des Zusammenwirkens der Activin-Rezeptor II (ActR-II) sein, da dieser das einzige extrazelluläre Element der Activin-Signalweiterleitung ist, mit dem eine Interaktion von Bambi beobachtet und dessen mRNA in *HEK293*-Zellen nachgewiesen wurde

(Shaw, 2005). Die intrazelluläre Domäne von Bambi bindet folglich an ActR-II und wirkt neutral oder agonistisch auf die ActivinA-vermittelte Signalweiterleitung. Eine Hemmung der ActivinA-vermittelten Signalweiterleitung durch Bambi ist nicht nachweisbar. Die unmittelbare postulierte Inhibition dieser durch Bambi ist demnach falsch, wohingegen eine indirekte Einflussnahme über alternative Signalwege nach aktuellem Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden kann. In jedem Fall kann aber eine kompetitive Inhibition der Bindung des Liganden ActivinA an die entsprechenden Typ-I-Rezeptoren durch die extrazelluläre Domäne von Bambi analog zu BMP-2 ausgeschlossen werden.

4.5 CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNG VON hBAMBI-ECD AN LIGANDEN DER BMP-/GDF-GRUPPE AM BEISPIEL VON BMP-2

Nachdem über Interaktionsstudien die von hBambi-ECD-Protein vermittelte Regulation der TGF- β -Signalweiterleitung auf diverse Liganden wie BMP-2 eingegrenzt werden konnte (s. 3.9.3), sollte diese in der Folge exakter charakterisiert werden. Hierfür wurden *in vitro* Wettbewerbsversuche mit verschiedenen BMP-responsiven Zelllinien durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien (*ATDC5*, *C2C12* und *C3H10T1/2*) stammen aus unterschiedlichen Geweben und lassen die Beobachtung unterschiedlicher Inhibitor-induzierter Effekte zu. In *ATDC5*-Zellen wird bei BMP-2-angeregter Differenzierung von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten ALP über den MAP-Kinase-Signalweg freigesetzt. Dies geschieht allerdings nicht ausschließlich durch den BMP-2-Stimulus. Aus diesem Grund kann das aus *ATDC5*-Zellen erhaltene Ergebnis die direkte inhibitorische Wirkung von hBambi-ECD-Protein auf den SMAD-Signalweg nicht eindeutig belegen, da noch andere Signalwege in die ALP-Ausschüttung involviert sind. Der Einfluss anderer Signalkaskaden ist hingegen bei der BMP-2-vermittelten Differenzierung der prämyoblastischen Zelllinie *C2C12* obsolet. Als Nebenprodukt der ausschließlich über den SMAD-1/-5-Signalweg-vermittelten Differenzierung zu Osteoblasten wird ALP sezerniert, wodurch ein direkter inhibitorischer Effekt von hBambi-ECD-Protein auf den BMP-2-Signalweg indirekt nachgewiesen werden kann. In *C3H10T1/2*-Zellen ist dieser Effekt über die Aktivität einer unter Kontrolle eines BMP-responsiven Promotors exprimierten Luziferase direkt messbar. Der hemmende Einfluss der Ektodomäne von Bambi kann ohne dazwischen geschaltete Signalwege beobachtet werden. (s. 3.10.1) Auf diese Weise ließen sich direkte wie indirekte Rückschlüsse auf die konzentrationsabhängige Inhibition des BMP-2-Signals dosisabhängig zur Titration von hBambi-ECD ziehen (s. Tabelle 57).

Zelllinie	K _i in nM (hBambi-ECD)	K _i in nM (hBR1A-ECD)
ATDC5	43	nicht bestimmt
C2C12	102	54
C3H10T1/2	82	nicht bestimmt

TABELLE 57: K_i-WERTE DER STIMULATIONSVERSUCHE MIT BMP-2 UND HBAMBI-ECD IN VERSCHIEDNEN ZELLINIEN

In allen drei verwendeten Zelllinien konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Das Ergebnis der ATDC5-Zellen ist mit einem starken Fehler behaftet, da die Messung dadurch erschwert wurde, dass ATDC5-Zellen im Vergleich zu anderen für ALP-Proben verwendete Zelllinien unter Stimulation im Vergleich zu C2C12-Zellen wenig zusätzliche alkalische Phosphatase ausbilden und exogen induzierte Änderungen des Phosphatasespiegels im Vergleich zum Hintergrundsignal sehr gering ausfallen (Thies *et al.*, 1992; Katagiri *et al.*, 1994; Shukunami *et al.*, 1998).

Eine nahezu vollständige Reduktion des gemessenen Signals auf Höhe der Basislinie im unstimulierten Zustand konnte bei hBambi-ECD-Konzentrationen von 2µM (ATDC5 und C2C12) bzw. 500nM (C3H10T1/2) beobachtet werden. Kein messbarer Effekt auf die Stimulation mit BMP-2 trat bei hBambi-ECD-Verdünnungen unterhalb von 16nM (ATDC5), bzw. 5nM (C2C12, C3H10T1/2) auf. Die ermittelte inhibitorische Konstante K_i lag bei allen drei Zelllinien im Mittel bei ungefähr 75nM. Verglichen mit der in C2C12-Zellen durchgeführten Titrationskurve von BR1A-ECD mit ansonsten exakt gleichen Bedingungen liegt die für hBambi-ECD erhaltene K_i ungefähr um 50% höher als diejenige von BR1A-ECD (54nM). (s. 3.10.1) Somit konnte die bereits *in vitro* bestimmte biologische Aktivität von hBambi-ECD ebenfalls *in vivo* mittels drei unterschiedlicher Zelltypen mit zwei unterschiedlichen Nachweismethoden gezeigt werden. Dabei wurde demonstriert, dass die Bindung von hBambi-ECD-Protein an BMP-2 einen dosisabhängigen direkten inhibitorischen Effekt ähnlich dem der löslichen Ektodomäne von BR1A auf die BMP-2-vermittelte Aktivierung des SMAD-1/-5/-8-Signalwegs induziert. Ob jedoch Bambi den Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren nur den Liganden „wegnimmt“ und nur das SMAD-Signal inhibiert oder diesen in einen alternativen Signalweg umleitet, wovon die SMAD-Inhibition ein Nebeneffekt wäre, lässt sich derzeit noch nicht belegen. Weiterhin lässt sich aus den Versuchen eine weitere Erkenntnis ableiten: die Bindestelle von hBambi-ECD am Liganden muss sich ob der beobachteten Inhibition der Signalweiterleitung entweder mit der der Typ-I- oder der Typ-II-Rezeptoren überlagern.

SPR-Messungen ergaben eine nanomolare Affinität von hBambi-ECD-Protein zum sehr gut charakterisierten BMP-2 (s. 3.9.1), dessen Struktur sowie Bindeepitope zu BR1A in vorangegangenen Arbeiten bereits vollständig aufgeklärt wurden (Kirsch *et al.*, 2000b; Weber *et al.*, 2007). Die Kristallstruktur zeigt klar auf, welche Reste bei der BMP-2-Bindung an seine Rezeptoren, BR1A und ActR-IIB, an der Bindung beteiligt sind. Ebenso wurden bereits durch einzelne Aminosäureaustausche die Hauptbindungs determinanten für die Ligand-Rezeptor-Interaktion identifiziert. Es wurde ebenfalls versucht, mit Hilfe von SPR-Co-Inject-Versuchen, bei denen entweder BMP-2 oder die Ektodomäne von Bambi auf dem Biosensor immobilisiert wurde, eine Komplexbildung aus Bambi, BMP-2 und der Ektodomäne eines Typ-II-Rezeptors (ActR-IIB oder BR-II) nachzuweisen und die Bindungen zu charakterisieren. In dieser Arbeit durchgeführte Stimulationsversuche mit der transfizierten Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD zeigen, dass die Bildung dieses Komplexes physiologisch möglich ist (s. 3.10.3.4). Diese Experimente blieben aber ohne Ergebnis, da der dimere Komplex aus Bambi und BMP-2 sich auf der Biosensoroberfläche als nicht stabil genug zeigte, um additive Massenlagerung nachzuweisen. Im Fall von immobilisiertem Bambi verblieb BMP-2 nicht lange genug assoziiert, um Bindestellen für den jeweiligen Typ-II-Rezeptor bereit zu stellen. Im Fall von immobilisiertem BMP-2 überlagerte sich die Dissoziation von Bambi mit der Assoziation des Typ-II-Rezeptors, so dass keine additiven Massezunahmen aufgenommen werden konnten. (Daten nicht gezeigt) Um den trimeren Komplex in SPR-Bindestudien nachzuweisen, bedarf es sehr kleiner Dissoziationsraten (k_{off}) für den ersten perfundierten Analyten, die mit den verwendeten wildtypischen Proteinen nicht erreicht werden konnten. Es müsste eine BMP-2-Bindungs mutante gefunden werden, deren Dissoziationsrate von Bambi viel geringer im Vergleich zu wildtypischem BMP-2 ist. Mit den derzeit verfügbaren Proteinen ist das beschriebene Experiment technisch nicht möglich.

Anhand der Interpretation des erstellten Homologiemodells der Ektodomäne von Bambi wurde unter Punkt 4.1 bereits die theoretische Bindung von Bambi an BMP-2 im Vergleich zu BR1A diskutiert. Findet diese an exakt der gleichen Stelle von BMP-2 statt und falls ja, wie sehr beeinflussen die Rezeptorbindung unterbindende Mutationen die Bindung von Bambi *in vitro*? Es sollte geklärt werden, ob die Bindung von Bambi an BMP-2 die gleichen Hauptbindungs determinanten wie BR1A verwendet. Stellt Bambi die Bindung zu BMP-2 über die selben Hauptbindungs determinanten her, so hätten einzelne Aminosäureaustausche, die

die Bindung der Rezeptoren der Signalweiterleitung sehr stark beeinflussen oder sie im Fall von BR1A und der Mutante BMP-2 L51P gar vollständig unmöglich machen, eine starke Verringerung der Affinität von Bambi zur entsprechenden BMP-2-Mutante zur Folge. Alle verwendeten Mutanten zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von hBambi-ECD (s. 3.9.5). Vergleicht man die beobachteten Bindungskonstanten K_D der Mutanten mit wildtypischem BMP-2, so zeigen sich keine großen Unterschiede in den berechneten Kinetiken (s. Tabelle 54). Die weder zu Typ-I noch zu Typ-II-Rezeptoren affine Doppelmutante BMP-2 L51P A34D ($35 \pm 15 \text{ nM}$) zeigt die gleiche Affinität wie wildtypisches BMP-2 ($24 \pm 8 \text{ nM}$). Eine vollständige Negation der Affinität, die die Punktmutation im Fall von BMP-2 L51P gegenüber BR1A induziert, war gegenüber Bambi ob dessen hoher sequentieller Ähnlichkeit durchaus zu erwarten, aber nicht zu beobachten ($94 \pm 50 \text{ nM}$). Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindungsarchitekturen von Bambi und BR1A an BMP-2 nicht identisch sein können. Seitenketten, die essentiell für die Bindung von BR1A an BMP-2 sind, haben keinen Einfluss auf die Bindung von Bambi. Dennoch zeigen andere durchgeführte Experimente dieser Arbeit, dass die Bindestelle von Bambi sich mit der von BR1A zumindest zum Teil überlagern muss, aber dafür, wenn überhaupt, wohl andere Seitenketten als Zielstruktur in Frage kommen. Demzufolge ist die Bindung womöglich sowohl weniger spezifisch als auch weniger stark, was den Unterschied in den Affinitäten im Vergleich zu BR1A erklärt.

4.6 TRANSFEKTIONSEXPERIMENTE MIT CHIMÄREN OFFENBAREN DIE BINDESTELLE VON BAMBI AN BMP-2

Eine direkte Bindung von hBambi-ECD an das über den SMAD-1/-5/-8-Signalweg signalisierende BMP-2 wurde bereits in Abschnitt 4.5 diskutiert und die Überschneidung der Bindestelle von hBambi-ECD am Liganden mit Bereichen der Typ-I-Rezeptoren geschlossen. Eine genauere Eingrenzung der Bindestelle sollte anhand der Messdaten der Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD ermöglicht werden. Kann diese Chimäre die Rolle des BR1A im signalaktiven membranären Komplex übernehmen, so wäre bestätigt, dass Bambi und BMP-2 an gleicher Stelle wie BR1A und BMP-2 ihre Bindung ausbilden. Aufschluss darüber, sowie über den Einfluss einzelner Domänen im Vergleich zu mit dem Protein voller Länge auf die Signalweiterleitung sollten Transfektionsexperimente mit den erfolgreich klonierten chimären Konstrukten *in vivo* geben (s. 3.10.3.3).

Dabei zeigte die durchgeführte Konzentrationsreihe mit wildtypischem Bambi (Bambi full) interessante Ergebnisse: wurde in die Zellen nur eine vergleichsweise geringe Menge (100ng) für das für Bambi kodierende Expressionskonstrukt transfiziert, so führte die Bambi-Überexpression nach sechsstündiger Stimulation mit 15nM BMP-2 zu einem Anstieg des SMAD-Signals um 8%. Wurde die DNA-Menge und somit die Expression von Bambi weiter erhöht (200 und 300ng Expressionsvektor), so fiel die SMAD-Signalaktivität auf 55% (200ng) bzw. auf etwa 31% (300ng) der mit Leervektor transfizierten Zellen der Kontrolle. Bei steigender Vektormenge (400-500ng) stabilisierte sich dieser Wert. Erst bei sehr hohen DNA-Mengen von 600-800ng erreichte die gemessene SMAD-Aktivität ca. 80% des Ursprungswertes der Leertransfektion (s. Abbildung 30). Die bereits nachgewiesene Bindung des extrazellulären Teils von hBambi an BMP-2 (s. 3.9.1 und 3.10.1) im Zusammenspiel mit der intrazellulären Domäne scheint die endogene BMP-2-vermittelte Weiterleitung konzentrationsabhängig zu beeinflussen. Geringe Konzentrationen des BMP-Pseudorezeptors Bambi in der Zellmembran scheinen einen mit BMP-Liganden synergistischen Effekt auf die Signalweiterleitung zu haben. Einher damit geht der Nachweis geringer Mengen konstitutiven Bambis in unstimulierten BMP-sensitiven Zellen (s. 3.10.2). Erst die ligandeninduzierte Co-Expression von weiteren Liganden und Bambi sorgt dafür, dass Bambi in höheren Konzentrationen auf der Zellmembran vorhanden ist und das BMP-Signal antagonisiert. Möglicherweise nimmt die Zelle das BMP-Signal unterstützt von Bambi auf und startet die Expression *bre*-kontrollierter Gene. Dadurch ist Bambi auf der Zelloberfläche vermehrt vorzufinden und bewirkt die autoregulatorische Inhibition von entsprechenden BMPs. Somit könnte Bambi gleichzeitig zwei Rollen in BMP-responsiven Zellen erfüllen. Zum einen wirkt es als unterstützender Faktor beim Start der BMP-Signalgebung und schützt zum anderen die Zelle vor einer späteren Überinterpretation der BMP-Stimulation. Dennoch sollte in einem künftigen Experiment gerade der Konzentrationsbereich mit 0-200ng Transfektionsvektor in kleineren Intervallen genauer überprüft werden, um festzustellen, ab welcher eingesetzten Menge an Bambi-full-Vektor sich der beobachtete pro-BMP-Effekt in einen antagonistischen Effekt umkehrt.

In einem weiteren Versuch sollten chimäre Konstrukte bestehend aus Teildomänen von Bambi und dem BMP-Rezeptor 1A transfiziert werden, um genauere Informationen über die Struktur und Bindungsarchitektur zwischen Bambi und BMP-2 zu erlangen. Es sollte geklärt werden, ob Bambi extrazellulär als Ligandenbindestelle fungieren kann und wenn ja, ob die

Bindung die gleiche Struktur und Architektur wie die Bindung von BR1A an BMP-2 aufweist. Wenn ja, dann könnte im Fall von Bambi eine intrazellulär angefügte Typ-I-Rezeptorkinase die Chimäre statt BR1A womöglich in den signalisierenden Komplex rekrutiert werden und die intrazelluläre Signalkaskade weitervermitteln. Falls nicht, so würden sich die Interaktion und Architektur von Bambi zu BMP-2 im Vergleich zu BR1A und BMP-2 grundlegend unterscheiden.

Eine separate Betrachtung einzelner Komponenten im direkten Vergleich mit überexprimiertem Bambi-Protein in voller Länge wurde in den Transfektionsexperimenten mit unterschiedlichen chimären Konstrukten bei gleichbleibender transfizierter DNA-Menge ermöglicht. Ausgehend von der Transfektion mit Leervektor (Mock) reduzieren wildtypisches Bambi (Bambi full) bzw. intrazellulär trunkiertes Bambi (Bambi TM-0) die SMAD-Aktivität um 50% bzw. 36% (s. Abbildung 32A & Abbildung 37A). In diesem Fall sind nicht-signalisierende zusätzliche Bindepartner von BMP-2 in der Membran überexprimiert, wobei die intrazelluläre Domäne von Bambi durchaus wichtig für den inhibitorischen Effekt zu sein scheint. Vergleicht man die beobachtete Aktivität von beiden Konstrukten, so ist im Fall von wildtypischem Bambi mit intaktem Intrazellularteil das gemessene Signal zusätzlich um 15% niedriger als im Fall von intrazellulär trunkiertem Bambi. Das chimäre Konstrukt BR1A-ECD-Bambi-ICD zeigt keinen Einfluss auf die gemessene Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Leertransfektion. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da um die intrazelluläre Kinasedomäne trunkierter BR1A antagonistisch auf das BMP-2-vermittelte Signal wirkt (Namiki *et al.*, 1997). BR1A-ECD-Bambi-ICD sollte sich in diesem Fall wie ein dominant negativer Rezeptor auswirken. Aus diesem Grund war eher von einer Reduzierung der beobachteten Aktivität auszugehen und demzufolge ist das Resultat hier nicht zu erklären. (s. Abbildung 37B) Bambi-ECD-BR1A-ICD liefert das beeindruckendste Ergebnis dieser Versuchsreihe. So ist die gemessene SMAD-Aktivität im Vergleich zur Leertransfektion um 38% erhöht. (s. Abbildung 32A) Dies spricht dafür, dass der extrazelluläre Bambi-Anteil BMP-2 bindet und das Transmembranprotein in den signalaktiven, heterohexameren Komplex rekrutiert werden kann. Gleichzeitig scheint die intrazelluläre Typ-I-Rezeptorkinase korrekt orientiert zu sein und der Typ-II-Rezeptorkinase als Substrat zur Verfügung zu stehen. Folglich ist durch die Transfektion der Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD zusätzlicher Typ-I-Rezeptor auf der Zelle exprimiert und es kann mehr BMP-2-vermitteltes Signal in die Zelle geleitet werden.

Ob die gesteigerte Signalweiterleitung direkt über eine Bindung von BMP-2 und die Bildung des heterohexameren Komplexes um die Chimäre mit angehängter Typ-I-Rezeptorkinase erfolgt oder dieses Konstrukt die Bildung des signalisierenden Komplexes fördert, sollte im anschließenden Versuch mit dem Antikörper AbD1556 überprüft werden. Dieser bindet im BMP-2-Bindebereich der Ektodomäne von BR1A und verhindert somit deren Bindung an BMP-2. In dieser Versuchsreihe wurde die Antikörperkonzentration so gewählt, dass das über endogenen BR1A-Rezeptor weitergeleitete SMAD-Signal einer Leertransfektion um die Hälfte reduziert werden sollte, um zu erwartende Effekte, die durch die Transfektion von chimären Konstrukten zu beobachten wären, zu verstärken.

Aus früheren Studien geht hervor, dass intrazellulär trunkierter BMP-Typ-I-Rezeptor 1A als ein dominant negativer Rezeptor wirkt (Namiki *et al.*, 1997). Im Fall von wildtypischem Bambi (Bambi full), intrazellulär trunkiertem Bambi (Bambi-TM-0) und der Chimäre BR1A-ECD-Bambi-ICD war zu erwarten, dass alle drei Varianten als dominant negative Rezeptoren wirken und das BMP-2-vermittelte Signal niedriger als in der Leertransfektion liegen müsste. Falls sich die weiter oben diskutierten Ergebnisse bestätigen lassen und das chimäre Konstrukt Bambi-ECD-BR1A-ICD tatsächlich als funktioneller Typ-I-Rezeptor wirkt, dann würde durch dessen Transfektion der Effekt der Antikörper-vermittelten Typ-I-Rezeptor-Blockierung entsteht, aufgefangen und gesteigerte SMAD-Aktivität zu beobachten sein.

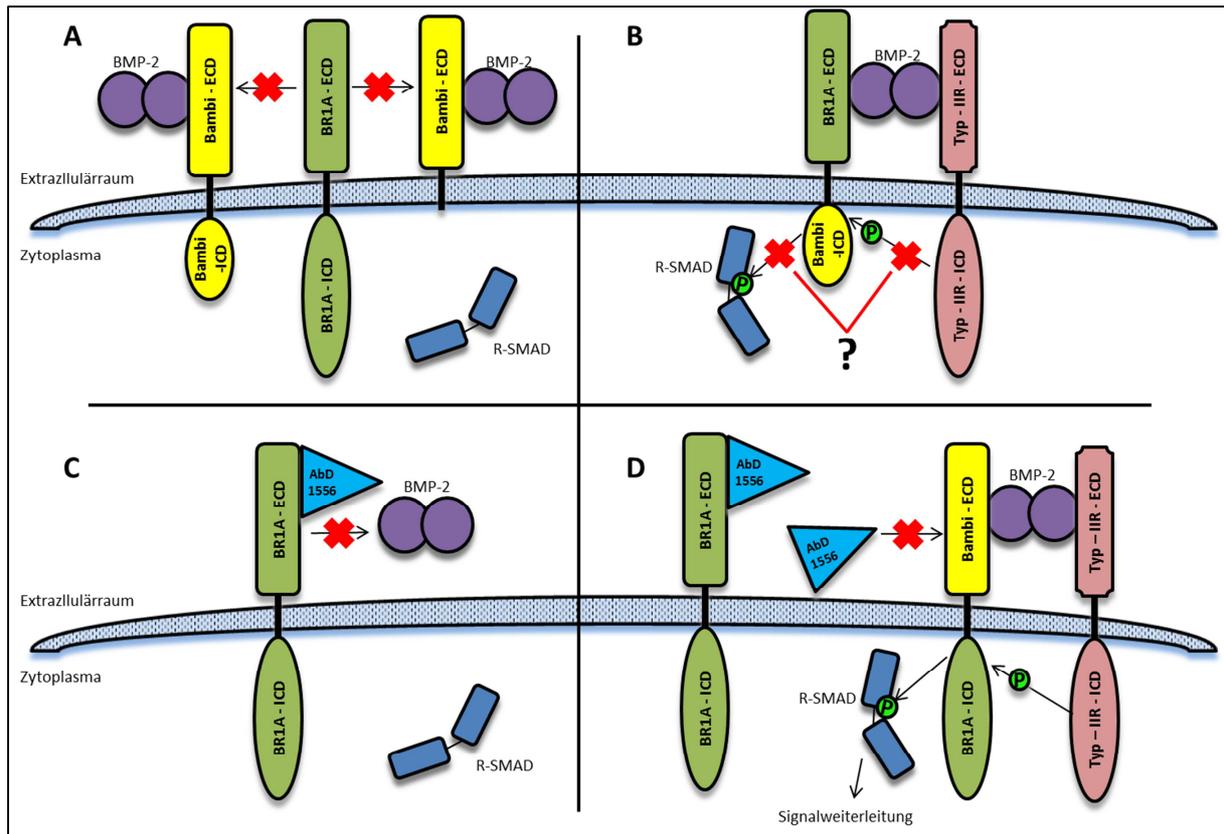


ABBILDUNG 37: AUSWIRKUNG CHIMÄRER KONSTRUKTE AUF DIE BMP-2-SIGNALWEITERLEITUNG

Es sind verschiedene Szenarien der der Einflussnahme von Chimären und des Antikörpers AbD1556 auf die membranäre Signalweiterleitung von BMP-2 schematisiert dargestellt. Aus Übersichtsgründen werden die beteiligten Transmembranproteine als Monomere sowie deren Bindung an den Liganden nicht exakt an deren korrekten Stellen des Liganden dargestellt. In blau mit schwarzen Punkten ist die Zellmembran in der Seitenansicht gezeigt, die Zuordnung der Protein-Domänen ist deren Beschriftung zu entnehmen und zu übertragene Phosphate als grüner Kreis mit „P“ symbolisiert. Pfeile zeigen Bindungen oder Interaktionen an, versehen mit einem roten Kreuz bedeutet es deren jeweiliges Nichtzustandekommen. **A** Transfiziert wurde entweder wildtypisches (Bambi full) oder intrazellulär trunkiertes Bambi (Bambi TM-0). Beide binden BMP-2 und verhindern sterisch die Rekrutierung endogenem BR1As. Der heterohexamere Komplex bildet sich nicht aus und eine Signalweiterleitung unterbleibt. **B** BR1A-ECD-Bambi-ICD wurde transfiziert, bindet an BMP-2 und der heterohexamere Komplex bildet sich aus. Intrazellulär fehlen die typische GS-Box und die Typ-I-Rezeptorkinase. Ungeklärt ist, ob eine Transphosphorylierung durch die Typ-II-Rezeptorkinase an die intrazelluläre Domäne von Bambi erfolgt und nur die Phosphorylierung des R-SMAD ausbleibt, oder ob Bambi-ICD nicht die notwendige Zielstruktur der Typ-II-Kinase stellt. In jedem Fall findet keine Signalweiterleitung statt. **C** Leertransfektanden werden mit stimulierendem BMP-2 sowie dem Antikörper AbD1556, der das BMP-2-Bindeepitop von endogenem BR1A sterisch blockiert, versetzt. BMP-2 wird nicht rekrutiert, der signalisierende heterohexamere Komplex bildet sich nicht aus und es findet keine Signalweiterleitung ins Zellinnere statt. **D** Transfiziert wurde Bambi-ECD-BR1A-ICD. Die Zellen wurden mit stimulierendem BMP-2 sowie dem Antikörper AbD1556 versetzt. Dieser bindet keine Bambi-Ektodomäne, jedoch endogenes BR1A und verhindert dessen Bindung an BMP-2 wie unter **C** beschrieben. Freie Bambi-ECD bindet BMP-2 und bildet mit zelleigenem Typ-II-Rezeptor den signalaktiven Komplex aus. Intrazellulär aktiviert die Typ-II-Rezeptorkinase die Typ-I-Kinase von Bambi-ECD-BR1A-ICD, welche R-SMADs phosphoryliert und die intrazelluläre Signalkaskade startet.

Ausgehend vom gemessenen Wert der Leertransfektion konnten verschiedene Effekte beobachtet werden: So zeigt der im Verhältnis niedrigere Wert bei wildtypischem Bambi (Bambi full) sowie bei intrazellulär trunkiertem Bambi (Bambi TM-0), dass sich schlicht ein

zusätzlicher Inhibitor der Signalweiterleitung in der Membran befindet, der freies BMP-2 bindet, welches nicht signalaktiv wirken kann. BR1A-ECD-Bambi-ICD hingegen stellt zusätzliche Bindepartner für den Antikörper und hält gewisse Mengen von diesem von endogenem BR1A fern, wodurch leicht erhöhte SMAD-Aktivität zu beobachten war. Die interessanteste Beobachtung ist die stark erhöhte Signalgebung im Fall von Bambi-ECD-BR1A-ICD. (s. Abbildung 33) Hier ist die gleiche Zahl endogener Typ-I-Rezeptoren durch den Antikörper wie in mit Leervektor transfizierten Zellen blockiert, doch wird deren Aufgabe, der Bindung des Liganden und der Signalweitergabe, über die phosphorylierende Aktivität der intrazellulären Kinasedomäne übernommen und höhere SMAD-Aktivität ist zu beobachten. (s. Abbildung 37 C & D) Daraus ergeben sich vier Schlüsse: (1) Der Antikörper AbD1556 gegen BR1A hat keine Affinität zu Bambi und beeinflusst dessen Bindung an BMP-2 nicht. (2) Bambi bindet extrazellulär an der gleichen Stelle des Liganden wie BR1A, denn die ICD der Chimäre ist im heterohexameren Komplex wildtypisch zur ICD des Typ-II-Rezeptors orientiert, so dass deren Kinase die posttransmembranäre GS-Box phosphorylieren, in der Folge das R-SMAD andocken und durch die Typ-I-Kinase aktiviert werden kann. (3) Die Bindung von Bambi-ECD an BMP-2 überlagert nicht die Bindestelle des Typ-II-Rezeptors. Dessen Bindung ist also unabhängig davon, ob BR1A-ECD oder Bambi-ECD an den Liganden gebunden ist, noch möglich. Für BR1A wurde bereits belegt, dass ActR-II und BR1A gebunden an den Liganden BMP-7 sowie BR1A und ActR-IIB gebunden an BMP-2 jeweils keinerlei Kontaktfläche außerhalb der Zelle haben (Greenwald *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2007). Dies kann für Bambi zwar nicht belegt, aber angenommen werden, denn (4) die Chimäre Bambi-ECD-BR1A-ICD ist ein funktioneller Typ-I-Rezeptor, über den eine Signalweiterleitung ins Zellinnere stattfindet. Demzufolge sollten die Struktur und die Bindungsarchitektur der Ektodomäne von Bambi an BMP-2 sehr ähnlich zu der Ektodomäne von BR1A in den oben genannten Komplexen liegen.

4.7 DIE EKTODOMÄNE VON HBAMBI ZEIGT HOHE SPEZIFISCHE AFFINITÄT ZU MITGLIEDERN DER BMP-/GDF-PROTEINGRUPPE

Der Nachweis der Hemmung der BMP-Signalaktivität durch Bambi wurde in früheren Studien bereits postuliert (Onichtchouk *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2004). Da Bambi dies jedoch nachweislich nicht auf der Ebene der Rezeptorektodomänen vermittelt (s. 4.3), muss die Inhibition an einer anderen Stelle der BMP-Signalkaskade direkt oder indirekt erfolgen. Da Bambi als Transmembranprotein einen extrazellulären Anteil besitzt, liegt die Vermutung

nahe, dass dieser Teil das inhibitorische Potential von Bambi (mit)vermittelt. Wenn die Ektodomäne nicht, wie nachgewiesen, für die Anlagerung an die Rezeptoren zuständig ist, so kann sie eine andere Funktion ausüben, um die *in vivo* beobachtete Hemmung der BMP-Signalaktivität (s. 3.10.1) zu erklären. In den in dieser Arbeit durchgeführten Bindestudien konnte *in vitro* klar eine hohe spezifische Affinität von hBambi-ECD-Protein zu verschiedenen Liganden der TGF- β -Superfamilie nachgewiesen werden (s. 3.9.4). Diese zeigte sich explizit gegenüber Mitgliedern der BMP-/GDF-Proteingruppe, die vorwiegend über SMAD-1/-5/-8 signalisieren (BMP-2,-4,-5,-6,-7,-15; GDF-5,-6,-7,-8/Myostatin). Das verwandtschaftlich am weitesten entfernte AMH/MIS signalisiert ebenfalls über SMAD-1/-5/-8, zeigt aber als eine Ausnahme keine nachgewiesene spezifische Interaktion mit Bambi. Eine Bindung an Bambi ist in diesem Fall zudem auch physiologisch nicht möglich, da beide Proteine in ihren Transkriptionsmustern zeitlich und räumlich vollständig voneinander getrennt sind: murines AMH wird in embryonalen Sertolizellen und postnatal ausschließlich in Oozyten im Ovar gebildet (Munsterberg & Lovell-Badge, 1991). Nachweise in Ratten haben ergeben, dass Bambi dort hingegen erst ab der Geburt in Sertolizellen und im Ovar, allerdings explizit nicht in Oozyten vorzufinden ist (Loveland *et al.*, 2003).

Analysiert man die von Bambi gebundenen Liganden hinsichtlich ihrer Bindungsspezifität gegenüber den von ihnen rekrutierten Rezeptoren, so fällt auf, dass hBambi, bis auf GDF-8/Myostatin, ausschließlich mit Liganden interagiert, die mit den Typ-I-Rezeptoren BR1A und BR1B wechselwirken. So suggeriert die Homologie auf Sequenzebene, die Bambi mit BR1A und BR1B teilt, dass sich hier eine ähnliche Bindungseigenschaft zu ähnlichen Liganden ergeben sollte. In der Tat zeigt hBambi-ECD-Protein eine spezifische Affinität zu BMP-2/-4, BMP-5/-6/-7, GDF-5/-6 und -7 sowie zu BMP-15 (s. 3.9.4). Vorab durchgeführte Kontrollmessungen zur Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Analyten mit bekannten Bindepartnern ergaben Bindungsaffinitäten, die im Rahmen der Messungengenauigkeiten die publizierten Werte und damit die Aktivität der verwendeten auf dem Biosensor immobilisierten Liganden bestätigten (s. Tabelle 51). Da die uniformen Versuchsbedingungen für eine Messung mit hBambi-ECD-Protein optimiert waren, lagen die erhaltenen Kontrollwerte mit einer Abweichung um den Faktor zehn im erwarteten Bereich.

Die höchste Affinität der Ektodomäne von Bambi lässt sich gegenüber der BMP-2/-4-Unterguppe sowie den über SMAD-1/-5/-8-signalisierenden GDFs 5,6 und 7 messen. Wie

weiter oben bereits diskutiert, fallen alle aufgenommenen Bindungsaffinitäten seltsamerweise biphasisch aus. Das bedeutet, dass sich sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsphase in jeweils zwei Bereiche unterteilen lassen, für die in der Auswertung jeweils eine eigene Assoziations-/Dissoziationskonstante aufgenommen wurde. Dabei fällt auf, dass die erste Assoziation bei allen aufgenommenen Kurven von hBambi-ECD im Vergleich zu BR1A-ECD leicht erhöht ist. Gleichzeitig ist die Dissoziationsrate von hBambi-ECD hingegen eher kleiner als gegenüber der von BR1A. Die Verweildauer von von Bambi rekrutierten Liganden am Pseudorezeptor ist also sehr kurz und diese werden unmittelbar nach Bindung wieder freigegeben. Dies lässt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten für die biologische Funktion von Bambi zu. Möglicherweise fungiert Bambi in Bezug auf spezifische Liganden der SMAD-1/-5/-8-vermittelten Signalweiterleitung als eine Art lokaler Konzentrador, der die Liganden der jeweiligen Typ-I-Rezeptoren an der Zelloberfläche BMP- und GDF-responsiver Zellen akkumuliert. Weiterhin würde deren Zeitfenster der Signalinduktion scharf abgetrennt und somit auch optimal minimiert, da einem nach abgeschlossener Oligomerisierung zum heterohexameren Komplex und erfolgter Signalweiterleitung im Zellinneren wieder freien Typ-I-Rezeptor sofort neues Substrat in Form eines von Bambi „angelockten“ Liganden zugeführt wird. Dafür und gleichzeitig gegen die publizierte Meinung, dass Bambi die BMP-Signalweiterleitung ausschließlich antagonisiert, würde sprechen, dass die Transkription von *bambi* durch BMP-4 neben der von *bmp-4* und weiteren BMP-4-responsiven Genen in verschiedenen Organismen hochreguliert wird (eine sogenannte Synexpression) (Onichtchouk *et al.*, 1999; Grotewold *et al.*, 2001; Higashihori *et al.*, 2008). Neben einer hypothetischen zeitlichen ist zusätzlich eine räumliche Eingrenzung des Ligandenwirkbereichs durch Bambi-vermittelte Direktion denkbar. In der Extremitätenknospe des Huhns kann eine cBMP-5-induzierte Synexpression von cBambi und cBMP-5 in den künftigen Fingerzwischenräumen beobachtet werden (Zuzarte-Luis *et al.*, 2004). cBMP-5 wirkt apoptotisch in diesem Bereich und cBambi würde in seiner möglichen Rolle als Akkumulator der Liganden den für die Fingerausbildung „schädlichen“ Aktivator der Apoptose, cBMP-5, in diese Fingerzwischenräume dirigieren und diese klar von umliegendem Fingergewebe abgrenzen. Würde Bambi in diesem Fall als reiner Inhibitor wirken, so würde die cBMP-5-induzierte Apoptose durch Bambi verhindert und die Bildung der Fingerzwischenräume wäre nicht möglich. Ebenso könnte das sezernierte cBMP-5 in Bereiche der künftigen Finger diffundieren und dort zur Rückbildung des Gewebes

führen. Eine normale Bildung der Finger wäre somit in einer frühen Phase der Entwicklung bereits gestört. Die Interaktion zwischen Bambi und BMP-5 wurde in SPR-Bindestudien dieser Arbeit klar belegt (s. Tabelle 52). Welchen Sinn ergäbe es in diesem Fall, den eigenen Inhibitor zusammen mit weiterem Aktivator in räumlicher Nähe gleichermaßen zu bilden?

BMP-2 und -4, die Liganden mit der höchsten Affinität zu Bambi, binden in einem sequentiellen Bindemechanismus an ihre Rezeptoren, welcher sich in seiner Abfolge von denen anderer Mitglieder der TGF- β -Superfamilie unterscheidet. So binden BMP-2 und -4 zuerst an den Typ-I-Rezeptor und rekrutieren anschließend erst den Typ-II-Rezeptor in den membranständigen Komplex (Knaus & Sebald, 2001). Denkbar wäre also auch die Bildung eines kurzlebigen Komplexes aus Ligand, Bambi und Typ-II-Rezeptor, um in Abwesenheit des Typ-I-Rezeptors die langsamere Rekrutierung des Typ-II-Rezeptors in den Komplex vorzuziehen. Möglich wäre, dass Bambi im Anschluss daran durch den entsprechenden Typ-I-Rezeptor im Komplex ersetzt würde und so die Komplexbildung beschleunigt würde, was in einer schnelleren Signalweiterleitung resultieren würde. Transfektionsexperimente dieser Arbeit zeigen, dass geringe Konzentrationen an transfiziertem Bambi unterstützend auf die BMP-vermittelte Signalweitergabe wirken (s. 3.10.3.2). Beide beschriebenen unbelegten Theorien der Wirkweise von Bambi, einerseits als Akkumulator der Liganden in räumlicher Nähe der Zelloberfläche und andererseits als unterstützender Faktor der Komplexbildung gingen mit dieser Beobachtung konform.

Versuche mit heterodimerisiertem BMP-2, welchem eine Bindestelle für Typ-I-Rezeptoren fehlt, haben gezeigt, dass die Rekrutierung von nur einem Typ-I-Rezeptor im signalisierenden Komplex aus Ligand sowie Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren ausreicht, um den Stimulus in die Zelle weiterzuleiten. Die beobachtete SMAD-Phosphorylierung ist davon nicht beeinträchtigt. (Knaus & Sebald, 2001). Eine asymmetrische Rezeptorrekrutierung, in der Bambi im vorangegangenen hypothetischen Beispiel im Komplex verbleibt, anstatt durch einen Typ-I-Rezeptor ersetzt zu werden, wäre also durchaus auch denkbar. Dabei könnte durch die lokale Bereitstellung von Bambi neben dem BR1A-/BR1B-aktivierten SMAD-1/-5/-8-Signalweg ein weiterer, noch unbekannter Signalweg angeschaltet werden. Bambi selbst könnte dabei an der intrazellulären Domäne von der zweiten, sich im Komplex befindlichen Typ-II-Kinase transphosphoryliert und somit auf eine noch unbekannt Weise aktiviert werden und seinerseits eine Aktivierung von assoziierten intrazellulären Proteinen

herbeiführen. Ein interessantes Experiment, das hier Klarheit über die Rolle von Bambi verschaffen könnte, wäre ein vergleichender DNA-Array einmal mit wildtypischem und einmal mit intrazellulär trunktiertem Bambi. Würde der intrazelluläre Bereich keine Rolle spielen, Bambi keine alternativen Signalwege ansteuern und nur als Inhibitor der SMAD-vermittelten Signalkaskade fungieren, dann sollten sich die beiden Arrays in ihrem Ergebnis nicht unterscheiden. In diesem Fall würde sich die Frage stellen, weshalb Bambi einen signifikanten intrazellulären Anteil als auch einen Transmembrananteil besitzt und nicht, ähnlich dem Co-Rezeptor Rgm-b, GPI-verankert oder sogar nur sezerniert ist.

Die Theorie der inhibitorischen Funktion von Bambi soll natürlich weiterhin nicht außer Acht gelassen werden. Im Fall einer nicht in der Literatur belegten, möglichen Abspaltung des extrazellulären Anteils ähnlich der von Betaglycan (Betaglycan Δ C) (s. 1.5) oder Rgm-c (Nili *et al.*, 2010) könnte die lösliche Ektodomäne von Bambi wie in den in dieser Arbeit beschriebenen kompetitiven Stimulationsversuchen mit BMP-responsiven Zellen (s. 3.10.1) die Rolle eines Inhibitors übernehmen. Ebenso möglich wäre eine bislang noch nicht bekannte um den Intrazellularteil reduzierte und in der Folge sezernierte alternative *splice*-Variante von Bambi. Dieser Inhibitor könnte mit Typ-I-Rezeptoren um freie Liganden konkurrieren, direkt an sie binden, deren Kontakt zu Typ-I-Rezeptoren sterisch blockieren und ähnlich wie zum Beispiel der sekretierte Faktor Noggin eine antagonistische Funktion auf die BMP-Signalweiterleitung haben. Interessanterweise findet sich Noggin nicht im den ursprünglichen Insekten zuzurechnenden rotbraunen Reismehlkäfer *Tribolium castaneum*, wohl aber Bambi. Umgekehrt verhält es sich in der Taufliege *Drosophila melanogaster*, die ein Vertreter höherer Insekten ist: Noggin ist dort vorhanden, Bambi jedoch fehlt. Die Autoren schlussfolgern, dass bei der Weiterentwicklung von ursprünglichen, kurzkeimigen (*short-germ*) Coleopteren zu höher entwickelten, langkeimigen (*long-germ*) Dipteren Bambi neben weiteren Proteinen (z.B. BMP-10, Dan, Gremlin) verloren gegangen und unter anderem Noggin (und z.B. Chordin und Screw, ein BMP-7-Ortholog) neu hinzugekommen sind. Vergleicht man allerdings mittels *in-situ*-Hybridisierungen die Expressionsprofile der beiden Proteine in beiden Organismen, so ist Bambi ausschließlich in dorsalen Bereichen des Embryos zu finden, wo der Gradient des BMP-2/-4-Orthologs Dpp seine maximale Stärke aufweist und in Folge von BMP-Aktivität MAD-Phosphorylierung stattfindet. (Van der Zee *et al.*, 2008) Entgegengesetzt dazu wird der Inhibitor Noggin nur am gegenüberliegenden, ventralen Pol gebildet, wo der Dpp-Gradient am niedrigsten ist (Nunes da Fonseca *et al.*,

2010). Daraus könnten sich verschiedene Rollen von Bambi, je nach Zustand und Konzentration, ableiten lassen: exprimiert auf der Zelloberfläche erfüllt Bambi in niedrigen Konzentrationen die Rolle eines Co-Rezeptors mit pro-BMP-Funktion, dessen Aufgabe es ist, BMP-Liganden spezifisch an der Zelloberfläche in räumlicher Nähe zu den zugehörigen Typ-I-Rezeptoren zu akkumulieren. Wird die Expression von Bambi in Folge der BMP-vermittelten Stimulation dann zusammen mit zusätzlich gebildetem BMP-Liganden innerhalb der Synexpressionsgruppe hochreguliert, so wirkt Bambi als Signalinhibitor, um die Zelle (auto-)regulatorisch vor einer Überinterpretation des selbst verstärkten Signals zu schützen und die maximale Konzentration des Dpp-/BMP-Gradienten zu deckeln. Gerade während der Embryonalentwicklung sind viele Vorgänge anhand von BMP-Gradienten gesteuert. Das Überschreiten von bestimmten lokalen Morphogen-Schwellenwerten bestimmt die Bildung unterschiedlicher Körper- oder Geweberegionen entlang dadurch definierter Achsen. (Übersichtsartikel: De Robertis & Kuroda, 2004) In der Arbeit von Paulsen und Kollegen wird gezeigt, dass die xBMP-4-vermittelte Synexpression von xBambi sich sowohl agonistisch auf die Ausbreitungsreichweite des xBMP-4-Gradienten aber auch limitierend auf das maximale xBMP-4-Signal auswirkt (Paulsen *et al.*, 2011). Für Bambi sind also im zellulären Kontext viele Rollen abhängig von seiner Expressionsstärke und -region denkbar und noch zu überprüfen und belegen.

Die im Lauf dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über Interaktionspartner von Bambi sowie die Lokalisation des Bereichs der Bindung machen eine Neuinterpretation und -ausrichtung von in der bisher veröffentlichten Literatur gezogener Schlüsse notwendig. Da Bambi nicht an die Ektodomänen der Oberflächenrezeptoren der TGF- β -Signalweiterleitung, sondern an über den SMAD-1/-5/-8-Signalweg signalisierende Liganden bindet, sollten die unterschiedlichen, in dieser Arbeit vorgeschlagenen Funktionen von Bambi innerhalb der Signalkaskade und auch darüber hinaus genauer untersucht werden. Vieles deutet darauf hin, dass Bambi eine weit komplexere Rolle als die eines membranständigen Inhibitors einzunehmen scheint. Eine Neuinterpretation bisheriger Ergebnisse sollte zu der Ansicht führen, dass Bambi nicht nur als Inhibitor, sondern vielmehr als Regulator BMP-vermittelter Signale und womöglich noch alternativer Rezeptor ist. Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Herstellungsprotokolls und der Identifikation von Interaktionspartnern wurde die Basis für die 3D-Strukturaufklärung und weitere funktionelle Studien von Bambi erfolgreich gelegt. Das dadurch gewonnene Verständnis kann in Zukunft dazu dienen, den

Beitrag von Bambi an den bereits beschriebenen und noch zu entdeckenden Krankheitsbildern zu erfassen und Ansatzpunkte und Möglichkeiten liefern, diese erfolgreich zu behandeln.

5 SUMMARY

The protein family of TGF- β -proteins consists of a huge number of predominantly homodimeric secreted ligands in higher animals, regulating many processes and developmental procedures in embryonic and adult forms via absolute or gradual influence. Signal transduction to cytoplasm and nucleus occurs by the aid of promiscuous, pairwise recruited type-I- and type-II-receptors, usually activating a variety of receptor-dependent nucleus-permissive SMAD-proteins by an intracellular kinase-phosphorylation-cascade. After translocation they induce transcription of *bre*-promoted genes. Every signal transduction step may be interfered by endogenous inhibitors. So far the known membrane-bound pseudoreceptor Bambi (BMP and activine membrane-bound inhibitor) is hypothesized to have inhibitory potential against BMP- and activin-mediated signaling pathway via binding of distinct ligand-dependent receptors. However, its proper function still remains unclear.

At the beginning of this work a homology model of the extracellular domain of hBambi was built based on a solved 3D-structure of BR1A-ECD bound to its ligand (PDB-ID: 1REW). Upon this model a work hypothesis was issued and biologically active recombinant protein was obtained successfully, both from transfected insect cells and from refolding ex bacterial inclusion bodies in sufficient amount and purified by chromatography, respectively. After comparative quality control of both samples the degree of oligomerisation and secondary structure composition was analyzed via CD spectroscopy and analytical gelfiltration runs. Binding affinity towards nearly all ligands of BMP-/GDF-group assigned to SMAD-1/-5/-8-signaling was shown for hBambi-ECD by SPR experiments. Known BMP-2-mutants lacking affinity for type-I- or type-II-receptors exhibited wildtype-like binding to hBambi-ECD, respectively. Contrary to the current opinion, neither various ectodomains of receptors nor ActivinA did show any specific binding. Moreover, proposed homooligomerisation of Bambi is not mediated via ECD. Introduction of hBambi-ECD into stimulation experiments on several BMP-responsive cells with differing detection modes yielded in concentration-dependent inhibition of BMP-2-signalling, confirming the results of SPR-attempts well.

In a further part of this work various chimeric constructs consisting of Bambi- and BR1A-coding sequence were cloned and effectively co-transfected into HEK Ad293 cells together with plasmids coding for BMP- and Activin-dependent reporters. Stimulation experiments with BMP-2 and ActivinA provided insights into Bambi participation within cellular processes.

Full length Bambi exhibited ambivalent behaviour with respect to BMP-2-signaling: small amounts have an agonistic effect, while increasing levels revert it into an antagonistic one with respect to reporter formation. Regarding ActivinA no antagonistic effect was observed. Assays with chimeric constructs led to a containment for Bambi-epitope to the type-I-binding-site of BMP-2. Direct impact of Bambi-ICD on BMP-2-signaling could be blackballed. Furthermore, attempts with an antibody against BR1A-epitope revealed another feature of Bambi-binding to the ligand: a construct of Bambi-ECD fused to intracellular BR1A-domain including kinase and GS-Box forms a functional type-I-receptor correctly orientated and incorporated into heterohexameric signaling-complex.

Upon gained results within this work, namely the successful establishment of a purification protocol for the extracellular domain of hBambi, the identification of its binding partners as well as the characterization of a prominent binding partner the basis for successful structure determination of hBambi-ECD aiming to unravel the function of this modulator of BMP-/GDF-signaling is laid. Likewise, first knowledge of the ICD was acquired that will be the basis for further experiments leading to continuative scientific findings.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die TGF- β -Proteinfamilie umfasst eine Vielzahl von zumeist homodimeren sezernierten Liganden in höheren Tieren, die viele Vorgänge und Entwicklungen im Embryo wie im adulten Lebewesen über absolute oder graduelle Einflussnahme steuern. Die Signalweiterleitung ins Zytoplasma und den Nukleus erfolgt über promisk paarig rekrutierte Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, ehe vorwiegend rezeptorabhängig verschiedene SMAD-Proteine von Typ-I-Kinasen der Rezeptoren aktiviert werden, in den Kern translozieren und die Transkription induzieren. Zu jedem Zeitpunkt dieser Signalweiterleitung kann mittels verschiedener endogener Inhibitoren regulatorisch eingegriffen werden. Dem bisher einzig bekannten membranständigen Pseudorezeptor Bambi (*BMP and Activine membrane bound inhibitor*) wurde in vorangegangenen Arbeiten inhibitorisches Potential gegenüber dem BMP- und Activin-vermittelten Signalweg über Bindung an distinkte ligandenadressierte Rezeptoren zugeschrieben, wobei die genaue Wirkweise bislang noch vollkommen unklar war.

In der vorliegenden Arbeit wurde initial ein Homologiemodell der extrazellulären Domäne von hBambi anhand der gelösten Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von BR1A im gebundenen Zustand (PDB-ID: 1REW) erstellt. Anhand dieses Modells wurde eine Arbeitshypothese entwickelt und es gelang in der Folge, biologisch aktives rekombinantes Protein zum einen aus transfizierten Insektenzellen sowie aus der Renaturierung aus bakteriellen Einschlusskörpern in hinreichender Menge herzustellen und chromatographisch aufzureinigen. Nach einer vergleichenden Qualitätskontrolle beider Exprimat wurden mittels CD-Spektroskopie und analytischer Gelfiltration der Anteil der Sekundärstrukturelemente sowie der Oligomerisierungsgrad erfolgreich bestimmt. In SPR-Bindestudien wurde der Beweis erbracht, dass hBambi-ECD Affinität zu annähernd allen getesteten Liganden der BMP-/GDF-Gruppe, die den SMAD-1/-5/-8-Signalweg aktivieren, zeigt. Bekannte Typ-I- und Typ-II-Bindungsmutanten von BMP-2 wurden ebenfalls von hBambi-ECD quasi wildtypisch gebunden. Verschiedene Rezeptorektodomänen sowie ActivinA wurden, wie bisher in der Literatur fälschlich angenommen wurde, hingegen nicht gebunden. Die propagierte Homooligomerisierung von Bambi wird überdies nicht über die extrazelluläre Domäne vermittelt. Eingesetzt in Stimulationsversuche mit BMP-responsiven Zellen wurde eine konzentrationsabhängige inhibierende Wirkung von freier hBambi-ECD

auf die BMP-2-vermittelte Signalweiterleitung mit unterschiedlichen Nachweismethoden ermittelt, welche die Ergebnisse aus den SPR-Versuchen erfolgreich bestätigten.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden verschiedene chimäre Konstrukte aus für Bambi- und BR1A-Domänen kodierenden Sequenzen kloniert, in HEK Ad293-Zellen zusammen mit BMP- und Activin-responsiven Reportergenkonstrukten transient transfiziert und Stimulationsversuche mit BMP-2 und ActivinA durchgeführt. Wildtypisches Bambi zeigte hierbei ein ambivalentes Verhalten in Bezug auf die Regulation des BMP-2-Signals: geringe Mengen wirken agonistisch, höhere Mengen antagonistisch auf die Ausbildung des Reporters. Im Fall von ActivinA zeigte sich hingegen kein antagonistischer Einfluss von Bambi. In den Experimenten mit chimären Varianten erfolgte durch die erhaltenen Daten die Eingrenzung der Bindestelle von hBambi-ECD an BMP-2 auf den Bereich der Typ-I-Bindestelle. Ein direkter Einfluss der intrazellulären Domäne auf den BMP-2-Signalweg wurde ausgeschlossen. Weiterhin konnte gerade in Versuchen mit einem Antikörper gegen BR1A-ECD eine weitere Eigenheit der Bindung von Bambi an den Liganden offenbart werden: so bildet das Konstrukt aus hBambi-ECD und der intrazellulären BR1A-Domäne mit zugehöriger GS-Box und Typ-I-Kinase einen korrekt in den signalaktiven heterohexameren Komplex rekrutierten funktionellen Typ-I-Rezeptor.

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, nämlich der gelungenen Erstellung eines Herstellungsprotokolls der ECD, deren erfolgreich identifizierten Bindepartnern sowie der Charakterisierung der Bindung an BMP-2 ist der Grundstein für die Strukturaufklärung von hBambi-ECD gelegt, welche weitere Klarheit in die Funktionalität dieses Modulators der BMP-/GDF-vermittelten Signalweiterleitung bringen wird. Ebenso sind erste das Verständnis der ICD aufklärende Ergebnisse erzielt worden, die das Fundament für weitere Experimente und darauf folgende Kenntnisergebnisse darstellen werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S.** . (1991). Cellular and molecular immunology (Philadelphia: Saunders).
- Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B., & De Robertis, E.M.** (2002). Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nature cell biology* **4**, 599-604.
- Akiyama, S., Katagiri, T., Namiki, M., Yamaji, N., Yamamoto, N., Miyama, K., Shibuya, H., Ueno, N., Wozney, J.M., & Suda, T.** (1997). Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP-2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts. *Exp Cell Res* **235**, 362-369.
- Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., & Kawabata, M.** (1999). c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem* **274**, 35269-35277.
- Allendorph, G.P., Isaacs, M.J., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J.C., & Choe, S.** (2007). BMP-3 and BMP-6 structures illuminate the nature of binding specificity with receptors. *Biochemistry* **46**, 12238-12247.
- Andrade, M.A., Chacón, P., Merelo, J.J., & Morán, F.** (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. *Prot. Engineering* **6**, 383-390.
- Andres, J.L., Ronnstrand, L., Cheifetz, S., & Massague, J.** (1991). Purification of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* **266**, 23282-23287.
- Arendt, D., & Nubler-Jung, K.** (1994). Inversion of dorsoventral axis? *Nature* **371**, 26.
- Armes, N.A., Neal, K.A., & Smith, J.C.** (1999). A short loop on the ALK-2 and ALK-4 activin receptors regulates signaling specificity but cannot account for all their effects on early *Xenopus* development. *J Biol Chem* **274**, 7929-7935.
- Arndt, S., Poser, I., Moser, M., & Bosserhoff, A.K.** (2007). Fussel-15, a novel Ski/Sno homolog protein, antagonizes BMP signaling. *Molecular and cellular neurosciences* **34**, 603-611.
- Arndt, S., Poser, I., Schubert, T., Moser, M., & Bosserhoff, A.K.** (2005). Cloning and functional characterization of a new Ski homolog, Fussel-18, specifically expressed in neuronal tissues. *Lab Invest* **85**, 1330-1341.
- Arora, K., Levine, M.S., & O'Connor, M.B.** (1994). The screw gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF-beta family required for specification of dorsal cell fates in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **8**, 2588-2601.
- Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R., & Gespach, C.** (1997). Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J Biol Chem* **272**, 1429-1432.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Cheifetz, S., & Massague, J.** (1992). Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* **68**, 97-108.
- Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F.M., Massague, J., & Wrana, J.L.** (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* **75**, 671-680.
- Avery, O.T., Macleod, C.M., & McCarty, M.** (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med* **79**, 137-158.
- Baarends, W.M., van Helmond, M.J., Post, M., van der Schoot, P.J., Hoogerbrugge, J.W., de Winter, J.P., Uilenbroek, J.T., Karel, B., Wilming, L.G., Meijers, J.H., & et al.** (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development* **120**, 189-197.
- Babitt, J.L., Zhang, Y., Samad, T.A., Xia, Y., Tang, J., Campagna, J.A., Schneyer, A.L., Woolf, C.J., & Lin, H.Y.** (2005). Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* **280**, 29820-29827.

- Babitt, J.L., Huang, F.W., Wrighting, D.M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T.A., Campagna, J.A., Chung, R.T., Schneyer, A.L., Woolf, C.J., Andrews, N.C., & Lin, H.Y.** (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* **38**, 531-539.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., & Arteaga, C.L.** (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* **275**, 36803-36810.
- Barneda-Zahonero, B., Minano-Molina, A., Badiola, N., Fado, R., Xifro, X., Saura, C.A., & Rodriguez-Alvarez, J.** (2009). Bone morphogenetic protein-6 promotes cerebellar granule neurons survival by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Mol Biol Cell* **20**, 5051-5063.
- Basler, K., Edlund, T., Jessell, T.M., & Yamada, T.** (1993). Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF beta family member. *Cell* **73**, 687-702.
- Behringer, R.R., Finegold, M.J., & Cate, R.L.** (1994). Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* **79**, 415-425.
- Bell, E., Munoz-Sanjuan, I., Altmann, C.R., Vonica, A., & Brivanlou, A.H.** (2003). Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGFbeta and Wnt inhibitor. *Development* **130**, 1381-1389.
- Berasi, S.P., Varadarajan, U., Archambault, J., Cain, M., Souza, T.A., Abouzeid, A., Li, J., Brown, C.T., Dorner, A.J., Seeherman, H.J., & Jelinsky, S.A.** (2011). Divergent activities of osteogenic BMP2, and tenogenic BMP12 and BMP13 independent of receptor binding affinities. *Growth Factors* **29**, 128-139.
- Bilwes, A., Rees, B., Moras, D., Menez, R., & Menez, A.** (1994). X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J Mol Biol* **239**, 122-136.
- Bitgood, M.J., & McMahon, A.P.** (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* **172**, 126-138.
- Bizet, A.A., Liu, K., Tran-Khanh, N., Saksena, A., Vorstenbosch, J., Finnson, K.W., Buschmann, M.D., & Philip, A.** (2011). The TGF-beta co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF-beta receptors. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 742-753.
- Blau, H.M., Chiu, C.P., & Webster, C.** (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**, 1171-1180.
- Bork, P.** (1993). The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* **327**, 125-130.
- Borkham-Kamphorst, E., Schaffrath, C., Van de Leur, E., Haas, U., Tihaa, L., Meurer, S.K., Nevzorova, Y.A., Liedtke, C., & Weiskirchen, R.** (2014). The anti-fibrotic effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF-beta signaling. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 902-914.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B., & De Robertis, E.M.** (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601.
- Braig, S., Wallner, S., Junglas, B., Fuchshofer, R., & Bosserhoff, A.K.** (2011). CTGF is overexpressed in malignant melanoma and promotes cell invasion and migration. *Br J Cancer* **105**, 231-238.
- Brown, C.B., Boyer, A.S., Runyan, R.B., & Barnett, J.V.** (1999). Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* **283**, 2080-2082.
- Busconi, L., & Michel, T.** (1995). Recombinant endothelial nitric oxide synthase: post-translational modifications in a baculovirus expression system. *Mol Pharmacol* **47**, 655-659.
- Campbell, G., Weaver, T., & Tomlinson, A.** (1993). Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: the role of wingless, decapentaplegic, and the homeobox gene *aristaless*. *Cell* **74**, 1113-1123.

- Chacko, B.M., Qin, B.Y., Tiwari, A., Shi, G., Lam, S., Hayward, L.J., De Caestecker, M., & Lin, K.** (2004). Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Molecular cell* **15**, 813-823.
- Chaikuad, A., Alfano, I., Kerr, G., Sanvitale, C.E., Boergermann, J.H., Triffitt, J.T., von Delft, F., Knapp, S., Knaus, P., & Bullock, A.N.** (2012). Structure of the bone morphogenetic protein receptor ALK2 and implications for fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem* **287**, 36990-36998.
- Chang, C., Holtzman, D.A., Chau, S., Chickering, T., Woolf, E.A., Holmgren, L.M., Bodorova, J., Gearing, D.P., Holmes, W.E., & Brivanlou, A.H.** (2001). Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* **410**, 483-487.
- Cheifetz, S., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L., Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas, R., & Massague, J.** (1987). The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* **48**, 409-415.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., & Letarte, M.** (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**, 19027-19030.
- Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M.D., Chien, K.R., Conway, S.J., Yoder, M.C., Haneline, L.S., Franco, D., & Shou, W.** (2004). BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* **131**, 2219-2231.
- Chen, J., Bush, J.O., Ovitt, C.E., Lan, Y., & Jiang, R.** (2007). The TGF-beta pseudoreceptor gene Bambi is dispensable for mouse embryonic development and postnatal survival. *Genesis* **45**, 482-486.
- Chen, Y.G., Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., & Massague, J.** (1998). Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **12**, 2144-2152.
- Chumakov, K.M.** (1994). Reverse transcriptase can inhibit PCR and stimulate primer-dimer formation. *PCR methods and applications* **4**, 62-64.
- Daluiski, A., Engstrand, T., Bahamonde, M.E., Gamer, L.W., Agius, E., Stevenson, S.L., Cox, K., Rosen, V., & Lyons, K.M.** (2001). Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet* **27**, 84-88.
- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y., & Davies, D.R.** (1992). Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* **257**, 369-373.
- De Crescenzo, G., Grothe, S., Zwaagstra, J., Tsang, M., & O'Connor-McCourt, M.D.** (2001). Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *J Biol Chem* **276**, 29632-29643.
- de Martin, R., Haendler, B., Hofer-Warbinek, R., Gaugitsch, H., Wrann, M., Schlusener, H., Seifert, J.M., Bodmer, S., Fontana, A., & Hofer, E.** (1987). Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *EMBO J* **6**, 3673-3677.
- De Robertis, E.M., & Kuroda, H.** (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 285-308.
- Deep, S., Walker, K.P., 3rd, Shu, Z., & Hinck, A.P.** (2003). Solution structure and backbone dynamics of the TGFbeta type II receptor extracellular domain. *Biochemistry* **42**, 10126-10139.
- Degen, W.G., Weterman, M.A., van Groningen, J.J., Cornelissen, I.M., Lemmers, J.P., Agterbos, M.A., Geurts van Kessel, A., Swart, G.W., & Bloemers, H.P.** (1996). Expression of nma, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of human melanoma cell lines and xenografts. *Int J Cancer* **65**, 460-465.
- Denker, A.E., Haas, A.R., Nicoll, S.B., & Tuan, R.S.** (1999). Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation* **64**, 67-76.

- Denkler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., & Gauthier, J.M.** (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* **17**, 3091-3100.
- Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B., & Goeddel, D.V.** (1985). Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**, 701-705.
- Derynck, R., Lindquist, P.B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J.L., Rhee, L., Mason, A.J., Miller, D.A., Coffey, R.J., & et al.** (1988). A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* **7**, 3737-3743.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., & Wrana, J.L.** (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature cell biology* **5**, 410-421.
- Doctor, J.S., Jackson, P.D., Rashka, K.E., Visalli, M., & Hoffmann, F.M.** (1992). Sequence, biochemical characterization, and developmental expression of a new member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **151**, 491-505.
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., & Matzuk, M.M.** (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* **383**, 531-535.
- Dore, J.J., DeWitt, J.C., Setty, N., Donald, M.D., Joo, E., Chesarone, M.A., & Birren, S.J.** (2009). Multiple signaling pathways converge to regulate bone-morphogenetic-protein-dependent glial gene expression. *Developmental neuroscience* **31**, 473-486.
- Dromann, D., Rupp, J., Rohmann, K., Osbahr, S., Ulmer, A.J., Marwitz, S., Roschmann, K., Abdullah, M., Schultz, H., Vollmer, E., Zabel, P., Dalhoff, K., & Goldmann, T.** (2010). The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Respiratory research* **11**, 67.
- Duan, X., Liang, Y.Y., Feng, X.H., & Lin, X.** (2006). Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem* **281**, 36526-36532.
- Dube, J.L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K.M., Celeste, A.J., & Matzuk, M.M.** (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* **12**, 1809-1817.
- Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., & Leduc, R.** (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **270**, 10618-10624.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., & Miyazono, K.** (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* **276**, 12477-12480.
- Eldar, A., Dorfman, R., Weiss, D., Ashe, H., Shilo, B.Z., & Barkai, N.** (2002). Robustness of the BMP morphogen gradient in *Drosophila* embryonic patterning. *Nature* **419**, 304-308.
- Farnworth, P.G., Wang, Y., Leembruggen, P., Ooi, G.T., Harrison, C., Robertson, D.M., & Findlay, J.K.** (2006). Rodent adrenocortical cells display high affinity binding sites and proteins for inhibin A, and express components required for autocrine signalling by activins and bone morphogenetic proteins. *J Endocrinol* **188**, 451-465.
- Felin, J.E., Mayo, J.L., Loos, T.J., Jensen, J.D., Sperry, D.K., Gauffin, S.L., Meinhart, C.A., Moss, J.B., & Bridgewater, L.C.** (2010). Nuclear variants of bone morphogenetic proteins. *BMC cell biology* **11**, 20.
- Feng, X.H., & Derynck, R.** (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J* **16**, 3912-3923.
- Feng, X.H., Filvaroff, E.H., & Derynck, R.** (1995). Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced down-regulation of cyclin A expression requires a functional TGF-beta receptor complex. Characterization of chimeric and truncated type I and type II receptors. *J Biol Chem* **270**, 24237-24245.

- Fiedler, J., Roderer, G., Gunther, K.P., & Brenner, R.E.** (2002). BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* **87**, 305-312.
- Finsson, K.W., Tam, B.Y., Liu, K., Marcoux, A., Lepage, P., Roy, S., Bizet, A.A., & Philip, A.** (2006). Identification of CD109 as part of the TGF-beta receptor system in human keratinocytes. *FASEB J* **20**, 1525-1527.
- Franzen, P., Ichijo, H., & Miyazono, K.** (1993). Different signals mediate transforming growth factor-beta 1-induced growth inhibition and extracellular matrix production in prostatic carcinoma cells. *Exp Cell Res* **207**, 1-7.
- Franzen, P., Heldin, C.H., & Miyazono, K.** (1995). The GS domain of the transforming growth factor-beta type I receptor is important in signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 682-689.
- Frey, R.S., & Mulder, K.M.** (1997). Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res* **57**, 628-633.
- Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., & Miyazono, K.** (1999). Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* **10**, 3801-3813.
- Gamer, L.W., Nove, J., Levin, M., & Rosen, V.** (2005). BMP-3 is a novel inhibitor of both activin and BMP-4 signaling in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **285**, 156-168.
- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M.A., & Hurler, J.M.** (1996). Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* **122**, 2349-2357.
- Garcia Abreu, J., Coffinier, C., Larrain, J., Oelgeschlager, M., & De Robertis, E.M.** (2002). Chordin-like CR domains and the regulation of evolutionarily conserved extracellular signaling systems. *Gene* **287**, 39-47.
- Gazzerro, E., Gangji, V., & Canalis, E.** (1998). Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* **102**, 2106-2114.
- Ge, G., Hopkins, D.R., Ho, W.B., & Greenspan, D.S.** (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**, 5846-5858.
- Gellibert, F., Fouchet, M.H., Nguyen, V.L., Wang, R., Krysa, G., de Gouville, A.C., Huet, S., & Dodic, N.** (2009). Design of novel quinazoline derivatives and related analogues as potent and selective ALK5 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 2277-2281.
- Gentry, L.E., & Nash, B.W.** (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**, 6851-6857.
- Gilboa, L., Wells, R.G., Lodish, H.F., & Henis, Y.I.** (1998). Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol* **140**, 767-777.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y.I., & Knaus, P.** (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* **11**, 1023-1035.
- Gordon, J.G., & Swalen, J.D.** (1977). Effect of Thin Organic Films on Surface Plasma Resonance on Gold. *Optics Communications* **22**, 374-376.
- Gossen, M., & Bujard, H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551.
- Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K., & Miyazawa, K.** (2007). Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* **282**, 20603-20611.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., & Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.

- Gray, A.M., & Mason, A.J.** (1990). Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* **247**, 1328-1330.
- Green, J.B., New, H.V., & Smith, J.C.** (1992). Responses of embryonic *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell* **71**, 731-739.
- Greenfield, N.J.** (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols* **1**, 2876-2890.
- Greenwald, J., Fischer, W.H., Vale, W.W., & Choe, S.** (1999). Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nature structural biology* **6**, 18-22.
- Greenwald, J., Vega, M.E., Allendorph, G.P., Fischer, W.H., Vale, W., & Choe, S.** (2004). A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors. *Molecular cell* **15**, 485-489.
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., & Choe, S.** (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Molecular cell* **11**, 605-617.
- Griffith, D.L., Keck, P.C., Sampath, T.K., Rueger, D.C., & Carlson, W.D.** (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 878-883.
- Groppe, J., Hinck, C.S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J.P., Taylor, A.B., Schwarz, P.M., Wrana, J.L., & Hinck, A.P.** (2008). Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Molecular cell* **29**, 157-168.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Izpisua Belmonte, J.C., & Choe, S.** (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **420**, 636-642.
- Grotewold, L., Plum, M., Dildrop, R., Peters, T., & Ruther, U.** (2001). Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mech Dev* **100**, 327-330.
- Guillot, N., Kollins, D., Badimon, J.J., Schlondorff, D., & Hutter, R.** (2013). Accelerated reendothelialization, increased neovascularization and erythrocyte extravasation after arterial injury in BAMBI-/- mice. *PLoS One* **8**, e58550.
- Guillot, N., Kollins, D., Gilbert, V., Xavier, S., Chen, J., Gentle, M., Reddy, A., Bottinger, E., Jiang, R., Rastaldi, M.P., Corbelli, A., & Schlondorff, D.** (2012). BAMBI regulates angiogenesis and endothelial homeostasis through modulation of alternative TGFbeta signaling. *PLoS One* **7**, e39406.
- Han, S., Loulakis, P., Griffor, M., & Xie, Z.** (2007). Crystal structure of activin receptor type IIB kinase domain from human at 2.0 Angstrom resolution. *Protein Sci* **16**, 2272-2277.
- Haniu, M., Rohde, M.F., & Kenney, W.C.** (1993). Disulfide bonds in recombinant human platelet-derived growth factor BB dimer: characterization of intermolecular and intramolecular disulfide linkages. *Biochemistry* **32**, 2431-2437.
- Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T., & Miyazono, K.** (2001). The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol* **155**, 1017-1027.
- Hart, P.J., Deep, S., Taylor, A.B., Shu, Z., Hinck, C.S., & Hinck, A.P.** (2002). Crystal structure of the human TbetaR2 ectodomain--TGF-beta3 complex. *Nature structural biology* **9**, 203-208.
- Harth, S., Kotsch, A., Hu, J., Sebald, W., & Mueller, T.D.** (2010). A selection fit mechanism in BMP receptor IA as a possible source for BMP ligand-receptor promiscuity. *PLoS One* **5**.
- Hartsough, M.T., & Mulder, K.M.** (1995). Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* **270**, 7117-7124.
- Hartsough, M.T., Frey, R.S., Zipfel, P.A., Buard, A., Cook, S.J., McCormick, F., & Mulder, K.M.** (1996). Altered transforming growth factor signaling in epithelial cells when ras activation is blocked. *J Biol Chem* **271**, 22368-22375.

- Hassel, S., Schmitt, S., Hartung, A., Roth, M., Nohe, A., Petersen, N., Ehrlich, M., Henis, Y.I., Sebald, W., & Knaus, P. (2003). Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**, 44-51.
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J., & Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* **12**, 186-197.
- Hatta, T., Konishi, H., Katoh, E., Natsume, T., Ueno, N., Kobayashi, Y., & Yamazaki, T. (2000). Identification of the ligand-binding site of the BMP type IA receptor for BMP-4. *Biopolymers* **55**, 399-406.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., & Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**, 1165-1173.
- Heberlein, U., Wolff, T., & Rubin, G.M. (1993). The TGF beta homolog dpp and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the Drosophila retina. *Cell* **75**, 913-926.
- Henis, Y.I., Moustakas, A., Lin, H.Y., & Lodish, H.F. (1994). The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers. *J Cell Biol* **126**, 139-154.
- Higashihori, N., Song, Y., & Richman, J.M. (2008). Expression and regulation of the decoy bone morphogenetic protein receptor BAMBI in the developing avian face. *Dev Dyn* **237**, 1500-1508.
- Hildyard, J.C., & Wells, D.J. (2014). Identification and validation of quantitative PCR reference genes suitable for normalizing expression in normal and dystrophic cell culture models of myogenesis. *PLoS currents* **6**.
- Hinck, A.P. (2012). Structural studies of the TGF-betas and their receptors - insights into evolution of the TGF-beta superfamily. *FEBS Lett* **586**, 1860-1870.
- Hinck, A.P., Archer, S.J., Qian, S.W., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L., Lucas, R., Zhang, B.L., Wenker, J., & Torchia, D.A. (1996). Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* **35**, 8517-8534.
- Holley, S.A., Jackson, P.D., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E.M., Hoffmann, F.M., & Ferguson, E.L. (1995). A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. *Nature* **376**, 249-253.
- Hough, C., Radu, M., & Dore, J.J. (2012). Tgf-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS One* **7**, e42513.
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., & Harland, R.M. (1998). The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Molecular cell* **1**, 673-683.
- Huang, J.D., Schwyter, D.H., Shirokawa, J.M., & Courey, A.J. (1993). The interplay between multiple enhancer and silencer elements defines the pattern of decapentaplegic expression. *Genes Dev* **7**, 694-704.
- Huse, M., Chen, Y.G., Massague, J., & Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* **96**, 425-436.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., & Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* **389**, 622-626.
- Immergluck, K., Lawrence, P.A., & Bienz, M. (1990). Induction across germ layers in Drosophila mediated by a genetic cascade. *Cell* **62**, 261-268.
- Itasaki, N., Jones, C.M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P.M., Smith, J.C., & Krumlauf, R. (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* **130**, 4295-4305.

- Jakowlew, S.B., Dillard, P.J., Sporn, M.B., & Roberts, A.B.** (1988). Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol* **2**, 1186-1195.
- Jena, N., Martin-Seisdedos, C., McCue, P., & Croce, C.M.** (1997). BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res* **230**, 28-37.
- Jones, C.M., Lyons, K.M., & Hogan, B.L.** (1991). Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* **111**, 531-542.
- Jones, C.M., Simon-Chazottes, D., Guenet, J.L., & Hogan, B.L.** (1992a). Isolation of Vgr-2, a novel member of the transforming growth factor-beta-related gene family. *Mol Endocrinol* **6**, 1961-1968.
- Jones, C.M., Lyons, K.M., Lapan, P.M., Wright, C.V., & Hogan, B.L.** (1992b). DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* **115**, 639-647.
- Joukov, V., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Pajusola, K., Olofsson, B., Kumar, V., Eriksson, U., & Alitalo, K.** (1997). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* **173**, 211-215.
- Jullien, P., Berg, T.M., & Lawrence, D.A.** (1989). Acidic cellular environments: activation of latent TGF-beta and sensitization of cellular responses to TGF-beta and EGF. *Int J Cancer* **43**, 886-891.
- Kang, D.H., Gho, Y.S., Suh, M.K., & Kang, C.H.** (2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **23**, 1511-1512.
- Kaphingst, K., & Kunes, S.** (1994). Pattern formation in the visual centers of the *Drosophila* brain: wingless acts via decapentaplegic to specify the dorsoventral axis. *Cell* **78**, 437-448.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Tanaka, H., Omura, S., & Suda, T.** (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**, 295-299.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A., & Suda, T.** (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* **127**, 1755-1766.
- Katoh, M.** (2004). Identification and characterization of human CKTSF1B2 and CKTSF1B3 genes in silico. *Oncology reports* **12**, 423-427.
- Kattamuri, C., Luedeke, D.M., Nolan, K., Rankin, S.A., Greis, K.D., Zorn, A.M., & Thompson, T.B.** (2012). Members of the DAN family are BMP antagonists that form highly stable noncovalent dimers. *J Mol Biol* **424**, 313-327.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., & Wrana, J.L.** (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular cell* **6**, 1365-1375.
- Kawabata, M., Chytil, A., & Moses, H.L.** (1995). Cloning of a novel type II serine/threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor-beta receptor. *J Biol Chem* **270**, 5625-5630.
- Keller, S., Nickel, J., Zhang, J.L., Sebald, W., & Mueller, T.D.** (2004). Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 481-488.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., & Price, N.C.** (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1751**, 119-139.
- Kessler, D.S., & Melton, D.A.** (1995). Induction of dorsal mesoderm by soluble, mature Vg1 protein. *Development* **121**, 2155-2164.
- Khilko, S.N., Corr, M., Boyd, L.F., Lees, A., Inman, J.K., & Margulies, D.H.** (1993). Direct-Detection of Major Histocompatibility Complex Class-I Binding to Antigenic Peptides Using Surface-Plasmon Resonance - Peptide Immobilization and Characterization of Binding-Specificity. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15425-15434.

- Kim, J., Johnson, K., Chen, H.J., Carroll, S., & Laughon, A. (1997). Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**, 304-308.
- Kim, S.Y., Zhu, J., & Woodruff, T.K. (2011). A truncated, activin-induced Smad3 isoform acts as a transcriptional repressor of FSHbeta expression in mouse pituitary. *Mol Cell Endocrinol* **342**, 64-72.
- Kingsley, D.M., Bland, A.E., Grubber, J.M., Marker, P.C., Russell, L.B., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (1992). The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* **71**, 399-410.
- Kirkbride, K.C., Townsend, T.A., Bruinsma, M.W., Barnett, J.V., & Blobe, G.C. (2008). Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* **283**, 7628-7637.
- Kirsch, T., Nickel, J., & Sebald, W. (2000a). BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J* **19**, 3314-3324.
- Kirsch, T., Sebald, W., & Dreyer, M.K. (2000b). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nature structural biology* **7**, 492-496.
- Kirsch, T., Nickel, J., & Sebald, W. (2000c). Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. *FEBS Lett* **468**, 215-219.
- Klages, J., Kotsch, A., Coles, M., Sebald, W., Nickel, J., Muller, T., & Kessler, H. (2008). The solution structure of BMPR-IA reveals a local disorder-to-order transition upon BMP-2 binding. *Biochemistry* **47**, 11930-11939.
- Klein, R.D., Sherman, D., Ho, W.H., Stone, D., Bennett, G.L., Moffat, B., Vandlen, R., Simmons, L., Gu, Q., Hongo, J.A., Devaux, B., Poulsen, K., Armanini, M., Nozaki, C., Asai, N., Goddard, A., Phillips, H., Henderson, C.E., Takahashi, M., & Rosenthal, A. (1997). A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* **387**, 717-721.
- Kleinschmidt, K., Ploeger, F., Nickel, J., Glockenmeier, J., Kunz, P., & Richter, W. (2013). Enhanced reconstruction of long bone architecture by a growth factor mutant combining positive features of GDF-5 and BMP-2. *Biomaterials* **34**, 5926-5936.
- Knaus, P., & Sebald, W. (2001). Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol Chem* **382**, 1189-1195.
- Knockaert, M., Sapkota, G., Alarcon, C., Massague, J., & Brivanlou, A.H. (2006). Unique players in the BMP pathway: small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11940-11945.
- Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T., & Miyazono, K. (2003). Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J* **22**, 6458-6470.
- Kondaiah, P., Sands, M.J., Smith, J.M., Fields, A., Roberts, A.B., Sporn, M.B., & Melton, D.A. (1990). Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* **265**, 1089-1093.
- Korchynskiy, O., & ten Dijke, P. (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* **277**, 4883-4891.
- Kotsch, A., Nickel, J., Seher, A., Sebald, W., & Muller, T.D. (2009). Crystal structure analysis reveals a spring-loaded latch as molecular mechanism for GDF-5-type I receptor specificity. *EMBO J* **28**, 937-947.
- Kotsch, A., Nickel, J., Seher, A., Heinecke, K., van Geersdaele, L., Herrmann, T., Sebald, W., & Mueller, T.D. (2008). Structure analysis of bone morphogenetic protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome. *J Biol Chem* **283**, 5876-5887.
- Kraich, M., Klein, M., Patino, E., Harrer, H., Nickel, J., Sebald, W., & Mueller, T.D. (2006). A modular interface of IL-4 allows for scalable affinity without affecting specificity for the IL-4 receptor. *BMC Biol* **4**, 13.

- Krause, C., Korchynskiy, O., de Rooij, K., Weidauer, S.E., de Gorter, D.J., van Bezooijen, R.L., Hatsell, S., Economides, A.N., Mueller, T.D., Lowik, C.W., & ten Dijke, P. (2010). Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem* **285**, 41614-41626.
- Kretschmann, E. (1971). Determination of Optical Constants of Metals by Excitation of Surface Plasmons. *Zeitschrift Fur Physik* **241**, 313-&.
- Kretschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J., & Massague, J. (1997). The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* **11**, 984-995.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* **27**, 95-125.
- Kusu, N., Laurikkala, J., Imanishi, M., Usui, H., Konishi, M., Miyake, A., Thesleff, I., & Itoh, N. (2003). Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity. *J Biol Chem* **278**, 24113-24117.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A., & Massague, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* **383**, 832-836.
- Larrain, J., Bachiller, D., Lu, B., Agius, E., Piccolo, S., & De Robertis, E.M. (2000). BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development* **127**, 821-830.
- Larrain, J., Oelgeschlager, M., Ketpura, N.I., Reversade, B., Zakin, L., & De Robertis, E.M. (2001). Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Development* **128**, 4439-4447.
- Laurikkala, J., Kassai, Y., Pakkasjarvi, L., Thesleff, I., & Itoh, N. (2003). Identification of a secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot. *Dev Biol* **264**, 91-105.
- Lawrence, D.A., Pircher, R., & Jullien, P. (1985). Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **133**, 1026-1034.
- Lawrence, D.A., Pircher, R., Kryceve-Martinerie, C., & Jullien, P. (1984). Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *J Cell Physiol* **121**, 184-188.
- Lazareno, S., & Birdsall, N.J. (1993). Estimation of competitive antagonist affinity from functional inhibition curves using the Gaddum, Schild and Cheng-Prusoff equations. *British journal of pharmacology* **109**, 1110-1119.
- Leboy, P.S., Sullivan, T.A., Nooreyazdan, M., & Venezian, R.A. (1997). Rapid chondrocyte maturation by serum-free culture with BMP-2 and ascorbic acid. *J Cell Biochem* **66**, 394-403.
- Lecuit, T., Brook, W.J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H., & Cohen, S.M. (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the Drosophila wing. *Nature* **381**, 387-393.
- Leong, G.M., Subramaniam, N., Figueroa, J., Flanagan, J.L., Hayman, M.J., Eisman, J.A., & Kouzmenko, A.P. (2001). Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J Biol Chem* **276**, 18243-18248.
- Levine, A.J., & Brivanlou, A.H. (2006). GDF3 at the crossroads of TGF-beta signaling. *Cell Cycle* **5**, 1069-1073.
- Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., & Vale, W. (2000). Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* **404**, 411-414.
- Li, I.W., Cheifetz, S., McCulloch, C.A., Sampath, K.T., & Sodek, J. (1996). Effects of osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. *J Cell Physiol* **169**, 115-125.

- Li, L., Xin, H., Xu, X., Huang, M., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, S., Fu, X.Y., & Chang, Z. (2004). CHIP mediates degradation of Smad proteins and potentially regulates Smad-induced transcription. *Mol Cell Biol* **24**, 856-864.
- Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E., & Wu, D. (2005). Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* **280**, 19883-19887.
- Liem, K.F., Jr., Tremml, G., Roelink, H., & Jessell, T.M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-979.
- Lin, H.Y., Wang, X.F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A., & Lodish, H.F. (1992). Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* **68**, 775-785.
- Lin, X., Liang, M., & Feng, X.H. (2000). Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **275**, 36818-36822.
- Lin, X., Duan, X., Liang, Y.Y., Su, Y., Wrighton, K.H., Long, J., Hu, M., Davis, C.M., Wang, J., Brunicaudi, F.C., Shi, Y., Chen, Y.G., Meng, A., & Feng, X.H. (2006). PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* **125**, 915-928.
- Lin, Z., Gao, C., Ning, Y., He, X., Wu, W., & Chen, Y.G. (2008). The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* **283**, 33053-33058.
- Lintern, K.B., Guidato, S., Rowe, A., Saldanha, J.W., & Itasaki, N. (2009). Characterization of wise protein and its molecular mechanism to interact with both Wnt and BMP signals. *J Biol Chem* **284**, 23159-23168.
- Liu, F., Hata, A., Baker, J.C., Doody, J., Carcamo, J., Harland, R.M., & Massague, J. (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* **381**, 620-623.
- Lo, P.C., & Frasch, M. (1999). Sequence and expression of myoglianin, a novel Drosophila gene of the TGF-beta superfamily. *Mech Dev* **86**, 171-175.
- Lo, R.S., Chen, Y.G., Shi, Y., Pavletich, N.P., & Massague, J. (1998). The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J* **17**, 996-1005.
- Logeart-Avramoglou, D., Bourguignon, M., Oudina, K., Ten Dijke, P., & Petite, H. (2006). An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct. *Anal Biochem* **349**, 78-86.
- Lopez-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L., & Massague, J. (1994). Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* **124**, 557-568.
- Loveland, K.L., Bakker, M., Meehan, T., Christy, E., von Schonfeldt, V., Drummond, A., & de Kretser, D. (2003). Expression of Bambi is widespread in juvenile and adult rat tissues and is regulated in male germ cells. *Endocrinology* **144**, 4180-4186.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., 3rd, de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., & Richardson, D.C. (2003). Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* **50**, 437-450.
- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., & Zhou, Q. (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev* **13**, 2196-2206.
- Lyons, K.M., Jones, C.M., & Hogan, B.L. (1991). The DVR gene family in embryonic development. *Trends in genetics : TIG* **7**, 408-412.
- Lyons, R.M., Keski-Oja, J., & Moses, H.L. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* **106**, 1659-1665.
- Mace, P.D., Cutfield, J.F., & Cutfield, S.M. (2006). High resolution structures of the bone morphogenetic protein type II receptor in two crystal forms: implications for ligand binding. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 831-838.

- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P.A., Pirone, R., Attisano, L., & Wrana, J.L.** (1996). MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* **87**, 1215-1224.
- Mahlawat, P., Ilangovan, U., Biswas, T., Sun, L.Z., & Hinck, A.P.** (2012). Structure of the Alk1 extracellular domain and characterization of its bone morphogenetic protein (BMP) binding properties. *Biochemistry* **51**, 6328-6341.
- Mathews, L.S., & Vale, W.W.** (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* **65**, 973-982.
- Mathews, L.S., & Vale, W.W.** (1993). Characterization of type II activin receptors. Binding, processing, and phosphorylation. *J Biol Chem* **268**, 19013-19018.
- McDonald, N.Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A., & Blundell, T.L.** (1991). New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **354**, 411-414.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., & Lee, S.J.** (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90.
- Mikic, B., Schalet, B.J., Clark, R.T., Gaschen, V., & Hunziker, E.B.** (2001). GDF-5 deficiency in mice alters the ultrastructure, mechanical properties and composition of the Achilles tendon. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **19**, 365-371.
- Minabe-Saegusa, C., Saegusa, H., Tsukahara, M., & Noguchi, S.** (1998). Sequence and expression of a novel mouse gene PRDC (protein related to DAN and cerberus) identified by a gene trap approach. *Development, growth & differentiation* **40**, 343-353.
- Minamizato, T., Sakamoto, K., Liu, T., Kokubo, H., Katsube, K., Perbal, B., Nakamura, S., & Yamaguchi, A.** (2007). CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 567-573.
- Miyazono, K., & Heldin, C.H.** (1989). Role for carbohydrate structures in TGF-beta 1 latency. *Nature* **338**, 158-160.
- Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C., & Heldin, C.H.** (1988). Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* **263**, 6407-6415.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Mueller, T.D., & Nickel, J.** (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett* **586**, 1846-1859.
- Mulder, K.M., & Morris, S.L.** (1992). Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem* **267**, 5029-5031.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., Rifkin, D.B., & Sheppard, D.** (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**, 319-328.
- Munsterberg, A., & Lovell-Badge, R.** (1991). Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* **113**, 613-624.
- Nagano, Y., Mavrakis, K.J., Lee, K.L., Fujii, T., Koinuma, D., Sase, H., Yuki, K., Isogaya, K., Saitoh, M., Imamura, T., Episkopou, V., Miyazono, K., & Miyazawa, K.** (2007). Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **282**, 20492-20501.

- Nakamura, K., Shirai, T., Morishita, S., Uchida, S., Saeki-Miura, K., & Makishima, F.** (1999). p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res* **250**, 351-363.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., & ten Dijke, P.** (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**, 631-635.
- Namiki, M., Akiyama, S., Katagiri, T., Suzuki, A., Ueno, N., Yamaji, N., Rosen, V., Wozney, J.M., & Suda, T.** (1997). A kinase domain-truncated type I receptor blocks bone morphogenetic protein-2-induced signal transduction in C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* **272**, 22046-22052.
- Nguyen, M., Parker, L., & Arora, K.** (2000). Identification of maverick, a novel member of the TGF-beta superfamily in Drosophila. *Mech Dev* **95**, 201-206.
- Nickel, J., Kotsch, A., Sebald, W., & Mueller, T.D.** (2011). Purification, crystallization and preliminary data analysis of the ligand-receptor complex of the growth and differentiation factor 5 variant R57A (GDF5R57A) and BMP receptor IA (BRIA). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **67**, 551-555.
- Nili, M., Shinde, U., & Rotwein, P.** (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**, 24783-24792.
- Nishita, M., Ueno, N., & Shibuya, H.** (1999). Smad8B, a Smad8 splice variant lacking the SSXS site that inhibits Smad8-mediated signalling. *Genes Cells* **4**, 583-591.
- Nogami, H., & Oohira, A.** (1984). Postnatal new bone formation. *Clin Orthop Relat Res*, 106-113.
- Nolan, K., Kattamuri, C., Luedeke, D.M., Deng, X., Jagpal, A., Zhang, F., Linhardt, R.J., Kenny, A.P., Zorn, A.M., & Thompson, T.B.** (2013). Structure of protein related to Dan and Cerberus: insights into the mechanism of bone morphogenetic protein antagonism. *Structure* **21**, 1417-1429.
- Nunes da Fonseca, R., van der Zee, M., & Roth, S.** (2010). Evolution of extracellular Dpp modulators in insects: The roles of tolloid and twisted-gastrulation in dorsoventral patterning of the *Tribolium* embryo. *Dev Biol* **345**, 80-93.
- Oelgeschlager, M., Reversade, B., Larrain, J., Little, S., Mullins, M.C., & De Robertis, E.M.** (2003). The pro-BMP activity of Twisted gastrulation is independent of BMP binding. *Development* **130**, 4047-4056.
- Ohta, K., Lupo, G., Kuriyama, S., Keynes, R., Holt, C.E., Harris, W.A., Tanaka, H., & Ohnuma, S.** (2004). Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Developmental cell* **7**, 347-358.
- Olofsson, A., Miyazono, K., Kanzaki, T., Colosetti, P., Engstrom, U., & Heldin, C.H.** (1992). Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes. *J Biol Chem* **267**, 19482-19488.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., & Niehrs, C.** (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**, 480-485.
- Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Bouillet, P., Mattei, M.G., Dolle, P., & Chambon, P.** (1998). Stra3/lefty, a retinoic acid-inducible novel member of the transforming growth factor-beta superfamily. *The International journal of developmental biology* **42**, 23-32.
- Padgett, R.W., St Johnston, R.D., & Gelbart, W.M.** (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* **325**, 81-84.
- Padgett, R.W., Wozney, J.M., & Gelbart, W.M.** (1993). Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2905-2909.
- Papworth, C.B., J. C.; Braman, J.; Wright, D. A.** (1996). Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Stratagene Strategies* **9**, 3-4.

- Paralkar, V.M., Weeks, B.S., Yu, Y.M., Kleinman, H.K., & Reddi, A.H.** (1992). Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation: potentiation and binding to type IV collagen. *J Cell Biol* **119**, 1721-1728.
- Parker, L., Ellis, J.E., Nguyen, M.Q., & Arora, K.** (2006). The divergent TGF-beta ligand Dawdle utilizes an activin pathway to influence axon guidance in *Drosophila*. *Development* **133**, 4981-4991.
- Parton, R.G., & Simons, K.** (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 185-194.
- Pathi, S., Rutenberg, J.B., Johnson, R.L., & Vortkamp, A.** (1999). Interaction of *Ihh* and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Dev Biol* **209**, 239-253.
- Paulsen, M., Legewie, S., Eils, R., Karaulanov, E., & Niehrs, C.** (2011). Negative feedback in the bone morphogenetic protein 4 (BMP4) synexpression group governs its dynamic signaling range and canalizes development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10202-10207.
- Pearce, K.H., Jr., Cunningham, B.C., Fuh, G., Teeri, T., & Wells, J.A.** (1999). Growth hormone binding affinity for its receptor surpasses the requirements for cellular activity. *Biochemistry* **38**, 81-89.
- Perides, G., Safran, R.M., Downing, L.A., & Charness, M.E.** (1994). Regulation of neural cell adhesion molecule and L1 by the transforming growth factor-beta superfamily. Selective effects of the bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* **269**, 765-770.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., & De Robertis, E.M.** (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589-598.
- Piccolo, S., Agius, E., Lu, B., Goodman, S., Dale, L., & De Robertis, E.M.** (1997). Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* **91**, 407-416.
- Piepenburg, O., Grimmer, D., Williams, P.H., & Smith, J.C.** (2004). Activin redux: specification of mesodermal pattern in *Xenopus* by graded concentrations of endogenous activin B. *Development* **131**, 4977-4986.
- Pils, D., Wittinger, M., Petz, M., Gugerell, A., Gregor, W., Alfan, A., Horvat, R., Braicu, E.I., Sehoul, J., Zeillinger, R., Mikulits, W., & Krainer, M.** (2010). BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment. *Gynecol Oncol* **117**, 189-197.
- Prockop, D.J., & Oh, J.Y.** (2012). Medical therapies with adult stem/progenitor cells (MSCs): a backward journey from dramatic results in vivo to the cellular and molecular explanations. *J Cell Biochem* **113**, 1460-1469.
- Radaev, S., Zou, Z., Huang, T., Lafer, E.M., Hinck, A.P., & Sun, P.D.** (2010). Ternary complex of transforming growth factor-beta1 reveals isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the superfamily. *J Biol Chem* **285**, 14806-14814.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V.** (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* **7**, 95-99.
- Ramakrishnan, C., & Ramachandran, G.N.** (1965). Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys J* **5**, 909-933.
- Ransick, A., & Davidson, E.H.** (1993). A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea urchin embryo. *Science* **259**, 1134-1138.
- Ray, R.P., Arora, K., Nusslein-Volhard, C., & Gelbart, W.M.** (1991). The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **113**, 35-54.
- Rees, B., & Bilwes, A.** (1993). Three-dimensional structures of neurotoxins and cardiotoxins. *Chem Res Toxicol* **6**, 385-406.
- Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T.A., Lee, S.J., Bidart, M., Feige, J.J., & Bailly, S.** (2012). BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* **119**, 6162-6171.

- Rodriguez, C., Chen, F., Weinberg, R.A., & Lodish, H.F.** (1995). Cooperative binding of transforming growth factor (TGF)-beta 2 to the types I and II TGF-beta receptors. *J Biol Chem* **270**, 15919-15922.
- Rodriguez Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A.N., Pascual, J., Ortiz, A., & Izpisua Belmonte, J.C.** (1999). The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* **401**, 243-251.
- Roth, S., Stein, D., & Nusslein-Volhard, C.** (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* **59**, 1189-1202.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Amagasa, T., Miyazono, K., Takagi, M., & Ichijo, H.** (1996). Identification of important regions in the cytoplasmic juxtamembrane domain of type I receptor that separate signaling pathways of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **271**, 2769-2775.
- Sako, D., Grinberg, A.V., Liu, J., Davies, M.V., Castonguay, R., Maniatis, S., Andreucci, A.J., Pobre, E.G., Tomkinson, K.N., Monnell, T.E., Ucran, J.A., Martinez-Hackert, E., Pearsall, R.S., Underwood, K.W., Sehra, J., & Kumar, R.** (2010). Characterization of the ligand binding functionality of the extracellular domain of activin receptor type IIb. *J Biol Chem* **285**, 21037-21048.
- Sampath, T.K., Rashka, K.E., Doctor, J.S., Tucker, R.F., & Hoffmann, F.M.** (1993). *Drosophila* transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6004-6008.
- Sanicola, M., Hession, C., Worley, D., Carmillo, P., Ehrenfels, C., Walus, L., Robinson, S., Jaworski, G., Wei, H., Tizard, R., Whitty, A., Pepinsky, R.B., & Cate, R.L.** (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6238-6243.
- Sanvitale, C.E., Kerr, G., Chaikuad, A., Ramel, M.C., Mohedas, A.H., Reichert, S., Wang, Y., Triffitt, J.T., Cuny, G.D., Yu, P.B., Hill, C.S., & Bullock, A.N.** (2013). A new class of small molecule inhibitor of BMP signaling. *PLoS One* **8**, e62721.
- Saremba, S., Nickel, J., Seher, A., Kotsch, A., Sebald, W., & Mueller, T.D.** (2008). Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *The FEBS journal* **275**, 172-183.
- Sasaki, T., Sasahira, T., Shimura, H., Ikeda, S., & Kuniyasu, H.** (2004). Effect of Nma on growth inhibition by TGF-beta in human gastric carcinoma cell lines. *Oncology reports* **11**, 1219-1223.
- Scheufler, C., Sebald, W., & Hulsmeyer, M.** (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* **287**, 103-115.
- Schmid, B., Furthauer, M., Connors, S.A., Trout, J., Thisse, B., Thisse, C., & Mullins, M.C.** (2000). Equivalent genetic roles for *bmp7/snailhouse* and *bmp2b/swirl* in dorsoventral pattern formation. *Development* **127**, 957-967.
- Seleiro, E.A., Connolly, D.J., & Cooke, J.** (1996). Early developmental expression and experimental axis determination by the chicken *Vg1* gene. *Curr Biol* **6**, 1476-1486.
- Semenov, M., Tamai, K., & He, X.** (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* **280**, 26770-26775.
- Settle, S., Marker, P., Gurley, K., Sinha, A., Thacker, A., Wang, Y., Higgins, K., Cunha, G., & Kingsley, D.M.** (2001). The BMP family member *Gdf7* is required for seminal vesicle growth, branching morphogenesis, and cytodifferentiation. *Dev Biol* **234**, 138-150.
- Settle, S.H., Jr., Rountree, R.B., Sinha, A., Thacker, A., Higgins, K., & Kingsley, D.M.** (2003). Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev Biol* **254**, 116-130.
- Sha, X., Brunner, A.M., Purchio, A.F., & Gentry, L.E.** (1989). Transforming growth factor beta 1: importance of glycosylation and acidic proteases for processing and secretion. *Mol Endocrinol* **3**, 1090-1098.
- Shah, N.M., Groves, A.K., & Anderson, D.J.** (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* **85**, 331-343.

- Shangguan, L., Ti, X., Krause, U., Hai, B., Zhao, Y., Yang, Z., & Liu, F. (2012). Inhibition of TGF-beta/Smad signaling by BAMBI blocks differentiation of human mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts and abolishes their protumor effects. *Stem Cells* **30**, 2810-2819.
- Shaw, G. (2005). A HEK293 Cell Database. <http://webserver.mbi.ufl.edu/~shaw/293.html> (Zeitpunkt des Zugriffs: 22.11.2013)
- Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J., & Pavletich, N.P. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**, 585-594.
- Shimmi, O., Umulis, D., Othmer, H., & O'Connor, M.B. (2005). Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the Drosophila blastoderm embryo. *Cell* **120**, 873-886.
- Shukunami, C., Ohta, Y., Sakuda, M., & Hiraki, Y. (1998). Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5. *Exp Cell Res* **241**, 1-11.
- Simmons, D.G., & Kennedy, T.G. (2002). Uterine sensitization-associated gene-1: a novel gene induced within the rat endometrium at the time of uterine receptivity/sensitization for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* **67**, 1638-1645.
- Smith, J.C. (1987). A mesoderm-inducing factor is produced by Xenopus cell line. *Development* **99**, 3-14.
- Solloway, M.J., Dudley, A.T., Bikoff, E.K., Lyons, K.M., Hogan, B.L., & Robertson, E.J. (1998). Mice lacking Bmp6 function. *Developmental genetics* **22**, 321-339.
- Stanley, E., Biben, C., Kotecha, S., Fabri, L., Tajbakhsh, S., Wang, C.C., Hatzistavrou, T., Roberts, B., Drinkwater, C., Lah, M., Buckingham, M., Hilton, D., Nash, A., Mohun, T., & Harvey, R.P. (1998). DAN is a secreted glycoprotein related to Xenopus cerberus. *Mech Dev* **77**, 173-184.
- Stroschein, S.L., Bonni, S., Wrana, J.L., & Luo, K. (2001). Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* **15**, 2822-2836.
- Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., & Luo, K. (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **286**, 771-774.
- Sudo, S., Avsian-Kretschmer, O., Wang, L.S., & Hsueh, A.J. (2004). Protein related to DAN and cerberus is a bone morphogenetic protein antagonist that participates in ovarian paracrine regulation. *J Biol Chem* **279**, 23134-23141.
- Sun, B.I., Bush, S.M., Collins-Racie, L.A., LaVallie, E.R., DiBlasio-Smith, E.A., Wolfman, N.M., McCoy, J.M., & Sive, H.L. (1999a). derriere: a TGF-beta family member required for posterior development in Xenopus. *Development* **126**, 1467-1482.
- Sun, J., Zhuang, F.F., Mullersman, J.E., Chen, H., Robertson, E.J., Warburton, D., Liu, Y.H., & Shi, W. (2006). BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction. *J Biol Chem* **281**, 29349-29356.
- Sun, Y., Liu, X., Eaton, E.N., Lane, W.S., Lodish, H.F., & Weinberg, R.A. (1999b). Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Molecular cell* **4**, 499-509.
- Surachetpong, W., Singh, N., Cheung, K.W., & Luckhart, S. (2009). MAPK ERK signaling regulates the TGF-beta1-dependent mosquito response to Plasmodium falciparum. *PLoS pathogens* **5**, e1000366.
- Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., & Miyazono, K. (2002). Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem* **277**, 39919-39925.
- Taipale, J., Miyazono, K., Heldin, C.H., & Keski-Oja, J. (1994). Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol* **124**, 171-181.
- Tang, L.Y., Yamashita, M., Coussens, N.P., Tang, Y., Wang, X., Li, C., Deng, C.X., Cheng, S.Y., & Zhang, Y.E. (2011). Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF-beta signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. *EMBO J* **30**, 4777-4789.

- Tannahill, D., & Melton, D.A.** (1989). Localized synthesis of the Vg1 protein during early *Xenopus* development. *Development* **106**, 775-785.
- Tare, R.S., Howard, D., Pound, J.C., Roach, H.I., & Oreffo, R.O.** (2005). Tissue engineering strategies for cartilage generation--micromass and three dimensional cultures using human chondrocytes and a continuous cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 609-621.
- ten Dijke, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Franzen, P., Laiho, M., Miyazono, K., & Heldin, C.H.** (1994). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* **264**, 101-104.
- ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.H., & Miyazono, K.** (1993). Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* **8**, 2879-2887.
- Thies, R.S., Bauduy, M., Ashton, B.A., Kurtzberg, L., Wozney, J.M., & Rosen, V.** (1992). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* **130**, 1318-1324.
- Thies, R.S., Chen, T., Davies, M.V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A., & Wolfman, N.M.** (2001). GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* **18**, 251-259.
- Thomas, J.T., & Moos, M., Jr.** (2007). Vg1 has specific processing requirements that restrict its action to body axis patterning centers. *Dev Biol* **310**, 129-139.
- Thomsen, G.H., & Melton, D.A.** (1993). Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell* **74**, 433-441.
- Todaro, G.J., & De Larco, J.E.** (1978). Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells. *Cancer Res* **38**, 4147-4154.
- Townson, S.A., Martinez-Hackert, E., Greppi, C., Lowden, P., Sako, D., Liu, J., Ucran, J.A., Liharska, K., Underwood, K.W., Sehra, J., Kumar, R., & Grinberg, A.V.** (2012). Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J Biol Chem* **287**, 27313-27325.
- Tramullas, M., Lantero, A., Diaz, A., Morchon, N., Merino, D., Villar, A., Buscher, D., Merino, R., Hurle, J.M., Izpisua-Belmonte, J.C., & Hurle, M.A.** (2010). BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation. *J Neurosci* **30**, 1502-1511.
- Tsuchida, K., Sawchenko, P.E., Nishikawa, S., & Vale, W.W.** (1996). Molecular cloning of a novel type I receptor serine/threonine kinase for the TGF beta superfamily from rat brain. *Molecular and cellular neurosciences* **7**, 467-478.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., & Wrana, J.L.** (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* **95**, 779-791.
- Urist, M.R.** (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, 893-899.
- Urist, M.R., Huo, Y.K., Brownell, A.G., Hohl, W.M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M., & DeLange, R.J.** (1984). Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 371-375.
- van Bezooijen, R.L., Roelen, B.A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P., & Lowik, C.W.** (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* **199**, 805-814.
- van Bezooijen, R.L., Svensson, J.P., Eefting, D., Visser, A., van der Horst, G., Karperien, M., Quax, P.H., Vrieling, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P., & Lowik, C.W.** (2007). Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Bone Miner Res* **22**, 19-28.
- Van der Zee, M., da Fonseca, R.N., & Roth, S.** (2008). TGFbeta signaling in *Tribolium*: vertebrate-like components in a beetle. *Development genes and evolution* **218**, 203-213.

- Van Stokkum, I.H.M., Spoelder, H.J.W., Bloemendal, M., Van Grondelle, R., & Groen, F.C.A.** (1990). Estimation of protein secondary structure and error analysis from CD spectra. *Anal. Biochem.* **191**, 110-118.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., & McCawley, P.** (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In vitro* **13**, 213-217.
- Ventura, F., Doody, J., Liu, F., Wrana, J.L., & Massague, J.** (1994). Reconstitution and transphosphorylation of TGF-beta receptor complexes. *EMBO J* **13**, 5581-5589.
- Vilchis-Landeros, M.M., Montiel, J.L., Mendoza, V., Mendoza-Hernandez, G., & Lopez-Casillas, F.** (2001). Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem J* **355**, 215-222.
- Villar, A.V., Garcia, R., Llano, M., Cobo, M., Merino, D., Lantero, A., Tramullas, M., Hurle, J.M., Hurle, M.A., & Nistal, J.F.** (2013). BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF-beta signaling. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 323-335.
- Vitt, U.A., Hsu, S.Y., & Hsueh, A.J.** (2001). Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol* **15**, 681-694.
- Vonica, A., & Brivanlou, A.H.** (2007). The left-right axis is regulated by the interplay of *Coco*, *Xnr1* and *derriere* in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **303**, 281-294.
- Wang, X.F., Lin, H.Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H.F., & Weinberg, R.A.** (1991). Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* **67**, 797-805.
- Watanabe, T.K., Suzuki, M., Omori, Y., Hishigaki, H., Horie, M., Kanemoto, N., Fujiwara, T., Nakamura, Y., & Takahashi, E.** (1997). Cloning and characterization of a novel member of the human Mad gene family (MADH6). *Genomics* **42**, 446-451.
- Weber, D., Kotsch, A., Nickel, J., Harth, S., Seher, A., Mueller, U., Sebald, W., & Mueller, T.D.** (2007). A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor. *BMC structural biology* **7**, 6.
- Weeks, D.L., & Melton, D.A.** (1987). A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell* **51**, 861-867.
- Weidauer, S.E., Schmieder, P., Beerbaum, M., Schmitz, W., Oschkinat, H., & Mueller, T.D.** (2009). NMR structure of the Wnt modulator protein Sclerostin. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 160-165.
- Wells, R.G., Gilboa, L., Sun, Y., Liu, X., Henis, Y.I., & Lodish, H.F.** (1999). Transforming growth factor-beta induces formation of a dithiothreitol-resistant type I/Type II receptor complex in live cells. *J Biol Chem* **274**, 5716-5722.
- Wharton, K.A., Ray, R.P., & Gelbart, W.M.** (1993). An activity gradient of decapentaplegic is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the *Drosophila* embryo. *Development* **117**, 807-822.
- Wharton, K.A., Cook, J.M., Torres-Schumann, S., de Castro, K., Borod, E., & Phillips, D.A.** (1999). Genetic analysis of the bone morphogenetic protein-related gene, *gbb*, identifies multiple requirements during *Drosophila* development. *Genetics* **152**, 629-640.
- Wiater, E., & Vale, W.** (2003). Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* **278**, 7934-7941.
- Wickham, T.J., Davis, T., Granados, R.R., Shuler, M.L., & Wood, H.A.** (1992). Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* **8**, 391-396.
- Wieser, R., Wrana, J.L., & Massague, J.** (1995). GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* **14**, 2199-2208.
- Wilkes, M.C., Murphy, S.J., Garamszegi, N., & Leof, E.B.** (2003). Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol Cell Biol* **23**, 8878-8889.

- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., & Hogan, B.L.** (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**, 2105-2116.
- Winzor, D.J.** (2003). Analytical exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **56**, 15-52.
- Woolf, A.S., & Cale, C.M.** (1997). Roles of growth factors in renal development. *Current opinion in nephrology and hypertension* **6**, 10-14.
- Wotton, K.R., Alcaine Colet, A., Jaeger, J., & Jimenez-Guri, E.** (2013). Evolution and expression of BMP genes in flies. *Development genes and evolution*.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., & Wang, E.A.** (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**, 1528-1534.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., & Massague, J.** (1994a). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341-347.
- Wrana, J.L., Tran, H., Attisano, L., Arora, K., Childs, S.R., Massague, J., & O'Connor, M.B.** (1994b). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol* **14**, 944-950.
- Wu, J.W., Krawitz, A.R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K., & Shi, Y.** (2002). Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell* **111**, 357-367.
- Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., Massague, J., & Shi, Y.** (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Molecular cell* **8**, 1277-1289.
- Xin, H., Xu, X., Li, L., Ning, H., Rong, Y., Shang, Y., Wang, Y., Fu, X.Y., & Chang, Z.** (2005). CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor-beta signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation. *J Biol Chem* **280**, 20842-20850.
- Xu, J., Wang, A.H., Oses-Prieto, J., Makhijani, K., Katsuno, Y., Pei, M., Yan, L., Zheng, Y.G., Burlingame, A., Bruckner, K., & Derynck, R.** (2013). Arginine Methylation Initiates BMP-Induced Smad Signaling. *Molecular cell* **51**, 5-19.
- Yaffe, D., & Saxel, O.** (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725-727.
- Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzen, P., Miyazono, K., & Heldin, C.H.** (1994). Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **269**, 20172-20178.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., Celeste, A.J., & Matzuk, M.M.** (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* **15**, 854-866.
- Yan, X., Lin, Z., Chen, F., Zhao, X., Chen, H., Ning, Y., & Chen, Y.G.** (2009). Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **284**, 30097-30104.
- Yanagita, M., Oka, M., Watabe, T., Iguchi, H., Niida, A., Takahashi, S., Akiyama, T., Miyazono, K., Yanagisawa, M., & Sakurai, T.** (2004). USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 490-500.
- Yeo, C., & Whitman, M.** (2001). Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Molecular cell* **7**, 949-957.
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., & Zhao, G.Q.** (2000). Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* **14**, 1053-1063.
- Yingling, J.M., Das, P., Savage, C., Zhang, M., Padgett, R.W., & Wang, X.F.** (1996). Mammalian dwarfins are phosphorylated in response to transforming growth factor beta and are implicated in control of cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8940-8944.

- Yokouchi, Y., Vogan, K.J., Pearse, R.V., 2nd, & Tabin, C.J.** (1999). Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* **98**, 573-583.
- Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T., & Yamamoto, T.** (2000). Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* **103**, 1085-1097.
- Yue, J., Frey, R.S., & Mulder, K.M.** (1999). Cross-talk between the Smad1 and Ras/MEK signaling pathways for TGFbeta. *Oncogene* **18**, 2033-2037.
- Yue, J., Sun, B., Liu, G., & Mulder, K.M.** (2004). Requirement of TGF-beta receptor-dependent activation of c-Jun N-terminal kinases (JNKs)/stress-activated protein kinases (Sapks) for TGF-beta up-regulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor. *J Cell Physiol* **199**, 284-292.
- Zhang, H., & Bradley, A.** (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **122**, 2977-2986.
- Zhang, J.L., Huang, Y., Qiu, L.Y., Nickel, J., & Sebald, W.** (2007). von Willebrand factor type C domain-containing proteins regulate bone morphogenetic protein signaling through different recognition mechanisms. *J Biol Chem* **282**, 20002-20014.
- Zhang, J.L., Qiu, L.Y., Kotzsch, A., Weidauer, S., Patterson, L., Hammerschmidt, M., Sebald, W., & Mueller, T.D.** (2008). Crystal structure analysis reveals how the Chordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding. *Developmental cell* **14**, 739-750.
- Zhang, Y., Feng, X., We, R., & Derynck, R.** (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* **383**, 168-172.
- Zhou, L., Park, J., Jang, K.Y., Park, H.S., Wagle, S., Yang, K.H., Lee, K.B., Park, B.H., & Kim, J.R.** (2013). The overexpression of BAMBI and its involvement in the growth and invasion of human osteosarcoma cells. *Oncology reports*.
- Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., & Thomsen, G.H.** (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**, 687-693.
- Zou, H., & Niswander, L.** (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-741.
- Zuniga, J.E., Ilangoan, U., Mahlawat, P., Hinck, C.S., Huang, T., Groppe, J.C., McEwen, D.G., & Hinck, A.P.** (2011). The TbetaR-I pre-helix extension is structurally ordered in the unbound form and its flanking prolines are essential for binding. *J Mol Biol* **412**, 601-618.
- Zuzarte-Luis, V., Montero, J.A., Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Rodriguez-Rey, J.C., & Hurle, J.M.** (2004). A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev Biol* **272**, 39-52.

8 ANHANG

8.1 THEORETISCHE VORHERSAGE ÜBER PHOSPHORYLIERUNGEN

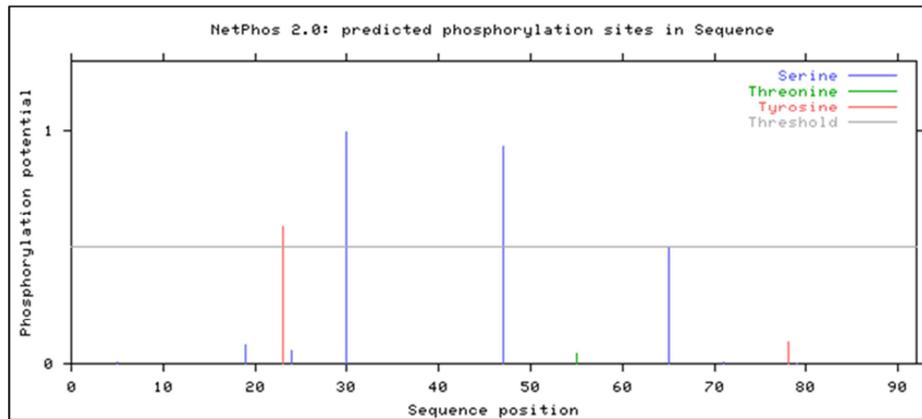


ABBILDUNG 38: VORHERSAGE ÜBER PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN VON HBAMBI-ICD

Abgebildet ist die visualisierte Auswertung des NetPhos.2.0-Algorithmus über hBambi-ICD. Aufgetragen ist die Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung über den jeweiligen Aminosäuren der Primärstruktur. Die horizontale Linie zeigt die Wahrscheinlichkeit von 50% für eine Phosphorylierung an der entsprechenden Position an. Die Art dieser ist der Legende zu entnehmen.

8.2 THEORETISCHE VORHERSAGE ÜBER GLYKOSYLIERUNGEN

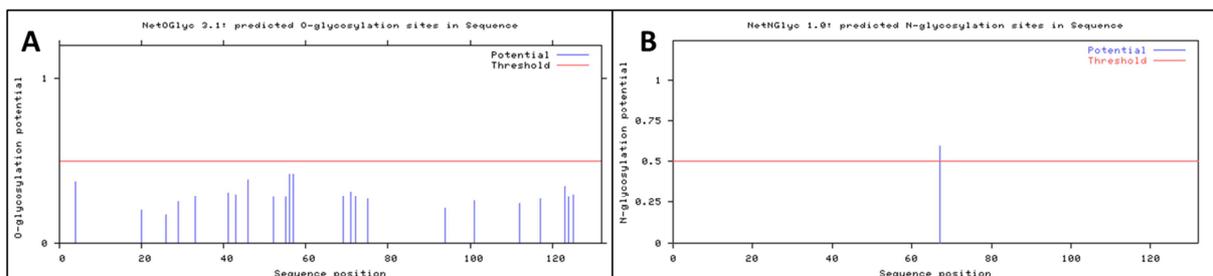


ABBILDUNG 39: VORHERSAGE ÜBER GLYKOSYLIERUNGSSTELLEN VON HBAMBI-ECD

Abgebildet ist die visualisierte Auswertung der NetOGlyc- (A) und NetNGlyc- (B)-Algorithmen über hBambi-ECD. Aufgetragen ist die Wahrscheinlichkeit einer Glykosylierung über den jeweiligen Aminosäuren der Primärstruktur. Die horizontale Linie zeigt die Wahrscheinlichkeit von 50% für eine Glykosylierung an der entsprechenden Position an.

1701	CTAGGTAAGCTTGGTACCctccggaagccggcgggggcccgcggccgtcggggcgctcaatggatcgccactccagctacatcttcatctggctgcagc	1800
	Signalpeptid	
	1821 BamHI	
	1827 SpeI	
1801	tggagctctgcgccatgcccGGATCCACTAGTCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGGGTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCCTCGTCTCGATTCT	1900
	v5 Tag	
	Signalpeptid	
	1907 EcoRI	
	1917 EcoRV	
1901	TACGCGGAATTCTGCAGATATCgtgctgctcaccaaaaggtgaaattcgatgctactgtgatgctgccactgtgtagccactggttatgtgtaaatct	2000
	v5 Tag	
2001	gagctcagcgcctgcttctctagacttcttgatcctcagaactcaaatccccactcaccatggctgctggactctcttgcaagcagcagacatct	2100
	Bambi volle Länge	
2101	gccaagccaacagggcccgaaccactctggcaccaccataccacattggaatgctgtcatgaagacatgtgcaattacagagggtgcacgatgttct	2200
	Bambi volle Länge	
2201	ctctcctcccagggtgaggcctcaggacaaggaacaggtatcagcatgatggtagcagaaaccttatcaccaaggtgcaggagctgacttcttccaaa	2300
	Bambi volle Länge	
	2270 olii	
2301	gagttgtggttccgggcagcggctcattgcccgtgccaattgctggagggtgattttagtgcttattatgtggccctgaggAAACATTATTGCAAGA	2400
	Bambi volle Länge	
	Transmembranteil	
	2334 PflMI	
	MunI silent site (NOT in frame!)	
2401	GCATCTCAAGCAGACGTCGTTACAATCGTGATTTGGAACAGGATGAAGCATTATTCCAGTTGGAGAATCACATAAAGACCTTATTGACCAGTCACAAA	2500
	BR1A-ICD	
2501	TTCTGGTAGTGGGTCTGGACTACCTTTATTGGTTCAGCGAACTATTGCCAAACAGATTCAGATGGTCCGGCAAGTTGGTAAAGGCCGATATGGAGAAGTA	2600
	BR1A-ICD	
2601	TGGATGGGCAAAATGGCGTGGCGAAAAAGTGGCGGTGAAAGTATTCTTTACCACGAAGAAGCCAGCTGGTTTCGAGAAACAGAAATCTACCAAACCTGTGC	2700
	BR1A-ICD	
	2789 BstXI	
2701	TAATGCGCCATGAAAACATACTTGGTTTCATAGCGGCAGACATTAAGGTACAGGTTCCGGACTCAGCTCTATTTGATTACTGATTACCATGAAAATGG	2800
2801	ATCTCTCTATGACTTCTGAAATGTGCTACACTGGACACAGAGCCCTGCTTAAATTGGCTTATTCAGCTGCCCTGTGGTCTGTGCCACCTGCACACAGAA	2900
	BR1A-ICD	
2901	ATTTATGGCACCCAAAGGAAAGCCCGCAATTGCTCATCGAGACCTAAAGAGCAAAAACATCTCATCAAGAAAAATGGGAGTTGCTGCATTGCTGACCTGG	3000
	BR1A-ICD	
3001	GCCTTGCTGTTAAATTCACAGTGACACAAATGAAGTTGATGTGCCCTTGAATACCAGGGTGGGCACCAACGCATATGGCTCCCGAAGTGTGGACGA	3100
	BR1A-ICD	
3101	AAGCCGGAACAAAACCACTCCAGCCCTACATCATGGCTGACATCTACAGCTTCGGCCTAATCATTGGGAGATGGCTCGTCTGTGTATCACAGGAGGG	3200
	BR1A-ICD	
3201	ATCGTGGAAAGAAATACCAATTGCCATATTACAACATGGTACCAGTGATCCGTCATACGAAGATATGCGTGAGGTTGTGTGTGCAACGTTTGGGCAA	3300
	BR1A-ICD	
3301	TTGTGCTAATCCGGTGGAAACAGTGATGAATGTCTACGAGCAGTTTTGAAGCTAATGTCAGAATGCTGGGCCCAATCCAGCCTCCAGACTCACAGCATT	3400

ABBILDUNG 46: KLONIERUNGSTELLE VON PEF6B-V5-SIGNAL-BAMBI-ECD-BR1A-ICD

9 FORMELLER ANHANG

9.1 SCHRIFTENVERZEICHNIS

Liste der Publikationen im Zeitraum von 2008-2014 (chronologisch)

Duppatla, V., Gjorgjevikj, M., Schmitz, W., Kottmair, M., Müller, T.D. & Sebald, W. (2012). Enzymatic Deglutathionylation to Generate Interleukin-4 Cysteine Muteins with free Thiol. Bioconjugate chemistry

Duppatla, V., Gjorgjevikj, M., Schmitz, W., Hermanns, H.M., Schafer, C.M., Kottmair, M., Müller, T.D. & Sebald, W. (2013). IL-4 Analogues with Site-Specific Chemical Modification at Position 121 Inhibit IL-4 and IL-13 Biological Activities. Bioconjugate chemistry

Posterbeiträge im Zeitraum von 2008-2014

Hellmann, T., Kottmair, M., Müller, T.D. (2011), Würzburg, Deutschland, Internationales Symposium des SFB 487 – Regulatorische Membranproteine. Postertitel: “Expression, Purification and Biophysical Characterization of BMP Modulator Proteins RGMB and BAMBI”

9.2 DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Müller für die Möglichkeit, die hier vorliegende Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Sein steter Eifer, ansteckender Enthusiasmus, vielseitiges Interesse, Herangehensweise an Problemstellungen sowie seine Hingabe für die Wissenschaft waren und werden mir immer Vorbild und Ansporn zugleich für jede sich mir zukünftig stellende Aufgabe sein. Seine Unterstützung und Offenheit bei und gegenüber eigenen Ideen sowie seine Diskussions- und Erklärungsbereitschaft waren mir eine sehr große Hilfe und ein exzellenter Rückhalt. Ich durfte viel von ihm lernen und konnte mich optimal weiterentwickeln. Lieber Thomas, vielen Dank für alles!

PD Dr. Robert Hock danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen ehemaligen Kollegen der AG Th. Müller, Tina Hellman, Juliane Fiebig, Simi Zapf, Jens Lautenschläger, Stefan Saremba, Alex Kotsch, Stella Weidauer, Dr. Jule Frank, Dr. Markos Pechlivanis, Dr. Verena Boschert, Steffi Hüttl, Eva-Maria Muth, Eva Wirth und Ramona Derr sowie allen Mitarbeitern der Botanik I danke ich für die allzeit gute Unterstützung, Hilfe bei Problemen und angenehme Atmosphäre in und außerhalb des Labors, die diese Zeit in meinem Leben unvergesslich werden lässt.

Besonderer Dank gilt Alice Schaaf für ihre Unterstützung, ihren großen Einsatz und dass sie immer den Überblick behalten hat, selbst, wenn es mal etwas chaotischer zuging. Ohne Dich liebe Alice hätte ich das alles nicht so gut hinbekommen! Vielen Dank!

Ebenso danke ich Jan-Philipp Scheide für seinen Einsatz und seine Ideen in all seinen Praktika für unser gemeinsames Projekt. Ich hoffe, ich habe dir viel beibringen können und Du empfandst unsere gemeinsame Zeit ebenso angenehm und produktiv wie ich.

Dr. Werner Schmitz danke ich für die geduldige Vermessung und Auswertung dutzender Proben am Massenspektrometer. Meine Besuche am Biozentrum waren mir stets eine Freude.

Prof Dr. Caroline Kisker und Bodo Sander danke ich für die Möglichkeit und die stets freundliche Hilfe bei den CD- und ITC-Messungen.

Maria Albrecht, Brigitte Neumann, und Melanie Papenfuß danke ich für Durchführung und Durchblick bei den Sequenzierungen. Überdies gilt mein großer Dank nochmals Melanie Papenfuß für ihre Hilfe bei den RTs.

Dr. Viswandadham Duppatla und Prof. Dr. Walter Sebald danke ich für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit im Il-4-Projekt.

Ich danke dem Kanapee, obwohl ich jetzt ein Wohnzimmer habe.

Allen Freunden und Verwandten danke ich für die Unterstützung, das Verständnis und die aufbauende Worte, wenn es in den letzten Jahren mal nicht nach Wunsch lief. Jetzt ist es ja endlich geschafft. Vielen Dank Euch allen für alles!

9.3 LEBENSLAUF

Zur Person

- Mathias Kottmair
- Geboren am 14. Juni 1981 in Wertingen
- Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

1987-1991 Volksschule Nordendorf in Nordendorf

1991-2001 Gymnasium Wertingen in Wertingen

06/2001 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Wertingen

Hochschulausbildung

2001-2007 Studium der Biologie auf Diplom an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen-Nürnberg

02/2004 Vordiplomsprüfung

07/2006 Diplomprüfung im Hauptfach Biotechnik sowie den Nebenfächern Tierphysiologie, Entwicklungsbiologie und Physik

08/06-06/07 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Yves A. Muller am Lehrstuhl für Biotechnik der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen mit dem Thema „Die Strukturaufklärung von YvoA und DasR“

06/07 Diplom in Biologie

05/08-heute Dissertation an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg am Julius-von-Sachs-Institut, Lehrstuhl für molekulare Pflanzengenetik und Biophysik bei Prof. Dr. Thomas D. Müller mit dem Thema „Bambi – Charakterisierung eines inhibitorischen BMP-Pseudorezeptors“

Anstellungen

06/07-07/07 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen-Nürnberg am Lehrstuhl für Biotechnik

ab 05/08 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, Julius-von-Sachs-Institut, Botanik I, Arbeitsgruppe Thomas Müller

Würzburg, den _____

Mathias Kottmair

9.4 ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt folgend §4, Abs. 3, Nm. 3 der 2. Satzung vom 13. November 2013 der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie der Universität Würzburg vom 15. März 1999, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Weder habe ich das Promotionsvorhaben kommerziell vermittelt bekommen, noch habe ich Personen oder Organisationen eingeschaltet, die Betreuer für Dissertationen suchen. Ich habe sogar diese Erklärung hier selbst verfasst, was normalerweise nicht üblich ist. Die aufgestellten Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Universität Würzburg als auch der DFG habe ich stets beachtet und eingehalten.

Ich versichere, dass alle verwendeten Abbildungen und Tabellen dieser Arbeit, so nicht anders gekennzeichnet, von mir persönlich konzipiert und angefertigt wurden. Von mir erstellten Darstellungen von Proteinstrukturen ist die zugehörige PDB-ID der Originaldaten sowie der Verweis zur jeweiligen Originalpublikation beigelegt. Zu Abbildung 6 auf Seite 48 habe ich die Erlaubnis des Rechteinhabers zu deren uneingeschränkter Verwendung eingeholt. Sie wird dieser Arbeit bei Abgabe separat in gedruckter Form beigelegt und liegt in der Folge der Universitätsbibliothek Würzburg zur Einsicht sowie dem Rechteinhaber vor.

Weiterhin erkläre ich, die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt zu haben.

Überdies erkläre ich, dass ich früher keine weiteren akademischen Grade als die im beiliegenden Lebenslauf erworben oder ersucht habe.

Würzburg, den _____

Mathias Kottmair