

BMP LIGAND-REZEPTOR-KOMPLEXE: MOLEKULARE
ERKENNUNG AM BEISPIEL DER SPEZIFISCHEN
INTERAKTION ZWISCHEN GDF-5 UND BMPR-IB

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

VORGELEGT VON
ALEXANDER KOTZSCH
AUS DRESDEN

WÜRZBURG 2008

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

„Die normale Wissenschaft besteht in der Verwirklichung jener Verheißung, einer Verwirklichung, die durch Erweiterung der Kenntnis der vom Paradigma als besonders aufschlußreich dargestellten Fakten mit den Voraussagen des Paradigmas sowie durch weitere Artikulierung des Paradigmas selbst herbeigeführt wird. Von denen, die nicht tatsächlich Fachleute in einer ausgereiften Wissenschaft sind, erkennen nur wenige, wieviel »Aufräumarbeit« solcher Art ein Paradigma übrig läßt, und wie faszinierend diese Arbeit tatsächlich sein kann. Das aber gilt es zu verstehen. Aufräumtätigkeiten sind das, was die meisten Wissenschaftler während ihrer gesamten Laufbahn beschäftigt, und sie machen das aus, was ich hier normale Wissenschaft nenne.“

aus: Thomas S. Kuhn, Die Struktur wissenschaftlicher Revolutionen

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG: DIE WACHSTUMSFAKTOREN DER TGF-β-SUPERFAMILIE ...	5
I.1. Liganden der TGF-β-Superfamilie.....	5
I. 1. 1. Aufbau und Struktur von Liganden der TGF- β -Superfamilie.....	5
I.2. Rezeptoren der TGF-β-Superfamilie	7
I. 2. 1. Typ I Rezeptoren.....	8
I. 2. 2. Typ II Rezeptoren	9
I.3. Signalübermittlung durch Rezeptoren der TGF-β-Superfamilie	10
I.4. Bindungspromiskuität und -spezifität, Effektoren	13
I.5. Spezifische Interaktion von GDF-5 und BMPR-IB	15
II. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	20
III. MATERIAL UND METHODEN.....	21
III.1. Abkürzungsverzeichnis.....	21
III.2. Chemikalien.....	22
III.3. Kits	22
III.4. Bakterienstämme	22
III.5. Vektoren.....	22
III. 5. 1. Vektoren für prokaryotische Expression.....	22
III. 5. 2. Vektoren für eukaryotische Expression.....	23
III.6. Antibiotika	24
III.7. Oligonukleotide	25
III.8. Sterile Arbeitsmittel	26
III.9. Kulturmedien	26
III.10. Verwendete Standardpuffer	27
III.11. Allgemeine molekularbiologische Methoden	28
III. 11. 1. Mutagenese durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
III. 11. 2. Schneiden und Ligieren von DNA-Fragmenten	29
III. 11. 3. Transformation von <i>E.coli</i>	30
III. 11. 4. Kolonie-PCR.....	30
III. 11. 5. Agarosegelelektrophorese.....	31
III.12. Allgemeine proteinchemische Methoden.....	31
III. 12. 1. Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
III. 12. 2. Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE	32

III. 12. 3.	Western Blot.....	32
III. 12. 4.	Konzentration von Proteinlösungen	33
III. 12. 5.	Flüssigchromatographie (FPLC und HPLC)	33
III. 12. 6.	Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte	35
III. 12. 7.	Massenspektrometrie.....	36
III. 12. 8.	Biotinylierung von Proteinen	36
III. 12. 9.	Interaktionsanalyse am Biacore 2000 System	36
III. 12. 10.	Zirkulardichroismus	37
III. 12. 11.	Isothermale Titrationskalorimetrie	39
III. 12. 12.	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC).....	40
III.13.	Expression rekombinanter Proteine in E.coli	41
III. 13. 1.	Klonierung der Expressionskonstrukte	41
III. 13. 2.	Proteinvarianten	41
III. 13. 3.	Expression der BMP Typ I Rezeptoren als Fusionsproteine	42
III.14.	Reinigung rekombinant hergestellter Proteine.....	44
III. 14. 1.	Reinigung von BMPR-IA, BMPR-IAsf und BMPR-IA/IB ^C ec.....	44
III. 14. 2.	Reinigung von BMPR-IBec als Thioredoxin-Fusionsprotein.....	46
III. 14. 3.	Reinigung von BMPR-IBec als DsbA-Fusionsprotein.....	47
III. 14. 4.	Reinigung von AR-IIBec als Thioredoxin-Fusion	48
III. 14. 5.	Reinigung von GDF-5	48
III.15.	Präparation von Ligand-Rezeptor-Komplexen.....	50
III. 15. 1.	Binäre GDF-5•BMP Typ I Rezeptor -Komplexe.....	50
III. 15. 2.	Binäre BMP-2•BMP Typ I Rezeptor -Komplexe	50
III. 15. 3.	Ternäre GDF-5•BMP Typ I Rezeptor•BMP Typ II Rezeptor -Komplexe	51
III.16.	Kristallisation der Proteinkomplexe.....	51
III. 16. 1.	Proteinlösungen für die Kristallisation	52
III. 16. 2.	Empirische Kristallisationsbedingungen	52
III. 16. 3.	Verfeinerung von Kristallisationsbedingungen	52
III. 16. 4.	Kristallisation bei gleichzeitiger <i>in situ</i> Proteolyse	53
III. 16. 5.	Methylierung von Proteinkomplexen	53
III. 16. 6.	Chemische Vernetzung von Proteinkristallen	54
III. 16. 7.	Weitere Methoden zur Verbesserung der Beugungseigenschaften von Proteinkristallen	54
III.17.	Röntgendiffraktometrie	55
III. 17. 1.	Messung von Röntgenbeugungsdaten	55
III. 17. 2.	Prozessierung und Analyse von Röntgenbeugungsdaten	56
III.18.	NMR-Spektroskopie	59
III.19.	Zellassays zur Bestimmung der Proteinaktivität	59
III. 19. 1.	Alkalische Phosphatase (ALP) Assays.....	60
III. 19. 2.	Luciferase Reporter-Gen-Assays.....	61

IV.	ERGEBNISSE.....	63
IV.1.	Reinigung der BMP Rezeptoren und GDF-5.....	63
IV. 1. 1.	BMPR-IA und Varianten.....	63
IV. 1. 2.	BMPR-IB und Varianten.....	68
IV. 1. 3.	ActR-IIBec.....	79
IV. 1. 4.	GDF-5 und Varianten.....	79
IV.2.	Biophysikalische Charakterisierung der präparierten Proteine.....	82
IV. 2. 1.	Massenspektrometrie.....	82
IV. 2. 2.	Messung der Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen.....	82
IV. 2. 3.	Messungen der Proteinfaltung mittels Zirkulardichroismus.....	92
IV.3.	Zellbiologische Arbeiten.....	94
IV. 3. 1.	Luciferase-Reporter-Gen-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität der verwendeten BMP-Rezeptoren.....	94
IV. 3. 2.	Alkalische Phosphatase (ALP) und Luciferase-Reporter-Gen-Assays zur Bestimmung der Aktivität von GDF-5 und GDF-5-Varianten.....	96
IV.4.	Präparation von Ligand-Rezeptor-Komplexen.....	99
IV. 4. 1.	Binärer Komplex aus BMP-2 und ¹⁵ N-BMPR-IA ^{ec} bzw. ¹⁵ N-BMPR-IA ^{sf}	99
IV. 4. 2.	Binäre Komplexe aus GDF-5 und BMPR-IB ^{ec} bzw. BMPR-IA/IB ^{ec}	101
IV. 4. 3.	Ternärer Komplex aus GDF-5, BMPR-IB ^{ec} bzw. BMPR-IA/IB ^{ec} und ActR-IIB ^{ec}	103
IV.5.	Kristallisation der Ligand-Rezeptor-Komplexe.....	103
IV. 5. 1.	Kristallisation vom GDF-5•BMPR-IB ^{ec} -Komplex.....	103
IV. 5. 2.	Kristallisation vom GDF-5•BMPR-IA/IB ^{ec} -Komplex.....	110
IV.6.	Datensätze aus der Vermessung von Proteinkristallen.....	118
IV. 6. 1.	Aufnahme und Prozessierung von Datensätzen.....	118
IV.7.	Strukturbeschreibung und -analyse.....	130
IV. 7. 1.	Die Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes.....	131
IV. 7. 2.	Die Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IA/IB ^{ec} -Komplexes.....	150
IV. 7. 3.	Die Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IB ^{ec} •ActR-IIB ^{ec} -Komplexes.....	152
IV. 7. 4.	Die NMR-Struktur der extrazellulären Domäne von BMPR-IA.....	155
IV.8.	Weitere Ergebnisse.....	160
IV. 8. 1.	Kristallstrukturen weiterer BMP-Ligand-Rezeptor oder BMP-Ligand-Modulatorprotein-Komplexe.....	160
IV. 8. 2.	Strukturelle Veränderungen bei phenotypischen Mutationen in BMPR-IA.....	162
V.	DISKUSSION.....	164
V.1.	Expression und Reinigung von BMP Rezeptoren.....	164
V.2.	Kristallisation der GDF-5•BMPR-IB^{ec}- und GDF-5•BMPR-IA/IB^{ec}-Komplexe.....	167

V.3.	Der GDF-5•BMPR-IB-Komplex.....	169
V. 3. 1.	Lage von BMPR-IB im „wrist“-Epitop von GDF-5	170
V. 3. 2.	Molekulare Erkennung zwischen GDF-5 und BMPR-IB	174
V.4.	Mechanismen natürlicher Mutationen in GDF-5	191
V. 4. 1.	Kompletter Funktionsverlust infolge der DP-Mutation.....	191
V. 4. 2.	„Loss of function“ infolge der L60P-Mutation.....	193
V. 4. 3.	„Gain of function“ infolge der R57L- (R57A-) Mutation	194
V. 4. 4.	Mechanismen weiterer Mutationen in GDF-5	196
V.5.	Schlussfolgerung und Ausblick	200
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	202
VII.	SUMMARY	204
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	206
IX.	ANHANG UND ERGÄNZUNGEN	227
IX.1.	Expressionsvektorkarten	227
IX.2.	Kalibrierung der Superdex 75 HR10/30-Säule.....	229
IX.3.	Massenspektrometrie.....	230
IX.4.	Biacore-Bindungsdaten von Proteinen	234
IX.5.	Erster Kristallisationsscreen für den GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex	239
IX.6.	Optimierung der Kristalle des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes	241
IX.7.	Statistiken der Datenprozessierung.....	242
IX. 7. 1.	GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Kristalle (PPG400-Form).....	242
IX. 7. 2.	GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Kristalle (PEG-Form)	243
IX. 7. 3.	GDF-5•BMPR-IA/IB ^c ec-Kristalle.....	244
IX.8.	Zuordnung von Signalen im 2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektrum von BMPR-IA _{sf}	245
IX.9.	Konsensus-Diagramm von BMPR-IA _{sf}	246
IX.10.	Deposition von Strukturen in der RCSB-Datenbank.....	247
X.	DANKSAGUNG	248
XI.	PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE.....	249
XII.	ERKLÄRUNG.....	251

I. Einleitung: Die Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie

I.1. Liganden der TGF- β -Superfamilie

Knochenwachstumsfaktoren (engl. Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) bilden eine große Gruppe strukturell verwandter, in den extrazellulären Raum sekretierter Moleküle, denen vielfältige Funktionen während der Embryogenese als auch Organhomöostase in adulten Organismen zugeschrieben werden. Namensgebend ist ihre Fähigkeit, ektopes Knochenwachstum in muskulärem Gewebe bei Implantation demineralisierter Knochenmatrix zu induzieren, wobei zunächst unklar blieb, ob es sich bei der unter Säureeinwirkung aus Knochenmatrix isolierten Proteinfraction um einzelne Moleküle oder einen Proteinkomplex handelte (Urist, 1965). Einige Zeit später gelang es Wozney et al., die Proteine BMP-2 und BMP-4 rekombinant herzustellen und den ursprünglich von Urist entdeckten knocheninduzierenden Effekt direkt mit den einzelnen BMP-Liganden zu verknüpfen (Wozney et al., 1988). In den folgenden Jahren wurden immer mehr, den bereits bekannten Knochenwachstumsfaktoren homologe Proteine entdeckt, wodurch sich das Funktionsspektrum dieser Proteinfamilie auf fast alle Bereiche des lebenden Organismus erweiterte (Hogan, 1996a; Hogan, 1996b; Kingsley, 1994). Allen BMP-Liganden ist ein hoch konserviertes Cystinknoten-Motiv gemeinsam, was zu der Einordnung von BMPs in die TGF- β -Superfamilie (engl. Transforming Growth Factor β) von Wachstumsfaktoren führte (Wozney et al., 1988). BMPs bilden die größte Untergruppe der TGF- β -Superfamilie. Nach J. Massague können die Liganden dieser Superfamilie basierend auf der Sequenzhomologie zu BMP-2 in einer absteigenden Reihenfolge von nahen zu entfernten Verwandten geordnet werden, wobei TGF- β s nur noch etwa ~35% und GDNF (engl. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) oder MIS (engl. Müllerian Duct Inhibiting Substance) nur ~25% Homologie zu BMP-2 aufweisen, jedoch exemplarisch etwa TGF- β s untereinander 75-80% Sequenzähnlichkeit besitzen (Massague, 1998). Die Aminosäuresequenzen einzelner Wachstumsfaktoren, beispielsweise BMP-2, BMP-7 oder TGF- β 3, sind in unterschiedlichen Vertebraten-Spezies hoch konserviert. Homologe Proteine finden sich ferner in *Drosophila melanogaster* (Decapentaplegic [BMP-2], Glass bottom boat [BMP-7], Screw [GDF-3], 60A [BMP-5]), *Xenopus laevis* (Vg1 [GDF-1]), *Anopheles gambiae* (AGAP000824-PA [BMP-7]) sowie *Caenorhabditis elegans* (DPP/BMP-like 1 [BMP-6], Abnormal DAuer formation [GDF-11]).

I. 1. 1. Aufbau und Struktur von Liganden der TGF- β -Superfamilie

Die Liganden der TGF- β -Superfamilie werden als Pro-Proteine exprimiert, die aus einem Signalpeptid, einer N-terminalen Pro-Domäne und einer C-terminalen reifen Domäne bestehen. Der Pro-Domäne werden Eigenschaften bei der Sekretion, Prozessierung des reifen Liganden und der Lebensdauer der exprimierten Vorläuferproteine zugeschrieben. Die Aktivierung des Wachstumsfaktors erfolgt durch die Abspaltung der N-terminalen Pro-Domäne durch Pro-Protein-Konvertasen (Furin-Proteasen) der extrazellulären Matrix, die in der Aminosäuresequenz RXXX katalytische Aktivität zeigen (Constam and Robertson, 1999; Dubois et al., 1995). Vermutlich regulieren diese Proteasen gleichzeitig die Menge an freigesetzten, aktiven Liganden im

extrazellulären Raum. Für TGF- β s, jedoch bisher mit Ausnahme von BMP-7 (Gregory et al., 2005) nicht für BMPs, ist gezeigt, dass das abgespaltene Pro-Peptid (LAP, Latency-Associated Protein) nichtkovalent an den reifen Liganden bindet und in einen Komplex rekrutiert, welcher Rezeptoren an der Zelloberfläche nicht zugänglich ist. Glycoproteine der extrazellulären Matrix (LTBPs, Latent TGF-\beta Binding Proteins) binden LAP über Disulfidbrücken und immobilisieren den LAP•TGF- β -Komplex in einer Art Pufferfunktion in der extrazellulären Matrix, bis Proteasen die einzelnen Komponenten, d.h. auch aktives TGF- β , freisetzen (Koli et al., 2001).

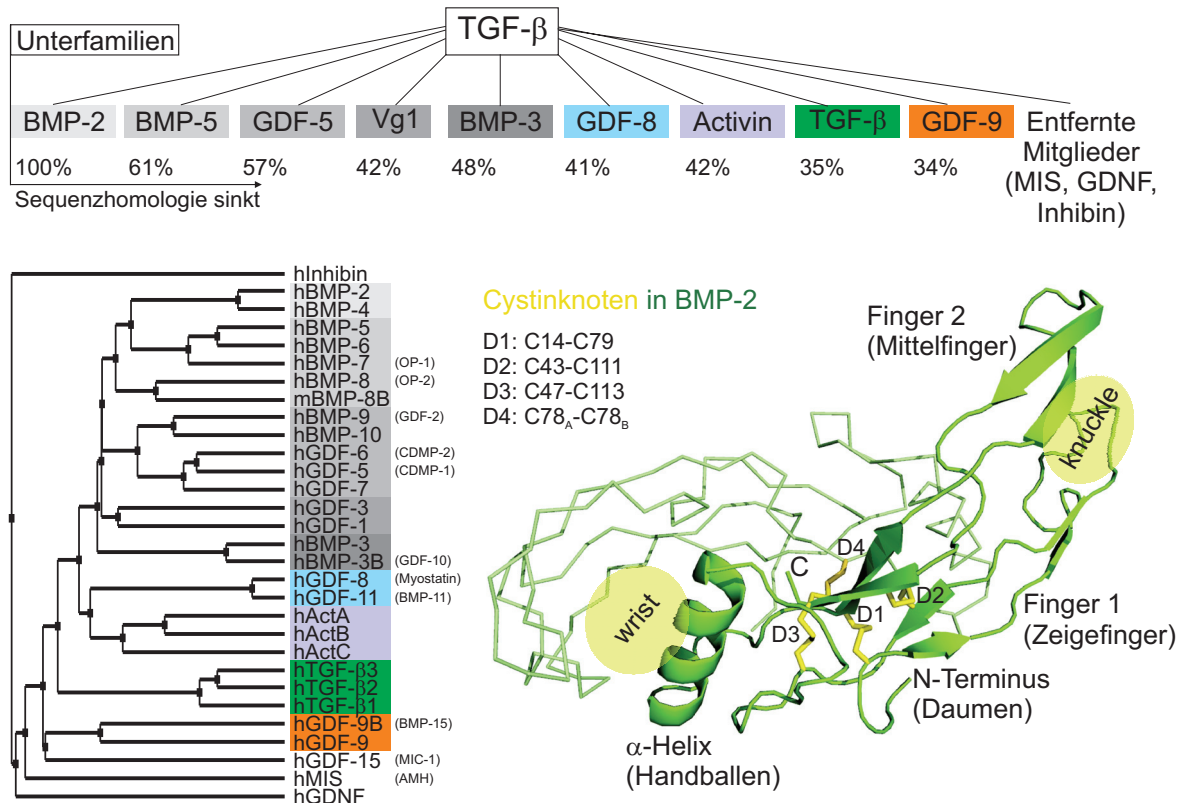


Abbildung I-1: Sequenzhomologien unter den Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie. Der Stammbaum links im Bild zeigt die einzelnen, in Untergruppen einteilbaren Mitglieder der TGF- β -Superfamilie. Hierfür wurden die Aminosäuresequenzen der reifen Liganden mit dem Programm CLUSTALW (Larkin et al., 2007; Thompson et al., 1994) verglichen. Die angegebenen Werte für die Sequenzhomologien gegenüber BMP-2 wurden einem Artikel von J. Massague entnommen (Massague, 1998). Das rechts gezeigte Strukturmodell von BMP-2 (RCSB-Eintrag 3BMP) verdeutlicht repräsentativ den hoch konservierten Cystinknoten der TGF- β s, bei dem die Disulfidbrücke D1 durch einen „Ring“ aus D2 und D3 „gefädelt“ ist. D4 verknüpft zwei monomere Liganden zum biologisch aktiven Homodimer.

Angesichts der moderaten Sequenzhomologie zwischen den Untergruppen scheint es erstaunlich, dass sich alle Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie in der Tertiärstruktur stark ähneln. Strukturelle Analysen an TGF- β 1 (Hinck et al., 1996), TGF- β 2 (Daopin et al., 1992), TGF- β 3 (Mittl et al., 1996), Activin A (Harrington et al., 2006), BMP-2 (Scheufler et al., 1999), BMP-3 (Allendorph et al., 2007), BMP-6 (Saremba et al., 2008), BMP-7 (Griffith et al., 1996b), BMP-9 (Brown et al., 2005), GDF-5 (Nickel et al., 2005) und GDNF (Eigenbrot and Gerber, 1997) zeigen eindrücklich, dass konformationelle Unterschiede in den Hauptketten meist auf Regionen in den Schleifen begrenzt sind, welche die Sekundärstrukturelemente verbinden und die wahrscheinlich für die spezifische Erkennung der Zelloberflächenrezeptoren von Bedeutung sind. Einer der Gründe mag sein, dass ein charakteristisches Cystinknoten-Motiv unter allen Liganden hoch konserviert ist. Dieser

Cystinknoten umfasst grundsätzlich sechs disulfidverbrückte Cysteine (Abbildung I-1, S. 6) und zusätzlich zwei potentiell disulfidverbrückte Cysteine am N-Terminus der TGF- β s, Aktivine sowie von GDF-8, GDF-11 und GDF-15 (Nickel et al., 2002). Ein weiterer Cysteinrest ist in allen Liganden mit Ausnahme von GDF-3, GDF-9 und GDF-9B Bestandteil einer intermolekularen Disulfidbrücke, welche der Verknüpfung zweier Monomere zu signalaktiven homodimeren Liganden dient, aber auch die Bildung von heterodimeren Molekülen mit abweichenden biologischen Eigenschaften ermöglicht. Interessanterweise finden sich ein derart konserviertes Cystinbrückenmuster und die β -Faltblattstrukturen nicht nur innerhalb der TGF- β -Superfamilie, sondern auch in anderen Wachstumsfaktoren der NGF-Familie (engl. Nerve Growth Factor), in PDGF (engl. Platelet-Derived Growth Factor) und in VEGF (engl. Vascular Endothelial Growth Factor), obwohl deren Sequenzen nur noch geringe Ähnlichkeiten mit den Proteinen der TGF- β -Superfamilie aufweisen – eine Beobachtung, die möglicherweise auf gemeinsame Vorgängermoleküle und davon divergierenden evolutionären Entwicklungen hinweist (McDonald and Hendrickson, 1993; Murray-Rust et al., 1993). Allerdings unterscheidet sich beispielsweise die Dimeranordnung der letztgenannten Wachstumsfaktoren wesentlich von denen der TGF- β -Superfamilie (Wiesmann and de Vos, 2000), und die Signalgebung erfolgt über strukturell den TGF- β -Rezeptoren nicht ähnliche Tyrosinkinase-Rezeptoren.

Die Struktur der monomeren Untereinheit der TGF- β -Liganden kann nach Daopin et al. (TGF- β 2) (Daopin et al., 1992) und Scheufler et al. (BMP-2) (Scheufler et al., 1999) als offene linke Hand beschrieben werden, in der Zeige- und Mittelfinger durch zwei jeweils unterbrochene, zweisträngige, antiparallele β -Faltblätter, der Handballen durch die zentrale α -Helix und der Daumen durch den N-Terminus verbildlicht sind (Abbildung I-1, S. 6). Das in den meisten TGF- β -Liganden existierende „freie“ Cystein verknüpft die zwei, in der dimeren Anordnung über eine zweizählige Rotationssymmetrie verwandten Monomere zum biologisch aktiven Protein, dass sich damit ähnlich wie NGF- und PDGF-Liganden durch mehrere, potentiell äquivalente Rezeptorbindestellen auszeichnet. Aus strukturellen und funktionellen Untersuchungen erschloss sich, dass auf der Oberfläche der Liganden der TGF- β -Superfamilie mit den „knuckle“- (Knöchel-) und „wrist“- (Handgelenk-) Epitopen zwei unterscheidbare, definierte Bindeepitope zur Rekrutierung von signalübermittelnden Rezeptoren zur Verfügung stehen.

I.2. Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie

Liganden der TGF- β -Superfamilie übermitteln Signale in das Zellinnere durch Rekrutierung von Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren in heterohexamere Komplexe, wodurch intrazellulär eine Phosphorylierungskaskade ausgelöst wird. Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie setzen sich aus einer extrazellulären, einzelnen transmembranen und zytoplasmischen Domäne zusammen (engl. single span transmembrane receptor). Die extrazelluläre Domäne hat verglichen mit der von Transmembran-Rezeptoren anderer Wachstumsfaktoren, die häufig aus mehreren, strukturell konservierten Domänen bestehen, mit einer Länge von durchschnittlich 100-130 Aminosäuren eine geringe Größe. Die transmembrane Domäne ist kurz (~25 Aminosäuren), während die intrazelluläre Kinasedomäne die größte der drei Untereinheiten darstellt (~350 Aminosäuren). Bisherige strukturelle Untersuchungen konzentrierten sich in der Mehrzahl auf die extrazellulären Domänen (ECDs) der Rezeptoren, deren molekulare Interaktion mit TGF- β -Liganden angesichts der hohen

Bindungspromiskuität im TGF- β -System von Bedeutung für das Verständnis der Signaltransduktion dieser Zytokine ist. Einzig die Kristallstrukturen der zytoplasmischen Domänen von T β R-I {Huse, 1999 #448} und von ActR-IIB {Han, 2007 #450} sind derzeit bekannt.

Eine Besonderheit des TGF- β -Systems stellt die Rekrutierung zweier, sich in ihren funktionellen Eigenschaften unterscheidenden Rezeptoren vom Typ I und Typ II dar, die beide für die Signalübermittlung in das Zellinnere notwendig sind. Im extrazellulären Teil weisen Typ I und Typ II Rezeptoren strukturelle Gemeinsamkeiten auf, die ähnlich wie in den Liganden der TGF- β -Superfamilie auf hoch konservierten Cystinbrückenmustern basieren. Charakteristisch für die Typ I Rezeptoren ist ein konserviertes Serin- und Threonin-reiches Segment mit einer konservierten SGSGSG-Sequenz (GS-Box) am C-Terminus der Kinasedomäne (Wrana et al., 1994b), an dem die Phosphorylierung durch die konstitutiv aktiven Typ II Rezeptor-Kinasen und daraus resultierend die Aktivierung der Typ I Rezeptorkinasen erfolgt (Attisano et al., 1996; Liu et al., 1995; Wieser et al., 1995; Wrana et al., 1994a). Die GS-Box kann mutationsabhängig gezielt inaktiviert oder konstitutiv aktiviert werden. Die Natur des intrazellulär generierten Signals hängt aufgrund der festgelegten Richtung der Phosphorylierungskaskade vom Typ I Rezeptor und dessen Bindungsspezifität zu nachgeordneten, intrazellulären Signalmolekülen ab (Carcamo et al., 1994).

I. 2. 1. Typ I Rezeptoren

Basierend auf der Sequenzähnlichkeit zu den Activin bindenden Typ II Rezeptoren bürgerte sich der Name „Activinrezeptor-ähnliche Kinase“ (engl. Activin Receptor-Like Kinase, Alk) zur Bezeichnung der Typ I Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie ein (Franzen et al., 1993; ten Dijke et al., 1993), weshalb die derzeit bekannten sieben Typ I Rezeptoren auch als Alk-1 (TSR-I) (Attisano et al., 1993; ten Dijke et al., 1993), Alk-2 (ActR-I) (Attisano et al., 1993; ten Dijke et al., 1993), Alk-3 (BMPR-IA) (ten Dijke et al., 1993), Alk-4 (ActR-IB) (ten Dijke et al., 1993), Alk-5 (T β R-I) (Franzen et al., 1993), Alk-6 (BMPR-IB) (ten Dijke et al., 1994a), Alk-7 (ActR-IC) (Tsuchida et al., 1996) bekannt sind. Bis vor kurzem waren außer der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von BMPR-IA im Komplex mit BMP-2 (Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000c) keine strukturellen Informationen für Typ I Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie verfügbar. Kürzlich konnte jedoch die dreidimensionale Struktur der extrazellulären Domäne eines zweiten Typ I Rezeptors, T β R-I, in Komplex mit TGF- β 3 und T β R-II aufgeklärt werden (Groppe et al., 2008).

Auf Grundlage der Strukturen von Schlangentoxinen wie Erabutoxin kann sowohl den Typ I als auch den Typ II Rezeptoren mit der Drei-Finger-Toxin-Faltung (engl. three finger toxin fold) ein konserviertes Tertiärstrukturmotiv zugeordnet werden (Greenwald et al., 1999; Rees and Bilwes, 1993). In Analogie zu den Liganden der TGF- β -Superfamilie sind zwei zentrale, über ein fünfgliedriges Cystinbrückennetzwerk vergleichsweise rigide verknüpfte zwei- und dreisträngige antiparallele β -Faltblätter weitgehend konserviert (Abbildung I-2, S. 9). Andere Bereiche der Rezeptoren, vor allem die die Sekundärstrukturelemente verbindenden Schleifen weisen trotz ihrer Kopplung an den rigiden Kern eine hohe strukturelle Varianz auf. Einige Typ I Rezeptoren sind zudem durch zusätzliche Sekundärstrukturen charakterisiert. So besitzt BMPR-IA zusätzlich zu den β -Strängen der Drei-Finger-Toxin-Faltung eine kurze, auf dem dreisträngigen β -Faltblatt ruhende α -Helix und eine C-terminale 3_{10} -Helix (Abbildung I-2, S. 9). Beide Helices fehlen hingegen in T β R-I, in dem offensichtlich ein vier Reste umfassender Einschub in der $\beta_4\beta_5$ -Schleife die Ausbildung einer α -Helix verhindert. Die stattdessen zu beobachtende vergleichsweise ungeordnete Struktur der

β 4 β 5-Schleife in T β R-I stellt vermutlich einen der Gründe für die fehlende Bindungsaffinität von T β R-I zu BMP-Liganden dar, auch weil in der kurzen α -Helix von BMPR-IA mit Gln86 die Hauptdeterminante der BMP-2•BMPR-IA-Bindung lokalisiert ist. Die pre-Helix-Erweiterung von T β R-I findet sich interessanterweise auch in ActR-IB und in geringerem Ausmaß in ActR-IC, nicht aber in ActR-I, BMPR-IB und TSR-I – was mit der Einteilung der Rezeptoren in Smad2/3- und Smad1/5/8-Signalgeber korreliert. Die Aminosäuresequenzen der sieben Typ I Rezeptoren weisen untereinander nur eine geringe Ähnlichkeit von < 50% (BMPR-IA vs. BMPR-IB) auf, was die teils sehr unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu den Liganden erklären könnte.

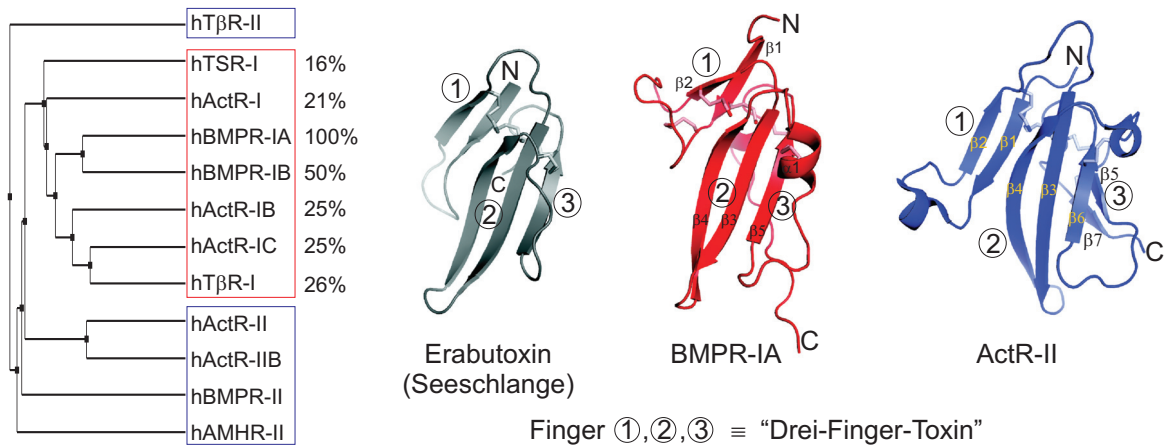


Abbildung I-2: Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie. Der Stammbaum links veranschaulicht die Verwandtschaft und Homologien unter den Typ I und Typ II Rezeptoren (nur extrazelluläre Domänen). Für die Typ I Rezeptoren sind Sequenzidentitäten auf Basis des Sequenzvergleichs in Abbildung V-2, S. 183 angegeben (rot umrahmt). Die partiell konservierten Cystinbrückenmuster aus 10-12 Cysteinen (Stäbchen) ähneln erstaunlicherweise sehr stark denen in Neuro- und Cardiotoxinen aus Schlangen, deren Tertiärstruktur – als „Drei-Finger-Toxin“-Faltung bekannt – ebenfalls durch drei, jeweils zwei antiparallele β -Stränge umfassende „Finger“ gekennzeichnet ist. Abseits dieser konservierten Kernstruktur weisen die TGF- β -Rezeptoren eine teils erhebliche Variabilität in den Randregionen auf.

Die Bindung der Typ I Rezeptoren erfolgt in den „wrist“-Epitopen der Liganden (siehe I.1.). Dabei bildet stets die leicht gekrümmte, konkave Fläche des zentralen β -Faltblatts (Finger 2 und 3 in Abbildung I-2, S. 9, als Aufsicht) das Bindepitop zu den entsprechend komplementären Epitopoberflächen der Liganden. Zusätzlich kontaktieren die β 4 β 5-Schleife und wenn vorhanden die α -Helix des Typ I Rezeptors die pre-Helix-Schleife, die sich anschließende α -Helix und die Innenseite des Fingers 1 des Liganden (Kirsch et al., 2000c). Sowohl die Interaktionsflächen der Liganden als auch Rezeptoren konstituieren sich mehrheitlich aus hydrophoben Aminosäuren, sodass hydrophobe Wechselwirkungen einen Großteil zur Bindungsaffinität beitragen. Angesichts der vergleichsweise flachen Interaktionsflächen müssen einzelne Reste Ligand und Rezeptor in definierten, für eine effiziente Wechselwirkung notwendigen Positionen verankern.

I. 2. 2. Typ II Rezeptoren

Activin Typ II Rezeptoren wurden zuerst unter Verwendung einer Expressionsklonierungsmethode basierend auf ihrer hohen Bindungsaffinität zu Activin A gefunden (Mathews and Vale, 1991). Nach der Entdeckung von ActR-II konnten in der Folgezeit mit ActR-IIB (Attisano et al., 1992), T β R-II (Lin et al., 1992), BMPR-II (Kawabata et al., 1995; Nohno et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995) und AMHR-II (Baarends et al., 1994; di Clemente et al., 1994) vier weitere Typ II Rezeptoren identifiziert werden. An den extrazellulären Domänen der Typ II Rezeptoren und deren Ligand-Rezeptor-

Komplexen erfolgten umfangreiche strukturelle Untersuchungen, was vermutlich mit den im folgenden Abschnitt beschriebenen Bindungsmechanismen der verschiedenen Liganden der TGF- β -Superfamilie zusammenhängt. So wurden in den vergangenen Jahren mehrere Strukturen von ActR-IIB in Komplexen mit Activin A (Greenwald et al., 2004; Thompson et al., 2003) und BMP-2 (Allendorph et al., 2006; Weber et al., 2007), von ActR-II in freiem Zustand (Greenwald et al., 1999) und in Komplex mit BMP-7 (Greenwald et al., 2003), von BMPR-II in freiem Zustand (Mace et al., 2006) sowie von T β R-II in freiem Zustand (Boesen et al., 2002) und in Komplexen mit TGF- β 3 (Groppe et al., 2008; Hart et al., 2002) bestimmt.

In Analogie zu den Typ I Rezeptoren ähnelt der strukturelle Aufbau der Typ II Rezeptoren dem der Schlangentoxine (Abbildung I-2, S. 9). Zusätzlich zu den Toxin-Fingern weisen Typ II Rezeptoren exklusiv ein drittes zweisträngiges, paralleles β -Faltblatt am C-Terminus auf. Ausgehend von den derzeit verfügbaren Strukturen der Typ II Rezeptoren zeigen sich wie bei den Typ I Rezeptoren die zentralen Strukturelemente konserviert, während einige der Schleifen variieren. Dies gilt insbesondere für durch Insertionen vergrößerte Schleifen, beispielsweise die β 1 β 2- und β 4 β 5- (A-) Schleifen von BMPR-II und T β R-II im Vergleich zu ihren Analoga in ActR-II oder ActR-IIB. Der T β R-II fällt im Vergleich etwas aus dem Rahmen, besitzt eine Disulfidbrücke mehr und weist ein um zwei auf fünf β -Stränge erweitertes zentrales β -Faltblatt sowie eine dadurch leicht veränderte Anordnung der Sekundärstrukturelemente auf. Wie Vergleiche zwischen Typ II Rezeptoren in freiem und gebundenem Zustand zeigen, ändern sich die Konformationen von Hauptbindungs-determinanten wie eines im Zentrum aller Rezeptorepitope zu findenden Tryptophan-Restes (Trp60 in ActR-II) bei Bindung des Liganden nur minimal. Insgesamt ist die definierte Tertiärstruktur der Rezeptoren bei Bindung also kaum Änderungen unterworfen; nur die sogenannten A- (β 4 β 5-) und M- (β 2 β 3-) Schleifen in Kontakt mit der Ligandenoberfläche sind nach derzeitigen Erkenntnissen mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Generierung spezifischer Interaktionen von Bedeutung und dementsprechend strukturell variabel. Die hohe Strukturstabilität zeigt sich anschaulich am T β R-II und ActR-II, deren jeweils freie und gebundene Strukturen mit einer mittleren quadratischen Abweichung von nur 0,47Å bzw. 0,39Å ($C\alpha$ -Atome) überlagert werden können.

Die Typ II Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie binden mit Ausnahme von T β R-II in den „knuckle“-Epitopen der Liganden (siehe I.1.). Dabei liegt die leicht gekrümmte, konkave Oberfläche des Rezeptors auf der konvexen Oberfläche des Liganden. Die Bindung von T β R-II an TGF- β erfolgt an den Fingerspitzen des Liganden (Hart et al., 2002).

I.3. Signalübermittlung durch Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie

Die Signalübertragung in der TGF- β -Superfamilie findet durch die Bildung von heterohexameren Ligand-Rezeptor-Komplexen an der Zellmembran statt. Die Transphosphorylierung der Typ I durch die Typ II Rezeptorkinasen aktiviert intrazelluläre rezeptorregulierte Smad-Signalmoleküle (R-Smads; engl. Small Mothers Against Decapentaplegic), die nach Oligomerisierung mit „Common-mediator“-Smads (Co-Smads) in den Zellkern migrieren und dort nach Rekrutierung von weiteren DNA-bindenden Faktoren die Transkription von Zielgenen initiieren (Heldin et al., 1997; Massague,

1998). Liganden der TGF- β -Superfamilie lösen abhängig von ihrer Zugehörigkeit zu den BMP- oder TGF- β /Activin-Untergruppen entweder die Smad2/3- oder Smad1/5/8-Signalwege aus, indem BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-I und TSR-I spezifisch die R-Smads-1, -5 und -8 und ActR-IB, ActR-IC und T β R-I spezifisch die R-Smads-2 und -3 phosphorylieren (Moustakas et al., 2001). Verantwortlich für die spezifische Rekrutierung der R-Smads zeichnet die Kompatibilität einer direkt der GS-Box benachbarten Schleife in den Typ I Rezeptoren (L45-Schleife) und einer Schleife in den R-Smads (L3-Schleife) (Shi and Massague, 2003). Alle aktivierten R-Smads rekrutieren das Co-Smad-4 in Proteinkomplexe, die anschließend in den Zellkern migrieren. Die intrazelluläre Signalübertragung ist auf vielen Ebenen reguliert (Massague and Chen, 2000). So kann die Translokation der R-Smad•Co-Smad-Komplexe durch inhibitorische Moleküle wie I-Smads-6 und -7 verhindert werden, die mit der Bindung von R-Smads an die Typ I Rezeptoren (Smad-7) oder von aktivierten R-Smads an Smad-4 (Smad-6) kompetitieren. Andere Faktoren wie SARA (engl. Smad Anchor for Receptor Activation) begünstigen die Bindung von R-Smad-2 an die Typ I Rezeptoren und damit deren Aktivierbarkeit, während Smurfs (engl. Smad ubiquitination regulatory factor) die R-Smads-1 und -5 erkennen, ubiquitinieren und einem proteolytischen Abbau zuführen. Ferner spielen Phosphatasen eine Rolle bei der Inaktivierung von Smad-Komplexen (Knockaert et al., 2006; Lin et al., 2006). Neben den Smad-Signalwegen können bestimmte zelluläre Ereignisse auch alternativ über die Aktivierung von Ras, Rho-GTPase und TGF- β -Activated Kinase 1 (TAK1) ausgelöst werden, die ihrerseits MAP-Kinasen (engl. Mitogen-Activated Protein Kinases) wie p38, JNK (engl. c-jun N-terminal Kinase) oder ER-Kinasen (engl. Extracellular Regulated Kinases) aktivieren (Moustakas and Heldin, 2005; ten Dijke et al., 2003).

Die Bildung der signalaktiven Ligand-Rezeptor-Komplexe unterliegt infolge unterschiedlicher Bindungseigenschaften der Rezeptoren und Liganden der TGF- β -Superfamilie zwei Bindungsmodi, die durch BMPs und TGF- β s/Activine repräsentiert werden (Massague, 1998). In einer allgemeinen Sichtweise, abgesehen von Ausnahmen wie BMP-6 und BMP-7, binden BMP-Liganden die prototypischen Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB mit niedrig nanomolarer und die Typ II Rezeptoren BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB mit hoch nanomolarer Bindungsaffinität (Tabelle I-1, S. 14). Neuere Strukturanalysen zeigen klar, dass die extrazellulären Domänen der Typ I und Typ II Rezeptoren in heterohexameren Komplexen keine Kontakte ausbilden (Allendorph et al., 2006; Weber et al., 2007), was zu der Schlussfolgerung führt, dass in der BMP-Untergruppe ein begrenzt oder nicht kooperativer Bindungsmodus vorliegt und beide Rezeptortypen völlig unabhängig voneinander durch BMP-Liganden gebunden werden. Die Reihenfolge, mit der Typ I bzw. Typ II Rezeptoren in den signalaktiven Komplex rekrutiert werden, ist letztlich nur durch die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu den Liganden und womöglich extrazelluläre Modulatorproteine festgelegt. Die in vielen Artikeln erwähnte, bei Quervernetzungsexperimenten mit Typ II Rezeptoren *in vivo* beobachtete Erhöhung des ligandeninduzierten Signals bei gleichzeitiger Transfektion mit dem Typ I Rezeptor kann vermutlich auf die Reduktion der Dimensionalität der Ligand-Rezeptor-Interaktion zurückgeführt werden. Dies bedeutet, dass der Ligand bei Bindung an den Typ I Rezeptor an der äußeren Zellmembran positioniert wird und wegen der somit vom drei- auf den zweidimensionalen Raum reduzierten Mobilität leichter Typ II Rezeptoren in den signalaktiven heterohexameren Komplex rekrutiert werden können (Schlessinger et al., 1995). Im Gegensatz zu den BMPs können Activine oder TGF- β s nur die Typ II Rezeptoren ActR-II, ActR-IIB oder T β R-II mit niedrig nanomolarer Bindungsaffinität in binäre Komplexe rekrutieren. Die Typ I Rezeptoren der TGF- β /Activin-Liganden besitzen keinerlei Bindungsaffinität

zu letzteren und können nur in Gegenwart der Typ II Rezeptoren in signalaktive, heterohexamere Komplexe rekrutiert werden. Für TGF- β s/Activine ergibt sich somit ein strikt sequentieller und zugleich kooperativer Bindungsmechanismus, in welchem zuerst der Typ II Rezeptor und anschließend der Typ I Rezeptor durch den Liganden rekrutiert werden. Der molekulare Hintergrund dieses Bindungsmechanismus konnte kürzlich mit der Kristallstruktur des ternären TGF- β 3•T β R-I•T β R-II-Komplexes aufgeklärt werden, die klar zeigt, dass weniger Kontakte zwischen T β R-I und TGF- β 3, sondern vielmehr Kontakte zwischen T β R-I und der N-terminalen Region von T β R-II zur Bindungsaffinität des erstgenannten beitragen (Groppe et al., 2008). Mit Blick auf den aus der Natur der Typ I und Typ II Rezeptoren hervorgehenden intrazellulären Aktivierungsmechanismus bleibt festzuhalten, dass dieser im TGF- β -/Activin- und BMP-System identisch ist, jedoch extrazellulär die durch die beiden Bindungsmodi gekennzeichnete Bildung der Ligand-Rezeptor-Komplexe unterschiedlichen Mechanismen unterliegt. Aus dieser Kohärenz zwischen der Richtung des intrazellulär generierten Phosphorylierungssignals und der Art der extrazellulären Komplexbildung könnten sich abweichende Signaleigenschaften zwischen dem TGF- β /Activin- und BMP-System, beispielsweise hinsichtlich der durch die Stabilität des signalaktiven Komplexes vorgegebenen Geschwindigkeit der intrazellulären Phosphorylierungsreaktion, ergeben. Neben der ligandeninduzierten Bildung des Komplexes besitzen sowohl Rezeptoren des BMP-Systems (Gilboa et al., 2000) als auch des TGF- β -Systems (Gilboa et al., 1998) die Fähigkeit zur Homo- bzw. Heterooligomerisierung. Gilboa et al. (Gilboa et al., 2000) demonstrierten, dass im BMP-System sowohl homodimere BMP Typ I und Typ II Rezeptoren, als auch heterodimere Anordnungen beider Rezeptortypen in der Zellmembran existieren („preformed complexes“). Dies wirft die Frage auf, welche Regionen in den Rezeptoren zur Oligomerisierung beitragen, wenn zumindest im BMP-System im extrazellulären Teil keine Rezeptor-Rezeptor-Kontakte möglich sind. Womöglich trägt der zytoplasmische Teil, speziell die Kinase- und C-terminal angrenzende Region, zur Bildung heterodimerer Rezeptoranordnungen bei, wie Experimente mit trunkierten Typ II Rezeptorvarianten andeuten (Nohe et al., 2002). Je nach Oligomerisierungsmechanismus werden entweder Smad-Signalwege (vorgebildete Komplexe) oder MAPK-Signalwege (ligandeninduzierte Komplexe) initiiert (Nohe et al., 2002). Es ist verlockend zu spekulieren, ob im Falle vorgebildeter Komplexe Liganden aufgrund von Aviditätseffekten effizienter gebunden werden und infolgedessen eine schnellere intrazelluläre Aktivierung erfolgen kann, woraus sich unterschiedliche Aktivierungszeiten für Signale aus vorgebildeten und ligandeninduzierten Komplexen ergeben würden. Ob und in welcher Form ähnlich wie im EPO-System (Livnah et al., 1999) oder EGF-System (Moriki et al., 2001) bei Bindung des Liganden an den vorgebildeten Rezeptorkomplex konformationelle Änderungen in der Rezeptoranordnung zur Auslösung der intrazellulären Phosphorylierungskaskade führen, ist bisher nicht bekannt.

In diesem Zusammenhang könnte die für einige Mitglieder der TGF- β -Superfamilie beobachtete strukturelle Plastizität eine Rolle spielen. Für Activin A und TGF- β 3 wurden in verschiedenen Kristallstrukturen unterschiedliche Winkel zwischen den jeweiligen Monomeren, mit einer ungefähr durch die intermolekulare Disulfidbrücke repräsentierten Rotationsachse, beobachtet, weshalb allosterische Bindungsmechanismen vorgeschlagen wurden (Greenwald et al., 2003; Harrington et al., 2006; Hart et al., 2002; Thompson et al., 2003). Hinsichtlich der Struktur von BMP-7 kann die kompakte Konformation von Activin im Komplex mit ActR-IIB als „geschlossen“, die ausgedehnte Konformation von TGF- β 3 im Komplex mit T β R-II hingegen als „offen“ bezeichnet werden (Hart et al., 2002; Thompson et al., 2003). Gezwungenermaßen sollten die konformationellen Änderungen in

der Dimeranordnung zu unterschiedlichen Anordnungen bzw. Geometrien der Typ I und Typ II Rezeptoren und daraus resultierend variablen Signaleigenschaften führen. Mangels struktureller als auch funktioneller Analysen speziell von ternären Activin-Komplexen konnten derartige Annahmen bisher nicht experimentell bestätigt werden.

I.4. Bindungspromiskuität und -spezifität, Effektoren

Die Signaltransduktion der mehr als 30 Liganden der TGF-Superfamilie erfolgt über eine begrenzte Zahl von Rezeptoren. Wie Tabelle I-1 veranschaulicht, existiert gerade in der BMP-Familie, in geringerem Maße jedoch auch in der Activin- und TGF- β -Untergruppe, eine sehr hohe Bindungspromiskuität zwischen Liganden und Typ I sowie Typ II Rezeptoren. Dies bedeutet, dass ein Rezeptor mehrere Liganden binden, umgekehrt jedoch auch ein Ligand mehrere Rezeptoren zur Signalübermittlung rekrutieren kann. Die prominentesten BMP-Untergruppen umfassen BMP-2s (BMP-2, -4), BMP-5s (BMP-5, -6, -7, -8) und GDF-5s (GDF-5, -6, -7, BMP-9, -10), deren Liganden mindestens einen der Typ I Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-I oder TSR-I sowie die Typ II Rezeptoren BMPR-II, ActR-II oder ActR-IIB zur Signalübermittlung rekrutieren (Mazerbourg and Hsueh, 2006). Aus den in Tabelle I-1 angegebenen Kombinationen der Liganden und Typ I Rezeptoren ergeben sich mit Bezug auf die BMP-Liganden mindestens 44 Möglichkeiten für BMP-Ligand-Typ I Rezeptor-Komplexe, welche sich bei Berücksichtigung heterodimerer Liganden und verschiedener Typ II Rezeptoren entsprechend multiplizieren. Für einige Liganden wie BMP-2, BMP-6, BMP-7 und GDF-5 sind die physiologisch relevanten Typ I Rezeptoren seit längerem bekannt (Ebisawa et al., 1999; Koenig et al., 1994; Nishitoh et al., 1996; ten Dijke et al., 1994b). So fungieren BMPR-IA und BMPR-IB als Rezeptoren für BMP-2, BMP-6, BMP-7 und GDF-5, während ActR-I spezifisch durch BMP-6 und BMP-7 gebunden wird. Für andere Liganden wie BMP-9 oder BMP-10 ergaben sich hinsichtlich der Rezeptorrekrutierung in jüngster Vergangenheit neue Erkenntnisse (Brown et al., 2005; David et al., 2007; Scharpfenecker et al., 2007). So konnte TSR-I, der eine wichtige Rolle bei der Blutgefäßentwicklung spielt und bei der hereditären hämorrhagischen Teleangiectasie mutiert ist, aber lange als „verwaister“ Rezeptor galt, in Endothelzellen als Rezeptor für BMP-9 und BMP-10 identifiziert werden. In anderen Zellen erfolgt die Signalgebung von BMP-9 hingegen ähnlich wie von BMP-6 und BMP-7 auch über ActR-I (Scharpfenecker et al., 2007), von BMP-10 auch über BMPR-IA oder BMPR-IB (Mazerbourg and Hsueh, 2006), was exemplarisch verdeutlicht, dass dem zellulären Kontext eine bedeutende Rolle bei der Erklärung der Bindungspromiskuität zukommt. Activine und Nodal binden ActR-IB und ActR-IC, während TGF- β s vorwiegend über T β R-I signalisieren. Funktionelle Studien deuten an, dass zusätzlich Heterodimere aus TSR-I und T β R-I in Komplexe mit TGF- β und homodimerem T β R-II rekrutiert werden können (Goumans et al., 2003). In Endothelzellen vermitteln die Komplexe mit TSR-I eine den „reinen“ TGF- β •T β R-I•T β R-II-Komplexen entgegengesetzte zelluläre Antwort, sodass die Balance zwischen TSR-I- und T β R-I-Signaltransduktion das Schicksal der Endothelzellen bestimmt (Goumans et al., 2003; Oh et al., 2000). Interessante Fragen stellen sich angesichts der hohen Sequenzhomologien in den „wrist“-Epitopen der Liganden der einzelnen Untergruppen mit Blick auf die Aktivierung unterschiedlicher Rezeptorsubtypen über die Architektur und das Design der beteiligten Proteine, das eine derart ausgeprägte Bindungspromiskuität und -spezifität erlaubt.

Hinsichtlich der Typ II Rezeptoren findet sich mit ActR-II und ActR-IIB bei Activinen und T β R-II bei TGF- β s eine weniger ausgeprägte Vielfalt. ActR-II und ActR-IIB nehmen insofern eine

herausragende Rolle ein, als diese sowohl von BMP- als auch Activin-Liganden verwendet werden. Diese „Universalität“ von ActR-II und ActR-IIB führte zu einer umfassenden strukturellen und funktionellen Charakterisierung beider Rezeptoren, auf deren Basis beispielsweise die im Vergleich zu BMP-Liganden 50-100fach höhere Bindungsaffinität gegenüber Activinen erklärt werden konnte (Weber et al., 2007). Abseits der durch ein hydrophobes Schlüssel-Schloss-Motiv definierten Bindungsdeterminanten im Zentrum der Ligand-Typ II Rezeptor-Interaktionsfläche konnte dabei eine „stillgelegte“ Wasserstoffbrücke identifiziert werden. Letztere ist durch auf der Ligandenoberfläche kodierte Aminosäureidentitäten aktivierbar und kann in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung vergleichsweise stark zur Bindungsaffinität beitragen. Während in Activin die Voraussetzungen zur Aktivierung dieser Wasserstoffbrücke gegeben sind, besitzt BMP-2 diese natürlicherweise nicht; durch Mutation zweier Reste L100K und N102D lassen sich jedoch die Bindungseigenschaften von Activin auf BMP-2 übertragen (Weber et al., 2007). Dementsprechend finden sich auch auf der Rezeptorseite Aminosäurereste, welche beispielsweise wie Lys37 von ActR-IIB die Spezifität zu verschiedenen BMP-Liganden (BMP-2, BMP-7) bewirken (Weber et al., 2007).

Untergruppe / Ligand ^a	Typ I Rezeptor (1)	Typ II Rezeptor (2)	Bindungsaffinität zum Typ I / Typ II Rezeptor ^b
BMPs			
BMP-2s	BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-I, (TSR-I) ^c	BMPR-II, ActR-II,	(1) +++, +++, - / (2) ++, ++, ++
BMP-5s		ActR-IIB	(1) ++, +++, + / (2) ++, +++, +
GDF-5s			(1) ++, +++, - / (2) ++, ++, +
Activine ^d	ActR-IB, ActR-IC	BMPR-II, ActR-II, ActR-IIB	(1) - / (2) ++, +++, +
TGF-βs	TβR-I, (TSR-I) ^e	TβR-II	(1) - / (2) +
MIS (AMH)	BMPR-IB, ActR-I	AMHR-II	keine Daten

^a GDNF wurde wegen des abweichenden Rezeptortyps nicht in die Aufzählung aufgenommen.

^b Auf einer Skala von 1-10nM (+++), 10-50nM (++) , 50-250nM (+) zu >250nM (-) Bindung an immobilisierte extrazelluläre Domänen der in den beiden mittleren Spalten angegebenen Typ I (1) und Typ II (2) Rezeptoren in der angegebenen Reihenfolge. Die Werte orientieren sich an publizierten (Allendorph et al., 2007; De Crescenzo et al., 2001; Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000a) und unveröffentlichten (J. Nickel, persönliche Mitteilung) Daten aus Biacore- (SPR-) Experimenten.

^c Die Rekrutierung von TSR-I wurde bisher für BMP-6 (Ebisawa et al., 1999), BMP-9 (Scharpfenecker et al., 2007) und BMP-10 (David et al., 2007) auf Basis von Quervernetzungsexperimenten *in vivo* und für BMP-9 zusätzlich *in vitro* (Brown et al., 2005) gezeigt.

^d Einschließlich Nodal.

^e In Endothelzellen *in vivo* gezeigt, jedoch keine Bindungsdaten *in vitro* (Oh et al., 2000). Die Bindung erfolgt vermutlich kooperativ in einen TGF-β3•TβR-I-Komplex (Goumans et al., 2003). Auch der dem TSR-I ähnlichste Rezeptor ActR-I kann vielleicht durch TGF-β3 gebunden werden.

Tabelle I-1: Rezeptorrekrutierung durch Liganden der TGF-β-Superfamilie.

Nicht nur Bindungsmechanismen, sondern auch in den extrazellulären Raum sekretierten Effektormolekülen kommt eine wichtige Funktion in der Modulation der BMP-induzierten Signale zu. Modulatorproteine regulieren im negativen und positiven Sinne Funktionen der BMPs und existieren entweder als membranständige Korezeptoren oder sekretierte Modulatorproteine (Balemans and Van Hul, 2002; Canalis et al., 2003; Gumienny and Padgett, 2002; Halbrooks et al., 2007). Antagonistisch wirkende Moleküle wie Noggin, Follistatin und DAN/Cerberus – ähnlich wie Liganden und Rezeptoren der TGF-β-Superfamilie über einen partiell konservierten Cystinknoten miteinander verwandt (Groppe et al., 2002) – binden BMP-Liganden *in vitro* mit niedrig

nanomolarer Bindungsaffinität. Durch die kooperative Besetzung von Typ I und Typ II Rezeptorbindeepitopen können diese Modulatorproteine effektiv mit den nativen Rezeptoren kompetitieren, wie die Kristallstrukturen des BMP-7•Noggin-Komplexes (Groppe et al., 2002), des ActA•Follistatin-Komplexes (Thompson et al., 2005) und des BMP-2•VWC1-Crossveinless-2-Komplexes (Zhang et al., 2008) eindrücklich belegen. Ähnliche Effekte werden durch membranständige Pseudorezeptoren ohne funktionierende Kinasedomäne wie BAMBI (engl. BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor) (Onichtchouk et al., 1999) oder GPI-(Glycosylphosphatidylinositol-) verankerte Proteoglycane wie Cripto, Endoglin und Betaglycan vermittelt (Gumienny and Padgett, 2002). Je nach adressierter Ligand-Untergruppe, beispielsweise TGF- β s und BMPs oder Activine und Nodal, können inhibitorische oder aktivierende Effekte auftreten, wodurch Signalwege beider Liganden einander gegenseitig beeinflussen (engl. „cross-talk“) (Gray et al., 2003; Scherner et al., 2007). Betaglycan trägt als Typ III Rezeptor der TGF- β s wesentlich zur Bildung von funktionalen TGF- β 2•T β R-II-Komplexen bei (Lin et al., 1995; Lopez-Casillas et al., 1994), was der Bedeutung von Cripto bei der Signalgebung durch Nodal gleichkommt (Whitman, 2001). Gleiches könnte für die Funktion von Endoglin, aber auch selektiv wirkenden membranständigen Effektoren wie die kürzlich entdeckten, nach ihrer Bedeutung in der Neuronalentwicklung benannten RGM-Proteine (engl. Repulsive Guidance Molecule) (Monnier et al., 2002; Samad et al., 2004) im BMP-System gelten. Letztere verstärken durch hochaffine Interaktion mit den BMP Typ I Rezeptoren ActR-I, BMPR-IA und BMPR-IB als auch den BMP-Liganden BMP-2 und BMP-4 deren Signalintensität *in vivo* (Halbrooks et al., 2007; Samad et al., 2005). Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch die promiske Bindung von Typ II Rezeptoren wie BMPR-II und ActR-II gefördert wird (Xia et al., 2007). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch RGM-Proteine spezifisch wirken, indem nur die Funktionen von Mitgliedern der BMP-2-Untergruppe (BMP-2, BMP-4) sowie der GDF-5-Untergruppe (GDF-7), nicht aber der BMP-5-Untergruppe (BMP-7) beeinflusst werden (Halbrooks et al., 2007; Samad et al., 2005). Auffällig ist ferner, dass einige dieser Modulatorproteine membranverankert sein müssen, um aktivierende Effekte auf die Signalübermittlung zu haben. Wie die Beispiele Betaglycan und RGMs demonstrieren, verwandelt das Abspalten des GPI-Ankers durch extrazelluläre Phospholipasen oder Proteasen (engl. „Shedding“) diese dann sekretierten Modulatorproteine in Antagonisten der ligandeninduzierten Signalgebung (Halbrooks et al., 2007; Lopez-Casillas et al., 1994; Samad et al., 2005) – ein Effekt, der auch für das „Shedding“ von BMPR-IB berichtet wurde (Singhatanadgit et al., 2006) und vermutlich mit einer der Funktionen der Modulatorproteine, die Liganden an der Membranoberfläche zu konzentrieren und den Rezeptoren zu präsentieren, zu tun hat.

I.5. Spezifische Interaktion von GDF-5 und BMPR-IB

Die in den vorangehenden Abschnitten geschilderte einerseits spezifische und andererseits hoch promiske Wechselwirkung zwischen Liganden und Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie ist deren Markenzeichen. Zwei prototypische Mitglieder der BMP-Familie, BMP-2 und GDF-5, zeichnen sich durch divergierende Bindungseigenschaften gegenüber den hochaffin bindenden Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB aus. Während BMP-2 beide Rezeptoren ähnlich gut bindet und nur geringe Unterschiede in der Komplexstabilität bestehen (siehe I.4.), weist GDF-5 eine Präferenz für BMPR-IB auf, die sich als ~15-20fach höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu BMPR-IA äußert (Tabelle I-2). Frühe zellbasierende Experimente ließen vermuten, dass BMPR-IB auch der physiologisch

relevante Typ I Rezeptor für GDF-5 ist und BMPR-IA nur in Gegenwart von ActR-II rekrutiert werden kann (Nishitoh et al., 1996). Neuere Daten weisen allerdings darauf hin, dass GDF-5 abhängig vom zellulären Kontext auch über BMPR-IA signalisiert, selbst wenn gleichzeitig BMPR-IB vorliegt (Upton et al., 2008). Konkurrenzexperimente mit einem neutralisierenden, spezifischen BMPR-IA-Antikörper in chondrogenen ATDC5-Zellen deuten ebenfalls in diese Richtung (J. Nickel, persönliche Mitteilung). Nichtsdestoweniger sind prinzipiell angesichts der nanomolaren Bindungsaffinität und Wirkung potentieller Modulatorproteine alle vier Ligand-Rezeptor-Kombinationen nicht nur möglich, sondern – unter Berücksichtigung zeitlicher und räumlicher Expressionsmuster – auch physiologisch bei der Regulation der Differenzierung verschiedener Zelltypen relevant. Die Expression von BMP-2 und GDF-5 in sich entwickelnden Mausgliedmaßen ist räumlich beschränkt: BMP-2 wurde in der apikal ektodermalen Randleiste (AER), aus der sich die Knospen für die Gliedmaßen entwickeln, und in mesenchymalen Kondensationen, aus denen Knorpelzellen hervorgehen, detektiert (Lyons et al., 1989; Lyons et al., 1990). Das Expressionsmuster von GDF-5 in Mäuseembryos umfasst in frühen Wachstumsstadien die Handplatte und davon ausgehende Fingerstrahlen (engl. digital rays) und später vor allem die Gelenke bzw. Räume zwischen den sich entwickelnden Segmenten der äußeren Gliedmaßen (Storm and Kingsley, 1996).

Bindungsaffinitäten [nM]	BMP-2	GDF-5
BMPR-IA	1,4	24
BMPR-IB	2,4	0,8

Tabelle I-2: Spezifische Bindungseigenschaften von BMP-2 und GDF-5 (Nickel et al., 2005).

Abhängig vom zellulären Kontext scheinen BMP-2 und GDF-5 die beiden Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB unterschiedlich zur Signalübermittlung während der Entwicklung der Gliedmaßen zu rekrutieren. Beiden Rezeptoren wurden abweichende Funktionen bei der Differenzierung von Mesenchymzellen in Chondrozyten zugeschrieben (Zou et al., 1997). BMPR-IB kann in den frühen Kondensationen mesenchymaler Zellen detektiert werden und wird stark in den Fingerstrahlen exprimiert. Zudem wird BMPR-IB die Eigenschaft zugeschrieben, apoptotische Signale zu übermitteln. Die Reifung hypertropher Chondrozyten, die mit einer Abnahme der BMPR-IB-Expression in späteren Stadien der Chondrogenese einhergeht, wird jedoch durch BMPR-IA vermittelt. Die Expression von BMPR-IA in den Knorpel-elementen und dem umgebenden Perichondrium überlagert sich mit der Expression von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 (Chang et al., 1994), während die Expressionsmuster von GDF-5 je nach Differenzierungsstatus mit denen von BMPR-IA und BMPR-IB korrelieren.

Studien an Knockout-Mäusen offenbarten ähnliche Phänotypen bei Deaktivierung von *gdf5* und *bmpr1b*, was auf gemeinsame, ergänzende Funktionen bei der Verknorpelung und eine spezifische Wechselwirkung hinweist (Baur et al., 2000). Weil beide Moleküle nicht gleichzeitig in allen Entwicklungsschritten nachweisbar sind, wurde geschlossen, dass GDF-5 zwar überwiegend BMPR-IB zur Induktion der Chondrogenese und späteren Fingersegmentierung, andere Typ I Rezeptoren wie BMPR-IA jedoch zur Regulation der Segmentlänge benötigt werden. In Analogie dazu können beispielsweise apoptotische Signale von BMPR-IB auch durch andere Liganden wie BMP-2 induziert werden (Baur et al., 2000). Die fehlende Expression von GDF-5 in Knockout-Mäusen führt zu einer Verkürzung der langen Knochen der Gliedmaßen, einer anormalen Entwicklung der Gelenke in den Gliedmaßen sowie fehlenden, wahrscheinlich fusionierten Segmenten in den Fingern zwei bis fünf („Brachypodismus“), hatte jedoch keinen Einfluss auf die

Entwicklung des axialen Skeletts (Storm et al., 1994; Storm and Kingsley, 1996). Dass nicht alle Gliedmaßen gleich stark von der GDF-5-Nullmutation betroffen sind, wurde auf das Vorhandensein homologer, die GDF-5-Funktion übernehmende Wachstumsfaktoren wie GDF-6 und GDF-7 zurückgeführt. Bei Mäusen mit Deletionen am BMPR-IB-Gen sind Veränderungen ebenfalls auf die äußeren Gliedmaßen beschränkt. Der Phänotyp ist vor allem durch Abnormalitäten an den Extremitäten und deren Gelenken charakterisiert (Brachydactylie), die mit einer reduzierten Proliferationsrate prächondrogener Zellen und Störungen der Differenzierung von Chondrozyten korrelieren (Yi et al., 2000). Sowohl für GDF-5 als auch BMPR-IB sind einige Mutationen bekannt, deren Erscheinungsbild *in vivo* je nach Homo- oder Heterozygotität der genetischen Veränderungen den oben beschriebenen Nullmutationen ähnelt. Im reifen, signalaktiven Teil von GDF-5 konzentrieren sich die Mutationen in der pre-Helix-Schleife sowie den beiden Fingern – also den Rezeptorbindestellen (siehe Abbildung IV-46, S. 134). Während Mutationen von und zu Cysteinen wahrscheinlich die Bildung des Cystinknotens und damit Faltung von GDF-5 beeinträchtigen und deshalb die Sekretion von GDF-5 behindern (Everman et al., 2002; Thomas et al., 1997), sollten Mutationen an anderen Resten die Bindungseigenschaften zu den beiden Rezeptortypen beeinflussen. In den letzten Jahren wurden mit P55T (Douzgou et al., 2008), R57L (Seemann et al., 2005), L60P (Seemann et al., 2005), S94N (Akarsu, 1999), E110K (Wang et al., 2006), sowie einem Cluster aus Δ Leu56, S58T und H59L (Abbildung I-3, S. 18) (Szczałuba et al., 2005) mehrere krankheitsverursachende, unabhängig voneinander auftretende Missense-Mutationen im reifen Teil von GDF-5 beschrieben, die entweder aktivierender (R57L, S94N, E110K) oder inaktivierender (P55T, L60P, Δ Leu56+S58T+H59L) Art sind.

Ein interessantes Beispiel, wie die molekulare Funktion mit der physiologischen Folge korrelieren kann, zeigt sich an zwei kürzlich beschriebenen, im Menschen vorkommenden Mutationen in GDF-5 (R57L, L60P; (Seemann et al., 2005)) Beide Mutationen sind in der pre-Helix-Schleife lokalisiert. Während die Expression der GDF-5-R57L-Variante zu einem Funktionsgewinn führt, ist bei der GDF-5-L60P-Variante ein Funktionsverlust zu verzeichnen – und damit einhergehend zwei in ihrem Phänotyp mild ausgeprägte Krankheitsbilder, welche als Symphalangismus Typ I (SYMS1, R57L) bzw. Brachydactylie A2 (BDA2, L60P) charakterisierbar sind. Interessanterweise ist der jeweilige Phänotyp ausschließlich auf die Hände, speziell die Morphogenese der Finger, beschränkt, ohne dass andere Veränderungen des Skeletts oder neuronale Defekte auftreten. Korrelierend mit den oben genannten Knockout-Phänotypen ist in Personen mit SYMS1 das Gelenk zwischen den proximalen Segmenten des kleinen Fingers fusioniert und ein anormales Gelenk im Ringfinger entstanden. In Patienten mit Brachydactylie sind ein kurzer Zeigefinger, ein verbogener, hypoplastischer kleiner Finger sowie das Fehlen des mittleren Fingerglieds im Zeigefinger festzustellen (Abbildung I-3, S. 18). Experimente mit rekombinant hergestelltem Protein zeigen, dass die Fähigkeit beider GDF-5-Varianten, BMPR-IA und BMPR-IB zu binden, gemäß dem Krankheitsbefund verändert ist (Seemann et al., 2005). Die GDF-5-L60P-Variante weist in Bindungsanalysen eine 22fach niedrigere Bindungsaffinität zu BMPR-IB und einen Verlust derselben zu BMPR-IA auf. GDF-5 L60P kann die Produktion extrazellulärer Matrix in Mikromasse-Kulturen aus Hühnereiern nicht induzieren. Auch die Produktion von Alkalischer Phosphatase (ALP) in Zellassays ist mit GDF-5-L60P nicht stimulierbar. Im Kontrast dazu ist die biologische Aktivität der GDF-5-R57L-Variante stark erhöht. Dies korreliert mit einer 2,5fach höheren Bindungsaffinität zu BMPR-IA, während die Bindungseigenschaften zu BMPR-IB nahezu unverändert blieben. Die Autoren schlussfolgern, dass durch die Mutation L60P in GDF-5 die beiden Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB nicht

mehr in einen funktionsfähigen heteromeren Komplex rekrutiert werden können. Die mangelnde Signaltransduktion führt dann zu einer Beeinträchtigung der Chondrozyten-Differenzierung und des Knorpelwachstums und so zu einer Verkürzung der Fingersegmente. Im Kontrast dazu können durch den Verlust der Bindungsspezifität sowohl BMPR-IA als auch BMPR-IB mit ähnlichen Bindungsaffinitäten von GDF-5-R57L in heteromere Komplexe rekrutiert werden. Die resultierende erhöhte Signalaktivität von GDF-5-R57L könnte eine zusätzliche Rekrutierung von Chondrozyten in den Raum zwischen den Fingersegmenten (Interzone) und deren Verknöcherung bedeuten. Alternativ sind wegen der möglichen Konkurrenz von GDF-5-R57L und BMP-2 um freien BMPR-IA eine Deregulierung der Chondrozytenproliferation in der Epiphysenfuge und eine Inhibition apoptotischer Prozesse in Betracht zu ziehen. Beide Vorgänge könnten zu einem ungebremsten Wachstum des Fingersegments, und letztlich zu einer „Fusion“ des putativen Gelenks führen.

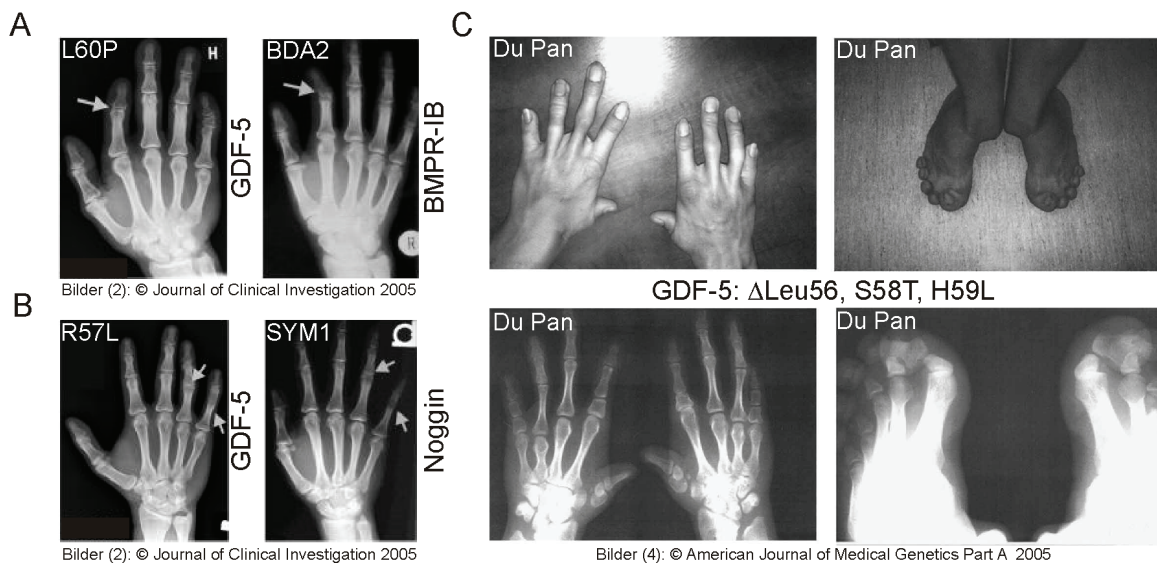


Abbildung I-3: Phänotypen bei Mutationen in GDF-5. **A:** Journal of Clinical Investigation by Seemann, P. et al. Copyright 2005 by American Society for Clinical Investigation. Reproduced with permission of American Society for Clinical Investigation in the format Dissertation via Copyright Clearance Center. Das Krankheitsbild der GDF-5-L60P-Mutation (Seemann et al., 2005) ähnelt dem der Brachydactylie vom Typ A2 (BDA2), das durch heterozygot auftretende Mutationen in der Kinasedomäne von BMPR-IB verursacht wird (Lehmann et al., 2003). **B:** Journal of Clinical Investigation by Seemann, P. et al. Copyright 2005 by American Society for Clinical Investigation. Reproduced with permission of American Society for Clinical Investigation in the format Dissertation via Copyright Clearance Center. Das Krankheitsbild der GDF-5-R57L-Variante (Seemann et al., 2005) ähnelt dem Symphalangismus vom Typ 1 (SYM1), der durch heterozygot auftretende Noggin-Mutationen hervorgerufen wird (Gong et al., 1999). **C:** Wiedergabe nach Szczaluba et al. (Szczaluba et al., 2005) mit Genehmigung von Wiley Interscience. Schwerere Missbildungen der Hände und Füße korrelieren mit drei Mutationen auf einem *gdf5*-Allel. Trotz der Heterozygotität des Defektes ist das als DuPan-Syndrom charakterisierte Krankheitsbild stark ausgeprägt, was auf einen dominant negativen Effekt dieser Mutationen spekulieren lässt (Szczaluba et al., 2005).

Die Häufung der krankheitsverursachenden Mutationen in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 unterstreicht die Bedeutung dieses Strukturelements bei der Bindung und Erkennung der beiden Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB. Unabhängig von den Untersuchungen der GDF-5-R57L- und GDF-5-L60P-Varianten durch Seemann et al. (Seemann et al., 2005) wurde von Nickel et al. (Nickel et al., 2005) basierend auf funktionellen Studien an einem Modell des GDF-5•BMPR-IA-Komplexes gezeigt, dass Arg57 von GDF-5 die Bindungsspezifität zum Typ I Rezeptor bestimmt. Bei Alaninmutation dieses Restes erhöht sich die Bindungsaffinität zu BMPR-IA um das 18fache von 24nM auf 1,3nM – was der Bindungsaffinität zu BMPR-IB (1,4nM) entspricht. Obwohl BMP-2 und

GDF-5 trotz ihrer Einordnung in unterschiedliche BMP-Untergruppen strukturell hoch homolog und die Aminosäuren in deren „wrist“-Epitopen hoch konserviert sind, können umgekehrt bei Mutation von Ala52 in BMP-2 zu Arginin (Arg57 in GDF-5) nicht die von GDF-5 bekannten spezifischen Rezeptorbindungseigenschaften in BMP-2 eingeführt werden. Die BMP-2-A52R-Variante zeigt sowohl gegenüber BMPR-IA als auch BMPR-IB eine niedrigere Bindungsaffinität (21nM bzw. 14nM). Auch der Versuch, alle Reste in der pre-Helix-Schleife von BMP-2 gegen solche von GDF-5 auszutauschen, war nicht erfolgreich, sodass weitere, bisher unbekannte Mechanismen zur spezifischen Erkennung von BMPR-IB durch GDF-5 beitragen müssen.

Aus Mangel an strukturellen Informationen über GDF-5•BMPR-IA- oder GDF-5•BMPR-IB-Komplexe konnten die eingangs beschriebenen funktionellen Daten bisher nicht mit molekularen Bindungsmechanismen korreliert werden. Diese Arbeit stellt mit der Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes und der NMR-Struktur des freien, ungebundenen BMPR-IA zwei Strukturen zur Verfügung, die weitere Einblicke in die molekularen Grundlagen promisker als auch spezifischer Wechselwirkungen zwischen Liganden der BMP-Familie und deren Typ I Rezeptoren erlauben und die eine Hilfestellung bieten, um biologische Effekte natürlicher Mutationen in GDF-5 als auch in den Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB mit strukturellen Informationen abgleichen zu können.

II. Zielstellung der Arbeit

Knochenwachstumsfaktoren (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) können basierend auf strukturellen Eigenschaften der TGF- β -Superfamilie multifunktionaler, in den extrazellulären Raum sekretierter Zytokine zugeordnet werden. Zur Übermittlung von Signalen in das Zellinnere werden membranständige Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren der Typen I und II in heterohexamere Komplexe rekrutiert, wodurch eine intrazelluläre Phosphorylierungskaskade ausgelöst wird. Die Rekrutierung der Rezeptoren erfolgt in einer teils spezifischen, teils promisken Art und Weise, weil etwa 30 Liganden nur sieben Typ I und fünf Typ II Rezeptoren gegenüberstehen. Die einzelnen Liganden und Rezeptoren zeichnen sich durch individuelle Bindungscharakteristika und Wirkungsschemata aus. Je nach Zusammensetzung des Komplexes können unterschiedliche intrazelluläre Signalwege und folglich verschiedene zelluläre Prozesse adressiert werden. Daneben wird die Signalgebung durch Effektoren sowohl intra- als auch extrazellulär strikt reguliert.

Angesichts der Vielzahl an BMP-Liganden, deren Signaltransduktion durch eine vergleichsweise geringe Anzahl an Typ I und Typ II Rezeptorsubtypen erfolgt, stellt sich die Frage, worauf die jeweiligen – promisken oder spezifischen – Bindungseigenschaften zwischen Liganden und Rezeptoren beruhen, und mehr noch, wie und ob eine spezifische biologische Funktion mit der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes korreliert. Bisher wurde die biologische Funktion oft allein mit der Bindungsaffinität zwischen zwei Molekülen oder dem zellulären Kontext erklärt. Neuere Untersuchungen, beispielsweise an Zytokinen wie dem menschlichen Wachstumsfaktor (hGH), Erythropoietin (EPO), Gewebewachstumsfaktoren (TGF- β s) und Knochenwachstumsfaktoren (BMPs), zeigen jedoch, dass zusätzlich beispielsweise Konformationsänderungen im Ligand oder Rezeptor bei Bindung, die Orientierung von Ligand und Rezeptor zueinander im Komplex oder kinetische Parameter der Ligand-Rezeptor-Interaktion von großer Bedeutung für die Signaltransduktion sind. Nur unter Einbeziehung der letztgenannten Merkmale lässt sich erklären, wie die Vielzahl der BMP-Liganden, der begrenzte Satz an Rezeptoren und die vielfältigen, von BMPs gesteuerten biologischen Funktionen zusammenhängen und ein funktionierendes Signalnetzwerk entsteht.

Die TGF- β -Superfamilie einschließlich der BMP-Unterfamilien ist ein herausragendes Beispiel, wie gleichzeitig promiske und spezifische Ligand-Rezeptor-Interaktionen bei strukturell hoch homologen Liganden und Rezeptoren erreicht werden können. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war deshalb, die der Ligand-Rezeptor-Erkennung im BMP-System zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu studieren. Die beiden eng verwandten BMP-Liganden BMP-2 und GDF-5 binden mit hoher Affinität an zwei BMP Typ I Rezeptoren, BMPR-IA und BMPR-IB. Dennoch gibt es Unterschiede in der zellulären Signalgebung, die mit den Bindungseigenschaften der beiden Liganden gegenüber den Rezeptoren korrelieren. BMPR-IA wird durch GDF-5 mit 15-20fach niedrigerer Bindungsaffinität als BMPR-IB gebunden. Im Kontrast dazu kann BMP-2 beide Rezeptoren mit sehr ähnlichen Bindungscharakteristika rekrutieren. Die funktionelle und strukturelle Analyse von Komplexen aus GDF-5 bzw. BMP-2 und BMPR-IA bzw. BMPR-IB sollte deshalb neue Hinweise auf die strukturellen Merkmale ergeben, die den unterschiedlichen Bindungseigenschaften von GDF-5 und BMP-2 zugrundeliegen.

III. Material und Methoden

III.1. Abkürzungsverzeichnis

ActR-IB	Activin Typ IB Rezeptor	HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ActR-II	Activin Typ II Rezeptor	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ActR-IIB	Activin Typ IIB Rezeptor	Kan	Kanamycin
Amp	Ampicillin	K_D	Dissoziationskonstante
amu	Atomare Masseneinheiten	k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeit
APS	Ammoniumperoxodisulfat	k_{off}	Dissoziationsgeschwindigkeit
β -ME	β -Mercaptoethanol	L	Liter
bp	Basenpaar	LB	Luria Broth
BMP	Bone morphogenetic protein	MeOH	Methanol
BMPR-IA	BMP Typ IA Rezeptor	M_w	Molekulargewicht
BMPR-IB	BMP Typ IB Rezeptor	OD	Optische Dichte
BMPR-II	BMP Typ II Rezeptor	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
BSA	Rinderserumalbumin	PCR	Polymerasekettenreaktion
Cam	Chloramphenicol	r.m.s.d.	Quadratwurzel der mittleren Abweichungen
Da	Dalton	rpm	Rotationen pro Minute
ddH ₂ O	Doppelt entionisiertes Wasser	RT	Raumtemperatur
DMSO	Dimethylsulfoxid	RU	Resonanzeinheit
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
cDNA	Kodierende DNA	SV	Säulenvolumen
DsbA	Disulfide bond isomerase A	TB	Terrific Broth
DTT	Dithiothreitol	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>E.coli</i>	Escherichia Coli	Tet	Tetracyclin
ec	extrazellulär	TFA	Trifluoressigsäure
ECD	Extrazelluläre Domäne	TGF- β	Transforming growth factor β
EDTA	Ethylendiamintetraazetat	T β R-I	TGF- β Typ I Rezeptor
EtOH	Ethanol	T β R-II	TGF- β Typ II Rezeptor
FPLC	Proteinflüssigchromatographie	Trx	Thioredoxin
GDF	Growth and differentiation factor	ÜN	über Nacht
GSH	Glutathion, reduziert	ÜNK	Übernachtkultur
GSSG	Glutathion, oxidiert	wt	wildtypisch
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid		

Aminosäuren werden entsprechend den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur abgekürzt (1984). Varianten von wildtypischen Proteinen werden im Ein-Buchstaben-Code benannt, z.B. bedeutet R57L, dass die Aminosäure Arginin an Position 57 durch Leucin ersetzt ist. Ein entsprechend mutiertes GDF-5 heißt dann GDF-5-R57L. Die biologische Herkunft der Proteine wird durch dem Proteinnamen vorangesetzte Buchstaben gekennzeichnet, wobei „h“ für „menschlich“ und „m“ für „Maus“ steht. Gene werden kursiv und klein geschrieben (z.B. *gdf5*). Die Partnermoleküle in Protein-Protein-Komplexen werden durch einen dicken Punkt „•“ getrennt.

III.2. Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen in höchster Reinheitsstufe bezogen: Acros, Biorad, Calbiochem, CK Gas Products, Fermentas, Fluka, General Electric (vorher Amersham, vorher Pharmacia), Gibco-BRL, Merck, New England Biolabs (NEB), Pierce, Roth, Sigma-Aldrich.

III.3. Kits

DNA-Minipräparationen: Nucleobond PC20 Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel)

DNA-Midipräparationen: Nucleobond PC100 (Macherey-Nagel)

Extraktion von DNA aus Agarosegelen und Reinigung von PCR-Produkten: Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel)

III.4. Bakterienstämme

- *E.coli* AD494 (DE3) (Novagen)

Genotyp: $\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII phoR \Delta malF3 F'[lac^+(lacI^q) pro] trxB::kan$ (DE3)

- *E.coli* OrigamiB (DE3) (Novagen)

Genotyp: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan$ (DE3)

- *E.coli* B834 (DE3) (Novagen)

Genotyp: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm met$ (DE3)

- *E.coli* BL21 (DE3) (Novagen)

Genotyp: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)

- *E.coli* Nova Blue (Novagen)

Genotyp: $endA1 hsdR17 (rK12- mK12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA+B+lacIqZ M15::Tn10]$ (TetR)

III.5. Vektoren

III. 5. 1. Vektoren für prokaryotische Expression

Bis auf pET32a handelt es sich um die Originalvektoren. Bei pET32a wurden die Basenpaare 223-297 im Originalvektor entfernt und somit die Thrombinschnittstelle unmittelbar vor das Zielgen

verschoben (Kirsch et al., 2000b). Die Bezeichnung der Vektoren mit dem Zielgen erfolgt anhand folgenden Schemas: Ursprungsvektor (z.B. pET32) plus Zielgen in Kurzschreibweise (z.B. A6 für Alk-6, BMPR-IB) ergibt die Bezeichnung (z.B. pET32A6).

Vektor	Selektion	Promoter/ Induktion	Fusions-Tags	PS	Zielprotein	Referenz
pET32a ¹⁾	Amp ₁₀₀	<i>T7lac</i> / IPTG	Trx-Tag, His-Tag, S-Tag	T E	BMPR-IA/IB ^{Cec} , BMPR-IBec, ActR-IIBec	(Kirsch et al., 2000b; Studier et al., 1990)
pET39b ¹⁾	Kan ₃₀	<i>T7lac</i> / IPTG	DsbA-Tag, His-Tag, S-Tag	T E	BMPR-IBec	(Missiakas et al., 1993)
RBSII _{N25} ^x /0 (pN25)	Amp ₁₀₀	<i>P_{N25}^x/0</i> / IPTG	-	-	GDF-5	(Stueber et al., 1984)
pG-KJE8 ²⁾	Cam ₅₀	<i>araB</i> / Arabinose <i>Pzt1</i> / Tet	-	-	DnaK-DnaJ-GrpE, GroES-GroEL	(Nishihara et al., 1998) (Nishihara et al., 2000)
pGro7 ²⁾	Cam ₅₀	<i>araB</i> / Arabinose	-	-	GroES-GroEL	(Nishihara et al., 1998)
pKJE7 ²⁾	Cam ₅₀	<i>araB</i> / Arabinose	-	-	DnaK-DnaJ-GrpE	(Nishihara et al., 1998)
pG-Tf2 ²⁾	Cam ₅₀	<i>Pzt1</i> / Tet	-	-	GroES-GroEL-Tig	(Nishihara et al., 2000)
pTf16 ²⁾	Cam ₅₀	<i>araB</i> / Arabinose	-	-	Tig	(Nishihara et al., 2000)

1) Hersteller: Novagen, 2) Hersteller: Takara Bioscience
 PS = Proteaseschnittstelle, T = Thrombin, E = Enterokinase
 Plasmidkarten für die Vektoren sind im Anhang zusammengestellt (ab S. 207).

Tabelle III-1: Verwendete Vektoren für Proteinexpression in *E.coli*.

III. 5. 2. Vektoren für eukaryotische Expression

Zur Analyse der *in vivo* Signaleigenschaften von BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-IA/IB^{Cec} wird die jeweilige cDNA inklusive der Signalsequenz über *Bam*HI- (N-terminal) und *Xba*I- (C-terminal) Schnittstellen in den Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen) kloniert. Die Konstrukte für BMPR-IA und BMPR-IB wurden von Prof. W. Sebald (Physiologische Chemie II), das Konstrukt für ActR-IB von K. Heinecke (Physiologische Chemie II) zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt für BMPR-IA/IB^{Cec} basiert auf dem pcDNA3.1-A6 und wird mit Hilfe einer zweistufigen PCR erzeugt, indem das extrazelluläre BMPR-IA/IB^{Cec}-Fragment mit Hilfe externer Primer in diesem Vektor eingebracht wird. Zusätzlich werden BMP Typ I Rezeptor-Activin Typ IB Rezeptor-Chimären erzeugt, in welchen die transmembrane und zytosolische Domäne dem ActR-IB, die extrazellulären Domänen den BMP Typ I Rezeptoren entstammen. Eine Analyse des BMPR-IA-Konstrukts mit dem Programm GCG (Accelrys) auf versteckte, einzigartige Schnittstellen für Restriktionsenzyme, welche durch stille Mutationen aktiviert werden können, führte zur Identifizierung von *Rsr*II. Dazu wird die in pcDNA3.1 ausserhalb der multiplen Klonierungsstelle vorhandene *Rsr*II-Schnittstelle bei bp4349 durch PCR inaktiviert und zwischen der cDNA der extrazellulären und der transmembranen

Domäne der BMPR-I-Konstrukte als auch des ActR-IB-Konstrukts eine neue *RsrII*-Schnittstelle eingeführt. Dies erfolgt ohne Veränderung der primären Proteinsequenz über stille Mutationen. Unter Verwendung der vorhandenen *BamHI*-, *XbaI*- und neu erschaffenen *RsrII*-Schnittstellen kann somit jede beliebige Chimäre – beispielsweise auch mit ActR-IB im extrazellulären Teil oder Kombinationen der BMP Typ I Rezeptoren (nicht gezeigt) – erzeugt werden. Dazu werden pcDNA3.1-A4rsrf (ActR-IB) und pcDNA3.1-A3rsrf (BMPR-IA) jeweils mit *RsrII* und *XbaI* geschnitten und das cDNA-Fragment der transmembranen und intrazellulären Domänen von ActR-IB und das Vektorrückgrat inklusive der extrazellulären Domäne von BMPR-IA isoliert und ligiert. Anschließend wird das so erhaltene pcDNA3.1-Swap4-Konstrukt sowie pcDNA3.1-A6rsrf und pcDNA3.1-A3BESA6rsrf mit *RsrII* und *BamHI* geschnitten und die cDNA der extrazellulären Domänen von BMPR-IB und BMPR-IA/IB^Cec und das Vektorrückgrat des pcDNA3.1-Swap4-Konstrukts isoliert. Die Fragmente werden zu den finalen Konstrukten ligiert. Die hergestellten Konstrukte mit den extrazellulären Domänen der BMP Typ I Rezeptoren und der transmembranen und zytosolischen Domäne von ActR-IB heißen pcDNA3.1-Swap4/5/6 (siehe unten).

Vektor	<i>RsrII</i> -Schnittstelle ^a	Fusions-Tag	Protein ^b
pcDNA3.1-A3	-	Flag	hBMPR-IA
pcDNA3.1-A6	-	HA	mBMPR-IB
pcDNA3.1-A3BESA6	-	Flag	hBMPR-IA/IB ^C
pcDNA3.1-A4	(100-101)	Flag	hActR-IB
pcDNA3.1-A3rsrf ^c	121-122	Flag	hBMPR-IA
pcDNA3.1-A6rsrf ^c	108-109	HA	mBMPR-IB
pcDNA3.1-A3BESA6rsrf ^c	121-122	Flag	hBMPR-IA/IB ^C
pcDNA3.1-Swap4	QNL...PPVVIG -- PVELV... (A3 1-121 -- A4 101-482)	Flag	BMPR-IAec-ActR-IBtm-ic
pcDNA3.1-Swap5	KKE...RDFVDG -- PVELV... (A6 1-108 -- A4 101-482)	Flag	BMPR-IBec-ActR-IBtm-ic
pcDNA3.1-Swap6	siehe Swap4	Flag	BMPR-IA/IB ^C ec-ActR- IBtm-ic

^a Bezeichnung der beiden Aminosäuren, zwischen denen im entsprechenden Rezeptor „geschnitten“ wird. Die Nummerierung startet beim extrazellulären Teil. pcDNA3.1-A4rsrf wird nicht hergestellt, sondern das PCR-Produkt mit der *RsrII*-Schnittstelle verwendet. Die Transmembran-Domäne startet in A3 mit Aminosäure 130, in A6 mit Aminosäure 114 und in A4 mit Aminosäure 104.

^b ec...extrazellulär, tm...transmembran, ic...intrazellulär; pcDNA3.1-Swap-Rückgrat stammt vom pcDNA3.1-A3; h...human; m...murin

^c In diesem Konstrukten ist die *RsrII*-Schnittstelle bei bp4349 stillgelegt und eine neue Schnittstelle zwischen den in Spalte 2 beschriebenen Aminosäuren eingefügt worden.

Tabelle III-2: Verwendete Vektoren für eukaryotische Proteinexpression.

III.6. Antibiotika

Antibiotika dienen zur Selektion auf Bakterien mit dem gewünschten Plasmid und werden dem Kulturmedium zugesetzt. Antibiotikakonzentrationen werden durch tiefgestellte Zahlen im Anschluss an entsprechende Abkürzungen gekennzeichnet (Amp₁₀₀ bedeutet 100µg/ml Ampicillin). Basislösungen sind wie folgt konzentriert:

Ampicillin	100mg/ml	in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Kanamycin	50mg/ml	in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Tetrazyklin	20mg/ml	in 70% EtOH
Chloramphenicol	50mg/ml	in MeOH

III.7. Oligonukleotide

Primer für die Klonierung von bmpr1bec in pET39b

P1_IBStart_for	5'- ATGGCTAAGAAGGAGGATGGA
P2_IB_BH_rev	5'- GGTTATGCTAGTTATTGCTAAGCTTATCACTTGTG

Primer für die Mutagenese an bmpr1bec

brib_h22sh23g_s	5'-CGTTGTAAATGCTCCGGCCACTGTCCG
brib_h22sh23g_as	5'-CGG ACA GTG GCC GGA GCA TTT ACA ACG
brib_p74a_s	5'-CACTCCCATTGCTCATCAAAGAAGA
brib_p74a_as	5'-TCTTCTTTGATGAGCAATGGGAGTG
brib_d70a_s	5'-CAATGTCGTGCCACTCCCATTCT
brib_d70a_as	5'-AGGAATGGGAGTGGCACGACATTG
brib_q67a_s	5'-GGGTCAGATTTTGCATGTCGTGACTC
brib_q67a_as	5'-GAGTGTACGACATGCAAAATCTGACC
brib_e62a_s	5'-CTAGGACTAGCAGGGTCAGAT
brib_e62a_as	5'-ATCTGACCCTGCTAGTCCTAGAC
brib_f66a_s	5'-GGGTCAGATGCTCAATGTCGTG
brib_f66a_as	5'-CACGACATTGAGCATCTGACCC

Primer für die Herstellung der BMPR-IA/IB^Cec-Chimäre ausgehend von bmpr1a

K88R_for	5'-TCTGATTTTCAGTGCAGAGATTCTCCAAAAGCC
K88R_rev	5'-GGCTTTTGGAGAATCTCTGCACTGAAAATCAGA
B1K88R_90-98for	5'-ACTCCAATTCCCCACCAACGCCGGTCAATAGAATGTTGT CGGACC
B1K88R_90-98rev	5'-TGACCGGCGTTGGTGGGGAATTGGAGTATCTCTGCACTG AAAATCAGATCC
B2K88R_74-80for	5'-ACTTCAGGGTGTTTGGGGTTAGAAGGATCTGATTTTCAG TGC
B2K88R_74-80rev	5'-TAACCCCAAACACCCTGAAGTTAATGTGGTTTCTCCCTG
D46E_for	5'-TCAGGGCACTGTCCAGAGGATGCTATTAATAAC
D46E_rev	5'-GTTATTAATAGCATCCTCTGGACAGTGCCCTGA
B3K88R_G42Hfor	5'-GTGCTATTGCTCACACCACTGTCCAGAGGATGC
B3K88R_G42Hrev	5'-GCATCCTCTGGACAGTGGTGTGAGCAATAGCAC
B4K88R_61-62for	5'-CTAATGGACATTGCTTTACCATGATAGAAGAAGATGACC AG
B4K88R_61-62rev	5'-CTGGTCATCTTCTTCTATCATGGTAAAGCAATGTCCATT AG

Primer für die Mutagenese an gdf5

g5_R57L_s	5'-CGAGTTCCCATTGCTCTCCCACCTGGAGC
g5_R57L_as	5'-GCTCCAGGTGGGAGAGCAATGGGAACCTCG
g5_L60P_s	5'-CGCTCCCACCCGGAGCCCACGAATCA
g5_L60P_as	5'-TGATTTCGTGGGCTCCGGGTGGGAGCG
g5_del56_s	5'-GGGCTGTGCGAGTCCCACGCTCCCACCTGGAGCCCAC

g5_del56_as	5'-GGGCTCCAGGTGGGAGCGTGGGAACTCGCACAG
g5_S58T_s	5'-AGTTCCCATTTGCGCACCCACCTGGAGCCCACGAAT
g5_S58T_as	5'-ATTCGTGGGCTCCAGGTGGGTGCGCAATGGGAACT
g5_H59L_s	5'-TCCCATTTGCGCTCCCTCCTGGAGCCCACGAATCATGCAG
g5_H59L_as	5'-CTGCATGATTCGTGGGCTCCAGGAGGGAGCGCAATGG GA
g5_Mut56-59_s	5'- GGGCTGTGCGAGTTCCCACGCACCCTCCTGGAGCCCAC
g5_Mut56-59_as	5'- GGGCTCCAGGAGGGTGCCTGGGAACTCGCACAG
<i>Primer für die Herstellung der Rezeptorchimären zur Expression in eukaryotischen Zellen</i>	
hAlk3_rsrii_s	5'-CCCCTGTTGTCATCGGTCCGTTTTTTGATGG-3'
hAlk3_rsrii_as	5'-CCATCAAAAAACGGACCGATGACAACAGGGG-3'
mAlk6_rsrii_s	5'-GACAGAGATTTTGTGACGGACCGATAACACCACAAGGCC-3'
mAlk6_rsrii_as	5'-GGCCTTGTGGTGTATCGGTCCGTCAACAAAATCTCTGTC-3'
hAlk4_rsrii_s	5'- CTGAGCACCCGTCCATGTTTCGGTCCGGTGGAGCTGGTAGGC
hAlk4_rsrii_as	5'- GCCTACCAGCTCCACCGACCGAACATGGACGGGTGCTCAG
pcDNA_worsrii_s	5'-GGCTGGGTGTGGCGCACGGCTATCAGGACATAGCG-3'
pcDNA_worsrii_as	5'-CGCTATGTCCTGATAGCCGTGCGCCACACCCAGCC-3'

III.8. Sterile Arbeitsmittel

Glasgeräte wie Kulturkolben und Glaspipetten werden trocken für 6h bei 180°C im Heißluftschrank (Heraeus Trockenschrank) sterilisiert. Kunststoffreaktionsgefäße, Kulturmedien und sonstige Lösungen werden für 20min bei 120°C und 1,1bar autoklaviert (Sterico Vapoklav Dampfsterilisator). Hitzelabile Lösungen werden mit Spritzenfiltern (Porendurchmesser 0,22µm) sterilfiltriert. Die verwendeten sterilen Plastikgefäße (Zellkulturmaterial, PP-Röhrchen) werden von der Firma Greiner bezogen. Dialyseschläuche (Zellutrans 3,5kDa Ausschlussgröße, Roth) werden vor Verwendung für 60min in 60°C heißen Puffer (20g/l NaHCO₃, 0,4g/l EDTA) gelegt, mehrmals mit dH₂O gewaschen und in 20% EtOH bei 4°C gelagert.

III.9. Kulturmedien

LB-Medium (Sambrook, 1989):

10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefeextrakt, 10g/l NaCl, pH7,5 mit 2M NaOH einstellen

TB-Medium (Sambrook, 1989):

13,3g/l Bacto-Trypton, 26,6g/l Bacto-Hefeextrakt, 4,4ml/l Glycerin; zu 720ml sterilem TB-Medium werden 80ml 10x Phosphatlösung gegeben

SOB-Medium:

20g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefeextrakt, 0,5g/l NaCl

SOC-Medium:

SOC-Medium plus 10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂, 0,4% Glucose

10x Phosphatlösung:

0,17M KH₂PO₄, 0,72M K₂HPO₄

LB-Agar-Platten:

40g/l LB-Agar-Pulver (Applichem) in dH₂O, pH7,5 mit 2M NaOH einstellen

M9 Minimalmedium:

dH₂O vorlegen und unter ständigem Rühren nacheinander in der angegebenen Reihenfolge zugeben: 100ml/l 10x M9-Puffer, 1ml/l MgSO₄-Lösung, 0.1ml/l CaCl₂-Lösung, 5ml/l (v/v) 200x Spurenelementelösung, 37,5ml/l Glucoselösung, 2ml/l Thiaminhydrochlorid-Lösung (frisch), 2,5ml/l NH₄Cl-Lösung, 2,5ml/l L-Cysteinlösung, 2ml/l L-Methioninlösung; mit dH₂O auffüllen.

10x M9-Puffer:

42mM Na₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄, 8.6mM NaCl, pH7,2-7,4

200x Spurenelementelösung:

5g/l EDTA, 0,8g/l FeCl₃, 0,05g/l ZnCl₂, 0,01g/l CuSO₄, 0,01g/l CoCl₂, 0,01g/l H₃BO₃, 1,6g/l MnCl₂, 0,01g/l Na₂WO₄, pH7,0 mit 2M NaOH einstellen

MgSO₄-Lösung:

1M MgSO₄ in dH₂O, sterilisiert

CaCl₂-Lösung:

1M CaCl₂ in dH₂O, sterilisiert

Glucoselösung:

20% (w/v) Glucose in dH₂O, sterilfiltriert; gleiches gilt für U-¹³C₆-Glucose (CK Gas Products)

Thiaminhydrochlorid-Lösung:

50mg/ml (w/v) Thiamin-HCl in dH₂O, sterilfiltriert

NH₄Cl-Lösung:

20% (w/v) NH₄Cl in dH₂O, sterilfiltriert; gleiches gilt für ¹⁵NH₄Cl (CK Gas Products)

L-Cysteinlösung:

20mg/ml L-Cystein in dH₂O, sterilfiltriert

L-Methioninlösung:

50mg/ml L-Methionin in dH₂O, sterilfiltriert

D/L-Selenomethioninlösung:

50mg/ml D/L-Selenomethionin in dH₂O, sterilfiltriert

III.10. Verwendete Standardpuffer

Abkürzung des Puffers	Zusammensetzung des Puffers
TBS	50mM Tris pH8,5, 150mM NaCl
TBSE	50mM Tris pH8,5, 150mM NaCl, 2mM EDTA
HBS	10mM Hepes pH7,4, 500mM NaCl
HBSE	10mM Hepes pH7,4, 500mM NaCl, 3,4mM EDTA
TN ₃₅	20mM Tris pH8,0, 35mM NaCl
TN ₁₅₀	10mM Tris pH7,4, 150mM NaCl
Thrombin-Spaltpuffer	50mM Tris pH7,5, 150mM NaCl, 2,5mM CaCl ₂
TNE	50mM Tris pH7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA
10x Pfu buffer	200mM Tris pH8,8, 100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1mg/ml BSA
5x TBE	446mM Tris pH8, 445mM H ₃ BO ₃ , 1mM EDTA
50x TAE	2M Tris pH8, 1M NaOAc, 50mM EDTA
TE	10mM Tris pH8, 1mM EDTA
20x PBS	175mM Na ₂ HPO ₄ , 60mM KH ₂ PO ₄ , 2,4M NaCl, 40mM KCl
5x SDS-Laufpuffer	124mM Tris, 960mM Glycin, 17,5mM SDS

(Fortsetzung auf nächster Seite.)

Abkürzung des Puffers	Zusammensetzung des Puffers
2x Probenpuffer für SDS-PAGE	125mM Tris pH6,8, 20% Glycerin, 139mM SDS, 15µM Brom-phenolblau, plus/minus 1/200 (v/v) β-ME
6x Probenpuffer für Agarosegele	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene Cyanol FF, 30% Glycerin; ggf. plus 1/10000 (v/v) 10000x SybrGold (Invitrogen)
4x Lower Tris	1,5M Tris pH8,8, 14mM SDS
4x Upper Tris	504mM Tris pH6, 14mM SDS
Blot-Puffer	24mM Tris, 193mM Glycin, 20% (v/v) MeOH

Tabelle III-3: Zusammensetzung verwendeter Standardpuffer.

III.11. Allgemeine molekularbiologische Methoden

III. 11. 1. Mutagenese durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für eine übliche PCR-Reaktion werden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge pipettiert (Tabelle III-4).

Reagenz	Konzentration	Menge für 50µl Endvolumen
DNA-Matrize	variabel	20ng
Primerpaar	10pmol/µl	je 2µl sense und antisense Primer
dNTP-Mix	2.5mM	5µl
Pfu buffer	10fach konzentriert	5µl
Steriles Wasser	variabel	variabel
Pfu-Polymerase	~10U/µl	1µl

Tabelle III-4. Zusammensetzung einer üblichen PCR-Reaktion.

Vor der Zugabe der Pfu-Polymerase wird der Reaktionsansatz für 3min auf 95°C erhitzt. Im Anschluß beginnt ein 25 Zyklen umfassendes Temperaturgradientenprogramm, welches aus einem Denaturierungsschritt (1min bei 95°C), einem Dimerisierungsschritt (1min bei 58°C) und einem Syntheseschritt (6min bei 72°C) besteht. An den letzten Schritt schließt sich eine vierminütige Inkubation bei 72°C an. Die Dimerisierungstemperatur richtet sich nach dem G/C-Gehalt der zur Reaktion eingesetzten Primer. Die Länge des Syntheseschrittes hängt von der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Fragments ab. Die Arbeitsgeschwindigkeit der Pfu-Polymerase beträgt etwa 500bp pro Minute. Durch schrittweises Absenken einer anfangs hohen Dimerisierungstemperatur während der ersten PCR-Zyklen (negativer Temperaturgradient) kann das Ergebnis der PCR-Reaktion verbessert werden. Die Primerpaare werden mit Hilfe geeigneter Computerprogramme konstruiert, um Selbstdimerisierung oder teilweise überlappende DNA-Sequenzen zu vermeiden.

Mutationen in DNA-Sequenzen können entweder durch Ein-Schritt- oder Zwei-Schritt-Mutagenese eingeführt werden. Zur Herstellung von Punktmutationen eignet sich die „zyklische“ (Ein-Schritt-) PCR, wobei ein zueinander komplementäres Primerpaar erforderlich ist und der gesamte Expressionsvektor vervielfältigt wird. Die methylierte DNA-Matrize muss nach der PCR durch Zugabe von 1µl *DpnI* und einstündiger Inkubation bei 37°C zerschnitten werden. Anschließend werden *E.coli* Nova Blue Zellen mit 2µl des Reaktionsansatzes transformiert. Zur Einführung mehrerer, auseinander liegender Punktmutationen wird ein in der Literatur vorgestelltes Verfahren

angewendet, bei dem die synthetisierte DNA erst methyliert und dann als Schablone für die nächste PCR verwendet wird (Kim and Maas, 2000).

Die Zwei-Schritt-Mutagenese wird bei Einführung mehrerer beieinander liegender Mutationen oder Insertionen angewendet. Hierbei überlappen die eingesetzten Primer nur teilweise im zu mutierenden DNA-Abschnitt. Die Länge des vervielfältigten DNA-Segments definiert sich dabei durch externe, 3'- und 5'-terminal des Mutageneseabschnitts bindende Primer. In einer ersten Reaktion werden zwei nur im zu mutierenden Abschnitt überlappende DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge erzeugt, indem zur PCR die DNA-Matrize zum einen zusammen mit dem „sense“ Mutageneseprimer und dem „antisense“ externen Primer und zum anderen zusammen mit dem „antisense“ Mutageneseprimer und dem „sense“ externen Primer eingesetzt wird. In einer zweiten PCR werden die so erzeugten DNA-Fragmente kombiniert, wozu nur die externen Primer Verwendung finden. Als DNA-Matrize dienen hierbei jeweils 2µl aus den beiden Reaktionen des ersten PCR-Ansatzes. Das resultierende DNA-Fragment wird mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten, mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt und in den gewünschten Expressionsvektor ligiert.

III. 11. 2. Schneiden und Ligieren von DNA-Fragmenten

Ein üblicher Restriktionsverdau mit einer Restriktionsendonuklease wird wie in Tabelle III-5 angegeben pipettiert.

Komponente	Volumen
PCR-Produkt oder Vektor	25µl oder 2-5µg
Restriktionsendonuklease	1µl
10x Restriktionsendonukleasepuffer	4µl
10x BSA (wenn notwendig)	4µl
Steriles Wasser	6µl

Tabelle III-5: Zusammensetzung eines Restriktionsverdaus.

Der Ansatz wird eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zeigen zwei Restriktionsendonukleasen volle Aktivität im gleichen Puffer, kann auch gleichzeitig geschnitten werden. Anderenfalls startet man den Verdau mit dem Enzym, welches einen Puffer mit niedrigem Salzgehalt benötigt, gleicht die Salzkonzentration anschließend an die Bedingungen des zweiten Enzyms an und inkubiert erneut. Zur Auftrennung der geschnittenen DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau wird der Ansatz mit SybrGold-Farbstoff (Invitrogen) versetzt und in die Taschen eines 1%igen (w/v) TA-gepufferten Agarosegels gefüllt. Die DNA-Banden werden mit einem Transilluminator (Dark Reader, Clare Chemical Research) visualisiert und die gewünschten DNA-Banden ausgeschnitten. Letztere werden mit Hilfe eines Gelextraktionskits aus dem Gel isoliert und in 25µl TE-Puffer gelöst.

Komponente	Volumen
Linearer Expressionsvektor (Gelextraktionskit)	2µl
Insert (Gelextraktionskit)	2µl
10x T4 DNA Ligasepuffer mit ATP	2µl
Steriles Wasser	13µl
T4 DNA Ligase (10000U/µl)	1µl

Tabelle III-6: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Zur anschließenden Ligation des Inserts und des linearen Expressionsvektors wird der in Tabelle III-6 (S. 29) angegebene Ansatz pipettiert.

Das Verhältnis bzw. die Menge von linearem Vektor und Insert richtet sich nach der Intensität der jeweiligen DNA-Banden auf dem Agarosegel. Generell sollte das Insert in leichtem Überschuss eingesetzt werden. Der Reaktionsansatz wird für 30min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ein Volumen von 5µl dient zur Transformation von *E.coli* Nova Blue Zellen.

III. 11. 3. Transformation von *E.coli*

TfbI-Puffer: 30mM KOAc, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15% Glycerin, pH5,8 mit verdünnter Essigsäure einstellen

TfbII-Puffer: 10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15% Glycerin, pH6,5 mit 2M NaOH einstellen

Expressionskonstrukte werden mittels chemischer Transformation in *E.coli* Zellen eingebracht. Chemisch kompetente *E.coli* Zellen werden mittels der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt und bei -80°C gelagert. Dazu impft man 50ml LB-Medium, gegebenenfalls mit notwendigen Antibiotika, mit 1/100 Volumen einer Übernachtskultur im gleichen Medium an und inkubiert im Schüttler bei 37°C, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,4 erreicht ist. Die Zellsuspension wird 15min auf Eis gelagert, zentrifugiert (3000xg, 5min, 4°C) und in 40ml TfbI resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wird erneut zentrifugiert (s.o.), das Zellpellet in 4ml TfbII resuspendiert und sofort 100µl-Aliquots dieser Zellsuspension in 1,5ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

Zur Transformation werden 20-40ng des zu transformierenden Expressionsvektors zu einem frisch aufgetauten Aliquot der chemisch kompetenten *E.coli* Zellen gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Durch 90-sekündiges Erhitzen des Ansatzes auf 42°C und anschließende fünfminütige Inkubation auf Eis kann die DNA in die Zellen eingebracht werden. Nachdem der Ansatz für 30min bei 37°C geschüttelt wurde, werden die Bakterienzellen auf mit zur Selektion notwendigen Antibiotika versetzten LB-Agarplatten in zwei verschiedenen Konzentrationen ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C stehen gelassen.

III. 11. 4. Kolonie-PCR

Kolonien von *E.coli* Nova Blue aus der Transformation des Ligationsprodukts können mit Hilfe der Kolonie-PCR einfach auf die Gegenwart des Expressionsvektors mit dem korrekten Insert geprüft werden. Dazu beimpft man 1ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einem einzelnen Klon von der LB-Agarplatte und inkubiert für 4h im Schüttler bei 37°C. Nach Zentrifugation (4min, 16000xg, RT) von 0,8ml der Zellsuspension wird in 50µl sterilem Wasser resuspendiert und für 10min auf 96°C erhitzt. Die Suspension wird zentrifugiert und 3µl des Überstands als Schablone für die folgende PCR verwendet. Am 3'- und 5'-Ende des Inserts bindende Sequenzierprimer eignen sich gut, um auf die Richtigkeit des eingefügten Genabschnitts zu prüfen. Entsprechende Bakterienklone werden unter selektiven Bedingungen in LB-Medium gezüchtet und deren Vektor-DNA mittels Plasmidminipräparationen isoliert. Letztere wird durch Sequenzierung charakterisiert.

III. 11. 5. Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Reaktionen und der Qualität von DNA-Präparationen finden TBE-gepufferte 1% (w/v) Agarosegele mit 1.6µg/ml Ethidiumbromid Anwendung. DNA-Banden werden hierbei unter UV-Licht sichtbar. TA-gepufferte 1% (w/v) Agarosegele ohne Ethidiumbromid werden bei der Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Dem Probenpuffer wird dabei 1/10000 (v/v) SybrGold (Invitrogen) zugesetzt, um die DNA-Banden unter Licht einer Wellenlänge von 500nm sichtbar zu machen. Die Agarosegelelektrophorese wird im entsprechenden Puffer bei einer Spannung von 120V durchgeführt.

III.12. Allgemeine proteinchemische Methoden

III. 12. 1. Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamidgele werden in Anlehnung an ein Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970) hergestellt (Tabelle III-7). Die angegebenen Volumina ergeben Lösungen für zwei Gele.

Komponente	Trenngel (12%)	Trenngel (15%)	Sammelgel
40% Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 29:1	3,0ml	3,75ml	0,5ml
4x Upper Tris	-	-	1,25ml
4x Lower Tris	2,5ml	2,5ml	-
87 % Glycerol	2,0ml	2,0ml	-
dH ₂ O	2,5ml	1,75ml	3,2ml
TEMED	20µl	20µl	18µl
40 % APS	20µl	20µl	18µl

Tabelle III-7. Zusammensetzung und Herstellung der Polyacrylamidgele.

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen auf das Acrylamidgel mit reduzierendem (+β-ME) oder nicht reduzierendem (-β-ME) Probenpuffer versetzt und 5min bei 95°C erhitzt. Maximal 20µl Proteinprobe in Probenpuffer können in jede Tasche des Gels gefüllt werden. Eine Tasche wird mit Proteinmarker (LMW-Kit für SDS-PAGE, Amersham) beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei 330V. Die Proteine auf dem Gel werden entweder mit Coomassie-Blau (>1µg Protein) oder mit Silber (<1µg Protein) angefärbt.

Lösung	Zusammensetzung der Lösung	Inkubation
1	60ml 50% (v/v) Aceton in dH ₂ O, 1,5ml 50% (w/v) TCA in dH ₂ O, 25µl 37% (w/v) Formaldehyd in dH ₂ O	5min + W
2	60ml dH ₂ O	5min + W
3	60ml 50% (v/v) Aceton in dH ₂ O	5min
4	60ml dH ₂ O, 100µl 10% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ in dH ₂ O	1min + W
5	60ml dH ₂ O, 0,8ml 20% (w/v) AgNO ₃ in dH ₂ O, 0,6ml 37% (w/v) Formaldehyd in dH ₂ O	8min + W
6	60ml dH ₂ O, 1,2g (w/v) NaCO ₃ in dH ₂ O, 25µl 37% (w/v) Formaldehyd in dH ₂ O, 25µl 10% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ in dH ₂ O	bis Banden sichtbar sind
7	1% (v/v) Essigsäure in dH ₂ O	15min

Tabelle III-8: Silberfärbung von Proteinbanden auf Polyacrylamidgelen.

Färbung mit Coomassie-Blau

Die Gele werden für mindestens 20min in Coomassie-Blau-Lösung (4,2g/L Coomassie-Blau in 50% Methanol, 10% Essigsäure, 40% Wasser) inkubiert. Anschließend werden die Gele mit Entfärberlösung (10% Isopropanol, 10% Essigsäure, 80% Wasser) behandelt.

Silberfärbung

Sofort nach Abschalten der Stromzufuhr werden die Proteinbanden auf dem Gel durch fünfminütige Behandlung mit Lösung 1 (siehe Tabelle III-8, S. 31) fixiert. Im Anschluß wird in der Glasschale in der angegebenen Reihenfolge mit den Lösungen 2-7 behandelt. Soweit gekennzeichnet wird zwischen den ersten fünf Schritten dreimal 5s mit dH₂O gewaschen („W“).

III. 12. 2. Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE

Die Größe von Proteinen auf SDS-PAGE-Gelen wird mit Hilfe eines Proteinmarkers (LMW Kit, GE) geschätzt. Dieser setzt sich aus folgenden Referenzproteinen zusammen (Tabelle III-9).

Protein	M _w	Konzentration (ng/μl)
Phosphorylase b	97.000	134
Albumin	66.000	166
Ovalbumin	45.000	294
Carbon anhydrase	30.000	166
Trypsin inhibitor	21.100	160
Lactalbumin	14.400	232

Tabelle III-9: Zusammensetzung des Proteinmarkers.

Es werden je nach Färbungsmethode 1-5μl Proteinmarker aufgetragen.

III. 12. 3. Western Blot

Hierfür werden im Anschluss an die SDS-PAGE die Proteinbanden vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Whatman) übertragen. Dazu werden Filterunterlage, Filterpapier (17Chr, Whatman), Gel, Membran, Filterpapier und Filterabdeckung kurz in Blot-Puffer gewaschen und in der angegebenen Reihenfolge schichtweise auf den Plastikeinsatz der Blot-Kammer (Mini V8, Gibco BRL Life Technologies) gelegt, ohne Luftblasen einzuschließen. Anschließend wird die Blot-Kammer mit Blot-Puffer befüllt und für 45min bei 160V transferiert.

Die Membran wird unter Schütteln für 30-60min mit Block-Puffer (0,9g Milchpulver in 45ml TBS für α-ActR-IIB, 2% (w/v) BSA in TBS für α-BMPR-IB) inkubiert und anschließend dreimal mit TBS gewaschen (je 5min). Die Bindung des primären Antikörpers (Tabelle III-10, in Block-Puffer) an die auf der Membran immobilisierten Proteine erfolgt für 1h bei RT oder ÜN bei 4°C unter ständigem Schütteln. Es wird dreimal je 5min mit TBS gewaschen und für 1h bei RT mit einem geeigneten sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Tabelle III-10, in Block-Puffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wird die Membran mit Detektionsreagenzlösung (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) überschichtet, für 5min inkubiert, abgetropft und in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Chemilumineszenz von 3-Aminophthalat wird durch Auflegen eines Röntgenfilms erfasst. Es werden nacheinander 3 Filme für 30s, 60s und 5min belichtet, entwickelt und fixiert. In Tabelle III-10 (S. 33) sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen zusammengestellt. Die Detektion von BMPR-IB erfolgt mit einem leicht abweichendem Protokoll bei Verwendung der angegebenen Antikörper. So wird für alle

Wasch- und Inkubationsschritte TBS-T (TBS plus 0,05% (v/v) Tween 20) verwendet. Das Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen erfolgt durch 2% (w/v) BSA in TBS-Puffer. Zudem sind die Inkubationszeiten der Membran mit den Antikörperlösungen genau zu beachten: 60min für den ersten, 30min für den zweiten Antikörper.

Antikörper	Herkunft	Immunogen	Konzentration	Verdünnung	Hersteller
α -BMPR-IB ^a (N-17)	Ziege	N-terminales Peptid	200 μ g/ml	1:500	SantaCruz Biotechnology
α -ActR-IIB ^b	Kaninchen	Extrazellulär	80 μ g/ml	1:2000	Immunoglobine
α -goat-IgG- HRP ^a	Esel	Ziege-IgG	400 μ g/ml	1:8000	SantaCruz Biotechnology
α -rabbit IgG-HRP ^a	Ziege	Kaninchen-IgG	-	1:1000	Rockland

^a monoklonal, ^b polyklonal

Tabelle III-10: Verwendete Antikörper.

III. 12. 4. Konzentration von Proteinlösungen

Große Volumina verdünnter Proteinlösungen werden durch Ultrafiltration in Amicon Rührkammern (Millipore) unter Benutzung von YM3-Membranen (3,5kDa Ausschlussgröße) oder durch Oberflächenfiltration in Crossflow Filterkammern (Vivascience) konzentriert. Kleine Volumina lassen sich mit Hilfe von Zentrifugalfilterkammern (Millipore, Vivascience) über YM3- oder PES-Membranen mit 5kDa Ausschlussgröße einengen.

III. 12. 5. Flüssigchromatographie (FPLC und HPLC)

Die Abtrennung von Begleitproteinen erfolgt durch Niederdruckflüssig- (FPLC) oder Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) unter Verwendung unterschiedlicher Chromatographiemedien (Tabelle III-11).

Matrix	Beschreibung	Hersteller
Superdex 75	Hochaufgelöste Gelfiltration, HR10/30, M_w -Bereich 3000-70000Da	GE Healthcare
Superdex 75pg	Präparative Gelfiltration, HiLoad 16/60, M_w -Bereich 3000-70000Da	GE Healthcare
Ni-NTA Superflow	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	Qiagen
Fractogel EMD-TMAE	Starker Anionenaustauscher, Trimethylammonium-Gruppe („Q-Typ“)	Merck
Fractogel EMD-SO ₃ ⁻	Starker Kationenaustauscher, Sulfoisobutyl-Gruppe	Merck
Sephacryl 200 HR	Präparative Gelfiltration, HiPrep 16/60, M_w -Bereich 5000-250000Da	GE Healthcare
CNBr-BMP-2	BMP-2 immobilisiert an CNBr-aktivierte Sepharose 6MB oder 4B; Kopplung von BMP-2 laut modifiziertem Herstellerprotokoll; BMP-2-Affinitätschromatographie	GE Healthcare
RP-C4	Analytische HPLC; 250x4,6mm, 214TP 10 μ m	GraceVydac
RP-C4	Präparative HPLC; 250x10mm, 214TP 10 μ m	GraceVydac

Tabelle III-11: Verwendete Säulenmaterialien.

Gelfiltrations- und HPLC-Gele wurden in vorgepackten Säulen (GE Healthcare, GraceVydac) geliefert und verwendet. Alle anderen Chromatographiegele wurden manuell in geeignete Säulengehäuse (Merck, GE Tricorn-Säulen, BioRad Econo-Säulen) gepackt.

Zur Reinigung der Proteine werden die entsprechenden Trennsäulen an halbautomatischen FPLC/HPLC-Systemen, wie z.B. BioRad Duoflow (BioRad) oder Äkta Prime (Pharmacia) betrieben. Detaillierte Informationen über die verwendeten FPLC/HPLC-Anlagen finden sich in Tabelle III-12. Für die BMP-2-Affinitätschromatographie wird stets eine Peristaltikpumpe verwendet.

III. 12. 5. 1. Herstellung einer BMP-2-Affinitätschromatographiesäule

Die benötigte Menge CNBr-aktivierter Sepharose 4B (45-165µm Partikelgröße) oder 6MB (200-300µm Partikelgröße) richtet sich nach der zu koppelnden Menge an Protein. Es werden 4mg BMP-2 pro 1ml Gel eingesetzt, wobei 1,5mg lyophilisierte Sepharose-Matrix nach einer 30-minütigen Quellung in 1mM HCl bei RT etwa 5ml Gel ergeben. Die folgenden Schritte erfolgen im Batch-Verfahren, d.h. bei Waschschrritten wird jeweils zentrifugiert (3000xg, 10min, 4°C) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Die Kopplung erfolgt nicht wie vom Hersteller angegeben bei basischen, sondern saurem pH-Wert und ohne NaCl im Puffer (J. Nickel, persönliche Mitteilung). Nach der Quellung des Materials wird mit 20 Bettvolumen 1mM HCl gewaschen und erst mit 20ml 0,5M NaHCO₃ pH8,0 gewaschen, dann erneut im gleichen Puffer zur Inaktivierung reaktiver Gruppen suspendiert (3h, 4°C). Das Gel wird mit zweimal 25ml 10mM NaOAc pH4,5 äquilibriert und anschließend mit der BMP-2-Lösung versetzt. Dazu werden 18mg BMP-2 in 5ml dH₂O gelöst und mit 1,7M NaOAc pH4,5 auf 10mM NaOAc pH4,5 gepuffert. Nach Zentrifugation wird der Überstand zum Gel gegeben, beides gut gemischt und anschließend ü.N. (20h) bei 4°C unter stetigem Schwenken gekoppelt. Es wird zentrifugiert und die Proteinmenge im Überstand gemessen. Die Menge an noch gelöstem Protein sollte minimal sein (~2% der eingesetzten Menge). Das mit BMP-2 beladene Gel wird mit 45ml 1mM HCl versetzt und die Suspension auf eine BioRad Econo-Säule gegeben. Es wird mehrmals mit 1mM HCl gewaschen und die Waschfraktionen spektrophotometrisch vermessen. Bei diesem Schritt wird präzipitiertes BMP-2 gelöst (~16% der eingesetzten Menge). Verbleibende aktive Gruppen werden unter langsamem Tropfen mit 0,2M Glycin (25ml) inaktiviert und nacheinander mit 1mM HCl (25ml) und 10mM NaOAc pH4,5 (25ml) behandelt, was nichtkovalent gebundenes BMP-2 entfernt (~3% der eingesetzten Menge). Zuletzt wird dreimal alternierend mit je zwei Säulenvolumen (a) 0,1M NaOAc pH4,5, 0,5M NaCl und (b) 0,1M Tris pH8,0, 0,5M NaCl gewaschen und die Säule mit Lagerungspuffer äquilibriert (10mM Hepes pH7,4, 150mM NaCl, 3,4mM EDTA, 1mM NaN₃) und bei 4°C gelagert. Die Kapazität der Säule wird mit BMPR-IAec oder einer Variante bestimmt, indem etwa 30mg BMPR-IAec-Ansatz nach der Anionenaustauschchromatographie – wovon durchschnittlich 50% bindeaktiv sind – gereinigt werden. Nach dem hier vorgestellten Protokoll sollte eine Bindekapazität von 6,9-7,0mg BMPR-IAec erreicht werden.

III. 12. 5. 2. Kalibrierung der Superdex 75 HR10/30-Säule

Die Superdex 75 HR10/30-Säule wird unter Verwendung des LMW Kit (GE Healthcare) durch Auftragen von 100µl Kalibrierlösung A und 100µl Kalibrierlösung B kalibriert (I.1.). Kalibrierlösung A besteht aus je 3mg/ml Conalbumin ($M_w=75000\text{Da}$), Carbonanhydrase ($M_w=29000\text{Da}$), RNase A ($M_w=13700\text{Da}$) und Aprotinin ($M_w=6500\text{Da}$). Kalibrierlösung B setzt sich aus je 3mg/ml RNase A ($M_w=13700\text{Da}$) und Aprotinin ($M_w=6500\text{Da}$) sowie 4mg/ml Ovalbumin ($M_w=43000\text{Da}$) zusammen. Das Ausschlussvolumen wird durch Injektion von 100µl 1mg/ml Dextranblau 2000 bestimmt. Alle

Proteine werden in HBS-Puffer gelöst. Die Chromatographie wird in HBS-Puffer bei einer Flussrate von 0,5ml/min durchgeführt. Die Retentionszeiten der Proteine, welche aus den Chromatogrammen abgelesen werden können, sind um die Äquilibrierungs- und Injektionsphasen zu korrigieren.

Instrument	Komponenten
ÄKTAprime	- Pumpe 0,01-10ml/min, max. Druck 10bar - Gradientenventil - Injektionsventil - Mixer - UV-Detektor mit Hg-Lampe, Filter 254 oder 280nm - Leitfähigkeitsdetektor - Fraktionssammler, 95er Rack, mit Zweizeige-Ventil
BioRad DuoFlow	- Computer mit BioLogic DuoFlow Steuerungssoftware V5.1 - Arbeitsstation mit F10 Pumpenkopf (0,01-10ml/min), max. Druck 233bar - Maximizer zur Puffermischung - Maximizer oder MX-1 Mixer - UV-Detektor mit Hg-Lampe, Filter 254 oder 280nm - Leitfähigkeitsdetektor und pH-Detektor - AVR7-3 Injektionsventil (7 Anschlüsse, 3 Positionen) - Fraktionssammler Modell 2128
BioRad Econo-Pumpe	- Modell EP-1, 0,01-20ml/min, max. Druck 2bar

Tabelle III-12: Verwendete FPLC- und HPLC-Anlagen.

III. 12. 6. Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte

Grundlage der Berechnung von Proteinkonzentrationen auf Basis photometrischer Messungen sind die in Tabelle III-13 aufgeführten Extinktionskoeffizienten und Molargewichte sowie das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d = (\epsilon_{280} \cdot c_m \cdot d) \cdot (M_w)^{-1}$$

(ϵ_{280} ...berechneter Extinktionskoeffizient bei 280 nm (<http://www.expasy.org>) in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c ...Molare Konzentration in mol l^{-1} , d ...Schichtdicke der Küvette in cm , M_w ...Molekulargewicht (<http://www.expasy.org>), c_m ...Massenkonzentration in g l^{-1}).

Protein	Molekulargewicht (Da)	Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
BMPr-IBec (aus Trx)	13194	1880
BMPr-IBec (aus DsbA)	13066	1880
BMPr-IA/IB ^C ec ^{a)}	14757	3160
BMP-2	25810	40510
BMPr-IBec_KKM ^{a)}	13320	3160
BMPr-IBec_NTerm ^{a)}	15268	1880
GDF-5	26775	31690
GDF-5:BMPr-IBec	51788	36450
GDF-5:BMPr-IBec:ActR-IIBec	77952	88120
GDF-5: BMPr-IA/IB ^C ec	54914	39010
BMP-2:BMPr-IA/IB ^C ec	55324	46830

^{a)} siehe Tabelle III-16 für die jeweiligen Mutationen im wildtypischen Protein.

Tabelle III-13: Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten.

Die zur Berechnung von Konzentrationen notwendigen Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten wildtypischen Proteine und Proteinkomplexe sind in Tabelle III-13 zusammengefasst.

III. 12. 7. Massenspektrometrie

Die Identität der gereinigten Proteine wird durch Elektrospray-Ionisations- (ESI-) Massenspektrometrie (MS) geprüft (Mann and Wilm, 1995). MS-Spektren werden mit einem Bruker APEX II Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz (FTICR-) Massenspektrometer, ausgestattet mit einem 7,5T Magneten, aufgenommen. Die etwa 1µM Proteinproben in 50% MeOH, 1% Ameisensäure werden nach Ionisierung mittels einer Apollo Elektrospray-Elektronenquelle im Positiv-Ion-Modus detektiert.

Die dazu notwendige Entsalzung der Proteinproben erfolgt mit ZipTip C₄ (Millipore) Pipettenspitzen, welche 0,6µl C₄-Matrix (Silica-Matrix, 15µm, 300Å) enthalten. Dazu werden 10µl der zu analysierenden Rezeptor-ECD mit 0,5% (v/v) TFA in dH₂O versetzt und gemischt. Mit Hilfe einer 10µl-Pipette wird die Matrix im ZipTip dreimal mit Acetonitril gewaschen, anschließend fünfmal mit 0,1% (v/v) TFA in dH₂O äquilibriert. Die vorbereitete BMPR-Lösung wird dann mindestens 20mal aufgezogen und wieder ausgedrückt, um möglichst viel Protein zu binden. Salz wird durch mehrmaliges Aspirieren von 0,1% (v/v) TFA in dH₂O eluiert. Zuletzt werden die gebundenen Proteine in 50% MeOH, 1% Ameisensäure in dH₂O aufgenommen. Das ZipTip wird erneut mit 0,1% (v/v) TFA in dH₂O gewaschen und der Zyklus insgesamt dreimal wiederholt, um ausreichend Protein zur MS-Analyse zu reinigen. Alternativ kann wie im Fall von BMP Liganden erst über HPLC gereinigt und die Protein enthaltenden Fraktionen lyophilisiert zur MS-Analyse gegeben werden.

III. 12. 8. Biotinylierung von Proteinen

Um die zu analysierenden Proteine auf Streptavidin-beschichtete Sensorchips immobilisieren zu können, müssen die Proteine biotinyliert werden. Dazu werden 20nmol rekombinantes Protein mit 40nmol LC-NHS-Sulfo-Biotin (Pierce) versetzt und für 2h auf Eis inkubiert. Anschließend wird PBS in geeigneten Zentrifugalfilterkammern (Millipore, Vivascience) vorgelegt, das Reaktionsgemisch zugegeben, auf etwa 500µl eingengt und mit PBS aufgefüllt. Letztere Schritte werden mindestens dreimal wiederholt, um sämtliches freies Biotin abzutrennen. Die zur Reaktion eingesetzte LC-NHS-Sulfo-Biotin-Lösung muss stets frisch hergestellt werden, indem z.B. 1mg LC-NHS-Sulfo-Biotin in 1ml dH₂O gelöst wird, was einer Konzentration von 1,8mM entspricht.

III. 12. 9. Interaktionsanalyse am Biacore 2000 System

Bindungsaffinitäten zweier Proteine werden durch die Methode der Oberflächenplasmonresonanz (engl. Surface Plasmon Resonance, SPR) am Biacore 2000 System (GE Healthcare, Biacore) experimentell bestimmt. Dabei wird einer der Bindungspartner auf einem Sensorchip immobilisiert und der zweite Bindungspartner (Analyt) in löslicher Form in verschiedenen Konzentrationen über den Sensorchip geleitet (Jonsson et al., 1991; Karlsson et al., 1993). Die Bindung des Analyten (Assoziation) wird über eine optische Waage als Massenzunahme detektiert. Nachdem der Gleichgewichtszustand erreicht ist, also Assoziation und Dissoziation des Komplexes etwa gleich sind, wird mit Pufferlösung gewaschen und die Dissoziation des Komplexes gemessen. Die Messung

erfolgt mit verschiedenen Analytkonzentrationen. Die Sensorchips können abschließend z.B. durch Behandlung mit 4M MgCl₂ regeneriert, erneut gewaschen und bei 4°C gelagert werden.

Bei der Interaktionsanalyse ist zu beachten, dass abhängig vom immobilisierten Protein unterschiedliche Bindungsaffinitäten resultieren können, weil Aviditätseffekte auftreten, d.h. ein zwei äquivalente Bindestellen aufweisendes Analytmolekül zwei immobilisierte Moleküle – abhängig von deren Oberflächendichte – binden kann (De Crescenzo et al., 2003; Sebald et al., 2004). BMP Liganden sind dimere Moleküle mit jeweils zwei Bindungsstellen für BMP Typ I und Typ II Rezeptoren. Sind letztere immobilisiert und in räumlicher Nähe zueinander, werden BMP Liganden mit hoher Wahrscheinlichkeit über beide Bindungsstellen gebunden (1:2-Interaktion). Ist der BMP Ligand immobilisiert, kann nur eine Bindungsstelle desselben durch ein BMP Typ I Rezeptormolekül besetzt werden (1:1-Interaktion). Deshalb sind die Bindungsaffinitäten der 1:2-Interaktion höher als die der 1:1-Interaktion, wobei letztere allerdings die physiologische Situation besser widerspiegelt. Dieser nicht quantifizierbare Effekt der Avidität führt bei der 1:2-Interaktion zu niedrigeren kinetischen Konstanten, also hohen Bindungsaffinitäten, weil in der Auswertung üblicherweise von einer 1:1 Interaktion ausgegangen wird. Ein Vorteil ist jedoch, dass sich auch schwach bindene Moleküle, beispielsweise Rezeptorvarianten, messen lassen, solange nicht die durch begrenzte Löslichkeit bedingte maximale BMP-Konzentration im Analysenpuffer (etwa 1,5-2 µM) erreicht wird. Ist der BMP Ligand auf der Chipoberfläche verankert, werden Aviditätseffekte vermieden. Zudem sind die Rezeptor-Ektodomänen im Analysepuffer auch in hohen Konzentrationen löslich. Allgemein können mit dieser Methode Interaktionen mit Affinitäten von weniger als 100µM bestimmt werden.

Alle in dieser Arbeit erläuterten Bindungsdaten beruhen auf Messungen der 1:2-Interaktion, sofern nicht anders angegeben. Dazu werden 250-300 Resonanzeinheiten (engl. resonance units, RU) der gewünschten, zuvor biotinylierten Rezeptor-Ektodomäne an die Streptavidin-beschichtete Matrix eines CM5 Sensorchips gekoppelt. Der BMP Ligand wird zu 10nM, 20nM, 30nM, 40nM, 60nM, und 80nM in HBSE gelöst. Sensorgramme der Ligand-Rezeptor-Interaktion werden bei einer Flussrate von 10µl/min bei 25°C aufgenommen. Die Zeit für Assoziation und Dissoziation wird auf 3min begrenzt. Nach jedem Zyklus wird der Sensorchip für 2min mit 4M MgCl₂ regeneriert. Alle Messungen werden mindestens zweimal für alle sechs Analytkonzentrationen durchgeführt. Von allen Sensorgrammen wird eine Kontrolle (Messkanal ohne immobilisiertes Protein) abgezogen. Die Bindungsaffinitäten werden berechnet, indem die kinetischen Daten unter Verwendung der Biaevaluation-Software Version 2.4 auf ein 1:1 Langmuir-Bindungsmodell eingepasst werden. Die Dissoziationskonstante (K_D) wird aus den kinetischen Konstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) berechnet. Mittelwerte weisen eine Standardabweichung von 30% für k_{on} und 15% für k_{off} auf, falls Fehlergrenzen nicht angegeben sind.

III. 12. 10. Zirkulardichroismus

Die Faltung von Proteinen wird durch CD-Spektroskopie (engl. circular dichroism, Zirkulardichroismus) evaluiert. Durch Interferenz mit chiralen Molekülen einer Lösung werden die links und rechts zirkulär polarisierten Komponenten von planar polarisiertem Licht unterschiedlich stark absorbiert, was letztlich zu elliptisch polarisiertem Licht führt. CD Spektrometer messen die Differenz der links und rechts polarisierten Komponenten (ΔA), woraus die sich die Elliptizität (θ_λ) aus der Beziehung $\theta_\lambda = 32,98 \cdot \Delta A$ [deg] ergibt. Bei Wellenlängen kleiner 240nm (ferner UV-Bereich) ist die Absorption auf die Peptidbindung zurückzuführen, bei Wellenlängen größer als 240nm

(naher UV-Bereich) auf die Gegenwart aromatischer Aminosäuren. Die unterschiedlichen Sekundärstrukturen innerhalb von Proteinen führen zu charakteristischen CD-Spektren, weshalb umgekehrt CD-Spektren Rückschlüsse auf Sekundärstrukturelemente und damit die Faltung von Proteinen erlauben (Kelly et al., 2005).

Zur Aufnahme von CD-Spektren werden die rekombinant hergestellten extrazellulären Domänen der BMP Rezeptoren gegen 10mM KPP pH7,2 dialysiert. Liganden werden in dH₂O gemessen. Leerwert ist der jeweilige Puffer. Die Konzentration der Rezeptoren beträgt 0,15mg/ml (10,2µM), die der Liganden im fernen UV-Bereich 0,1mg/ml (3,7µM) und im nahen UV-Bereich 1-2mg/ml. Pro Messung werden etwa 250µl Proteinlösung benötigt, wobei diese zurück gewonnen und die Probe zur genauen Konzentrationsbestimmung erneut am Photometer vermessen wird. Spektren werden zwischen 250 und 185nm (ferner UV-Bereich) sowie zwischen 340 und 250 nm (naher UV-Bereich) aufgenommen. Die Sekundärstruktur der Proteine lässt sich bei niedrigen Wellenlängen, die Veränderung der Position von Tyrosin- und Tryptophan-Resten im Protein bei höheren Wellenlängen abschätzen. Letzteres trifft hier entsprechend nur auf die Analyse der Liganden zu. Die Messparameter sind wie folgt:

Spectrometer: JASCO J-715 oder JASCO J-810

Küvette: Hellma-Quartzglasküvette, Schichtdicke 1mm (121-QS, 110-QS)

Temperatur: 20°C (Thermostat)

Akkumulationen: 30 (J-715), 2 (Denaturierung) (J-810), 5 (Nativ) (J-810)

Reaktionszeit: 0,25s, Scan-Geschwindigkeit: 100nm/min, Bandweite: 1nm

Datenweite: 1nm, Scan Modus: fortwährend, Empfindlichkeit: 100mdeg.

Bei thermischer Denaturierung wird das Protein in der Küvette schrittweise über eine mit dem Spektrometer verbundene Temperaturkontrolleinheit erwärmt. Spektren werden jeweils bei konstanter Temperatur gemessen. Erst nach Abschluss der jeweiligen Messung wird die Temperatur weiter erhöht. Dazu findet folgender Gradient Anwendung:

Temperaturanstieg: von 20 bis 96°C

Schrittrate: 2°C, Heizrate 2°C pro Minute

Akkumulationen: 2 pro Temperaturwert

Anschließend wird zur Prüfung auf mögliche Reversibilität der Denaturierung mit einer Kühlrate von 16°C pro Minute auf 20°C temperiert und erneut ein CD-Spektrum gemessen. Alternativ kann die Denaturierung bei der Wellenlänge gemessen werden, bei welcher die größte Veränderung zu beobachten ist. Von den erhaltenen Spektren wird jeweils der Leerwert (Puffer) abgezogen und die Kurve geglättet (Savitzky-Golay-Regression).

Die gemessene Elliptizität (θ_λ), also die Fähigkeit des Proteins entgegengesetzt polarisiertes Licht zu drehen, wird in Winkelgraden (Milligrad, mdeg) angegeben. Diese ist in die über alle Aminosäurereste gemittelte Elliptizität ($[\theta]$, engl.: mean residue ellipticity) umzurechnen:

$$[\theta] = \theta_\lambda \cdot 100 / (c \cdot d \cdot N_A) \text{ [deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}\text{]}$$

(c...Konzentration in mol/l, d...Schichtdicke in cm, N_A...Anzahl der Aminosäurereste)

Für die Ermittlung der mittleren Denaturierungstemperatur (T_m) wird die Elliptizität ($[\theta]$) bei der Wellenlänge von 202nm (Rezeptoren) bzw. 222nm (Liganden) in Abhängigkeit von der Temperatur im Diagramm aufgetragen. Üblicherweise werden hierfür bei 222nm gemessene Daten verwendet, weil sich bei dieser Wellenlänge die Entfaltung α -helikaler Strukturen des Proteins am stärksten zeigt. In BMP Rezeptoren finden sich neben einer kleinen α -Helix und ungefalteten Bereichen nur

β -Faltblattstrukturen, deren Entfaltung wie hier gezeigt am besten bei 202nm zu beobachten ist, während Denaturierungskurven von GDF-5 bei einer Wellenlänge von 222nm gemessen werden.

III. 12. 11. Isothermale Titrationskalorimetrie

Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie wird der Energiegehalt einer Reaktion gemessen. Unter Bezug auf ein Referenzsystem konstanter Temperatur wird die Temperatur im Meßsystem, welche sich infolge einer Reaktion ändert, konstant gehalten, indem Energie zu- oder abgeführt wird. Der dazu erforderliche Strom wird kontinuierlich über die definierte Zeitspanne ermittelt. Letztere ergibt sich aus der Menge (Volumen) des in das Meßsystem injizierten Titranten und der Anzahl der Injektionsschritte. Die Injektion in die Messkammer erfolgt schrittweise, um die Energieänderung der Reaktion zu verfolgen und aus der Messkurve thermodynamische Charakteristika der Reaktion wie z.B. Enthalpie- und Entropieänderung, Wärmekapazität und Affinitätskonstante zu bestimmen. Zur Bestimmung der Reaktionswärme der Komplexbildung zwischen der extrazellulären Domäne von BMPR-IA und BMP-2 werden beide Proteine gegen 10 mM Hepes, 500 mM NaCl (HBS₅₀₀-Puffer) dialysiert, einem Puffer mit einer geringen Ionisierbarkeit. Die Konzentration von BMP-2 ist aus Löslichkeitsgründen auf ~2-3 μ M begrenzt. Aus diesem Grund wird BMP-2 in der Messzelle vorgelegt und mit BMPR-IA titriert. Die Messung erfolgt bei verschiedenen Temperaturen, um die Wärmekapazität des Systems zu bestimmen. Die bei Messung am VP-ITC Mikrokolorimeter (MicroCal Inc., Northampton, USA) verwendeten Proteinkonzentrationen, Puffer, Messtemperaturen und Injektionsprogramme sind in Tabelle III-14 zusammengefasst. Die ungefähren Konzentrationen der Bindungspartner ergeben sich aus folgender Beziehung:

(1) Konzentration der Komponente in der Messzelle: $k_{on} \cdot c_{Vorgelegt} = 10$ bis 50

(2) Konzentration der Komponente in der 250 μ l-Spritze: $c_{titriert} = 7 \cdot n_{Stoichiometrie} \cdot c_{Vorgelegt}$

Zur Bestimmung der Verdünnungswärme wird unter Verwendung des gleichen Messprogramms eine BMPR-IA-Lösung gleicher Konzentration in HBS₅₀₀-Puffer titriert (Referenzmessung). Die thermodynamischen Daten werden aus den Kurven nach Abzug der Referenzmessung gewonnen. Die Auswertung erfolgt mit der mitgelieferten Software (MicroCal Origin, Version 7.0).

Nr.	Vorgelegt (Messzelle)	Titriert (Spritze)	Puffer in der Messzelle [#]	Puffer in der Spritze	Temperatur [K]
1 ^a	1,8 μ M BMP-2	50,0 μ M BMPR-IAec	HBS ₅₀₀	HBS ₅₀₀	298,15
2 ^a	-	50,0 μ M BMPR-IAec	HBS ₅₀₀	HBS ₅₀₀	298,15
3 ^b	1,6 μ M BMP-2	39,2 μ M BMPR-IAec	HBS ₅₀₀	HBS ₅₀₀	298,15
4 ^b	-	39,2 μ M BMPR-IAec	HBS ₅₀₀	HBS ₅₀₀	298,15
5 ^b	1,6 μ M BMP-2	39,2 μ M BMPR-IAec	HBS ₅₀₀	HBS ₅₀₀	304,15
6 ^b	1,6 μ M BMP-2	39,2 μ M BMPR-IAec	HBS ₅₀₀	HBS ₅₀₀	310,15

Messprogramm:

^a 5 μ l in 5s, 360s Äquibrierung, dann 14x je 10 μ l in 10s und 300s Äquibrierung, 300rpm

^b 5 μ l in 5s, 360s Äquibrierung, dann 29x je 10 μ l in 10s und 300s Äquibrierung, 300rpm

Tabelle III-14: Zusammenstellung der Messungen zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter der BMP-2•BMPR-IAec-Interaktion.

Nach Integration der Peaks bei Injektion wird deren Fläche, d.h. die Reaktionswärme, gegen das molare Verhältnis von injiziertem zu vorgelegtem Protein aufgetragen und durch Marquadt-Regression die thermodynamischen Parameter der Reaktion bestimmt. Aus der sigmoidalen Kurve

lassen sich die Anzahl der äquivalenten Bindungsstellen (n, x-Wert bei halbmaximalem y-Wert), die Reaktionsenthalpie (ΔH , Differenz aus minimalem und maximalem y-Wert) sowie die Dissoziationskonstante (K_D , Anstieg der Regressionsgeraden) ermitteln. Aus der Gibbs-Helmholtz-Gleichung lassen sich zudem die freie Enthalpie (ΔG) und die Reaktionsentropie (ΔS) berechnen. Die semi-empirischen Gleichungen (1-3) ermöglichen zudem die Berechnung der Beiträge von Solvatisierungsentropie (ΔS_{solv}), konformationeller Entropie (ΔS_{conf}) und der Translations- und Rotationsfreiheitsgrade (ΔS_{rt}) zur Gesamtentropie:

$$(1) \Delta S = \Delta S_{solv} + \Delta S_{conf} - \Delta S_{rt}$$

$$(2) \Delta S_{solv} = \Delta C_p \cdot \ln\left(\frac{T}{T^*}\right) \quad (\text{Murphy et al., 1995})$$

$$(3) \Delta C_p = 0.45\Delta ASA_{apol} - 0.26\Delta ASA_{pol} \quad (\text{Murphy et al., 1992; Murphy and Freire, 1992})$$

mit T...Messtemperatur, T*...385K, ΔC_p ...Wärmekapazität, ΔASA_{apol} ...nach Bindung unzugängliche Oberfläche apolarer Aminosäurereste, ΔASA_{pol} ...nach Bindung unzugängliche Oberfläche polarer Aminosäurereste.

Die Änderung in den Translations- und Rotationsfreiheitsgraden beträgt für eine bimolekulare Reaktion etwa $-8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Lavigne et al., 2000; Murphy et al., 1994). Die Oberfläche der nach Bindung von Ligand und Rezeptor dem Lösungsmittel unzugänglichen Aminosäurereste (ΔASA) errechnet sich aus der Struktur des Proteinkomplexes.

III. 12. 12. Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Gereinigte Proteine werden durch RP-HPLC an C4-Säulen (Tabelle III-11) auf Integrität überprüft. Dazu wird die Säule zunächst mit Puffer A (0,1%ige TFA-Lösung in dH₂O, entgast) bei RT und einer Flussrate von 1ml/min äquilibriert. Die Proteinprobe wird über eine Injektionsschleife eingespritzt und mit Puffer A bis zur Konstanz der UV-Absorption bei 280nm gewaschen. Anschließend erfolgt die Trennung und Elution der im Gemisch enthaltenen Proteine gemäß ihrer Hydrophobizität durch Mischung von Puffer A mit Puffer B (100% Acetonitril) (Tabelle III-15). Der Acetonitril-Gradient unterscheidet sich wie angegeben für die gereinigten Liganden und Rezeptoren.

Rezeptoren (Flussrate 1ml/min)								
Volumen pro Schritt (ml) [#]	2	0,5	8	3,5	31,5	7	3,5	7
Puffer B (%)								
Start	0	0	0	0	25	45	100	100
Ende	0	0	0	25	45	100	100	0
Liganden (Flussrate 1,5ml/min)								
Volumen pro Schritt (ml) [#]	5	10/0,5 ¹⁾	15	15	55	20	15	15
Puffer B (%)								
Start	0	0	0	0	25	45	100	100
Ende	0	0	0	25	45	100	100	0

¹⁾ präparativ/analytisch)

Tabelle III-15: RP-HPLC-Gradienten.

III.13. Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

III. 13. 1. Klonierung der Expressionskonstrukte

Die extrazellulären Domänen von mBMPr-IB (Reste 14-126, SWISS-PROT Zugangskennung P36898) und Derivaten, hActR-IIB (Reste 20-127, SWISS-PROT Zugangskennung Q13705), der BMPr-IA/BMPr-IB-Chimäre BMPr-IA/IB^C (Mutationen in den Resten 24-152 des hBMPr-IA, SWISSPROT Zugangskennung P36894) und BMPr-IA^{sf} (Reste 51-152 von hBMPr-IA) werden als Thioredoxin-Fusionsproteine in *E.coli* AD494 (DE3) und BL21 (DE3) exprimiert. BMPr-IB^{ec} wird auch als DsbA-Fusionsprotein in *E.coli* BL21 (DE3) hergestellt. Zur Präparation der Fusionsproteine werden die entsprechenden DNA-Sequenzen in den nach Kirsch et al. (Kirsch et al., 2000b) modifizierten Vektor pET32a (Thioredoxin-Fusion, siehe III.5. und Plasmidkarte in Abbildung IX-1, S. 227) oder pET39b (DsbA-Fusion, siehe III.5. und Plasmidkarte in Abbildung IX-1, S. 227) eingefügt. Die Thioredoxin-Expressionskonstrukte für BMPr-IB^{ec} und ActR-IIB^{ec} wurden von Prof. W. Sebald zur Verfügung gestellt. Proteinvarianten werden analog zu den Wildtyp-Proteinen kloniert, die in pET32a erforderlichen Schnittstellen für *NcoI* und *Bpu1102I* mittels PCR-Mutagenese (III. 11. 1.) erzeugt. *BmprIbec* wurde über das in III.7. angegebene Primerpaar aus pET32a isoliert und mit *HindIII* geschnitten. Anschließend wurde pET39b mit *ScaI* und *HindIII* verdaut und mit *bmprIbec* ligiert.

Das Expressionskonstrukt zur Herstellung des reifen Teils von humanem GDF-5 (Reste 387-501, SWISS-PROT Zugangskennung P43026) und dessen Varianten basiert auf dem Vektor RBSII_{N25}^x/0 (Stueber et al., 1984) und wurde von Dr. J. Nickel zur Verfügung gestellt. Das GDF-5 kodierende DNA-Fragment ist über *EcoRI*- und *BamHI*-Schnittstellen in den Vektor eingefügt.

III. 13. 2. Proteinvarianten

Die im Rahmen der Doktorarbeit hergestellten Rezeptorvarianten sind in Tabelle III-16 beschrieben.

Wildtyp-Protein	Variante	Mutationen / Hintergrund	Diskussion ab Seite
BMPr-IA ^{ec1}	BMPr-IA/IB ^{ec}	K88R, S90T, K92I, A93P, H95Q, T98S („B1“) plus A74T, M78L, K79G, Y80L („B12“) plus D46E („B123“) plus G42H („B1234“) plus A61T, I62M („IA/IB ^C “); entspricht BMPr-IB ^{ec}	63, 83, 92, 94, 110, 129, 150, 164, 167, 174
BMPr-IA ^{ec1}	BMPr-IA ^{sf}	Verkürzung um 27 Aminosäuren am N-Terminus durch Einführung einer PreScission-Protease-Schnittstelle (E22L, N23E, G24V, V25L, T26F, L27Q, A28G)	67, 155, 179
BMPr-IA ^{ec1}	-Y39G42	Y39L, S41H, G42H: BMPr-IB-Schleife	63, 83, 174
BMPr-IB ^{ec1}	-KKM	<u>K</u> ristall <u>k</u> ontakt <u>m</u> utante, bei der an Kristallkontakten beteiligte Reste von BMPr-IA ^{ec} im Komplex mit BMP-2 ausgetauscht wurden (P14L, K15P, I16F, R18K, V30I, S35I, S59Q, I73K, H75Q, K80Q, D81Y)	68, 83, 164

(Fortsetzung auf nächster Seite)

Wildtyp-Protein	Variante	Mutationen / Hintergrund	Diskussion ab Seite
BMPR-IBec ¹⁾	-NTerm	<u>N-terminales</u> Peptid von BMPR-IAec (19 Aminosäuren: -19 [MA] QNLDSMLHGTGMKSDSDQK -1)	68, 164
BMPR-IBec ²⁾	H22S, H23G	Mechanismus molekulare Erkennung	83, 138, 145, 174
	E62A	Mechanismus molekulare Erkennung	83, 138, 83, 138, Fehler!
	F66A	Bindungsdeterminante	Textmarke nicht definiert., 179
	Q67A	Bindungsdeterminante in BMPR-IA	83, 138, 179
	D70A	Mechanismus molekulare Erkennung	83, 138
	P74A	Mechanismus molekulare Erkennung	83, 138, 179
GDF-5	del56L	Analyse der Einzelmutationen aus DP	
	R57L	Brachydaktylie, verringerte Aktivität	
	S58T	Analyse der Einzelmutationen aus DP	79, 83, 92, 94,
	H59L	Analyse der Einzelmutationen aus DP	191, 196
	L60P	Symphalangismus, erhöhte Aktivität	
	DP	del56L,S58T,H59L: DuPan-Syndrom	

1) Expression als Thioredoxin-Fusionsprotein
2) Expression als DsbA-Fusionsprotein

Tabelle III-16: Übersicht über die angefertigten Rezeptor- und GDF-5-Varianten.

III. 13. 3. Expression der BMP Typ I Rezeptoren als Fusionsproteine

III. 13. 3. 1. Thioredoxin-Fusion in *E. coli* AD494 (DE3)

Die Expression der extrazellulären Domäne der Rezeptoren erfolgt als Thioredoxin-Fusion, um im Zytoplasma von *E. coli* einerseits die Löslichkeit der exprimierten Proteine und andererseits die Bildung von nativen Disulfidbrücken in den rekombinanten Proteinen zu fördern. Durch Inaktivierung des Gens kodierend für die Thioredoxin-Reduktase (TrxB) entsteht in *E. coli* AD494 (DE3) eine mehr oxidierende Umgebung, welche zur Stabilität der im rekombinanten Protein gebildeten Disulfidbrücken beiträgt.

Um den Anteil von biologisch aktiver Rezeptor-ECD am gebildeten Protein zu steigern werden zusätzlich Chaperonproteine, z.B. GroEL/GroES (Hsp60) oder Trigger-Faktor (Tig), ko-exprimiert (Takara Bioscience, siehe III.5.). Hierfür werden 300ng des entsprechenden Expressionskonstrukts zusammen mit der gleichen Menge pET32a in den gewünschten Bakterienstamm (III.4.) transformiert. Ferner können die Chaperon-Plasmide zur Herstellung kompetenter Zellen zunächst in den Expressionstamm eingebracht und kompetente Zellen hergestellt werden (III. 11. 3.), sodass später einfach mit dem gewünschten Rezeptor-Plasmid transformiert werden kann.

Anfangs wird eine Übertagkultur (5ml LB-Medium) mit einem Klon des Expressionsklons angeimpft und bei 37°C und 130rpm für etwa 8h im Schüttler inkubiert. Für eine Übernachtskultur (200-400ml LB-Medium) wird die Zellsuspension im Volumenverhältnis 1/100 zugesetzt und über Nacht inkubiert (s.o.). Die Expression erfolgt in 2l-Kolben, welche mit 800ml Medium und den benötigten

Antibiotika befüllt werden. Nach Zugabe von 15-20ml der Übernachtskultur wird das Wachstum der Bakterien durch Messen der Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600nm (OD_{600}) überwacht. Erreicht die Absorption einen Wert von 0,7 wird auf 20°C gekühlt (Derman and Beckwith, 1995) und die Expression der Chaperone induziert (0,025% (w/v) Arabinose plus 10ng/ml Tetrazyklin, je nach Konstrukt; siehe III.5.). Ist die Temperatur der Zellsuspension auf 23-24°C gesunken, wird die Expression des Rezeptorproteins induziert (1mM IPTG) und über Nacht bei 20°C geschüttelt. Die Zellernte erfolgt durch Zentrifugation (6000xg, 4°C, 20min). Die Zellmasse wird gewogen und in Aliquots zu 10g bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

III. 13. 3. 2. DsbA-Fusion in *E. coli* BL21 (DE3)

Zur Expression von BMPR-IBec als DsbA-Fusionsprotein werden *E.coli* BL21 (DE3) mit pET39A6 (siehe III.5.) transformiert. Die Selektion auf korrekte Transformanten erfolgt durch Zusatz von 30µg/ml Kanamycin (Kan₃₀) zum Medium. Zur Expression werden 0,8l TB-Medium mit 20ml einer Übernachtskultur in LB-Medium beimpft und bei 37°C und 130rpm im Schüttler inkubiert. Bei Erreichen von $OD_{600}=0,7$ wird auf 20°C gekühlt, anschließend durch Zugabe von 1mM IPTG induziert und über Nacht bei 20°C exprimiert. Zur Zellernte wird wie oben beschrieben vorgegangen.

III. 13. 3. 3. Expression von GDF-5 und dessen Varianten

Die Expression von GDF-5 erfolgt in *E.coli* BL21 (DE3). Hierzu wird entsprechend Abschnitt III. 13. 3. 2 vorgegangen, aber bei $OD_{600}=0,7-0,8$ mit 1mM IPTG induziert und für weitere 6h bei 37°C geschüttelt und dann geerntet. Alternativ wird nach vierstündiger Expression bei 37°C auf 20°C gekühlt, über Nacht bei 20°C geschüttelt und dann wie beschrieben geerntet.

III. 13. 3. 4. ¹⁵N- und ¹³C, ¹⁵N-Markierung von BMPR-IAec und BMPR-IAsf

Die Expression zum Einbau der Isotope ¹⁵N und ¹³C in BMPR-IAec bzw. BMPR-IAsf erfolgt prinzipiell wie unter III. 13. 3. 1 beschrieben. TB-Medium wird jedoch durch M9 Minimalmedium ersetzt (siehe III.9.). Zur Markierung mit ¹⁵N wird NH₄Cl durch ¹⁵NH₄Cl ersetzt. Zur Doppelmarkierung mit ¹⁵N und ¹³C wird NH₄Cl durch ¹⁵NH₄Cl und Glucose durch U-¹³C₆-Glucose ersetzt. Anders als für ¹⁵NH₄Cl wird die Menge an U-¹³C₆-Glucose verringert: Anfangs werden nur 15ml 20%ige U-¹³C₆-Glucoselösung (Endkonzentration 3,75g/l) zugegeben und bei Induktion mit IPTG weitere 5ml 20%ige U-¹³C₆-Glucoselösung zugesetzt, was sich zu insgesamt 5g/l U-¹³C₆-Glucose addiert. Weiterhin wird schon die Übernachtskultur im angegebenen M9 Minimalmedium angezogen. Die eigentliche Expression und Zellernte erfolgt wie in III. 13. 3. 1 beschrieben. Weil *E.coli* AD494 (DE3) und *E.coli* Origami B (DE3) nicht in M9 Minimalmedium wachsen können, muss in *E.coli* BL21 (DE3), also unter stärker reduzierenden Bedingungen, exprimiert werden, weshalb die Koexpression von Chaperon-Systemen für eine ausreichende Ausbeute an aktivem BMPR-IAec oder BMPR-IAsf unbedingt erforderlich ist.

III. 13. 3. 5. Selenomethionin-Markierung von Proteinen

Zur Markierung von Proteinen mit Selenomethionin (Se-Met) wird ebenfalls M9 Minimalmedium verwendet (III.9.). Der Einbau von Se-Met kann auf zwei Wegen erreicht werden: Einmal unter Verwendung von *E.coli* BL21 (DE3) durch die Suppression des bakterieneigenen Methionin-Syntheseweges (Van Duyne et al., 1993) und zum anderen durch die Verwendung des Methionin-auxotrophen Stammes *E.coli* B834 (DE3), in welchem Methionin biosynthetisch nicht hergestellt werden kann (siehe III.5.) (Budisa et al., 1995).

Bei ersterer Methode werden die Zellen in M9 Minimalmedium analog zu III. 13. 3. 1 bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,7 vermehrt. Dann erfolgt die Zugabe von jeweils 100 μ g/ml L-Lys, L-Thr und L-Phe sowie jeweils 50 μ g/ml L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin und (D,L)-Se-Methionin (alle als 50mg/ml Lösung in dH_2O). Durch den Überschuss an Lys, Thr, Phe, Leu, Val und Ile im Medium wird die Biosynthese von Methionin gehemmt, sodass überwiegend (D,L)-Se-Methionin für die Proteinbiosynthese Verwendung findet. Bei Zugabe der Aminosäuren wird im Falle der Rezeptoren auf 20°C gekühlt und nach etwa einer Stunde die Expression der Chaperone induziert. Ab einer Temperatur von 23-24°C im Medium kann 1mM IPTG zugegeben werden. Bei Expression der Se-markierten Liganden wird wie in III. 13. 3. 3 beschrieben vorgegangen.

Bei Verwendung des Met-auxotrophen Stammes *E.coli* B834 (DE3) werden dem M9 Minimalmedium anfangs alle 20 natürlichen Aminosäuren in Konzentrationen von 50 μ g/ml (L-Cys), 100 μ g/ml (L-Met), und 50 μ g/ml (restliche Aminosäuren) zugesetzt. Bei einer OD_{600} von 0,7-0,8 werden die Zellen zentrifugiert (6500xg, 4°C, 10min) und das Zellpellet vorsichtig mit einem Pinsel im gleichen, aber frisch zubereiteten M9-Minimalmedium ohne Zusatz von L-Methionin resuspendiert. Anschließend wird bis zur Konstanz der OD_{600} bei 37 °C geschüttelt. Dies bedeutet, dass restliches in den Bakterienzellen vorhandenes Methionin verbraucht und demnach die Biosynthese von Biomolekülen gehemmt ist. Die Zugabe von 2ml 20mg/ml (D,L)-Se-Methioninlösung (Endkonzentration 50 μ g/ml) führt zu erneutem Zellwachstum, nun allerdings unter alleiniger Verwendung von Se-Met. Bei Expression der Rezeptoren wird die Temperatur im Schüttler auf 20°C gesenkt und nach 15min die Expression der Chaperone induziert. Hat die Bakterienkultur eine Temperatur von etwa 23°C erreicht, wird die Synthese des Zielproteins durch Zugabe von 1mM IPTG gestartet und über Nacht bei 20°C exprimiert. Liganden werden nach Supplementierung mit (D,L)-Se-Methionin wie in Abschnitt III. 13. 3. 3 dargestellt exprimiert.

III.14. Reinigung rekombinant hergestellter Proteine

III. 14. 1. Reinigung von BMPR-IA, BMPR-IA^{sf} und BMPR-IA/IB^{Cec}

Die Reinigung von BMPR-IA^{ec}, BMPR-IA^{sf} und BMPR-IA/IB^{Cec} erfolgt in Anlehnung an bereits beschriebene Protokolle (Keller, 2004; Kirsch et al., 2000b).

III. 14. 1. 1. Zellaufschluss und Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Zellen aus der Expressionskultur werden im 2fachen Volumen Auftragspuffer (20mM Tris pH7.9, 500mM NaCl, 20mM Imidazol) bei 4°C resuspendiert. Proteaseaktivität wird durch Zugabe von 40 μ l Protease-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem) verringert. Anschließend wird mit Auftragspuffer auf etwa 120ml aufgefüllt und am Ultraschallgerät in der Rosette unter Eiskühlung in 8 Intervallen mit je 30s Schall und 30s Pause aufgeschlossen (400W, 80% Amplitude). Die unlöslichen Zellbestandteile werden sofort bei 33000xg und 4°C für 45min zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wird dekantiert und sofort weiter verwendet bzw. kurz auf Eis gelagert.

Die NTA-Säule (siehe Tabelle III-11) wird unter Verwendung des Äkta Prime Systems mit Nickel-Ionen beladen, mit dH_2O gewaschen und bei 4°C mit Auftragspuffer äquilibriert. Der Rohextrakt wird bei einer Flussrate von 3ml/min aufgetragen. Nachdem bis zur Konstanz der UV-Absorption mit Auftragspuffer gewaschen wurde, wird das Thioredoxin-Fusionsprotein mit Elutionspuffer (20mM Tris pH7.9, 500mM NaCl, 500mM Imidazol) eluiert. Die einzelnen Elutionsfraktionen

werden mittels SDS-PAGE auf rekombinantes Protein untersucht, die entsprechenden Fraktionen vereinigt, EDTA (250mM Lösung in dH₂O, pH8,0) bis zu einer Endkonzentration von 2,5mM zugesetzt und gegen TNE-Puffer dialysiert (5L, 4°C, ü.N.).

III. 14. 1. 2. Thrombinspaltung

Das Ni-affinitätsgereinigte Protein wird anschließend zur Entfernung von EDTA gegen Thrombin-Spaltpuffer dialysiert (5L, 4°C, 3h) und ein Proteinspektrum zur Bestimmung der Konzentration des Fusionsproteins gemessen. Pro 1mg Thioredoxin-Fusionsprotein werden 0,3U humanes Thrombin (1U/μl in 50% Glycerin, Sigma) eingesetzt. Es wird gut gemischt und für 5h bei 30°C inkubiert. Das Proteingemisch wird dann gegen TN₃₅-Puffer dialysiert (5L, 4°C, ü.N.) Die Ausbeute an aktiver Rezeptor-ECD kann durch anschließende dreitägige Inkubation bei 4°C etwa um den Faktor zwei bis drei gesteigert werden (Weber et al., 2007), vermutlich weil Thioredoxin als Katalysator bei der Umlagerung von Disulfidbrücken im Rezeptor wirken kann. Mittels SDS-PAGE wird auf Vollständigkeit der Spaltung geprüft.

III. 14. 1. 3. Anionenaustauschchromatographie

Die Trennung von Thioredoxin und der jeweiligen Rezeptor-Ektodomäne erfolgt durch Anionenaustauschchromatographie bei leicht basischem pH-Wert. Dazu wird die Säule (EMD TMAE, Merck, siehe Tabelle III-11) mit Puffer A (20mM Tris pH8,0, 35mM NaCl) am Biorad Duoflow System (Tabelle III-12) äquilibriert, der Proteinansatz nach Thrombinspaltung und Inkubation aufgetragen und bis zur Konstanz der UV-Absorption gewaschen. Die Elution mit Puffer B (20mM Tris pH8,0, 1M NaCl) erfolgt unter Anwendung eines NaCl-Gradienten (Tabelle III-17).

Volumen (ml) pro Schritt	Start % Puffer B	Ende % Puffer B	Flussrate	Schritt
10	0	0	2ml/min	Äquilibrieren
variabel	0	0	2ml/min	Injektion des Proteins
45	0	0	2ml/min	Waschen
20	0	15	2ml/min	Gradient
60	15	30	2ml/min	Gradient
10	30	100	2ml/min	Gradient
15	100	100	2ml/min	Gradient
15	100	0	2ml/min	Gradient
10	0	0	2ml/min	Äquilibrieren

Tabelle III-17: Gradient für die Anionenaustauschchromatographie.

Es werden Fraktionen zu 2ml gesammelt, diese mittels SDS-PAGE analysiert und solche mit monomerem BMPR-IA vereinigt. Unter reduzierenden Bedingungen können Thioredoxin und BMPR-IA trotz ihrer fast gleichen Molekulargewichte mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden, nichtreduzierende Bedingungen erlauben die Analyse auf multimere Proteine. Die vereinigten Fraktionen mit monomerer Rezeptor-ECD werden gegen HBSE dialysiert (5L, 4°C, ü.N.).

III. 14. 1. 4. Spaltung mit PreScission-Protease (nur BMPR-IAsf)

Bei der Reinigung von BMPR-IAsf werden die vereinigten Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie mit 10U PreScission-Protease (~130U/ml PreScission-Protease in 20mM Tris pH8,0, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin) pro 1mg rekombinantes

Protein ü.N. (16h) bei 8°C inkubiert. Die Spaltung wird mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen überprüft. Anschließend wird gegen HBSE-Puffer dialysiert.

III. 14. 1. 5. BMP-2 Affinitätschromatographie

Im letzten Reinigungsschritt werden unter Verwendung einer Säule mit immobilisiertem BMP-2 (Tabelle III-11) aktive und inaktive Rezeptor-ECD getrennt. Die BMP-2- Affinitätssäule wird mit HBSE äquilibriert und der Proteinansatz aus dem vorhergehenden Schritt manuell aufgetragen. Die Menge an aufgetragenem Protein orientiert sich an der zuvor ermittelten Bindekapazität der BMP-2-Affinitätssäule, um unnötige Wiederholungen zu vermeiden. Mit Laufpuffer wird bis zur Konstanz der UV-Absorption gewaschen und mit 4M MgCl₂ eluiert (1ml/min). Die Fraktionen werden einzeln am Photometer vermessen, jene mit Protein vereinigt und sofort gegen TN₁₅₀-Puffer (5L, 4°C, ü.N.) dialysiert. Der Dialyseschritt wird mindestens zweimal wiederholt. Gegebenenfalls kann zuletzt gegen PBS-Puffer dialysiert werden, wenn das Protein z.B. biotinyliert werden soll. Die BMP-2 Affinitätssäule wird nach Gebrauch unter Lagerungspuffer (10mM Hepes pH7,4, 150mM NaCl, 3,4mM EDTA, 1mM NaN₃) bei 4 °C aufbewahrt.

Die gereinigte Rezeptor-ECD wird mittels Ultrafiltration eingengt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Reinheit der Rezeptor-ECD wird mittels Massenspektrometrie, HPLC und SDS-PAGE analysiert.

III. 14. 2. Reinigung von BMPR-IBec als Thioredoxin-Fusionsprotein

Die Reinigung von Thioredoxin-fusioniertem BMPR-IBec und den entsprechend in Tabelle III-16 angegebenen Varianten erfolgt ähnlich wie für den BMPR-IAec beschrieben (III. 14. 1.). Der Zellaufschluss, die Nickel-Affinitätschromatographie und die Thrombinspaltung werden analog zu dem für BMPR-IAec beschriebenen Protokoll (III. 14. 1.) durchgeführt. Die der Thrombinspaltung folgende Anionenaustauschchromatographie wird allerdings durch einen Gelfiltrationsschritt ersetzt, an welchen sich eine zweite Ni-Affinitätschromatographie und die BMP-2 Affinitätschromatographie anschließen. Im Folgenden ist das im Rahmen dieser Arbeit modifizierte Reinigungsschema beschrieben.

III. 14. 2. 1. Gelfiltration an Superdex 75 prep grade (16/60)

Die Trennung von BMPR-IBec, BMPR-IBec-Multimeren und Thioredoxin erfolgt anders als bei der Reinigung von BMPR-IAec durch Gelfiltration. Dazu wird der Proteinansatz in TN₃₅-Puffer nach Thrombinspaltung und Inkubation bei 4°C mittels Ultrafiltration auf ein Volumen kleiner als 20ml und eine Konzentration von etwa 8mg/ml eingengt. Anschließend wird gegen Gelfiltrations-Laufpuffer (20mM Tris pH8,0, 500mM NaCl) dialysiert. Die Trennung erfolgt mit der HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säule am Äkta Prime System bei einer Flussrate von 1,5ml/min bei 4°C. Pro Lauf werden 5ml der Proteinlösung über eine Injektionsschleife aufgetragen. Es werden Fraktionen zu 3ml gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen mit monomerem BMPR-IBec sind zu vereinigen und bis zur folgenden Ni-Affinitätschromatographie bei -20°C aufzubewahren. Wichtig ist bei diesem Schritt die Abtrennung der multimeren BMPR-IBec-Spezies, verbleibendes Thioredoxin wird im nächsten Reinigungsschritt abgetrennt.

III. 14. 2. 2. Zweite Ni-Affinitätschromatographie

Durch diesen zusätzlichen Chromatographieschritt wird restliches Thioredoxin entfernt, welches die Bindung von BMPR-IBec an die BMP-2-Affinitätsmatrix beeinträchtigt. Der BMPR-IBec-Ansatz aus der Gelfiltration wird über einen Superloop (Pharmacia) auf die mit Puffer A (20mM Tris pH8,0,

500mM NaCl) äquilibrierte Ni-NTA-Säule am BioRad Duoflow System bei einer Flussrate von 2ml/min aufgetragen. Durch einen Gradienten mit Puffer B (20mM Tris pH8,0, 500mM NaCl, 500mM Imidazol) wird eluiert (Tabelle III-18).

Volumen pro Schritt (ml)	Start % Puffer B	Ende % Puffer B	Schritt
10	0	0	Äquilibrieren
variabel	0	0	Injektion des Proteins
30	0	0	Waschen
70	0	65	Gradient
15	65	100	Gradient
10	100	100	Gradient
10	100	0	Gradient
20	0	0	Äquilibrieren

Tabelle III-18: Gradient für die zweite Ni-Affinitätschromatographie.

Fraktionen mit reinem, monomerem BMPR-IBec werden vereinigt und entweder gegen HBSE-Puffer dialysiert und nur kurz bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert oder gegen TN₁₅₀-Puffer dialysiert und bei -20°C gelagert.

III. 14. 2. 3. BMP-2 Affinitätschromatographie

Im letzten Schritt des Reinigungsprotokolls wird analog zur BMPR-IAec-Reinigung unter Verwendung einer BMP-2 Affinitätssäule aktives, monomeres Protein von inaktivem getrennt.

Nach intensiver Dialyse gegen TN₁₅₀-Puffer wird mittels Ultrafiltration eingeengt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

III. 14. 3. Reinigung von BMPR-IBec als DsbA-Fusionsprotein

Alternativ zur Expression und Reinigung von BMPR-IBec als Thioredoxin-Fusionsprotein wurde ein Protokoll zur Gewinnung von BMPR-IBec als DsbA-Fusionsprotein, das in den periplasmischen Raum von *E.coli* sekretiert wird, etabliert.

III. 14. 3. 1. Zellaufschluss und Ni-Affinitätschromatographie

Für den Zellaufschluss mittels osmotischen Schocks wird das Zellpellet (III. 13. 3. 2) aus 1,6l TB-Medium vorsichtig in 200ml kaltem Puffer 1 (30mM Tris pH7,0, 20% Sucrose, 1mM EDTA) resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wird zentrifugiert (11000xg, 20min, 4°C) und das Pellet in 300ml Puffer 2 (5mM MgSO₄) mit 40µl Protease-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem) aufgenommen. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wird die Suspension zentrifugiert (11000xg, 20min, 4°C). Der Überstand enthält das DsbA-BMPR-IBec Fusionsprotein und wird bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die Proteinlösung wird durch Zugabe von 10fach konzentriertem Tris-Puffer (200mM Tris pH7,9, 1,5M NaCl) gepuffert und 4ml im gleichen Puffer äquilibrierte und suspendierte Ni-NTA-Matrix (Qiagen) zugegeben. Zur Bindung des Fusionsproteins an die Matrix wird eine Stunde bei 4°C geschwenkt. Über eine Econo-Säule (Biorad) wird die Ni-NTA-Matrix von der Lösung getrennt. Das Gelbett wird im Batch-Verfahren ohne Pumpe mit 60ml Waschpuffer behandelt (20mM Tris pH7,9, 500mM NaCl, 20mM Imidazol). Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mit 20mM Tris pH7,9, 500mM NaCl, 500mM Imidazol in Fraktionen zu 6ml. Die Elutionsfraktionen, der Rohextrakt, der

Säulendurchlauf und die Waschfraktion werden mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen mit Fusionsprotein werden vereinigt, mit 2,5mM EDTA versetzt und gegen TNE-Puffer dialysiert (5L, 4 °C, ü.N.).

III. 14. 3. 2. Thrombinspaltung

Die Proteinlösung wird gegen Thrombin-Spaltpuffer dialysiert (5L, 4°C, 3h) und die Konzentration bestimmt. Pro 1mg Fusionsprotein werden 0,3U Thrombin (Sigma) zur Proteinlösung gegeben, gut gemischt und 5h bei 30°C inkubiert. Direkt an die nachfolgende Dialyse gegen TN₃₅-Puffer (5L, 4 °C, ü.N.) schließt sich die Anionenaustauschchromatographie an.

III. 14. 3. 3. Anionenaustauschchromatographie

Die Trennung von BMPR-IBec und DsbA erfolgt durch Verwendung einer EMD-TMAE-Ionenaustauschsäule (Merck). Trotz des unterschiedlichen Molekulargewichts von DsbA und BMPR-IBec konnten beide Proteine nicht durch Gelfiltration getrennt werden, was auf nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen hinweist. Der große Unterschied in den berechneten Werten für den isoelektrischen Punkt (BMPR-IBec: pI = 5,56, DsbA: pI = 6,75; zum Vergleich Thioredoxin: pI = 6,01) ermöglicht jedoch eine gute Trennung am Anionenaustauscher. Bei pH=8,0 bindet allein BMPR-IBec, nicht jedoch DsbA an das Säulenmaterial. Die Durchführung des Chromatographieschritts sowie der angewendete NaCl-Gradient zur Elution des gebundenen BMPR-IBec gleicht dem in III. 14. 1. für BMPR-IAec vorgestelltem Protokoll. Die Elutionsfraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert und solche mit monomerem BMPR-IBec vereinigt. Der so gereinigte BMPR-IBec wird gegen PBS-Puffer dialysiert, eingengt und bei -20°C gelagert.

III. 14. 4. Reinigung von AR-IIBec als Thioredoxin-Fusion

Die Schritte zur Reinigung von ActR-IIB lehnen sich an das bereits in Abschnitt III. 14. 1. für den BMPR-IA beschriebene Verfahren an und sind anderswo detailliert wiedergegeben (Weber et al., 2007). Alternativ zur BMP-2-Affinitätschromatographie wird hierbei über eine RP-HPLC fraktioniert und der Rezeptor zur Lagerung lyophilisiert.

III. 14. 5. Reinigung von GDF-5

Wildtypisches BMP-2 als auch GDF-5 wurden von Prof. W. Sebald und Dr. J. Nickel zur Verfügung gestellt. Selenomethionin-markiertes Protein als auch die physiologisch relevanten Varianten von GDF-5 wurden indes im Rahmen der Arbeit in Anlehnung an existierende Protokolle hergestellt (Mueller et al., 2005; Ruppert et al., 1996). Dazu wird wie in III. 13. 3. 3 und III. 13. 3. 5 beschrieben exprimiert und die Zellen geerntet. Das Zellpellet aus 2,4L TB-Medium (10-12g Zellnassgewicht) wird mit Hilfe eines Pinsels in 150ml TBSE-Puffer unter Zugabe von 1/500 (v/v) β-ME resuspendiert und anschließend zentrifugiert (4500xg, 15min, 4°C). Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt und zuletzt im fünffachen Volumen TBSE-Puffer plus 1/500 (v/v) β-ME aufgenommen. Die Zellsuspension kann entweder bei -80°C gelagert werden oder wird sofort weiter verwendet.

III. 14. 5. 1. Zellaufschluss

Das Volumen der Zellsuspension wird mit TBSE-Puffer auf 120ml gebracht. Die Zellen werden in einer Rosette durch Ultraschall (300W, 80% Amplitude, 5min ohne Pause, Eiskühlung) lysiert und die Suspension zentrifugiert (22000xg, 30min, 4°C). Der Überstand wird verworfen und die pelletierten, unlöslichen Zellbestandteile erneut mit dem Pinsel in 120ml TBSE-Puffer plus 1/200 β-ME resuspendiert. Der Ultraschallaufschluß wird wiederholt und erneut zentrifugiert (siehe oben).

Die dunkelgrau gefärbten Einschlusskörper werden im 25fachen Volumen (v/w) an 50mM NaOAc pH4,5, 1mM EDTA, 0,6M GuHCl, 1/200 β -Mercaptoethanol aufgenommen und 15min bei RT gerührt. Anschließend wird zentrifugiert (22000xg, 30min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet mit den gereinigten Einschlusskörpern unter langsamen Rühren im 10fachen Volumen (v/w) an 50mM NaOAc pH4,5, 1mM EDTA, 6M GuHCl, 1/200 β -Mercaptoethanol gelöst (RT, ü.N.). Die Lösung kann entweder bei -80 °C gelagert werden oder wird zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen (38000xg, 45min, 4°C). Der dunkelfarbige Überstand ist mittels Ultrafiltration (YM3-Membran) auf 10ml einzuengen.

III. 14. 5. 2. Gelfiltration des Rohextrakts

Die eingeeengte Lösung mit denaturiertem GDF-5 wird erneut zentrifugiert (s.o.) und wenn nötig vor dem Auftrag auf die Gelfiltrationssäule filtriert. Die Säule (Sephacryl 200 HR, Tabelle III-11) wird bis zur Konstanz der UV-Absorption bei 280nm mit Laufpuffer (50mM NaOAc pH4,5, 1mM EDTA, 6M GuHCl) bei einer Flussrate von 2ml/min gewaschen und anschließend 5ml des denaturierten Proteinansatzes über eine Injektionsschleife aufgetragen. Es werden Fraktionen zu 3ml gesammelt und am Spektrophotometer vermessen. Fraktionen mit einem Proteinspektrum (Absorptionsmaximum bei 270-280nm) können vereinigt (meist Fr. 11-25) und für kurze Zeit bei 4°C gelagert werden. Um oxidative Prozesse im Protein zu vermeiden, kann, insbesondere bei Se-Met markierten GDF-5, zusätzlich 1mM DTT zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert werden.

III. 14. 5. 3. Renaturierung von GDF-5

Nach Einengen des Gelfiltrationsansatzes auf $\sim 20OD_{280}/ml$ wird der Renaturierungspuffer (2M LiCl, 50mM Tris pH8,0, 5mM EDTA, 33mM CHAPS, 2mM GSH, 0,5mM GSSG) frisch zubereitet und auf 14°C temperiert. Die Menge des Renaturierungspuffers richtet sich nach dem Volumen und der Konzentration des rückzufaltenden Proteins. Im Renaturierungspuffer sollte die Proteinkonzentration maximal 0,2OD₂₈₀/ml, besser jedoch 0,1OD₂₈₀/ml, betragen, was einer 100-200fachen Verdünnung entspricht. Gleichzeitig darf die Konzentration von GuHCl im Renaturierungspuffer 60mM nicht überschreiten. Das Redoxpaar GSH/GSSG wird erst kurz vor der Verwendung des Puffers zugegeben. Das denaturierte Protein wird über eine Säule langsam in den moderat gerührten Puffer getropft und der Renaturierungsansatz 8-10d bei 14°C inkubiert.

III. 14. 5. 4. Kationenaustauschchromatographie

Nach der Rückfaltung, deren Fortschritt mittels SDS-PAGE beobachtet werden kann, wird der pH-Wert der Renaturierungslösung mit verdünnter Salzsäure auf pH=3 eingestellt und entweder mittels Ultrafiltration (Amicon YM3-Membran, 4°C) oder Oberflächenfiltration (Crossflow, Vivascience, RT) auf mindestens 100ml eingeeengt. Die konzentrierte Lösung wird mehrmals gegen 1mM HCl dialysiert (5L, 4°C, ü.N.), um die Komponenten des Renaturierungspuffers zu entfernen.

Die Chromatographiesäule mit EMD-SO₃⁻-Matrix (Merck) wird an der Äkta Prime mit Puffer A (20mM NaOAc pH4,5, 30% Isopropanol) bei RT und einer Flussrate von 3ml/min äquilibriert. Der Proteinlösung wird Isopropanol mit einer Endkonzentration von 30% (v/v) sowie NaOAc pH4,5 mit einer Endkonzentration von 20mM zugegeben und gut vermischt. Anschließend wird zentrifugiert (3000xg, 20min, 4°C), um unlösliche Bestandteile wie z.B. DNA abzutrennen. Der Überstand kann direkt auf die Säule gegeben werden. Der Durchfluss wird gesammelt und die UV-Absorption bei 280nm verfolgt, welche nach Auftragen des Proteins und Waschen mit Puffer A einen konstanten Wert erreicht haben sollte. Die Elution erfolgt mit einem NaCl-Gradienten durch Mischung von Puffer A mit Puffer B (20mM NaOAc pH4,5, 30% Isopropanol, 2M NaCl) (Tabelle III-19).

Volumen pro Schritt (ml)	Start % Puffer B	Ende % Puffer B	Schritt
50	100	0	Äquilibrieren
variabel	100	0	Injektion
100	0	50	Gradient
15	50	50	Gradient
50	50	100	Gradient
50	100	100	Gradient
50	100	0	Äquilibrieren

Tabelle III-19: Gradient für die Kationenaustauschchromatographie mit GDF-5.

Dimeres GDF-5 eluiert bei einer NaCl-Konzentration von 1M, möglicherweise vorhandenes monomeres GDF-5 bei etwa 0,8M NaCl. Die Fraktionen werden mittels SDS-PAGE (nichtreduzierend) analysiert und solche mit dimeren Protein vereinigt. Zur Proteinlösung gibt man das gleiche Volumen 1mM HCl, mischt und dialysiert zweimal gegen 1mM HCl (5L, 4°C, ü.N.) und zweimal gegen dH₂O (5L, 4°C, ü.N.). Das Protein wird eingengt (Amicon YM3-Membran), aliquotiert und lyophilisiert. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

III.15. Präparation von Ligand-Rezeptor-Komplexen

III. 15. 1. Binäre GDF-5•BMP Typ I Rezeptor -Komplexe

Zur Herstellung der binären Komplexe zwischen GDF-5 und BMPR-IA/IB^cec bzw. BMPR-IBec wird der Rezeptor in zweifach konzentriertem HBS-Puffer vorgelegt und der Ligand unter starkem Mischen (vortexen) zugegeben. Lyophilisiertes GDF-5 wird entweder in dH₂O oder alternativ in 1 mM HCl gelöst. Der jeweilige Rezeptor ist wie in III.14. beschrieben in TN₁₅₀-Puffer gelöst. Pro Ansatz werden 44nmol Rezeptor mit 4fach konzentriertem HBS-Puffer und dH₂O auf eine dem 2fach konzentriertem HBS-Puffer entsprechende Konzentration (20mM Hepes pH7,4, 1M NaCl) gebracht. Unter Vortexen der Rezeptorlösung werden pro Ansatz 20nmol GDF-5 zugegeben und 20min bei RT inkubiert. Die Proteinkomplex-Lösung wird zentrifugiert (3000xg, 15min, 4°C) und der Überstand durch Ultrafiltration in Zentrifugalfiltrerröhrchen auf ein Volumen von 250µl eingengt. Überschüssiger Rezeptor wird durch Gelfiltration an einer Superdex 75 HR10/30-Säule (Flussrate: 0,5ml/min, Puffer: HBS) abgetrennt. Die Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert, solche mit dem Proteinkomplex vereinigt und die Proteinkonzentration ermittelt. Bis zur Kristallisation oder Präparation eines ternären Komplexes wird die Proteinlösung bei 4°C aufbewahrt.

III. 15. 2. Binäre BMP-2•BMP Typ I Rezeptor -Komplexe

Die Herstellung von binären Komplexen aus BMP-2 und (¹⁵N-markiertem) BMPR-IAec bzw. BMPR-IAsf erfolgte in 10mM MES pH6,0, 700mM NaCl mit oder ohne 0,2% (v/v) CHAPS. Zur Präparation wurden 30nmol BMP-2 in dH₂O mit 66nmol BMPR-IA gemischt und anschließend wie in III. 15. 1. beschrieben vorgegangen. Nach der Gelfiltration wird gegen NMR-kompatiblen Puffer bestehend aus 25mM Na₂HPO₄ pH6,6, 50mM NaCl, 0,2% (v/v) CHAPS dialysiert (Ilangovan et al., 2004) und zur NMR-Analyse auf die gewünschte Konzentrationen eingengt.

III. 15. 3. Ternäre GDF-5•BMP Typ I Rezeptor•BMP Typ II Rezeptor -Komplexe

Die Herstellung des ternären Ligand-Rezeptor-Komplexes zwischen GDF-5, BMPR-IBec und ActR-IIBec erfolgt mit dem aus III. 15. 1. erhaltenen binären Komplex. Lyophilisierter ActR-IIBec wird in HBS-Puffer gelöst. Die 2,1fache Stoffmenge ActR-IIBec wird mit binärem Komplex gemischt und die Lösung für 20min bei RT inkubiert. Mittels Ultrafiltration wird auf 250µl eingengt. Überschüssiger ActR-IIBec wird durch Gelfiltration (siehe III. 15. 1.) abgetrennt, die Fraktionen mit ternärem Komplex vereinigt und die Proteinlösung bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

III.16. Kristallisation der Proteinkomplexe

Die anfängliche Kristallisation der Ligand-Rezeptor-Komplexe erfolgt auf Basis von empirisch gefundenen Pufferbedingungen, welche als „Sparse-Matrix-Screens“ (Cudney et al., 1994; Jancarik and Kim, 1991) beispielsweise von Hampton Research, Qiagen, oder Molecular Dimensions erhältlich sind. Pufferbedingungen, mit denen Proteinkristalle gezüchtet werden können, werden anschließend in mehreren Dimensionen (pH-Wert, Salzkonzentration, Proteinkonzentration, Additive, Temperatur) verfeinert, um die Qualität (Größe, Aussehen) der Proteinkristalle zu verbessern. Die Kristallisation erfolgt durch Dampfdiffusion (engl. vapor diffusion). Hierbei steigt durch Diffusion von Wasserdampf die Fällungsmittelkonzentration in einem aus Proteinlösung und Fällungsmittel bestehendem Proteintropfen sehr kleinen Volumens, bis im Gleichgewicht die Fällungsmittelkonzentration der korrespondierenden Pufferlösung großen Volumens erreicht ist (Abbildung III-1, S. 51). Durch diesen Prozess wird neben der Fällungsmittelkonzentration auch die Proteinkonzentration erhöht, was zu einer Übersättigung der Lösung mit Proteinmolekülen führt. In diesem Zustand der Übersättigung kommt es zur Bildung von Molekülaggregaten, welche als Kristallisationskeime fungieren. Durch lokale Verringerung der Proteinkonzentration wird ein metastabiler Zustand erreicht, aus welchem Kristallisationskeime langsam zu Kristallen heranwachsen bis sich ein Sättigungsgleichgewicht einstellt. Schematisch kann dies durch ein Phasendiagramm veranschaulicht werden (Abbildung III-1, S. 51).

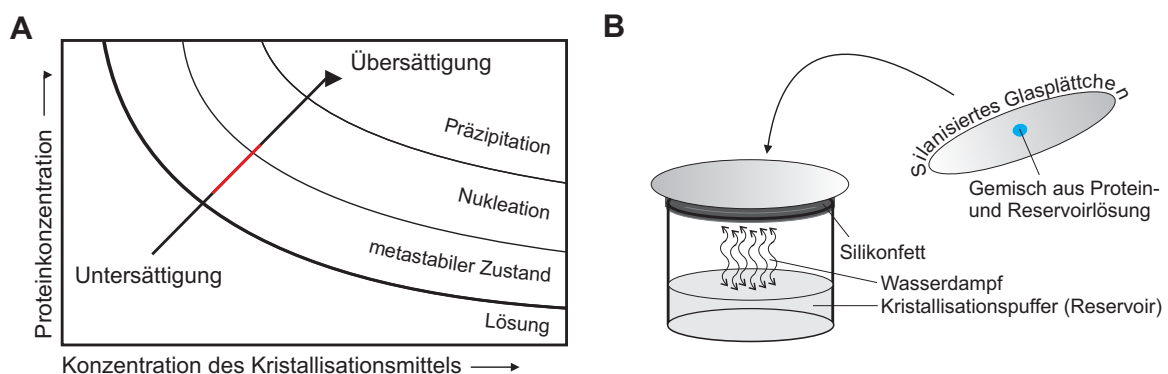


Abbildung III-1: Schematisches Phasendiagramm eines Proteins (A) und schematische Darstellung eines Kristallisationsansatzes (B). **A:** Kristallwachstum findet in der rot markierten Zone in der Nähe der Sättigungskurve (dicke Linie) statt. **B:** Kristallisationsansatz am Beispiel des hängenden Tropfens („hanging drop“). Durch das Mischen von Proteinlösung und Reservörlösung auf dem Glasplättchen wird letztere verdünnt. Gegenüber dem Reservoir entsteht ein Konzentrationsgefälle, das durch die Diffusion von Wasserdampf und volatilen Pufferbestandteilen langsam ausgeglichen wird. Dadurch erhöht sich langsam die Proteinkonzentration im Tropfen, was zur Nukleation und schließlich Kristallisation des Proteins führt (siehe Phasendiagramm).

III. 16. 1. Proteinlösungen für die Kristallisation

Vor der Kristallisation wird die Proteinlösung mit binärem Komplex (III. 15. 1.) oder ternärem Komplex (III. 15. 3.) mittels Ultrafiltration auf Konzentrationen zwischen 4mg/ml und 10mg/ml eingeeengt und zentrifugiert (13200xg, 15min, 4°C). Die Lagerung erfolgt bei 4°C. Vor dem Ansetzen von Kristallisationsscreens wird erneut wie beschrieben zentrifugiert.

III. 16. 2. Empirische Kristallisationsbedingungen

„Sparse-Matrix-Screens“ werden nach der „Sitting Drop“-Methode (Abb.) angesetzt. Dazu werden 200µl Pufferlösung („Reservoirlösung“) in die Kammer einer 96-Well-Kristallisationsplatte (CrystalQuick Plate, Greiner) pipettiert. Anschließend wird 1µl der Proteinlösung in das mittlere Nöpfchen des erhöhten Sockels in der Kammer pipettiert und mit 1µl der Reservoirlösung gemischt. Die Kristallisationsplatte wird abschließend mit Abdeckfolie (AMPLIseal, Greiner) luftdicht verschlossen. Folgende Screens werden verwendet: Crystal Screen I und II, Crystal Screen LITE, Index Screen, Salt Screen, Cryo Screen, PEG-Ion Screen (alle Hampton Research). Zusätzlich werden einzelne Pufferbedingungen durch Einsatz von Additiven optimiert, indem der Proteintropfen aus 1µl Proteinlösung und 0,8µl Pufferlösung mit 0,2µl Additivlösung aus den Additive Screens 1-3 (Hampton Research) versetzt wird. Bei flüchtigen Additiven werden 180µl Reservoirlösung mit 20µl Additivlösung gemischt und zur Kristallisation 1µl dieser Mischung mit 1µl Proteinlösung versetzt. Die Kristallisationsansätze werden bei RT inkubiert und in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

III. 16. 3. Verfeinerung von Kristallisationsbedingungen

Die Verfeinerung von Kristallisationsbedingungen („Fine-Screens“) erfolgt in 24-Well-Kristallisationsplatten (XRL plate, Molecular Dimensions) mit der „Hanging Drop“-Methode (Abbildung III-1, S. 51). Dazu wird jedes Well mit 1ml der jeweiligen Pufferbedingung gefüllt und die Ränder der Vertiefungen mit hochviskosem Silikonfett (Baysilone-Paste, Bayer) versehen. Auf silanisierten Glasplättchen (Siliconized Circle Cover Slides, Hampton Research) werden jeweils 1µl Proteinlösung und 1µl Pufferlösung vermischt und die Glasplättchen mit dem Tropfen zur Reservoirlösung zeigend auf die gefetteten Löcher der Kristallisationsplatte gelegt. Durch vorsichtiges Andrücken des Glasplättchens wird der Kristallisationsansatz luftdicht verschlossen und erschütterungsfrei bei RT im Klimaschrank gelagert. Das Wachstum der Kristalle wird in regelmäßigen Abständen beobachtet, um den Zeitpunkt und Fortgang der Kristallbildung zu erfassen.

Die in den „Fine-Screens“ verwendeten Kristallisationspuffer werden manuell aus den Einzelkomponenten zusammengestellt. Dazu werden Stammlösungen angesetzt, deren Konzentration sich aus der Löslichkeit der jeweiligen Chemikalie ergibt. Puffersalze werden als 1M Lösungen hergestellt und mit einer Endkonzentration von 0,1M im Reservoirpuffer verwendet. Der pH-Wert der Reservoirlösung wird durch Zugabe von 1N Base oder 1N Säure eingestellt. Deren Volumen ergibt sich aus Titrationskurven (Hampton Research). Anderenfalls wird der pH-Wert der Puffersalz-Stammlösungen durch Titration mit dem entsprechenden Gegenion am pH-Meter eingestellt und dieser nach Verdünnung der Puffersalz-Stammlösung erneut kontrolliert.

III. 16. 4. Kristallisation bei gleichzeitiger *in situ* Proteolyse

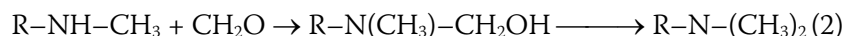
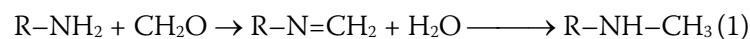
Um die Beugungseigenschaften von Proteinkristallen des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes zu verbessern, wurden dem Kristallisationstropfen verschiedene Proteasen zugesetzt. Diese schneiden flexible, extern zugängliche Bereiche im Proteinkomplex und stellen so eine Möglichkeit dar, neue Kontakte zwischen den einzelnen Proteinkomplex-Molekülen im Kristall (Kristallkontakte) zu erzeugen. Durch eine bessere Anordnung der Moleküle im Kristall lässt sich so möglicherweise eine neue Kristallform erzeugen, aber auch die Streukraft des Proteinkristalls erhöhen.

Zunächst werden Aliquots des in HBS-Puffer gelösten GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes mit Trypsin, Subtilisin und Subtilisin A (Subtilisin Carlsberg) (alle Sigma-Aldrich) verdaut. Die Stammlösungen der Proteasen haben eine Konzentration von 1mg/ml, Lösungsmittel ist der vom Hersteller angegebene Puffer. Die Protease-Stammlösungen werden mit dH₂O auf 10µg/ml verdünnt und in drei Ansätzen jeweils 5µl dieser Proteaselösung mit 8µl HBS-Puffer und 8µl GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexlösung (6,3mg/ml; 50,4µg) vermischt. Das Mischungsverhältnis entspricht ungefähr einem Kristallisationsansatz von 2:2:1 (Protein:Puffer:Protease); das Masseverhältnis von Protein zu Protease ist etwa 1 zu 1000. Nach 15, 30, 60, 120, 240, 360min sowie 20h werden je 3µl des Reaktionsansatzes in 10µl Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen und sofort kurz aufgekocht, dann bei -20°C gelagert. Anschließend wird mittels SDS-PAGE auf die Gegenwart stabiler Spaltprodukte geprüft.

Zur Kristallisation wird der Proteintropfen wie beschrieben angesetzt, jedoch zusätzlich 10ng Subtilisin (10µg/ml Lösung in dH₂O) zugegeben. Abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration bzw. vom in den Tropfen pipettierten Proteinvolumen kann das Masseverhältnis Protein zu Protease zwischen 1:500 und 1:4000 schwanken. Alternativ wird der GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex in HBS-Puffer präparativ mit Subtilisin verdaut, über Gelfiltrationschromatographie gereinigt (III. 15. 1.), die Fraktionen mit binärem Komplex isoliert, eingengt und der so erhaltene „verkürzte“ Komplex der Kristallisation zugeführt.

III. 16. 5. Methylierung von Proteinkomplexen

Die selektive Methylierung von Lysin-Resten an der ε-Aminogruppe kann angewendet werden, um die Oberflächeneigenschaften von Proteinen zu verändern und damit die Beugungseigenschaften von entsprechenden Proteinkristallen vermutlich durch eine geordnetere Molekülpackung deutlich zu verbessern (Kobayashi et al., 1999; Kurinov et al., 2000; Rypniewski et al., 1993; Schubot and Waugh, 2004). Dabei reagieren primäre Amine mit Formaldehyd unter Bildung einer Schiff-Base, welche durch ein geeignetes Reduktionsmittel reduziert wird. Die Reaktion mit Formaldehyd führt weiter zum di-methylierten Produkt:



Die reduktive Methylierung des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes wird in Anlehnung an publizierte Protokolle durchgeführt (Rayment, 1997). Für die Reaktion werden eine 1M Formaldehyd-Lösung und eine 1M Dimethylaminboran (DMAB, Fluka)-Lösung in dH₂O benötigt. Beide Lösungen werden frisch hergestellt. Die Formaldehyd-Lösung erhält man durch Erhitzen von 30mg Paraformaldehyd (PFA) in 1ml dH₂O mit 3µl 4M K₂HPO₄ auf 60°C. Nachdem die Lösung klar geworden ist, werden 4µl 2M NaH₂PO₄ zugegeben, was dann zu einem 20mM Phosphatpuffer führt. Der gereinigte GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex ist zu 1mg/ml in HBS-Puffer gelöst und wird

vorgelegt. Formaldehyd wird in 20fachem Überschuss (x) bezüglich der freien Aminogruppen (n_{Lysine}) im Komplex eingesetzt. Das Volumen 1M Formaldehyd-Lösung berechnet sich wie folgt:

$$V_{\text{Formaldehyd}} = m_{\text{Komplex}} \cdot x \cdot n_{\text{Lysine}} / (M_{\text{Komplex}} \cdot c_{\text{Formaldehyd}})$$

mit $x=20$, $n_{\text{Lysine}}=20$, $M_{\text{Komplex}}=54914\text{g/mol}$

Die DMAB-Menge beträgt 50% der Formaldehyd-Menge für die zweistündige Inkubation und 25% der Formaldehyd-Menge für die ü.N.-Inkubation.

Zu 224 μl 1mg/ml Komplexlösung werden nacheinander 1 μl DMAB-Lösung und 1,6 μl Formaldehydlösung gegeben, jeweils gemischt und 2h bei 4°C inkubiert. Erneut werden 1 μl DMAB-Lösung und 1,6 μl Formaldehydlösung zugegeben und 2h bei 4°C inkubiert. Anschließend werden 0,5 μl DMAB-Lösung zugegeben und ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Reaktionslösung wird mit 10mM Tris pH7,4, 500mM NaCl gewaschen, indem in dreimaliger Wiederholung in Zentrifugalfiltrerröhrchen eingeeengt und mit Puffer aufgefüllt wird. Zuletzt wird in HBS-Puffer umgepuffert und die Kristallisation angesetzt.

III. 16. 6. Chemische Vernetzung von Proteinkristallen

Um die Stabilität von Proteinkristallen zu erhöhen, können die einzelnen Moleküle im Kristall mit Glutaraldehyd chemisch vernetzt werden (engl. Cross-link) (Quiocho and Richards, 1964). Zum einen werden Proteinkristalle dadurch toleranter gegenüber Waschvorgängen, z.B. in Puffern mit erhöhtem Gehalt an Gefrierschutzmittel, oder Dehydrierungsexperimenten, zum anderen werden flexible Regionen im Kristall stabilisiert. Zudem kann eine Unordnung des Kristallgitters beim Einfrieren der Kristalle in flüssigem Stickstoff („flash freezing“) vermieden werden.

Zur chemischen Vernetzung werden Mikrobrücken mit Vertiefungen (Hampton Research) in die Kammern einer 24-Well-Kristallisationsplatte gestellt und die Kammern mit 1ml Kristallisationspuffer gefüllt, wobei letzterer der jeweiligen Original-Reservoirlösung entspricht. Die Vertiefung der Mikrobrücke wird mit 10 μl 25% (v/v) wässrigem Glutaraldehyd (Sigma) aus einer frisch geöffneten Ampulle befüllt. Das Glasplättchen mit dem Proteintropfen und darin enthaltenen Kristallen wird vorsichtig von der Original-Kristallisationsplatte gehoben und auf die Kammer mit der Mikrobrücke gesetzt. Anschließend wird 1h bei RT inkubiert, wobei die Atmosphäre der Kammer mit Glutaraldehyd gesättigt wird. Die Original-Kammer wird zwischenzeitlich mit einem neuen Glasplättchen verschlossen. Nach der Inkubation wird das Glasplättchen mit dem Proteintropfen auf eine Kammer mit frischer Reservoirlösung gleicher Zusammensetzung wie die Original-Reservoirlösung gesetzt.

III. 16. 7. Weitere Methoden zur Verbesserung der Beugungseigenschaften von Proteinkristallen

Die schrittweise Verringerung des Lösungsmittelgehalts von Proteinkristallen kann zu einer Umordnung des Kristallgitters und möglicherweise besseren Beugungseigenschaften führen. Dazu eignen sich mehrere Methoden, bei denen einzelne Proteinkristalle entweder für einige Minuten direkt in Pufferlösungen mit schrittweise erhöhtem Präzipitansgehalt gewaschen oder die Proteinkristalle im Originaltropfen für einige Stunden über neuen Reservoirlösungen mit erhöhtem Präzipitansgehalt äquilibriert werden (Heras and Martin, 2005). Das Einfrieren von Proteinkristallen zur Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten erfordert Gefrierschutzmittel (engl. „cryo protectants“), um die Wassermoleküle in einen glasartigen oder amorphen Zustand zu überführen, der mit der Röntgenbeugung des Proteinkristallgitters nicht interferiert. Konnten Proteinkristalle nicht unter

Zusatz von Gefrierschutzmittel im Kristallisationspuffer erzeugt werden, muss vor dem Einfrieren gewaschen werden (engl. „soaking“). Dazu werden Pufferlösungen angesetzt, welche bis auf den in 5-10%-Schritten steigenden Gefrierschutzmittelgehalt der Zusammensetzung der Reservoirlösung entsprechen. Der letztlich erforderliche Gehalt an Gefrierschutzmittel wird experimentell durch Einfrieren des Puffers ermittelt, wobei der Tropfen in der Schleife glasklar bleiben sollte. Der Proteinkristall wird dann sukzessive für einige Minuten in den verschiedenen Pufferlösungen gelagert und anschließend schock-gefroren. Für die jeweilige Pufferbedingung geeignete Gefrierschutzmittel müssen experimentell ermittelt werden und orientieren sich an der Zusammensetzung der originalen Pufferbedingung. Beipielsweise eignen sich für Polyalkoholhaltige Kristallisationsbedingungen niedermolekulare PEGs ab Konzentrationen von 25% (w/v) sowie Glucose, Sucrose oder Glycerin und andere Alkohole ab Konzentrationen von 35% (w/v) und für salzhaltige Kristallisationsbedingungen hoch konzentrierte LiCl-, NaCl- oder Na-Malonatlösungen. Entsprechende Stammlösungen können dem CryoPro-Kit (Hampton Research) entnommen werden. Proteinkristalle sollten durch das Waschen keine Risse bekommen, stark schrumpfen oder Auflösungserscheinungen zeigen. Kleinere Eiskristalle auf der Oberfläche des glasartigen Tropfens mit dem Kristall in der auf dem Goniometer montierten Kristallisationsschleife können durch einen Auftau-/ Gefrierzyklus beseitigt werden. Bei manchen Kristallen führt dies zusätzlich zu einer verbesserten Qualität der Beugungsdaten (engl. „crystal annealing“) (Harp et al., 1999). Dazu wird der -180°C kalte Stickstoffstrom mit einem kleinen Stück Pappe für wenige Sekunden blockiert. Der Tropfen mit dem Kristall taut so kurz auf und wird sofort wieder eingefroren.

III.17. Röntgendiffraktometrie

III. 17. 1. Messung von Röntgenbeugungsdaten

III. 17. 1. 1. Drehanodenanlage

Röntgenbeugungsdaten werden an einer hausinternen Drehanodenanlage (Rigaku), ausgestattet mit einer MicroMax-007 Röntgenquelle (Cu-Drehanode mit K_{α} -Strahlung einer Wellenlänge von 1,54 Å), Osmic VariMax HR Spiegeln, einem R-AXIS IV++ Bildplattendetektor, einer X-Stream 2000 Kühlanlage zur Produktion von -180°C kaltem Stickstoff und CrystalClear-Software zur Datenprozessierung, aufgenommen. Proteinkristalle werden mit auf Kupferpins mit magnetisierbarer Basis befestigten Nylonschleifen geeigneter Größe (CrystalCap Copper, Hampton Research) aus dem Kristallisationstropfen entnommen und in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Die Gefrierfähigkeit der Proteinkristalle muss vorher durch Einfrieren des Kristallisationstropfens getestet werden. Falls die Lösung im gefrorenen Zustand eine Trübung zeigt, werden, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, aus Reservoirlösung und Stammlösungen von Gefrierschutzmitteln neue Pufferlösungen mit steigendem Gefrierschutzmittelgehalt hergestellt. Der Proteinkristall wird sukzessive in diesen Lösungen inkubiert und anschließend eingefroren. Die Befestigung der Kupferpins erfolgt auf der magnetischen Basis eines invers montierten Phi-Achsen-Goniometers. Anschließend wird der Kristall auf den Focus des Röntgenstrahls zentriert.

Um auf die Röntgenbeugung von Kristallen zu testen, wird für 180s bis 300s bei gleichzeitiger 1°-Rotation des Kristalls um die Goniometerwinkel $\varphi=0^{\circ}$ und $\varphi=90^{\circ}$, gegebenenfalls auch $\varphi=180^{\circ}$ und $\varphi=270^{\circ}$, mit Röntgenstrahlung belichtet. Beugen die Proteinkristalle mit einer Auflösung von kleiner als 3,2Å, lohnt die Messung eines Datensatzes. Anderenfalls lassen sich die aus der Testmessung nur

die Gitterkonstanten und die Raumsymmetrie bestimmen. Nach Indexierung des initialen Beugungsmusters und Ermittlung einer Strategie zur Aufnahme eines möglichst kompletten, mehrfach redundanten Datensatzes können die Beugungsdaten bei einer Schrittweite von $\Delta\varphi=0,5^\circ$ bis $\Delta\varphi=1^\circ$ und einer Belichtungsdauer von 6min bis 15min gemessen werden.

III. 17. 1. 2. Synchrotron

Am Synchrotron können abhängig vom jeweiligen Proteinkristall Daten mit etwas höherer Auflösung als an der Drehanodenanlage gemessen werden. Besonders für kleine Kristalle eignet sich der am Synchrotron stark fokussierte Röntgenstrahl, weil dadurch ein niedrigeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht wird. Zusätzlich können die Proteinkristalle mit Röntgenstrahlung benutzerdefinierter Wellenlänge analysiert werden, was die Messung anomaler Daten ermöglicht. Die Datenaufnahme erfolgt am BESSY (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m.b.H., Berlin) an den Messstationen BL14.1 und BL14.2 und an der SLS (Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz) an der Messstation PX-I (X06SA). Einige Charakteristika der Strahlenquellen sind in Tabelle III-20 wiedergegeben.

Die Datenaufnahme am Synchrotron erfolgt bei -180°C , nachdem die initialen Beugungsreflexe mit dem Programm MOSFLM (Leslie, 1992) zur Berechnung einer Datenaufnahmestrategie indexiert wurden. Für MAD- (Multiwavelength Anomalous Dispersion-) Experimente wird bei drei Wellenlängen gemessen, wobei mit der Aufnahme des „peak“-Datensatzes begonnen wird und sich die „inflection“- und „remote“-Datensätze in dieser Reihenfolge daran anschließen. Als anomal streuendes Atom wird Selen in das Protein eingebaut (III. 13. 3. 5), dessen genaue, proteinspezifische K_α -Absorptionskante durch einen Fluoreszenzscan entlang des erwarteten Wellenlängenbereichs mit dem Programm CHOOCH (Evans and Pettifer, 2001) bestimmt wird (IV. 6. 1. 1). Die jeweiligen Wellenlängen und Messparameter sind in den Statistiktabellen der Datensätze im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Strahlenquelle	BESSY BL14.1	SLS PX I	Micromax-007
Energiebereich [keV]	5,5-15,5	5,7-17,5	8,0
Photonenfluss [Photonen (0,1A s) ⁻¹] ^a	$1,4 \cdot 10^{11}$ (13,5keV)	$> 5 \cdot 10^{11}$ (12,4keV)	$3,9 \cdot 10^9$
Energieauflösung [eV]	< 2 (bei 9keV)	< 2 (bei 9keV)	-
Focus horizontal x vertikal [μm]	174 x 214	85 x 10	\varnothing 208
Belichtungszeit [s]	3-20s	1s	60-1800

^a Photonenfluss bezogen auf den Strahlendurchmesser.

Tabelle III-20: Charakteristika der verwendeten Strahlenquellen.

III. 17. 2. Prozessierung und Analyse von Röntgenbeugungsdaten

Die an der hausinternen Drehanodenanlage gemessenen Daten werden mit der Software CrystalClear (Rigaku MSC) prozessiert. An Synchrotron-Strahlenquellen aufgenommene Daten werden gleich nach der Messung je nach Ausstattung der Messstation mit der Software HKL2000 (Otwinowski, 1997), MOSFLM (Leslie, 1992), SCALA aus der CCP4-Suite (1994) und im Fall von MAD-Daten zusätzlich SHELX (Schneider and Sheldrick, 2002; Sheldrick, 2008), implementiert in HKL2MAP (PAPE, 2003), analysiert. Im Fall von MAD-Daten müssen die Bjiövet-Paare getrennt in die Datei mit den Beugungsdaten geschrieben werden.

III. 17. 2. 1. Molekularer Ersatz (Molecular Replacement)

Für die Durchführung des molekularen Ersatzes zur Suche nach Strukturmodellen mit Hilfe von zum gesuchten Protein homologen Strukturmodellen werden Programme der CCP4-Suite, namentlich PHASER (McCoy et al., 2007) und AMORE (Navaza, 1994), verwendet. Zur Suche nach einer Lösung für den kristallisierten Proteinkomplex werden in mehreren Rechnungen Strukturmodelle des kompletten, homologen Komplexes oder einzelne Bestandteile (BMP-Ligand, BMP-Rezeptor) eingesetzt. Eine Strukturlösung zeigt sich in einer Kristallpackung, bei der alle Moleküle in Kontakt miteinander stehen, keine oder nur geringfügige Überlappungen der Proteinketten auftreten und der Lösungsmittelgehalt, ausgedrückt als Matthews-Koeffizient, im für Proteinkristalle üblichen Bereich liegt ($1,7-3,5 \text{ \AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$) (Matthews, 1968). In einem ersten Verfeinerungsschritt (Refinement) mit der Struktur aus dem molekularen Ersatz sollten zudem die Fehlerfaktoren (R-Faktoren) R_{cryst} und R_{free} , wenn zunächst auch nur geringfügig, sinken.

III. 17. 2. 2. Multiwavelength Anomalous Dispersion (MAD)

MAD-Datensätze werden mit den Programmen SHELX (Schneider and Sheldrick, 2002; Sheldrick, 2008), SHARP/AUTOSHARP (Bricogne et al., 2003; La Fortelle, 1997) und SOLVE/RESOLVE (Terwilliger, 2000; Terwilliger, 2003; Terwilliger and Berendzen, 1999) analysiert. Die Qualität der experimentell phasierten Elektronendichte sowie die Länge und Konnektivität der in allen drei Fällen mit dem Programm ARP/WARP (LAMZIN, 1999; PERRAKIS ET AL., 2001) ermittelten Strukturfragmente aus Polyaninketten können für den prozessierten Datensatz schwanken, weshalb die Prozessierungsergebnisse der Programme zunächst verglichen werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der BMP-Ligand-Rezeptor-Komplexe können markante Sekundärstrukturelemente wie z.B. α -Helices aus vorhandenen Strukturen mit den experimentell ermittelten Polyaninketten überlagert werden, um so ein besser bearbeitbares anfängliches Strukturmodell mit spezifizierten Aminosäuren zu generieren, welches Anhaltspunkte über die Position einzelner charakteristischer Aminosäuren wie Cysteine, Tryptophane oder Tyrosine liefert. Eine wichtige Orientierungshilfe bieten die Selen-Atome der Methionine, deren Positionen experimentell verfügbar sind. Mit dem Modul XBuild/AutoFit des Programms QUANTA (Accelrys) kann nach Sekundärstrukturelementen gesucht und eine CA-Kette durch die Elektronendichte gelegt werden, welche sich anschließend in eine Aminosäurekette umwandeln lässt. Mit Hilfe der bekannten Aminosäuresequenz kann dann von diesen Resten ausgehend die Proteinkette nacheinander passend in die Elektronendichte modelliert und die automatisch zugeordneten Alaninreste in die eigentlichen Aminosäuren umgewandelt werden, woraus sich bei Vervollständigung ein erstes Strukturmodell des kristallisierten Proteins ergibt. Eine automatische Suche der Elektronendichte nach den sequentiell kodierten Aminosäuren (engl. automatic tracing) ist erst bei Auflösungen $< 1,8 \text{ \AA}$ sinnvoll.

III. 17. 2. 3. Verfeinerung des Strukturmodells (Refinement)

Das mit den Mitteln des molekularen Ersatzes oder der experimentellen Phasierungstechnik berechnete Strukturmodell des gesuchten Proteins wird über eine erste eingeschränkte Verfeinerung (engl. restrained refinement) mit dem Programm REFMAC (Murshudov et al., 1997) verbessert. „Eingeschränkt“ bedeutet hierbei, dass die Verfeinerung, also die Angleichung von beobachteten und berechneten Intensitäten, unter Beachtung stereochemischer Vorgaben für die einzelnen Aminosäuren und gegebenenfalls anderer Moleküle abläuft. Mit einer Energiegleichung, welche stereochemische und kristallographische Terme vereinigt, lässt sich dies veranschaulichen (McRee, 1999): $E_{\text{total}} = w_A \sum E_{\text{kristallographisch}} + w_B \sum E_{\text{Bindungslängen}} + w_C \sum E_{\text{Bindungswinkel}} + w_D \sum E_{\text{Torionswinkel}} +$

$w_E \sum E_{\text{nichtkovalente Kontakte}} + w_F \sum E_{\text{Planare Gruppen}} + w_G \sum E_{\text{chirale Volumina}}$, worin w Wichtungsfaktoren für die verschiedenen Terme darstellen. Die Energie für den kristallographischen Term ergibt sich aus der Differenz von beobachteten und berechneten Intensitäten. Die Energie für die stereochemischen Terme ergibt sich aus den Unterschieden zwischen der idealisierten und aktuellen Geometrie, wobei die Energie mit zunehmender Abweichung beider Werte zunimmt. Bei der Verfeinerung mit REFMAC wird die Gesamtenergie des Systems mit Methoden der größten Wahrscheinlichkeit (engl. Maximum Likelihood) minimiert, indem die Atomkoordinaten in einem sich wiederholenden Prozess auf Positionen mit der niedrigsten Energie verschoben werden, bis die Gesamtenergie des Systems mit zunehmenden Verfeinerungsrunden auf einen minimalen Wert konvergiert, welcher optimalerweise ein globales Energieminimum kennzeichnet. Die mittlere quadratische Abweichung eines jeden Atoms von seiner durchschnittlichen Position wird durch sogenannte atomare Auslenkungsparameter (engl. atomic displacement parameter, ADP) repräsentiert, welche unterschiedliche Positionen äquivalenter Atome in den Einheitszellen, die zeitabhängige Bewegung äquivalenter Atome während der Beugungsaufnahme und Fehler im Strukturmodell beschreiben. Der totale atomare (anisotrope) Auslenkungsparameter eines Systems U setzt sich nach Winn et al. summarisch aus Beiträgen der Kristallanisotropie (U_{Krist}), translatorischen und Librationsbewegungen einzelner Polypeptidketten oder Domänen (engl. pseudo-rigid bodies) der asymmetrischen Einheit (U_{TLS}), intramolekularen, kollektiven Bewegungen wie Schwankungen um Torsionswinkel (U_{Intern}) und der Auslenkung einzelner Atome (U_{Atom}) zusammen (Winn et al., 2001). TLS Parameter tragen den größten Teil zu den ADPs bei und können im sogenannten „TLS Refinement“ berechnet und verfeinert werden, um die entsprechende Anisotropie in den Beugungsdaten zu korrigieren (Schomake.V and Trueblood.Kn, 1968; Winn et al., 2001).

Nach der ersten Verfeinerung werden die Positionen der Aminosäuren in der $(2F_o - F_c)$ -Elektronendichte (dargestellt bei einem Konturlevel von $+1\sigma$ und $+2\sigma$) mit dem Modul XBuild/Autofit des Programms QUANTA (Accelrys) manuell optimiert, sodass eine gute Ausfüllung der Elektronendichte resultiert. Die $(F_o - F_c)$ -Differenzelektronendichte (dargestellt bei einem Konturlevel von $+3\sigma$ und -3σ) dient dazu, Regionen ohne Korrelation experimenteller und berechneter Daten zu identifizieren, in denen also Atome fehlen oder falsch positioniert sind. Das sich ergebende Strukturmodell wird erneut der Verfeinerung mit REFMAC unterworfen. Durch mehrere alternierende Zyklen manueller und automatischer Verfeinerung entsteht letztlich das finale Strukturmodell, dessen Qualität sich durch niedrige Fehlerfaktoren R_{cryst} ($<25\%$) und R_{free} ($<30\%$), durch einen Gewichtungsfaktor (engl. figure of merit, FOM) von größer als 90% und durch eine den tabellierten, idealen Vorgaben annähernd entsprechende Geometrie auszeichnet (Brunger, 1992; Brunger et al., 1987; Read, 1986). Die beiden Fehlerfaktoren konvergieren mit zunehmenden Verfeinerungszyklen gegen einen immer niedrigeren Wert. Am Ende der Verfeinerungsprozedur können Wassermoleküle in die (Differenz-) Elektronendichte eingefügt werden (Modul Solvate des Programms QUANTA). Zusätzlich können im Verlauf der Strukturverbesserung bei Anwendung des „TLS and restrained refinement“ in REFMAC einzelne Polypeptidketten definiert werden, welche in einem dem „restrained refinement“ vorgelagertem „TLS refinement“ als virtuelle starre Körper (engl. pseudo rigid bodies) behandelt werden, um die Anisotropie in den Daten zu auszugleichen (Schomake.V and Trueblood.Kn, 1968; Winn et al., 2001). Die finale Struktur wird mit den Programmen PROCHECK (Laskowski et al., 1993) und WHATCHECK (Hooft et al., 1996) charakterisiert.

III.18. NMR-Spektroskopie

Die Lösung der NMR-Struktur von BMPR-IA erfolgte durch J. Klages (TU München). Einzelheiten über die zur Strukturlösung angewendeten Methoden und Verfahrensweisen finden sich bei Klages et al. (Klages, 2008b) bzw. in seiner Dissertation (Klages, 2008a) und sollen hier nicht im Detail beschrieben werden. Alle Spektren wurden bei 25°C auf Bruker DMX600, DMX750 und Avance 1900 Spektrometern aufgenommen. Die Zuordnung der Aminosäuresequenz des Proteinrückgrats (^1HN , ^{15}N , ^{13}CA , ^{13}CO) erfolgte über Tripelresonanz-Experimente (HNCA-, HNCA-, HN(CA)CO-, HN(CO)CA- und HN(CA)CB-TOCSY). Aliphatische Seitenketten wurden über HCCH-TOCSY- (engl. Total Correlation Spectroscopy), CCH-TOCSY- und CCH-COSY- (engl. Correlation Spectroscopy) Experimente, aromatische Seitenketten über HCH-NOESY- (engl. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) Spektren zugeordnet. Abstände zwischen den Atomen zur Berechnung der dreidimensionalen Raumstruktur wurden über 3D-NOESY-Spektren ermittelt. Die einzelnen NMR-Experimente sind im korrespondierenden Eintrag der Proteindatenbank (RCSB) zusammengestellt. Die Strukturberechnung erfolgte mit dem Programm XPLOR (NIH Version 2.9.4) unter Anwendung eines Protokolls des simulierten langsamen Abkühlens (engl. simulated annealing). Für das finale Modell wurden 50 Strukturen berechnet. Aus den 20 Strukturen mit der besten Geometrie wurde eine Durchschnittsstruktur berechnet, welche das Ensemble strukturell repräsentiert. Die Strukturen wurden mit den Programmen PROCHECK (Laskowski et al., 1993), WHATCHECK (Hooft et al., 1996) und Molprobability (Lovell et al., 2003) validiert. Eine letzte Verfeinerung erfolgte durch einen halbquantitativen Vergleich der experimentellen und zurückgerechneten ^{15}N -HSQC-, CNH- und NNH-NOESY-Spektren.

III.19. Zellassays zur Bestimmung der Proteinaktivität

Um die Aktivität von GDF-5 und dessen Varianten zu testen, wurden Assays mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Hierbei wurden die Bildung von Alkalischer Phosphatase (ALP) und die Aktivierung des intrazellulären Smad1/5/8-Signalwegs nach Stimulation durch BMPs beobachtet.

Alkalische Phosphatase (ALP) ist ein für osteogene Zellen, z.B. Chondrozyten oder Osteoblasten, charakteristisches Protein. Die Zugabe von BMPs zum Zellkulturmedium begünstigt die Differenzierung dieser Zellen, was unter anderem zur Produktion von ALP führt. Die Aktivität von ALP lässt sich einfach mit Hilfe eines photometrischen Assays, in welchem die Dephosphorylierung von p-Nitrophenylphosphat durch ALP gemessen wird, ermitteln. Die Aktivierung des durch BMPs aktivierten intrazellulären Smad1/5/8-Signalwegs lässt sich über Reporter-Gen-Assays bestimmen, wobei die Aktivierung eines Reporter-Konstrukts, hier BRE (BMP Responsive Element), gemessen wird. BRE ist an die Glühwürmchen-Luciferase gekoppelt, welche die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Letztere Reaktion kann ebenfalls photometrisch beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Zelllinien verwendet: (1) Die Maus-Teratokarzinom-Knorpelzelllinie ATDC5 (Atsumi et al., 1990), (2) die Ratten-Osteoblasten-Zelllinie RobC26 (Yamaguchi and Kahn, 1991) und (3) die multipotente Maus-Fibroblasten-Zelllinie C3H10T1/2 (Reznikoff et al., 1973). Mesenchymale ATDC5-Zellen durchlaufen mehrere Stadien der Differenzierung von (1) kondensierenden pre-chondrogenen Zellen zu (2) proliferierenden Chondrozyten und (3) hypertrophischen und calcifizierenden Chondrozyten (Shukunami et al., 1997). Im hypertrophen Stadium ist die ALP Aktivität stark erhöht, weshalb letztere als Maß für die

Fähigkeit von BMPs, die chondrogene Zelldifferenzierung zu induzieren, dienen kann. Auch RobC26- und C3H10T1/2-Zellen differenzieren durch Zugabe von BMPs. Analog zu ATDC5-Zellen lässt sich auch in diesen Zelllinien die ALP-Aktivität in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration messen. Komplementär zur ALP-Aktivität wird mit Hilfe von BRE-Luciferase Reporter-Gen-Assays die Aktivierung des intrazellulären Smad1/5/8-Signalwegs durch exogene BMP Liganden untersucht (Korchynskyi and ten Dijke, 2002).

III. 19. 1. Alkalische Phosphatase (ALP) Assays

ATDC5-Zellen (RIKEN, No. RCB0565) werden in Vollmedium (DMEM:HamsF12=1:1), welchem 5% (v/v) FCS (engl. Fetal Calf Serum), 100U/ml Penicillin G, 100mg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutamin zugesetzt werden, bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ kultiviert (Standardbedingungen). Hungermedium werden nur 2% (v/v) FCS zugesetzt.

Die Unterhaltung der Zellkultur von ATDC5-Zellen ist im Folgenden beschrieben. Das Medium über an der inneren Oberfläche einer 75cm²-Zellkulturflasche adherierenden konfluenten Zellen wird abgesaugt und die Zellen werden durch zweiminütige Inkubation mit 2ml 2fach konzentriertem Trypsin bei 37°C abgelöst. Die Trypsinisierung wird durch Zugabe von 4ml Vollmedium gestoppt, die Zellen suspendiert und zentrifugiert (1000xg, 2min, RT). Die Zellen werden in 10ml Vollmedium resuspendiert. Neue Zellkulturflaschen (Grundfläche 25, 75 oder 175cm²) werden mit frischem, auf 37°C temperiertem Vollmedium befüllt (10, 15 oder 40ml minus Volumen der Zellsuspension) und die Zellsuspension im Verhältnis von Zellsuspension:Vollmedium gleich 1:4 (1,9, 3,75 oder 7,5ml) zugegeben. Anschließend wird für 3d kultiviert. Die Zellen werden erneut wie beschrieben gesplittet.

Für ALP-Assays werden die Zellen wie beschrieben trypsinisiert. Die Zellzahl der in Vollmedium suspendierten Zellen wird anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen werden auf eine Dichte von 1,5x10⁵ Zellen pro 1ml Vollmedium verdünnt, in 100µl-Aliquots auf die Löcher einer 96-Well-Platte verteilt (entspricht 1,5x10⁴ Zellen pro 1ml) und kultiviert. Nach 24h wird das Medium abgesaugt und in jede Vertiefung 100µl des Hungermediums pipettiert, wobei die ersten Vertiefungen jeder Reihe mit dem doppelten Volumen befüllt werden. Die Proteinlösung wird mit einer Endkonzentration von 1µM in die erste Vertiefung jeder Reihe gegeben und gut gemischt. Durch Pipettieren von 100µl Lösung aus der ersten in die zweite Vertiefung einer jeden Reihe und so weiter bis zur zwölften Vertiefung erhält man eine logarithmische (log₁₀-) Verdünnung des zugegebenen Proteins. Die 96-Well-Platte wird für 72h inkubiert, das Medium abgesaugt und jede Vertiefung mit 100µl PBS gewaschen. Pro Vertiefung werden 100µl Lysispuffer I (0,1M Glycin pH9,6, 1% NP-40, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂) zugegeben und 1h unter Schütteln bei RT lysiert. Anschließend werden pro Vertiefung 100µl Detektionslösung bestehend aus 10ml Lysispuffer II (0,1M Glycin pH9,6, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂) und 1ml 20mg/ml p-Nitrophenylphosphat in dH₂O zugegeben. Sofort wird die Farbreaktion im ELISA-Photometer bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Die Messung wird 2-3mal bei unterschiedlichen Inkubationszeiten wiederholt. Jedes Experiment wird mindestens einmal wiederholt und in Doppelbestimmung durchgeführt.

RobC26-Zellen werden in α-MEM (engl. minimal essential medium) mit 10% (v/v) FCS sowie 100U/ml Penicillin G und 100mg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Die Unterhaltung der Zellkultur und Durchführung der ALP-Assays erfolgt wie für ATDC5-Zellen beschrieben.

III. 19. 2. Luciferase Reportergergen-Assays

III. 19. 2. 1. Smad2/3 Luciferase Reportergergen-Assay in HEK293TSA-Zellen

Bei Transfektion von BMP Rezeptor Varianten kann deren Aktivität nicht unabhängig von endogen in den Zellen vorhandenen Rezeptoren ermittelt werden. Zeigt beispielsweise eine Variante einen Verlust an Bindung gegenüber BMP-2 in Biacore-Bindungsstudien, so lässt sich die *in vivo* Aktivität dieser Variante in Zellassays nicht bestimmen. Außerdem kann nicht festgestellt werden, ob die Aktivität eines BMP Liganden vom rekrutierten BMP Rezeptor abhängt. Deshalb wird die extrazelluläre, BMP-Ligand bindende Domäne von BMPR-IA, BMPR-IA/IB^C und BMPR-IB an die Transmembran- und intrazelluläre Domäne von ActR-IB gekoppelt und so BMP Typ I:Activin Typ IB Rezeptor-Chimären (III.5.) erzeugt. Weil ActR-IB Signale über Smad2/3-Proteine überträgt, kann unter Verwendung eines spezifischen, Luciferase-gekoppelten Reportergergens (p(CAGA)₁₂-Luc) nur das über die jeweils transfizierte Chimäre übermittelte Signal gemessen werden, unabhängig vom endogenen Smad1/5/8-Signalweg.

Für die Zellassays werden HEK293TSA-Zellen (ATCC-Zellbank, LGC Promochem) in Vollmedium (DMEM, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin G, 100mg/ml Streptomycin und 1mM Natriumpyruvat) bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für transiente Transfektionen werden HEK293TSA-Zellen in mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Platten (Greiner) bei einer Zelldichte von 1,5x10⁵ Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 16h werden die Zellen mit 50ng/Vertiefung pSV-β-Gal (Promega), 100ng/Vertiefung p(CAGA)₁₂-Luc (Dennler et al., 1998) und 50-100ng/Vertiefung pcDNA3.1-Plasmid, welches für die jeweilige Chimäre kodiert, unter Verwendung von HEKfectin Transfektionsreagenz (Biorad) anhand des Herstellerprotokolls transfiziert. Die Transfektion von pSV-β-Gal, kodierend für β-Galactosidase, dient als interne Kontrolle, um auf die Transfektionseffizienz normalisieren zu können. 24h nach der Transfektion wird das Vollmedium durch Hungermedium (wie Vollmedium, jedoch nur 0,1% (v/v) FCS) ersetzt und die Zellen für 24h mit 5nM oder 10nM BMP-2 behandelt. Das Medium wird abgenommen und die Zellen mit 100µl Reporter-Lysispuffer (Promega) versetzt. Die β-Galactosidase-Aktivität wird über einen kolorimetrischen Assay bestimmt, indem jeweils 50µl des Lysats in eine 96-Well-Platte transferiert und je 50µl einer zweifach konzentrierten β-Gal-Substratlösung (5mM o-Nitrophenylgalactopyranosid in 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgCl₂, und 50mM β-ME) zugegeben werden. Die Proben werden für 15-45min inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 405nm spektrophotometrisch vermessen. Zur Messung der Luciferase-Aktivität werden jeweils 20µl des Lysats in eine 96-Well-Platte transferiert und erst für 15min bei -80°C, dann 15min bei 37°C gelagert. Das Luciferase-Signal wird mit einem Kit (Luciferase Assay Kit, Promega) und einem Luminometer anhand des Herstellerprotokolls bestimmt und in RLU (engl. Relative Luciferase Light Unit) angegeben. Jedes Experiment wird zweimal in Doppelbestimmung durchgeführt.

Zusätzlich wurden GDF-5-Varianten über Smad2/3 Luciferase Reportergergen-Assays mit der BMPR-IA-ActR-IB-Chimäre (Swap4) und BMPR-IB-ActR-IB-Chimäre (Swap5) getestet. Dafür wurden HEK293TSA-Zellen wie beschrieben mit pcDNA3.1-Swap4 oder pcDNA3.1-Swap5 transient transfiziert und den Ansätzen analog zu dem oben für BMP-2 beschriebenen Experiment jede GDF-5-Variante in Konzentrationen von 0, 0,01, 0,1, 1,0 und 10µM zugesetzt und zuletzt die Luciferase-Aktivität ermittelt.

III. 19. 2. 2. Smad1/5/8 Luciferase Reportergergen-Kompetitions-Assay in C3H10T1/2-Zellen

C3H10T1/2-Zellen mit stabil-transfiziertem BRE-Luciferase Reportergergen (p(BRE)₂-Luc) (zur Verfügung gestellt von P. ten Dijke) werden in Vollmedium (DMEM, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin G, 100mg/ml Streptomycin und 200µg/ml Geneticin-Sulfat) bei einer Zelldichte von 3x10⁴ Zellen pro cm² in 24-Well-Platten ausgesät. Nach 16h wird das Vollmedium durch Hungermedium (wie Vollmedium, jedoch nur 0,1% (v/v) FCS) ersetzt und die Zellen mit 5nM BMP-2 und steigenden Konzentrationen von BMPR-IA^{ec}, BMPR-IB^{ec} und BMPR-IA/IB^{Cec} (0,5, 1, 2, 4 und 6µM) für 72h bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen werden mit 100µl Reporter-Lysispuffer (Promega) aufgeschlossen und wie in III. 19. 2. 1 beschrieben weiter verfahren.

III. 19. 2. 3. Smad1/5/8 Luciferase Reportergergen-Assays in ATDC5- und C3H10T1/2-Zellen

Die Ansätze erfolgen gemäß dem für die Reportergergen-Assays in C3H10T1/2-Zellen beschriebenen Protokoll. Während C3H10T1/2-Zellen stabil mit p(BRE)₂-Luc transfiziert sind, müssen ATDC5-Zellen vorher mit dem Reportergergen p(BRE)₂-Luc unter Verwendung von Lipofectamin (Invitrogen) wie vom Hersteller angegeben transfiziert werden. Dazu werden pro Vertiefung einer 24-Well-Platte 2·10⁴ Zellen ausgesät. Nach 16h erfolgt die Transfektion mit 500ng DNA pro Vertiefung. Dafür werden 100ng p(BRE)₂-Luc und 400ng pcDNA3.1 (Leervektor) in 500µl DMEM aufgenommen und die an der Platte adherierten ATDC5-Zellen für 3h mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wird 500µl Vollmedium mit 10% (v/v) FCS zugegeben (Endkonzentration 5% (v/v) FCS). Am nächsten Tag wird das Vollmedium durch Hungermedium (DMEM mit 2% (v/v) FCS) ersetzt. C3H10T1/2-Zellen werden wie oben beschrieben in Hungermedium mit 0,1% (v/v) FCS ausgesät. Anschließend wird mit GDF-5 bzw. dessen Varianten stimuliert. Den Assays mit ATDC5- und C3H10T1/2-Zellen werden dazu die Liganden in Konzentrationen von 0, 0,1 (nur C3H10T1/2), 1,0, 10, 100 und 500µM zugesetzt und die Ansätze für 72h unter Standardbedingungen inkubiert. Die weitere Vorgehensweise entspricht dem in III. 19. 2. 1 angegebenen Protokoll.

IV. Ergebnisse

IV.1. Reinigung der BMP Rezeptoren und GDF-5

IV. 1. 1. BMPR-IA und Varianten

Die vom BMPR-IA abgeleiteten Proteinvarianten – BMPR-IAsf, BMPR-IA-Y39G42 und BMPR-IA/IB^Cec – wurden in Anlehnung an das von Kirsch et al. (Kirsch et al., 2000b) vorgestellte Protokoll gereinigt (siehe III. 14. 1.). Die Ergebnisse der Reinigungsschritte für BMPR-IA-Y39G42, BMPR-IAsf und BMPR-IA/IB^Cec unterscheiden sich nicht und sollen daher exemplarisch für BMPR-IA/IB^C wiedergegeben werden. Für BMPR-IAsf schließt sich an die Ionenaustauschchromatographie die Spaltung mit PreScission-Protease an, bevor das N-terminale Peptid und der verkürzte BMPR-IA mittels BMP-2-Affinitätschromatographie separiert werden. Das Ergebnis dieser Spaltung wird ebenfalls gezeigt. Die Reinigung von isotopenmarkierten BMPR-IAsf ist identisch zum unmarkierten Protein. Ausbeuten sind tabellarisch für alle gereinigten Proteine angegeben.

IV. 1. 1. 1. Expression, Zellaufschluss und Ni-Affinitätschromatographie

Die Expression von rekombinantem, Thioredoxin-fusioniertem (Trx-) BMPR-IA/IB^Cec erfolgt durch Induktion mit 1mM IPTG bei 20°C und etwa 16-stündiger Inkubation (ü.N.). Experimente mit BMPR-IBec ergaben, dass die Koexpression von DnaK-DnaJ-GrpE (Hsp70-System)/GroEL-GroES (Hsp60-System) oder Tig den Anteil von aktivem BMPR-IBec an der in *E.coli* produzierten Gesamtmenge um etwa den Faktor zwei erhöhen kann (siehe IV. 1. 2.). Deshalb wurde eines dieser beiden Chaperon-Systeme auch bei der Expression der hier diskutierten BMPR-IA-Varianten ko-exprimiert. Vor allem für die Expression von BMPR-IAsf im reduzierendem Milieu von *E.coli* BL21 (DE3) war dies entscheidend, um für die NMR-Strukturanalyse ausreichende Proteinmengen zu produzieren.

Das Vorhandensein von Trx-BMPR-IA/IB^Cec wird durch Analyse eines Zellaufschlusses vor und nach Induktion mittels SDS-PAGE geprüft (Abbildung IV-1, S. 64). Bahn vier auf dem Gel zeigt deutlich eine Bande bei etwa 35kDa, was dem erwarteten Molekulargewicht des Fusionsproteins entspricht. Die anderen Banden können den ko-exprimierten Chaperonen zugeordnet werden. Pro Liter TB-Medium konnten zwischen 3,5g und 4,5g Zellen geerntet werden. Pro Reinigung wurden 8-12g Zellpellet in 120ml Aufschlusspuffer resuspendiert und wie in III. 14. 1. 1 angegeben aufgeschlossen. Durch Ni-Affinitätschromatographie konnte ein großer Teil von Begleitproteinen abgetrennt werden. Bemerkenswert ist, dass größere Mengen der Chaperone DnaK (69kDa) und DnaJ (41kDa) sowie kleinere Mengen GrpE (22kDa) auch nach diesem Reinigungsschritt im Proteinansatz vorhanden waren und offensichtlich auch nicht durch Thrombin gespalten wurden. Fraglich bleibt, ob das Hsp70-System direkt an die Ni-NTA-Matrix oder indirekt über starke nichtkovalente Wechselwirkungen an das Trx-BMPR-IA/IB^C-Fusionsprotein gebunden war. GroEL (57kDa) und GroES (10kDa) interagierten nicht mit der Ni-NTA-Matrix. Vor der Thrombinspaltung wurde der Proteinansatz zur Abtrennung koeluerter Ni-Ionen erst gegen TNE-Puffer, dann gegen Thrombinspaltpuffer dialysiert. Die Menge an Trx-BMPR-IA/IB^Cec isolierbar aus 11g Zellmasse betrug 180mg.

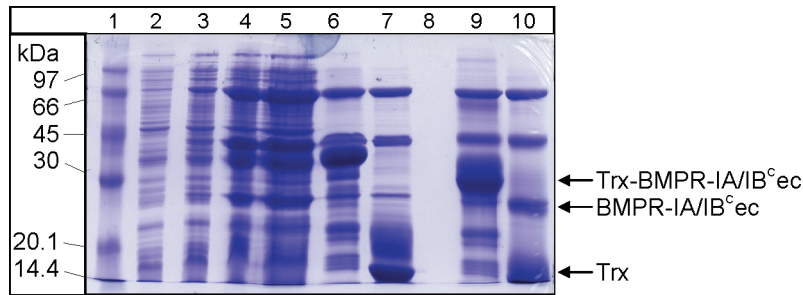


Abbildung IV-1: SDS-PAGE der Induktion, Ni-NTA-Säule und TS von BMPR-IA/IB^cec. Das Fusionsprotein wurde nach Zugabe von Thrombin gespalten. Interessanterweise ließ sich nach der Thrombinspaltung noch Hsp70 im Ansatz nachweisen, was potentiell einen positiven Einfluss auf die Aktivierung von BMPR-IBec in der anschließenden Inkubationsperiode gehabt haben könnte. **Bahnen:** 1...Marker, 2...vor Induktion der Chaperone, 3...vor / 4...nach Induktion von BMPR-IA/IB^cec, 5...Rohextrakt, 6+9...vor / 7+10...nach Thrombinspaltung. Bahnen 2-7 reduzierende Bedingungen, Bahnen 9 und 10 nichtreduzierende Bedingungen.

IV. 1. 1. 2. Thrombinspaltung

Die Thrombinspaltung (TS) erfolgte für 5h bei 30°C, wodurch das Fusionsprotein vollständig gespalten werden konnte (Zeitabhängigkeit der Spaltung nicht gezeigt). Interessanterweise erscheint die BMPR-IA/IB^cec-Bande in nichtreduzierendem Puffer bei einer Größe von etwa 28kDa, in reduzierendem Puffer hingegen bei etwa 20kDa, was möglicherweise auf eine geringere Bindung von SDS an nativen BMPR-IA/IB^cec und damit ein geringeres Ladungs-Masse-Verhältnis oder eine partiell globuläre Struktur von BMPR-IA/IB^cec zurückzuführen ist.

Im Anschluss an die Proteolyse wurde gegen TN₃₅-Puffer dialysiert und für 3-4d bei 4°C inkubiert. Die Inkubationsdauer richtete sich nach Experimenten von D. Weber mit ActR-IIBec (persönliche Mitteilung) und eigenen Versuchen mit BMPR-IBec (nicht gezeigt) und stellt ein Optimum dar. Durch diese Rückfaltungsperiode kann die Ausbeute an aktiver, monomerer Rezeptor-ECD um etwa den Faktor zwei gesteigert werden, wohingegen bei längerer Inkubation die Menge an multimeren Spezies stark ansteigt. Der Einfluss der noch in der Lösung vorhandenen molekularen Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE auf die Effizienz der Renaturierung falsch gefalteter BMPR-IA/IB^cec-Spezies konnte nicht ermittelt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die aktivierende Funktion von Thioredoxin, welchem Disulfidisomerase- und Chaperonartige Eigenschaften zugeschrieben werden (Kern et al., 2003), unterstützt wird, indem durch nichtkovalente Bindung von DnaK oder DnaJ an den BMP Rezeptor dessen ungefaltete Bereiche Redox-Prozessen besser zugänglich gemacht und Aggregationsprozesse vermieden werden. Allerdings ist die Aktivität des Hsp70-Systems stark abhängig von der Gegenwart von ATP, welches dem Inkubationspuffer nicht zugesetzt wurde. Eine Übersicht über die Funktionsweise ausgewählter Chaperon-Systeme findet sich beispielsweise bei Houry (Houry, 2001).

IV. 1. 1. 3. Anionenaustauschchromatographie

Die Abtrennung von Thioredoxin erfolgt effizient mittels Anionenaustauschchromatographie bei leicht basischen pH-Wert (pH 8,0). Weil sich Werte für den berechneten isoelektrischen Punkt von Trx und BMPR-IA/IB^cec relativ stark unterscheiden (Trx: pI=6,01; BMPR-IA/IB^cec: pI=4,76), lässt sich für vom BMPR-IA abgeleitete Proteine eine sehr gute Trennung erreichen (Abbildung IV-2, S. 65). Von großem Vorteil ist, dass zugleich multimerer BMPR-IA/IB^cec-Spezies separiert werden können. Monomeres BMPR-IA/IB^cec eluiert bei etwa 150mM NaCl, anschließend folgen dimere und trimere Rezeptorspezies. Die entsprechenden Fraktionen werden anhand der SDS-PAGE

vereinigt und gegen HBSE-Puffer dialysiert. Die Ausbeute an monomeren BMPR-IA/IB^Cec beträgt 3mg/g Zellnassgewicht.

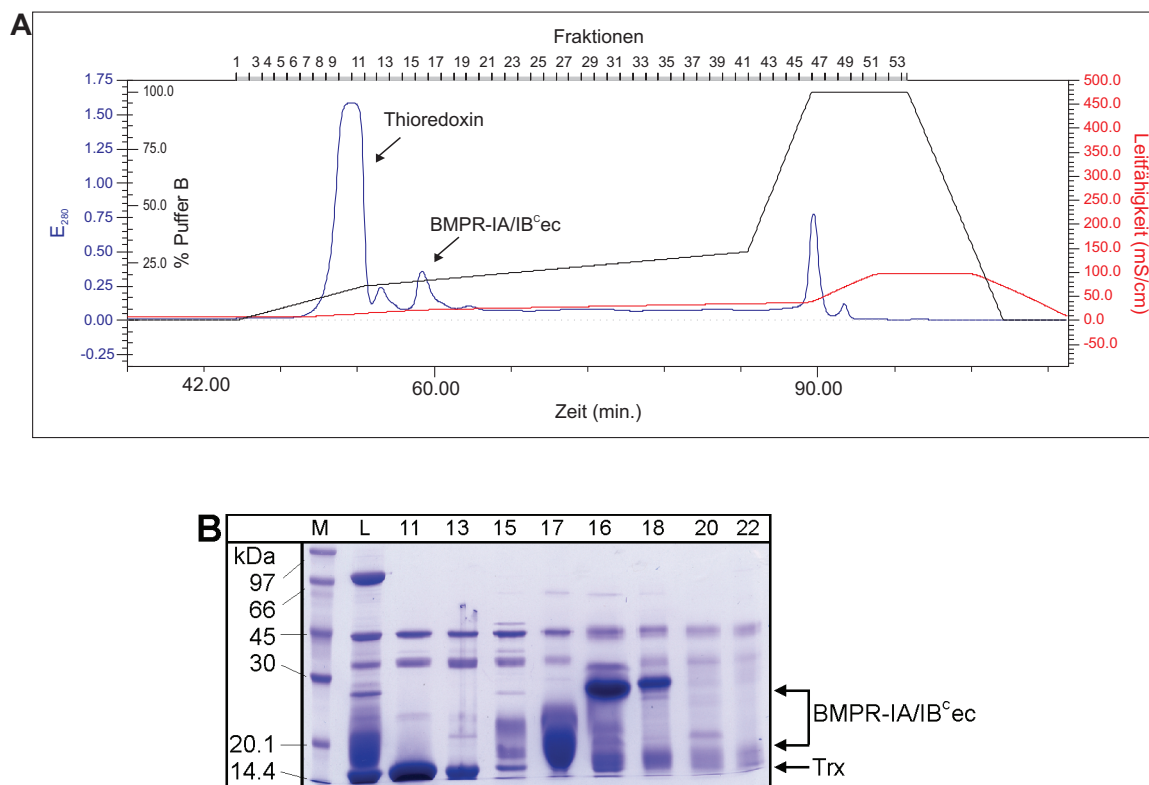


Abbildung IV-2: Chromatogramm und SDS-PAGE der Anionenaustauschsäule mit BMPR-IA/IB^Cec.
A: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie. **B:** SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen. **Bahnen:** M...Marker, L...Injiziertes Protein, Nummern...Fraktionen aus dem Gelfiltrationslauf; Bahnen 2-6 reduzierende Bedingungen, Bahnen 7-10 nichtreduzierende Bedingungen

IV. 1. 1. 4. Spaltung von BMPR-IA^sf mit PreScission-Protease

In die Sequenz von BMPR-IA^{ec} wurde eine Schnittstelle für PreScission-Protease (3C Protease von menschlichem Rhinovirus) eingebaut, um die NMR-Strukturanalyse zu ermöglichen. Erste Untersuchungen durch Messung von ¹H-¹⁵N-2D-HSQC-Spektren einer ¹⁵N-markiertem BMPR-IA^{ec}-Probe zeigten intensive für entfaltete, ungeordnete Strukturen charakteristische Peaks, welche mit den Peaks der gefalteten Bereiche stark überlappten (Abbildung IV-57, S. 156) und so die Strukturanalyse erschwert hätten. Korrelierend damit ist in der Kristallstruktur des BMP-2•BMPR-IA^{ec}-Komplexes (RCSB-Eintrag 1REW) für die ersten 31 Aminosäurereste von BMPR-IA^{ec} keine Elektronendichte detektierbar, was auf die hohe Flexibilität und ungeordnete Struktur des N-terminalen Peptids hinweist. Deshalb wurde eine verkürzte BMPR-IA^{ec}-Variante (BMPR-IA^sf) erzeugt, welcher die N-terminalen 27 Aminosäuren fehlen. Weil diese N-terminalen Reste für die Faltung und damit effiziente Expression des rekombinant als Thioredoxin-Fusionsprotein hergestellten BMPR-IA^{ec} von Bedeutung sind, wurde durch Mutagenese eine Schnittstelle für die hochselektiv wirkende, auch bei niedrigen Temperaturen hohe proteolytische Aktivität zeigende PreScission-Protease (Cordingley et al., 1990; Leong et al., 1992; Walker et al., 1994) erzeugt (siehe Tabelle III-16). Diese spaltet nach der Aminosäure Glycin in der Sequenz LeuGluValLeuPheGlnGlyPro. Die Abspaltung der 27 N-terminalen Aminosäuren inklusive Glycin erfolgte direkt nach der Anionenaustauschchromatographie im Elutionspuffer (Abbildung IV-3,

S. 66). Letzterer enthält zwar kein EDTA und DTT wie vom Hersteller für den optimalen Spaltpuffer angegeben, dennoch war Proteaseaktivität vorhanden. Die Molekulargewichtsdifferenz zum unverkürzten BMPR-IAec ($\Delta M_w=3391\text{Da}$) ist unter reduzierenden Bedingungen deutlich zu erkennen.

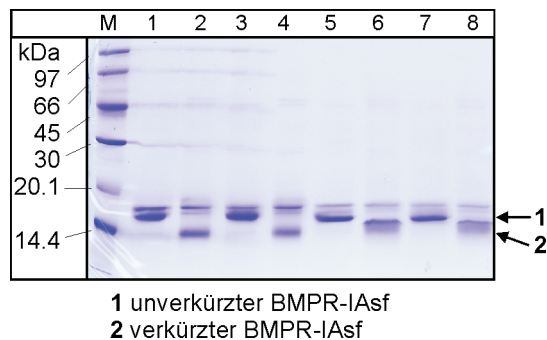


Abbildung IV-3: SDS-PAGE der Spaltung von BMPR-IAf mit PreScission-Protease. Bahnen: M...Marker; 1-4 reduzierende und 5-8 nichtreduzierende Bedingungen; 1,3,5,7...vor Spaltung mit PreScission-Protease; 2,4,6,8...nach Spaltung mit PreScission-Protease.

IV. 1. 1. 5. BMP-2-Affinitätschromatographie

Die Trennung von inaktivem und aktivem, monomerem BMPR-IA/IB^Cec erfolgte über die Bindung an immobilisiertes BMP-2 (III. 14. 1.). Die Elution erfolgt unter leicht denaturierenden Bedingungen mit 4M MgCl₂, weshalb die Protein enthaltenden Fraktionen sofort vereinigt und gegen TN₁₅₀-Puffer dialysiert werden mussten. Im Falle von BMPR-IA/IB^Cec konnten so aus dem Gesamtproteinansatz nach der Anionenaustauschchromatographie aktives, monomeres Protein mit einer Ausbeute von 54% isoliert werden. Die für BMPR-IA/IB^Cec erhaltene Ausbeute nach der BMP-2-Affinitätssäule ist mit 1,6mg/g Zellnassgewicht (Tabelle IV-1, S. 67) deutlich höher als die von S. Keller für BMPR-IAec berichtete (Keller, 2004). Dies galt auch für den ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit, jedoch ohne Koexpression von Chaperon-Systemen, gereinigten BMPR-IAec, welcher mit einer Ausbeute von 0,9-1,0mg/g Zellnassgewicht erhalten werden konnte. Diese Ausbeute entspricht annähernd den von D. Weber beschriebenen Mengen (Weber, 2006). SDS-PAGE-Gele der affinitätsgereinigten Rezeptoren BMPR-IAf, BMPR-IA-Y39G42 und BMPR-IA/IB^Cec sind in Abbildung IV-4 (S. 66) gezeigt.

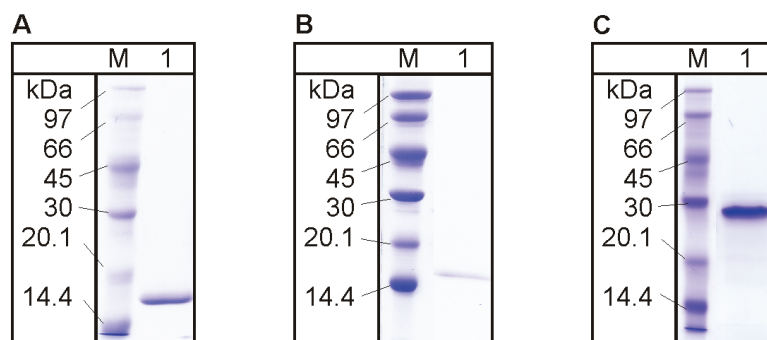


Abbildung IV-4: SDS-PAGE von affinitätsgereinigten BMPR-IAec-Varianten. A: BMPR-IAf. **B:** BMPR-IA-Y39G42. **C:** BMPR-IA/IB^Cec.

Interessanterweise ist die Ausbeute bei der BMPR-IA-Y39G42-Variante mit 0,2mg/g Zellnassgewicht um das achtfache niedriger als bei der BMPR-IA/IB^Cec-Variante mit 1,6mg/g Zellnassgewicht (Tabelle IV-1, S. 67), was möglicherweise auf die Mutation von Tyr39 zu Lys

zurückgeführt werden kann. Bei jungen Menschen wurde eine Mutation des Tyr39 zu Asp in BMPR-IA mit einer krebsartigen Erkrankung des Darms, der juvenilen Polyposis (JPS), korreliert (Howe et al., 2004). Wie die Analyse einer rekombinant hergestellten BMPR-IA-Y39D-Variante zeigte, spielt Tyr39 bei der Faltung von BMPR-IAec eine entscheidende Rolle (siehe IV. 8. 2.). Die Y39D-Mutation führt zu einem komplett entfalteten und inaktiven BMPR-IA, der zwar auf die Zelloberfläche transportiert wurde, aber nicht mehr funktionell ist. Die Einzelmutation von Tyr39 zu Lys in BMPR-IAec – entsprechend der Situation in wildtypischen BMPR-IBec – hatte im Gegensatz zur Y39D-Mutation keinen Einfluss auf die Faltung und Aktivität von BMPR-IA. Möglicherweise beeinflusst der Y39K-Austausch weniger die Aktivität von BMPR-IA als dessen Expressions- und Faltungseffizienz. Ähnlich niedrige Ausbeuten wie mit der BMPR-IA-Y39K-Variante (~0,6mg/g Zellnassgewicht) ergaben sich auch für wildtypischen BMPR-IBec (~0,4mg/g, siehe Tabelle IV-5), in welchem an der entsprechenden Position ebenfalls ein Lysin vorhanden ist.

Reinigungsschritt	BMPR-IA ^{sf}	BMPR-IA-Y39G42	BMPR-IA/IB ^C ec
Fermentation	1,3g pro L TB	3,4g pro L TB	4,3g pro L TB
Zellnassgewicht	12,5g	8,2g	11g
Ni-Affinitätssäule	10,9mg/g	19,8mg/g	16,7mg/g
Anionenaustauschsäule	1,3mg/g	4,5mg/g	3,1mg/g
BMP-2-Affinitätssäule	0,3mg/g	0,2mg/g	1,6mg/g

Tabelle IV-1: Reinigungstabelle für die Aufarbeitung von ausgewählten BMPR-IAec-Varianten.

IV. 1. 1. 6. Isotopenmarkierung von BMPR-IA^{sf}

Vor Expression von ¹³C, ¹⁵N-markiertem BMPR-IA^{sf} wurden vier Klone zwecks Testexpression unter den gleichen Bedingungen wie die Hauptexpression kultiviert und mit IPTG induziert. Mittels einer SDS-PAGE wurde von den getesteten Klonen derjenige mit der stärksten Expression des Zielproteins zur Verwendung in der Hauptexpression (III. 14. 1.) ausgewählt.

Die Ausbeuten für ¹⁵N- und ¹³C, ¹⁵N-markierten BMPR-IA^{sf} sind mit 0,2mg/g etwas niedriger als für unmarkierten BMPR-IA^{sf}, aber deutlich niedriger in Bezug auf unverkürzten BMPR-IAec oder BMPR-IA/IB^Cec (1-1,6mg/g), was vor allem der reduzierenden Umgebung im Zytoplasma von *E.coli* BL21 (DE3) zugeschrieben werden kann. Die Gegenwart von Natriumchlorid oder anderen Salzen im Messpuffer führt bei NMR-Messungen zu einer starken Probenerwärmung. Aus diesem Grund konnte der letzte Schritt der Probenkonzentration nicht wie üblich in salzhaltigem Puffer durchgeführt werden, sondern es musste auf dH₂O oder 10mM KPP pH6,5 ausgewichen werden. Hierbei präzipitierten oder adsorbierten 20-40% des aktiven, monomeren ¹⁵N- oder ¹³C, ¹⁵N-BMPR-IA^{sf} an der YM3-Membran. Davon unabhängig wurde eine ähnliche Tendenz zur Präzipitation an Oberflächen bei hohen Proteinkonzentrationen von BMPR-IA^{sf} beim Einengen in TN₁₅₀-Puffer als auch des BMP-2•BMPR-IA^{sf}-Komplexes beim Einengen in HBS₇₀₀-Puffer beobachtet. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass dem N-Terminus von BMPR-IAec nicht nur eine bedeutende Rolle für die Expression, sondern auch für die chemischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins zukommt. Der wie beschrieben präparierte ¹³C, ¹⁵N-BMPR-IA^{sf} ergab eine einzelne Bande auf dem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel. Die massenspektrometrische Analyse ergab ein Molekulargewicht von 11837,632amu, was dem theoretischen Wert für 94%ig mit ¹³C und 98%ig mit ¹⁵N markiertem BMPR-IA^{sf} entspricht (Abbildung IV-5, S. 68).

Für die NMR-Messungen wurden 250µl einer 500µM ¹³C, ¹⁵N-BMPR-IA^{sf}-Lösung in 10mM KPP pH6,3, 1mM NaN₃, 5% (v/v) D₂O sowie 250µl einer 1,1mM ¹⁵N-BMPR-IA^{sf}-Lösung im gleichen

Puffer hergestellt. Nach Zentrifugation dieser Lösungen wurde luftblasenfrei in Shigemi-Röhrchen (Shigemi, Inc) abgefüllt und diese zur NMR-spektroskopischen Analyse dem Kooperationspartner J. Klages (AG H. Kessler, TU München) übergeben.

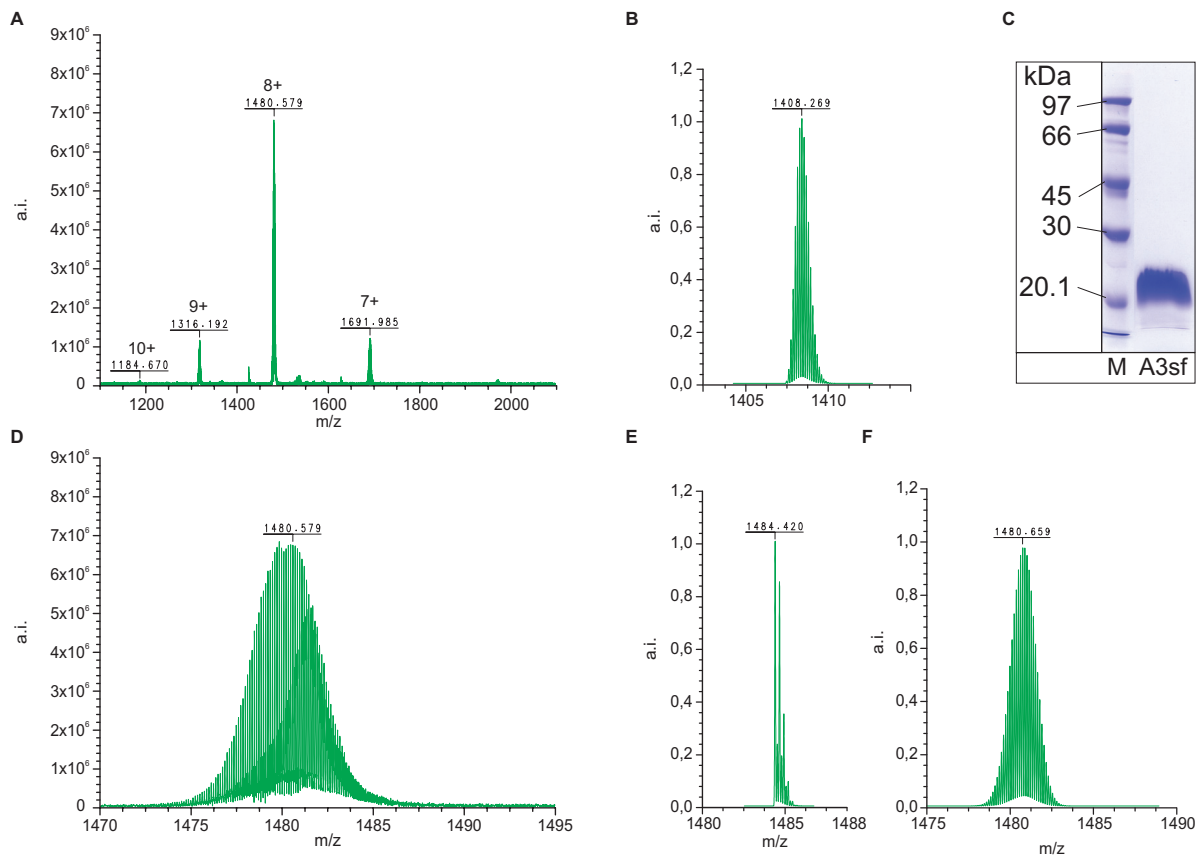


Abbildung IV-5: Massenspektrum und SDS-PAGE des für die NMR verwendeten ^{13}C , ^{15}N -BMPR-IAsf. **A:** Experimentelles Massenspektrum für ^{13}C , ^{15}N -BMPR-IAsf. Verschieden stark geladene Spezies sind angegeben. **B:** Theoretisches Massenspektrum von 8fach geladenen Ionen des unmarkierten BMPR-IAsf mit $M = 11259,152\text{amu}$. **C:** SDS-PAGE des ^{13}C , ^{15}N -BMPR-IAsf. **D:** Vergrößerung des Peaks der 8fach positiv geladenen ^{13}C , ^{15}N -BMPR-IAsf-Spezies mit $M = 11837,632\text{amu}$. Der Massenunterschied zum unmarkierten Protein in (B) ist klar erkennbar. **E:** Theoretisches Massenspektrum von 8fach geladenen Ionen des zu 100% mit den Isotopen ^{13}C und ^{15}N markierten BMPR-IAsf mit $M = 11868,360\text{amu}$. **F:** Theoretisches Massenspektrum von 8fach geladenen Ionen des zu 94% mit ^{13}C und 98% mit ^{15}N markierten BMPR-IAsf mit $M = 11838,272\text{amu}$. Diese Masse stimmt mit der experimentell für 8fach geladene Ionen ermittelten Masse (D) überein.

Reinigungsschritt	^{15}N -BMPR-IAsf	^{13}C , ^{15}N -BMPR-IAsf
Fermentation	4,4g pro L M9	4,2g pro L M9
Zellnassgewicht	20,9g	16,9g
Ni-Affinitätssäule*	11,4mg/g	10,8mg/g
Anionenaustauschsäule	0,9mg/g	1,1mg/g
BMP-2-Affinitätssäule	0,2mg/g	0,2mg/g

Tabelle IV-2: Reinigungstabelle für die Aufarbeitung von markiertem BMPR-IAsf.

IV. 1. 2. BMPR-IB und Varianten

Die Reinigung von BMPR-IBec und dessen Varianten erfolgte in Anlehnung an das für den BMPR-IAec beschriebene Protokoll (III. 14. 1.), welches jedoch im Rahmen der Arbeit modifiziert wurde,

um höhere Ausbeuten zu erzielen (III. 14. 2.). BMPR-IBec Varianten, in denen einzelne Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht sind, wurden über ein kürzeres, neu entwickeltes Protokoll gereinigt (III. 14. 3.). Zusätzlich wurde getestet, ob die Gegenwart der in III.5. angegebenen Chaperon-Systeme einen positiven Effekt auf die Bildung von aktivem BMPR-IBec in *E.coli* hat und ob die Zugabe verschiedener redox-aktiver Verbindungen zur Renaturierung nach der Thrombinspaltung eine Verbesserung der Ausbeute bewirkt. Im Folgenden wird die Reinigung von BMPR-IBec jeweils für die Trx- und DsbA-Fusion exemplarisch beschrieben und diskutiert.

IV. 1. 2. 1. Expression der BMPR-IBec-Trx- und BMPR-IBec-DsbA-Fusionsproteine

Die reduzierende Umgebung im *E.coli* Zytoplasma führt zu einer geringen Stabilität von Cysteinbrücken im exprimierten Zielmolekül, wodurch letztlich nur ein geringer Anteil dessen in nativer, bindungsaktiver Form isoliert werden kann. *E.coli*-Stämme mit einem stärker oxidativen Zytoplasma aufgrund inaktivierender Mutationen in den Genen für Thioredoxin-Reduktase oder Glutathion-Reduktase, z.B. *E.coli* AD494 (DE3) oder *E.coli* Origami B (DE3), erleichtern die Produktion des aktiven Zielproteins (Bessette et al., 1999; Prinz et al., 1997; Proba et al., 1995). Die Fusion von Cystein-reichen Proteinen mit einem Chaperon wie Thioredoxin fördert zum einen die korrekte Bildung von Disulfidbrücken, zum anderen die Freisetzung des löslichen Proteins statt dessen Akkumulation in Einschlusskörperchen.

Die geringen Ausbeuten an bindungsaktivem BMPR-IBec in Anbetracht der hohen Expressionsrate des Thioredoxin-Fusionsproteins in *E.coli* AD494 (DE3) Zellen führte zu der Überlegung, ob der Anteil des aktiven Proteins am insgesamt exprimierten Protein durch Koexpression verschiedener Chaperon-Systeme (Houry, 2001) gesteigert werden könnte. Dazu wurden die in III.5. angegebenen Vektoren zusammen mit dem Zielvektor in *E.coli* AD494 (DE3) transformiert und getestet, inwieweit die Bildung von bindungsaktivem BMPR-IBec in Abhängigkeit vom koexprimierten Chaperon-System beeinflusst wird. In einem parallelen Ansatz wurden jeweils 2,4l TB-Medium mit einem der fünf so erhaltenen Bakterienstämme beimpft, die jeweiligen Chaperone und das Zielprotein exprimiert und über das in III. 14. 2. angegebene Protokoll gereinigt.

Reinigungsschritt	Hsp60 und Hsp70	Hsp60	Hsp70	Hsp60 plus Tig	Tig
Vektor (siehe III.5.)	pG-KJE8	pGro7	pKJE7	pG-Tf2	pTf16
Fermentation	8,0g/L TB	10,1g/L TB	12,8g/L TB	8,4g/L TB	6,8g/L TB
Zellnassgewicht	19,2g	24,2g	30,7g	20,1g	16,4g
Ni-Affinitätssäule 1	9,6mg/g	5,7mg/g	6,0mg/g	7,3mg/g	9,8mg/g
Gelfiltrationssäule	4,8mg/g	3,7mg/g	3,8mg/g	4,0mg/g	4,7mg/g
Ni-Affinitätssäule 2	1,4mg/g	0,8mg/g	0,7mg/g	0,8mg/g	0,8mg/g
BMP-2-Affinitätssäule	0,08mg/g	0,05mg/g	0,02mg/g	0,05mg/g	0,08mg/g

Tabelle IV-3: Einfluss der Koexpression verschiedener Chaperon-Systeme auf die Ausbeute von aktivem BMPR-IBec bei der Expression als Trx-Fusionsprotein.

Die daraus resultierenden Ausbeuten an BMPR-IBec sind in Tabelle IV-3 aufgeführt. Diese sind im Vergleich zu den in Tabelle IV-5 angegebenen Ausbeuten recht niedrig, weil die Isolierung von BMPR-IBec bezogen auf die Zellmasse hier scheinbar weniger effizient war, liegen aber im Bereich von publizierten Werten (80µg/g) (Keller, 2004). Die in Tabelle IV-5 für den BMPR-IBec (Trx) gezeigten Ausbeuten wurden erst nach weiteren, in IV. 1. 2. 2 beschriebenen Optimierungsschritten erreicht. Vergleicht man jedoch die Experimente untereinander, so ist klar zu erkennen, dass die

Bildung von aktivem BMPR-IBec in Gegenwart von Hsp60/Hsp70 sowie Trigger-Faktor gegenüber den übrigen Chaperon-Systemen begünstigt war. Dies war der Grund, weshalb nicht nur das BMPR-IBec-Trx- sondern auch die BMPR-IA/IB^{Cec}-Trx- und BMPR-IA^{sf}-Trx-Fusionsproteine in Gegenwart von Hsp60/Hsp70 exprimiert wurden. Für die in den Abschnitten IV. 1. 1. 6 und IV. 1. 2. 4 näher erläuterten Markierungsexperimente mit Isotopen oder Schweratomen war die Koexpression des Chaperonsystems unverzichtbar.

Die Expression von an DsbA fusionierten BMPR-IBec erfolgte in das Periplasma von *E.coli* BL21 (DE3). Neben den Eigenschaften als Chaperon fungiert DsbA als Signal für den periplasmischen Transport, sodass das zunächst entfaltete Fusionsprotein erst in der oxidativen Umgebung des Periplasmas in Gegenwart von Dsb-Proteinen renaturiert wird (Bardwell, 1994; Kamitani et al., 1992; Zapun et al., 1995). Der die Ausbeute des periplasmisch sekretierten BMPR-IB-DsbA-Fusionsproteins limitierende Schritt war offenbar dessen Transport in das Periplasma nach Expression im Zytoplasma. Die gesamte Expressionsrate des Fusionsproteins im Zytoplasma war sehr hoch, wie eine Analyse vom Zellpellet nach dem Periplasmaaufschluss zeigte (Abbildung IV-10, S. 76). Demgegenüber konnten nur vergleichsweise geringe Mengen des Fusionsproteins aus dem Periplasma isoliert werden (Tabelle IV-5).

IV. 1. 2. 2. Reinigung des BMPR-IBec-Thioredoxin-Fusionsproteins

Die ersten Schritte der Reinigung von BMPR-IBec entsprechen denen für BMPR-IA/IB^{Cec} und auch die Ausbeuten an Fusionsprotein liegen im gleichen Bereich. Wie für den BMPR-IA/IB^{Cec} beschrieben, ist auch bei der Reinigung von BMPR-IBec ein Teil der Chaperone nach der Ni-Affinitätschromatographie noch vorhanden, was sich positiv auf die Renaturierungsperiode nach der folgenden Thrombinspaltung ausgewirkt haben könnte (Abbildung IV-6, S. 71). Um die Renaturierung zu verbessern, wurden verschiedene Kombinationen eines Redox-Paars (reduziertes und oxidiertes Glutathion) sowie der Proteine Corystein (Wada and Buchanan, 1981) und Proteindisulfidisomerase (PDI) (Lambert and Freedman, 1983), welche beide die Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysieren, dem BMPR-IBec-Ansatz nach der Thrombinspaltung zugesetzt. Der BMPR-IBec-Ansatz wurde dazu in sechs Aliquots geteilt, die in Tabelle IV-4 angeführten Zusätze zugegeben und für 4d bei 12°C inkubiert. Im Vergleich mit der Kontrolle ohne Zusätze war nur durch Zugabe des Redox-Paars allein oder der Kombination aus Redox-Paar und Corystein oder PDI eine Steigerung der Ausbeute messbar. Bei Inkubation des BMPR-IBec-Ansatzes in Gegenwart von 5µg/mg Corystein plus 1mM GSH und 0,2mM GSSG ergab sich eine Steigerung der Ausbeute um das 2,5fache. Das Mengenverhältnis GSH zu GSSG orientierte sich an Literaturangaben (Lyles and Gilbert, 1991; Noiva, 1994). Der gegenteilige Effekt konnte beobachtet werden, wenn nur Corystein oder PDI in Abwesenheit des Redox-Paars eingesetzt wurden; in diesem Fall war eine Verringerung der Ausbeute um das Zweifache zu beobachten. Offensichtlich wurde das Redox-Paar GSH/GSSG im Einklang mit Literaturangaben (Lyles and Gilbert, 1991) für die Aktivierung der Cysteine in Corystein und PDI benötigt. Weil die Zugabe von GSH/GSSG allein schon für eine Steigerung der Ausbeute ausreichte, ist eine synergistische Wirkung mit dem in der Proteinlösung vorhandenen Thioredoxin zu vermuten. Für Corystein wurde beispielsweise gezeigt, dass es durch Thioredoxin effektiver als durch andere Reduktionsmittel wie DTT reduziert wird (Johnson et al., 1987), was auch für GSH gelten könnte. Zusätzlich wurde die Renaturierungsaktivität von Thioredoxin durch Corystein in Abwesenheit ausreichender Reduktionsäquivalente gehemmt, was zum Einen mit der Toxizität von Corystein in Zusammenhang stehen könnte und zum Anderen auf die Notwendigkeit des Redoxpaares GSH/GSSG im beschriebenen Renaturierungsansatz verweist.

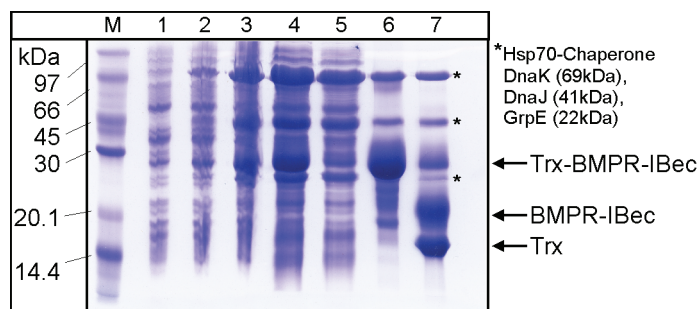


Abbildung IV-6: SDS-PAGE der Induktion, Ni-NTA-Reinigung und Thrombinspaltung von Trx-BMPR-IBec. *Bahnen:* M...Marker, 1...vor Induktion der Chaperone, 2...vor Induktion von Trx-BMPR-IBec, 3...nach Induktion von Trx-BMPR-IBec, 4...Rohextrakt, 5...Durchlauf der Ni-NTA-Säule, 6...vor / 7...nach Thrombinspaltung; alle Bahnen reduzierende Bedingungen.

Reinigungs-schritt	Corystein ^a	PDI ^b	Corystein ^a + GSH/GSSG ^c	PDI ^b + GSH/GSSG ^c	GSH/GSSG ^c	Kontrolle
Fermentation			6.7g/L TB			
Zellgewicht			20g			
Ni-Affinität 1			13.8mg/g			
Gelfiltration	1,3mg/g	1,6mg/g	1,5mg/g	1,6mg/g	1,3mg/g	1,3mg/g
Ni-Affinität 2	0,5mg/g	0,4mg/g	0,5mg/g	0,4mg/g	0,5mg/g	0,42mg/g
BMP-2-Säule	0,04mg/g	0,04mg/g	0,21mg/g	0,15mg/g	0,16mg/g	0,09mg/g

^a Corystein (Takara Bioscience) wurde in einer Konzentration von 5.0µg per 1mg rekombinantes Protein zugegeben. Corystein ist auch unter dem Namen Purothionin bekannt.
^b Proteindisulfidisomerase (PDI, Takara Bioscience) wurde in einer Konzentration von 1.0µg per 1mg rekombinantes Protein zugegeben.
^c Glutathion (reduziert, GSH, Sigma) und Glutathion (oxidiert, GSSG, Sigma) wurden im Verhältnis 5:1 zugegeben (GSH:GSSG entspricht 1mM:0.2mM).

Tabelle IV-4: Steigerung der Effizienz der BMPR-IBec Renaturierung durch Additive.

Im Anschluss an die Inkubationsperiode wurde nicht wie für BMPR-IA/IB^Cec beschrieben über eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt, sondern dieser Schritt durch eine Gelfiltrations- und eine zweite Ni-Affinitätschromatographie ersetzt. BMPR-IA/IB^Cec und Trx konnten durch die Anionenaustauschchromatographie effizient getrennt werden, weil deren (berechnete) isoelektrische Punkte ausreichend unterschiedlich sind ($pI_{\text{BMPR-IAec}}=4,76$; $pI_{\text{Trx}}=6,01$). Dies gilt nicht für BMPR-IBec ($pI_{\text{BMPR-IBec}}=5,57$), weshalb bei Anwendung des BMPR-IA/IB^Cec-Reinigungsprotokolls keine vollständige Abtrennung des Thioredoxin erreicht werden konnte. Weil Thioredoxin die Bindung der BMP Rezeptoren an die BMP-2-Affinitätsmatrix beeinträchtigt, musste ein alternatives Protokoll entwickelt werden, um BMPR-IBec in Form einer monomeren Fraktion frei von Begleitproteinen zu isolieren.

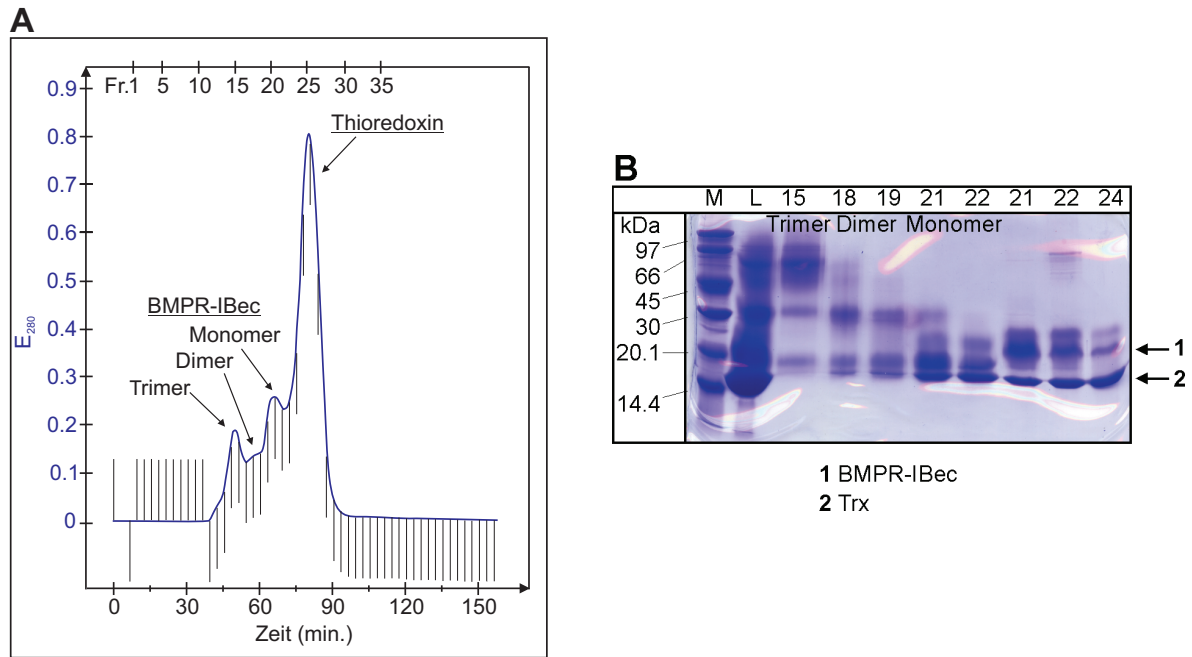


Abbildung IV-7: Chromatogramm und SDS-PAGE der Gelfiltrationssäule. **A:** Chromatogramm der Gelfiltration. **B:** SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen. **Bahnen:** M...Marker, L...Injiziertes Protein, Nummern...Fraktionen aus der Gelfiltration; Bahnen 2-7 (Fraktionen L, 15, 18, 19, 21, 22) nichtreduzierende Bedingungen und Bahnen 8-10 (Fraktionen 21, 22, 24) reduzierende Bedingungen.

Interessanterweise ließen sich Thioredoxin und BMPR-IBec trotz ihres fast gleichen Molekulargewichts gut durch Gelfiltration trennen. Wie aus Abbildung IV-7 (S. 72) ersichtlich ist, eluierten nacheinander trimere und dimere Formen von BMPR-IBec, dann monomeres BMPR-IBec und zuletzt Thioredoxin. Zwar konnte Thioredoxin im Gelfiltrationslauf nur unvollständig entfernt werden, gleichwohl fand die Trennung im Vergleich zur Anionenaustauschchromatographie unter milderen Bedingungen statt. Der am Thioredoxin nach der Thrombinspaltung verbleibende 6xHis-Tag erlaubte anschließend die effektive Abtrennung desselben mit Hilfe eines zweiten Ni-Affinitätschromatographieschritts. Die im Elutionsprofil in Abbildung IV-8 (S. 73) auffallende Bindung von BMPR-IBec an die Ni-NTA-Matrix kann mit den insgesamt sieben Histidinresten, wovon drei konsekutiv in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife angeordnet sind, erklärt werden. Der nach diesem Reinigungsschritt erhaltene, anschließend auf die BMP-2-Affinitätssäule aufgetragene BMPR-IBec-Ansatz war frei von kontaminierenden Proteinen, wie die einzelne BMPR-IBec-Bande im SDS-PAGE-Gel in Abbildung IV-8 (S. 73) illustriert. Aus dem Ansatz nach der Ni-NTA-Säule konnten mittels BMP-2-Affinitätschromatographie etwa 10-18% bindungsaktiver BMPR-IBec isoliert werden (Abbildung IV-8, S. 73). Dabei war sofort nach der Elution mit 4M $MgCl_2$ gegen TN_{150} -Puffer zu dialysieren, um eine Denaturierung bzw. Aggregation und damit Inaktivierung von BMPR-IBec zu vermeiden. Mit dem vorangehend erläuterten modifizierten Protokoll konnte die Ausbeute an aktivem, monomerem BMPR-IBec gegenüber dem ursprünglich verwendeten Reinigungsschema um 100% auf 0,4mg BMPR-IBec pro 1g Zellnassgewicht gesteigert werden (Tabelle IV-5, S. 77).

Aufgrund der Reinheit von BMPR-IBec nach der zweiten Ni-NTA-Säule wurde versucht, diesen Ansatz zur Präparation von binären Komplexen mit GDF-5 zu verwenden, um den kritischen Schritt der BMP-2-Affinitätschromatographie zu umgehen. Der Anteil an aktiven BMPR-IBec am

Gesamtansatz nach der Ni-NTA-Säule wurde bestimmt, indem unterschiedliche Mengen des Ansatzes für die Komplexpräparation eingesetzt wurden, und betrug etwa 20%.

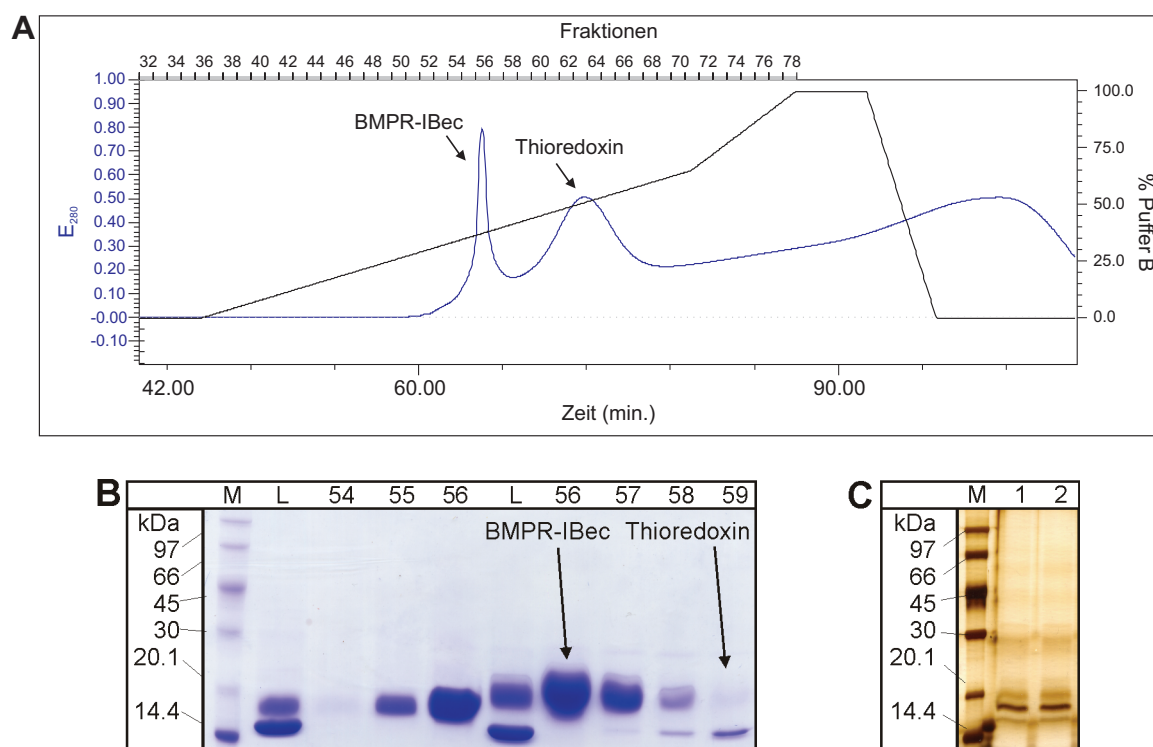


Abbildung IV-8: Chromatogramm und SDS-PAGE des zweiten Ni-NTA-Reinigungsschritts. A: Chromatogramm der zweiten Ni-Affinitätschromatographie. **B:** SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen. **Bahnen:** M...Marker, L...Injiziertes Protein, Nummern...Fraktionen aus Ni-NTA-Lauf, Bahnen 2-5 nichtreduzierende und Bahnen 6-10 reduzierende Bedingungen. **C:** Aktiver, monomerer BMPR-IBec (Trx) nach BMP-2-Affinitätschromatographie. **Bahnen:** M...Marker, Bahnen 1 und 2: BMPR-IB (Trx).

Ein Sequenzvergleich zwischen BMPR-IAec und BMPR-IBec offenbart Unterschiede in der Länge der N-Termini beider Rezeptoren. Mit Blick auf die Ergebnisse mit dem BMPR-IASf (IV. 1. 1. 6) stellte sich die Frage, ob die Stabilität und damit die Ausbeute von BMPR-IBec erhöht werden kann, wenn dessen N-Terminus entsprechend dem BMPR-IA verlängert wird. Dazu wurden die 19 N-terminalen Reste von BMPR-IAec mit dem N-Terminus von BMPR-IBec verknüpft (siehe Sequenzvergleich in Abbildung IV-46, S. 134). Experimente zeigten jedoch, dass sich der Anteil an aktivem, monomeren BMPR-IBec am insgesamt exprimierten Protein durch die Einführung des N-terminalen Peptids nicht steigern ließ. Die Ausbeute nach der BMP-2-Affinitätschromatographie war mit 0,3mg Protein pro 1g Zellnassgewicht geringer als für wildtypischen BMPR-IBec (Tabelle IV-5, S. 77). In Bindungsstudien wies diese BMPR-IBec-NTerm-Variante dem wildtypischen Protein vergleichbare Bindungseigenschaften auf (Tabelle IX-2, S. 234).

Nicht die Proteinreinigung, sondern die unzureichenden Beugungseigenschaften der Kristalle der BMP-Ligand-BMPR-IBec-Komplexe waren der Grund, eine Kristallkontaktmutante (BMPR-IB-KKM) zu konstruieren. Um günstigere Kristallkontakte zwischen den einzelnen Komplexmolekülen im Kristallgitter und damit einen geordneteren Aufbau des Kristalls zu erreichen, wurden Aminosäurereste, die Kristallkontakte im BMP-2•BMPR-IAec-Komplex (RCSB-Eintrag 1REW) ausbilden, in den BMPR-IBec übernommen (Tabelle III-16, S. 42). Die entsprechend dem oben vorgestellten Reinigungsschema rekombinant hergestellte BMPR-IB-KKM-Variante ließ sich in geringeren Ausbeuten als wildtypischer Rezeptor isolieren (~0,2mg/g Zellnassgewicht, Tabelle IV-5,

S. 77). Zur Präparation des binären Komplexes mit BMP-2 musste jedoch die dreifache Menge BMPR-IB-KKM – 99nmol statt üblicherweise 33nmol – eingesetzt werden, um das verwendete BMP-2 (15nmol) vollständig in einen binären Komplex zu rekrutieren.

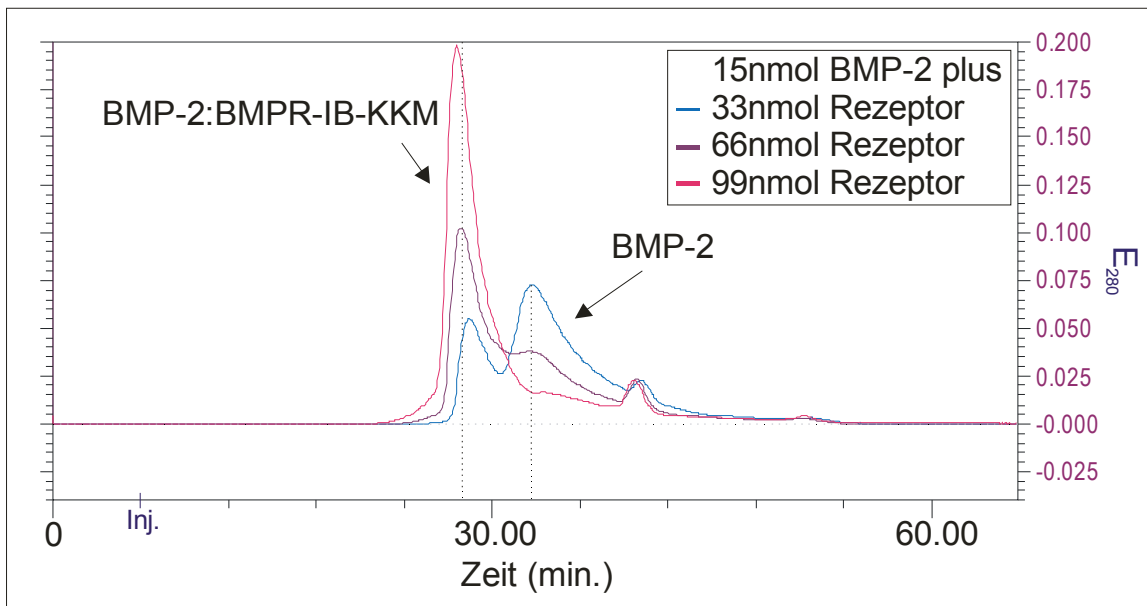


Abbildung IV-9: Hyperchromer Effekt in der BMPR-IB-KKM-Variante. Drei Ansätzen mit jeweils 15nmol BMP-2 wurden 33nmol, 66nmol und 99nmol BMPR-IB-KKM zugesetzt und der in MES-Puffer (mit 0,2% CHAPS) entstandene Komplex mittels Gelfiltration gereinigt. Mit steigender Menge Rezeptor ist deutlich die Extinktionsabnahme des BMP-2-Peaks ($t_R=26,9\text{min}$) bei gleichzeitiger Extinktionszunahme des Komplex-Peaks ($t_R=22,1\text{min}$) zu erkennen, was auf einen hyperchromen Effekt im BMPR-IB-KKM und damit etwa dreifach höheren Extinktionskoeffizienten hinweist. Da die Konzentration von BMPR-IB-KKM mit dem berechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt wurde, war die reale Konzentration im Ansatz also dreifach geringer als angenommen, sodass BMP-2 nicht vollständig in den binären Komplex rekrutiert wurde. Anderenfalls hätte bei Verwendung von 99nmol Rezeptor eine starke Absorption der nicht in den Komplex rekrutierten Rezeptormoleküle in Form eines dem Komplexpeak folgenden Peaks detektiert werden müssen. Das starke Tailing des zweiten Peaks ist charakteristisch für BMP-2, welches durch CHAPS teilweise in Lösung gehalten wurde. Die Proteinmengen für den Komplex-Peak sind in abnehmender Reihenfolge: 560 μg (Magenta), 280 μg (Flußblau) und 123 μg (Himmelblau).

Chromatogramme verschiedener Gelfiltrationsläufe zeigten deutlich eine höhere Intensität des Elutionspeaks für den Komplex bei gleichzeitig geringerer Intensität des Elutionspeaks für BMP-2 in Abhängigkeit von der BMPR-IB-KKM-Konzentration im Ansatz (Abbildung IV-9, S. 74). Dies weist auf einen durch eine oder mehrere der Aminosäuresubstitutionen – beispielsweise D81Y – verursachten hyperchromen Effekt hin, durch den sich der Extinktionskoeffizient von BMPR-IB-KKM offenbar verdreifachte. Das Fehlen eines Elutionspeaks von überschüssigem BMPR-IB-KKM bei Verwendung von 99nmol Rezeptor zur Komplexpräparation unterstreicht die Schlussfolgerung, dass nicht ein Drittel des eingesetzten BMPR-IB-KKM inaktiv waren, sondern dessen Extinktionskoeffizient verändert ist. Eine Proteinbestimmung in unterschiedlich konzentrierten Lösungen von BMPR-IB-KKM mittels eines BCA- (Bicinchoninsäure-) Tests (Smith et al., 1985) durch D. Weber (Physiologische Chemie II) ergab eine durchschnittlich 1,5fach niedrigere BMPR-IB-KKM-Konzentration als ursprünglich berechnet. Allerdings lieferte auch dieser Test nicht vom Tyrosin- oder Tryptophangehalt unabhängige Ergebnisse, sodass exakte Quantifizierung von BMPR-IB-KKM in Lösung nicht möglich war. Weiter gehende Analysen wie beispielsweise die experimentelle Massenbestimmung einer Rezeptorlösung durch Trocknung wurden nicht

durchgeführt (Pace et al., 1995). Die Kristallisationseigenschaften des BMP-2•BMPR-IB-KKM-Komplexes wurden mit für den BMP-2•BMPR-IBec-Komplex beschriebenen Pufferbedingungen (Keller, 2004) geprüft. Unter keiner der Pufferbedingungen konnten Kristalle des BMP-2•BMPR-IB-KKM-Komplexes beobachtet werden, sodass der Ansatz mit der BMPR-IB-KKM-Variante nicht weiter verfolgt und die Kristallisation von Komplexen des wildtypischen BMPR-IBec favorisiert wurde.

IV. 1. 2. 3. Reinigung des BMPR-IBec-DsbA-Fusionsproteins

Die Reinigung von BMPR-IBec aus der Expression als Thioredoxin-Fusion erfordert umfassende Chromatographie- und Proteinkonzentrationsschritte, wodurch dieser Reinigungsweg anfälliger für die Inaktivierung oder den Verlust von aktiven BMPR-IBec ist. Zudem kann zur Präparation von BMPR-IBec-Varianten, in denen einzelne, für die Bindung an GDF-5 oder BMP-2 wichtige Reste mutiert sind, die BMP-2-Affinitätschromatographie nicht eingesetzt werden. Letztere erübrigte sich bei Anwendung eines deutlich kürzeren Reinigungsprotokolls, bei dem BMPR-IBec aus einem DsbA-BMPR-IBec-Fusionsprotein isoliert wurde. Die Bindungsaffinität des so gewonnenen BMPR-IBec (DsbA) gegenüber BMP-2 und GDF-5 war vergleichbar mit der von BMPR-IBec (Trx) aus herkömmlicher Reinigung inklusive der BMP-2-Affinitätsreinigung (Tabelle IX-2, S. 234). Die Fusion an DsbA erwies sich im Vergleich zu den anderen getesteten Fusionen DsbC und Maltosebindendes Protein (MBP) am effizientesten hinsichtlich der Reinigungsprozedur und wurde aus diesem Grund verwendet.

Anders als bei der Reinigung von BMPR-IBec (Trx) wurde bei der Extraktion des DsbA-BMPR-IBec-Fusionsproteins nicht mittels Ultraschall sondern durch osmotischen Schock aufgeschlossen, um spezifisch Proteine aus dem Periplasma von *E.coli* freizusetzen. Wie Abbildung IV-10, S. 76, illustriert, war das über die Ni-NTA-Säule gereinigte Fusionsprotein bereits frei von vielen Verunreinigungen. Das Gel zeigt jedoch auch, dass sich noch große Mengen Fusionsprotein im Pellet befanden, was entweder auf einen unzureichenden Periplasmaaufschluss hinweist oder auf eine geringe Transportrate des Fusionsproteins aus dem zytoplasmischen in den periplasmischen Raum zurückzuführen ist. Als wichtig erwies sich, die NaCl-Konzentration des Rohextrakts (5mM MgSO₄ mit Fusionsprotein) durch Zugabe von 10fach konzentrierter TN₁₅₀-Pufferlösung auf maximal 150mM NaCl anzuheben und die Ni-NTA-Säule mit diesem äquilibrierten Rohextrakt zu beladen. Bei Verwendung höherer NaCl-Konzentrationen im Rohextrakt konnte in der späteren Anionenaustauschchromatographie eine deutliche Zunahme an multimeren BMPR-IBec-Formen beobachtet werden. Die Ausbeuten an isoliertem Fusionsprotein waren mit 0,2mg/g deutlich geringer als die von BMPR-IBec-Trx (20,9mg/g).

Die Thrombinspaltung des BMPR-IBec-DsbA-Fusionsproteins erfolgte wie für BMPR-IBec (Trx) beschrieben. Nach der Dialyse des Thrombinspaltansatzes gegen TN₃₅-Puffer wurde sofort mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Durch Inkubation über mehrere Tage konnte keine Verbesserung der Ausbeute, vielmehr eine verstärkte Bildung von Multimeren zu Lasten des aktiven Monomers beobachtet werden. Dies ähnelt dem Versuch, Corystein oder PDI ohne dem Glutathion-Redox-Paar der Renaturierung von BMPR-IBec (Trx) zuzusetzen (IV. 1. 2. 2) und lässt die Schlussfolgerung zu, dass DsbA in Analogie zu Corystein oder PDI beispielsweise bei Fehlen des Redox-Systems ebenfalls einen negativen Einfluss auf eine mögliche Renaturierung von BMPR-IBec hat. Offenbar katalysiert DsbA vor allem die Bildung von korrekten Disulfidbrücken; falsch ausgebildete Disulfidbrücken können jedoch nicht korrekt isomerisiert werden, vielleicht weil dazu notwendige Chaperone in der Proteinlösung fehlen (Noiva, 1994).

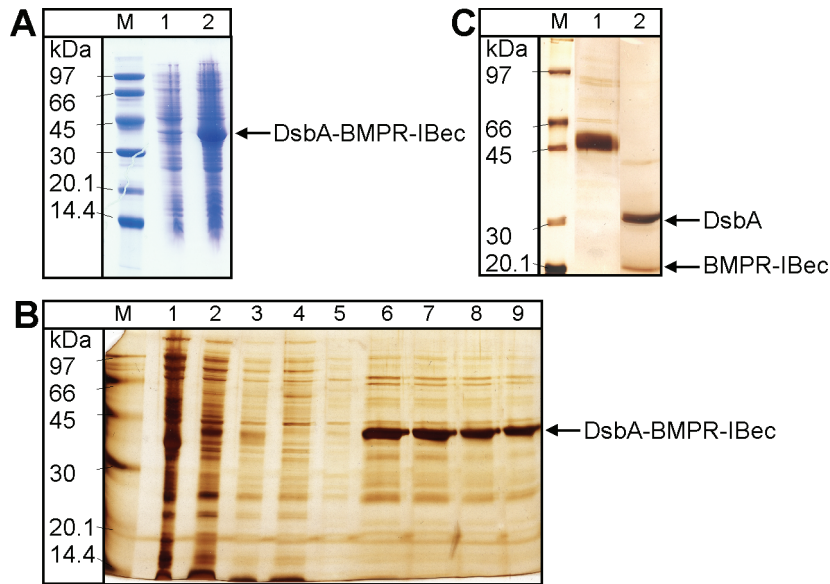


Abbildung IV-10: Induktion, Periplasmaaufschluss und Thrombinspaltung von DsbA-BMPR-IBec. **A:** Induktion von DsbA-BMPR-IBec; 1...vor / 2...nach Zugabe von IPTG. **B:** Periplasmaaufschluss (PA) und Fraktionen der Ni-Affinitätssäule. *Bahnen:* 1...Pellet nach PA, 2...Überstand nach Resuspension der Zellen in Sucrose-Puffer, 3...Überstand nach Resuspension der Zellen in 5mM MgSO₄ (=PA), 4...Durchlauf der Ni-Affinitätssäule, 5...Waschen der Ni-Affinitätssäule, 6-9...Fraktionen der Ni-Affinitätssäule. **C:** Thrombinspaltung (TS) von DsbA-BMPR-IBec; 1...vor / 2...nach TS.

Durch den höheren isoelektrischen Punkt ist DsbA ($pI_{DsbA}=6,75$) bei pH=8 weniger negativ geladen als BMPR-IBec ($pI_{BMPR-IBec}=5,57$). Dementsprechend interagiert nur BMPR-IBec, nicht aber DsbA mit der Anionenaustauschmatrix (Abbildung IV-11, S. 77). Die SDS-PAGE-Analyse zeigt, dass DsbA, BMPR-IBec und die geringen Mengen an BMPR-IBec-Multimeren mit diesem Reinigungsschritt sehr effizient getrennt werden konnten. Mit Blick auf die unterschiedlichen Molekulargewichte von DsbA ($M_w=25kDa$) und BMPR-IBec ($M_w=13,2kDa$) wurde alternativ versucht, über eine Gelfiltrationssäule ähnlich wie in IV. 1. 2. 2 zu reinigen. Vermutlich aufgrund starker nichtkovalenter Wechselwirkungen zwischen DsbA und BMPR-IBec war dabei keine Trennung zu erreichen (nicht gezeigt).

Mit dem aus der Anionenaustauschchromatographie erhaltenen BMPR-IBec (DsbA) wurden Bindungsstudien am Biacore-Gerät durchgeführt, um auf die Bindungsaktivität des Rezeptors zu prüfen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindungskinetiken von BMPR-IBec (DsbA) gegenüber BMP-2 und GDF-5 den für BMP-2-affinitätsgereinigten BMPR-IBec (Trx) bekannten Werten entsprechen (Tabelle IX-2, S. 234). Allerdings wurde eine geringere Masse BMP-2 bzw. GDF-5 durch den auf dem Biacore-Chip immobilisierten BMPR-IBec (DsbA) gebunden, was darauf hindeutet, dass der BMPR-IBec-Ansatz nach dem Anionenaustausch nicht nur aktiven, monomeren Rezeptor, sondern teilweise inaktiven Rezeptor enthielt. Für Bindungsstudien mit immobilisiertem Rezeptor konnte dies vernachlässigt werden. Experimente mit immobilisierten Liganden oder zellbasierende Assays erfordern hingegen eine BMP-2-Affinitätsreinigung nach der Anionenaustauschchromatographie von BMPR-IBec (DsbA). Die massenspektrometrische Analyse von BMPR-IBec (DsbA) ergab ein mit der Theorie übereinstimmendes Molekulargewicht von 13056Da. Die Ausbeute an BMPR-IBec (DsbA) war bezogen auf das Zellnassgewicht mit 0,1mg/g vergleichsweise gering (Tabelle IV-5), für analytische Anwendungen wie Bindungsstudien jedoch ausreichend. Das auf der DsbA-Fusion basierende Protokoll bietet damit eine Möglichkeit zur schnellen Präparation von BMPR-IBec-

Varianten für analytische Zwecke. Die für die Herstellung und Kristallisation von Ligand-BMPR-IBec-Komplexen notwendigen Mengen an BMPR-IBec lassen sich besser über den in III. 14. 2. beschriebenen Weg als Trx-Fusionsprotein herstellen.

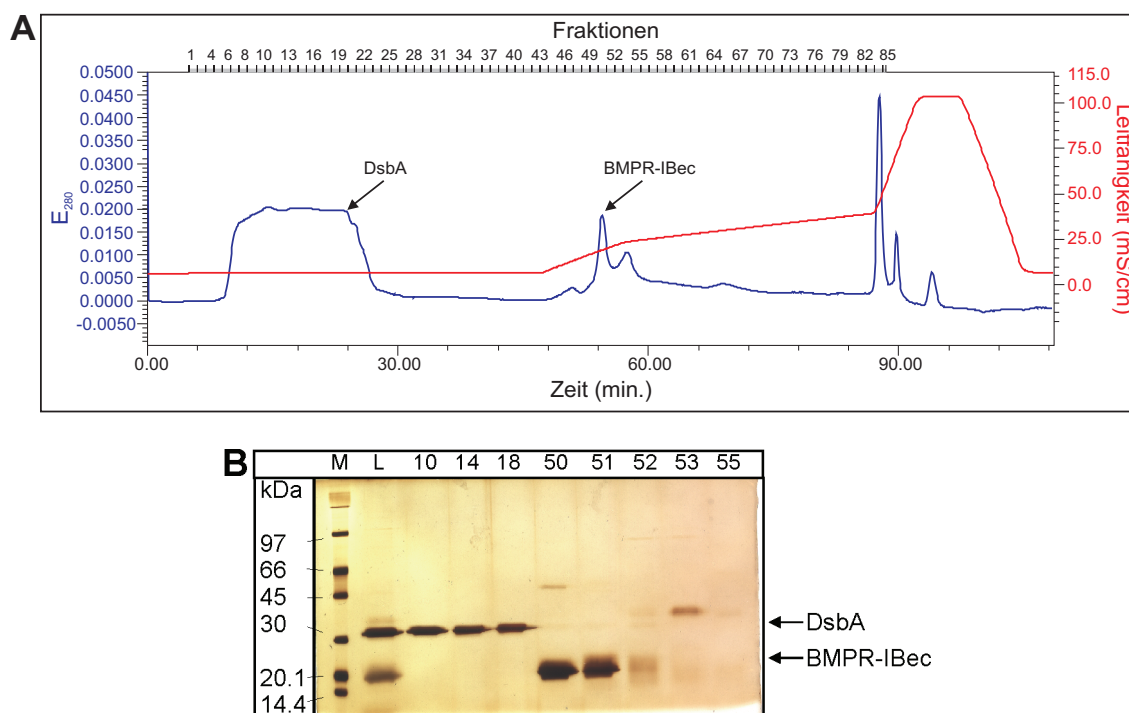


Abbildung IV-11: Anionenaustauschchromatographie von BMPR-IBec (DsbA). **A:** Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie. **B:** SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen. **Bahnen:** M...Marker, L...Injiziertes Protein, Nummern: Fraktionen aus (A), alle Bahnen nichtreduzierende Bedingungen.

Reinigungsschritt	BMPR-IBec	BMPR-IBec	BMPR-IB-KKM	BMPR-IB-NTerm
	Trx	DsbA	Trx	Trx
Fusion	3,6g pro L TB	8,5g pro L TB	8,8g pro L TB	4,8g pro L TB
Fermentation	3,6g pro L TB	8,5g pro L TB	8,8g pro L TB	4,8g pro L TB
Zellnassgewicht	23g	13,6g	22g	11,8g
Ni-Affinitätssäule 1	20,9mg/g	0,2mg/g	18,3mg/g	19,9mg/g
Anionenaustauschsäule	-	0,1mg/g	-	6,2mg/g ^a
Gelfiltrationssäule	4,1mg/g ^a	-	5,2mg/g ^a	-
Ni-Affinitätssäule 2	2,2mg/g	-	1,9mg/g	-
BMP-2-Affinitätssäule	0,4mg/g	-	0,2mg/g	0,3mg/g

^a Weil laut SDS-PAGE noch etwa 20% Trx enthalten sind, wird durch Anwendung von $E_{280} = (\epsilon_{BMPR-IBec} + 0,2\epsilon_{Trx}) \cdot c_{BMPR-IBec} \cdot d$ um den Beitrag von Trx zur Absorption korrigiert.

Tabelle IV-5: Reinigungstabelle für BMPR-IBec.

IV. 1. 2. 4. Selenomethionin-Markierung von BMPR-IBec

Die Selenomethionin-Markierung von BMPR-IBec erfolgte in Anlehnung an Literaturangaben (Budisa et al., 1995) nach dem in III. 13. 3. 5 angegebenen Protokoll durch Expression in Minimalmedium, welches mit Selenomethionin supplementiert wurde. Die Verwendung von *E.coli* B834 (DE3) erlaubte den spezifischen und vollständigen Einbau von Selenomethionin an allen drei möglichen Positionen in BMPR-IBec (Met-2, Met43, Met51), wie das Massenspektrum in Abbildung

IV-12, S. 78, klar zeigt. Es war nur ein geringer Anteil einer BMPR-IBec-Form mit zwei Se-Met zu beobachten. Das berechnete Molekulargewicht von Se_3 -BMPR-IBec stimmte mit dem experimentell ermittelten überein (Soll: 13324,833amu, Experimentell: 13325,107amu). Die Reinigung des markierten Rezeptors erfolgte gemäß dem in III. 14. 2. beschriebenen Verfahren (Ausbeuten in Tabelle IV-6, S. 78). Die abschließende Reinigung über eine BMP-2-Affinitätssäule erfolgte jedoch nicht. Zur Präparation von Komplexen mit GDF-5 wurde deshalb der Ansatz nach der zweiten Ni-NTA-Säule eingesetzt. Basierend auf der Ausbeute an GDF-5•Se-BMPR-IBec-Komplex ließ sich der Anteil von biologisch aktivem Se-BMPR-IBec im Ni-NTA-Ansatz mit ~10% bestimmen, was 0,09mg/g Zellnassgewicht entsprach. Die vergleichsweise geringe Ausbeute kann auf die reduzierende Umgebung im Zytoplasma des *E.coli* BL21 (DE3) Derivats *E.coli* B834 (DE3) zurückgeführt werden. Eine SDS-PAGE-Analyse von Se-BMPR-IBec findet sich bei den Komplexpräparationen in Abschnitt IV. 4. 2.

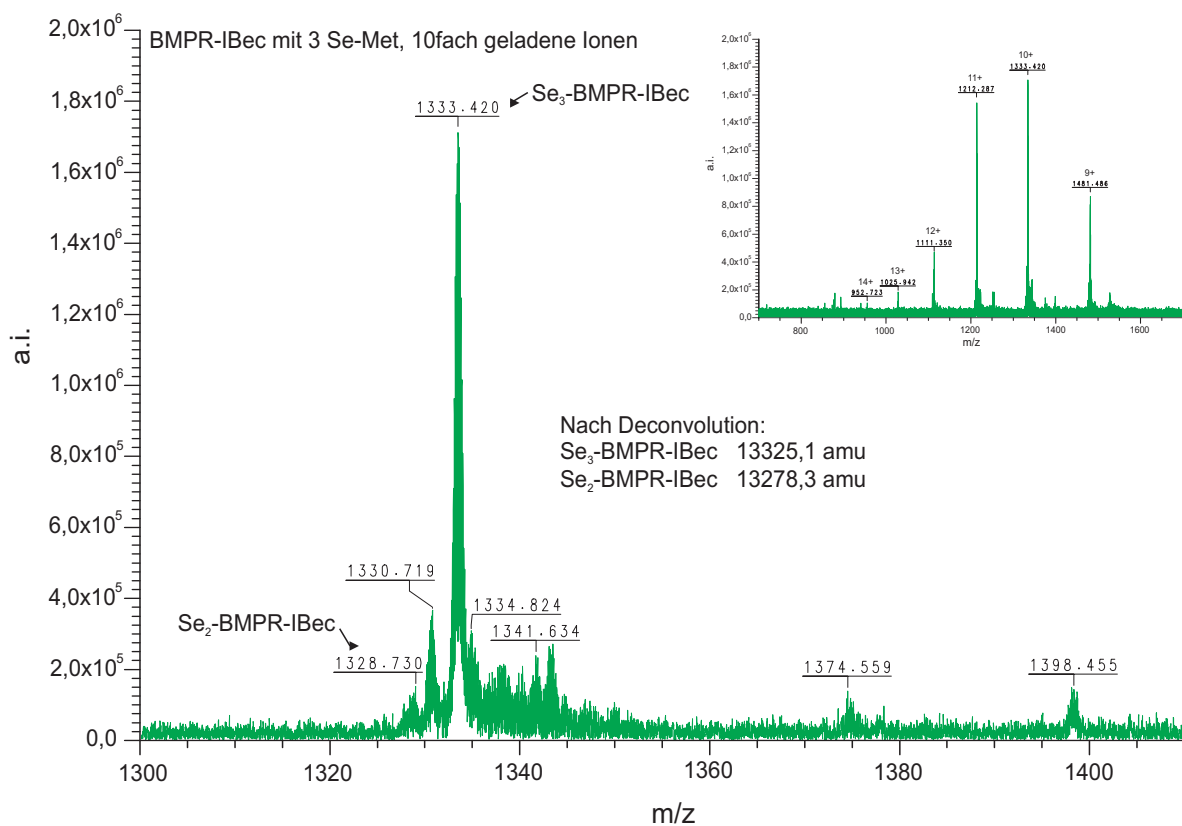


Abbildung IV-12: Massenspektrum von Se-BMPR-IBec. Der präparierte Se-BMPR-IBec konnte nahezu homogen mit Se-Methionin markiert werden. Spezies mit zwei Se-Methioninresten hatten nur einen vernachlässigbaren Anteil am Gesamtprotein. Eine Kreuzmarkierung von Cysteinresten mit Selen war nicht zu beobachten.

Fermentation	Zellnassgewicht	Ni-Affinitätssäule 1	Gelfiltrationssäule	Ni-Affinitätssäule 2
5,8g pro L M9	28g	11,1mg/g	2,4mg/g	0,9mg/g ^a

^a Der Anteil an biologisch aktivem Rezeptor beträgt ~10%, also ~0,09mg/g Zellnassgewicht.

Tabelle IV-6: Reinigungstabelle für Se-BMPR-IBec.

IV. 1. 3. ActR-IIBec

ActR-IIBec wurde nach einem Protokoll von D. Weber (Weber, 2006) exprimiert und zur Homogenität gereinigt. Die entsprechenden Reinigungsschritte und Ausbeuten sind in der genannten Arbeit ausführlich diskutiert und konnten im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle nur die SDS-PAGE-Analyse von gereinigtem ActR-IIBec (Abbildung IV-13, S. 79) sowie die Reinigungstabelle (Tabelle IV-7, S. 79) vorgestellt werden. Die abschließende Reinigung von ActR-IIBec erfolgte mittels RP-HPLC. Ein kleiner Teil des ActR-IIBec-Ansatzes nach der Anionenaustauschchromatographie wurde auf eine BMP-2-Affinitätssäule gegeben, um den Anteil an aktivem ActR-IIBec im Ansatz zu bestimmen. Dabei konnten ~70% des Gesamtproteins an die BMP-2-Affinitätssäule gebunden werden.

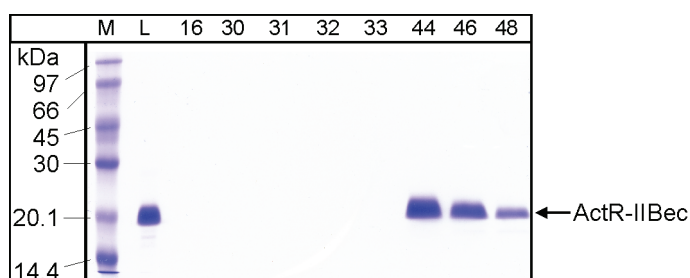


Abbildung IV-13: SDS-PAGE der ActR-IIBec-Fractionen nach der RP-HPLC. Bahnen: M...Marker, L...Injiziertes Protein (Ansatz nach Anionenaustauschsäule), Nummern: Fractionen nach der RP-HPLC; alle Bahnen nichtreduzierende Bedingungen.

Fermentation	Zellnassgewicht	Ni-Affinitätssäule 1	Anionenaustauschsäule	RP-HPLC
3,4g pro L TB	10,8g	16,3mg/g	1,8mg/g	1,1mg/g

Tabelle IV-7: Reinigungstabelle für ActR-IIBec.

IV. 1. 4. GDF-5 und Varianten

GDF-5 sowie die in Tabelle III-16 aufgeführten Varianten wurden nach einem Protokoll von J. Nickel (persönliche Mitteilung) aus Einschlusskörpern renaturiert und gereinigt (siehe III. 14. 5.). Am Beispiel von Selenomethionin-markierten GDF-5 (Se-GDF-5) sollen die Ergebnisse der Reinigung kurz vorgestellt werden. Die in Tabelle IV-8, S. 81, angegebenen Ausbeuten können für die einzelnen GDF-5-Varianten sowie für wildtypisches GDF-5 stark unterschiedlich sein und schwanken zwischen 15,7mg/g Einschlusskörper (H59L-Variante) und 2,4mg/g Einschlusskörper (DP-Variante). Für die GDF-5-del56L-Variante konnten bemerkenswerterweise dimeres und monomeres Protein in annähernd gleichen Ausbeuten erhalten werden, während bei den Präparationen von GDF-5 und weiteren GDF-5-Varianten der Anteil an monomerem Liganden so gering war, dass dieser nicht isoliert werden konnte. Die massenspektrometrische Analyse für die GDF-5-del56L-Variante ergab, dass im Monomer ein Cysteinrest mit Glutathion, welches zur Renaturierung eingesetzt wurde, verknüpft war (Tabelle IX-1, S. 230).

Während der Reinigung von Se-GDF-5 musste unter stark reduzierenden Bedingungen gearbeitet werden, um unerwünschte Oxidationsprodukte zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden nach der Abtrennung von Nukleotiden und DNA-Fragmenten mittels der S200-Säule erneut 1/2000 (v/v) β -ME sowie 1mM DTT zum Se-GDF-5-Ansatz gegeben. Bei der Gelfiltration mit der S200-Säule unter

denaturierenden Bedingungen eluierte Se-GDF-5 in einem Peak zwischen höhermolekularen DNA-Fragmenten und Nukleotiden. Fraktionen mit einem UV-Absorptionsmaximum bei 270-275nm wurden gesammelt. Die Se-GDF-5-Fraktionen wurden auf etwa 12,7mg/ml (V=17ml) eingengt und die Lösung in 2,5l Renaturierungspuffer getropft. Nach achttägiger Inkubation bei 14°C wurde bei pH3,0 eingengt und gegen 1mM HCl dialysiert, wobei sich zunächst ein weißer Niederschlag bildete, der sich jedoch nach weiteren Dialyseschritten wieder teilweise auflöste. Der Überstand wurde mit 30% Isopropanol und 20mM NaOAc pH4,5 versetzt und erneut zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Bei der folgenden Kationenaustauschchromatographie eluierte dimeres Se-GDF-5 bei einer NaCl-Konzentration von ~1M (Abbildung IV-14, S. 80). Die SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen zeigt, dass neben dem Dimer nur geringe Mengen Monomer, aber größere Mengen einer nicht identifizierten Verunreinigung mit einem Molekulargewicht von 97kDa vorlagen. Fraktionen mit dimeren GDF-5 (Peakmaximum; etwa Fr. 58-70) wurden vereinigt und mehrmals gegen 1mM HCl, dann dH₂O dialysiert und konzentriert. Zuletzt wurde mittels HPLC gereinigt, wobei ein Teil des monomeren Se-GDF-5, jedoch nicht die Verunreinigung bei 97kDa abgetrennt werden konnte (Abbildung IV-15, S. 81). Anschließend wurden die vereinigten Fraktionen gegen dH₂O dialysiert, eingengt und Aliquots von Se-GDF-5 lyophilisiert. Die Ausbeute war mit 29mg Se-GDF-5 aus 9,0g Zellmasse (Nassgewicht) sehr hoch (Tabelle IV-8, S. 81).

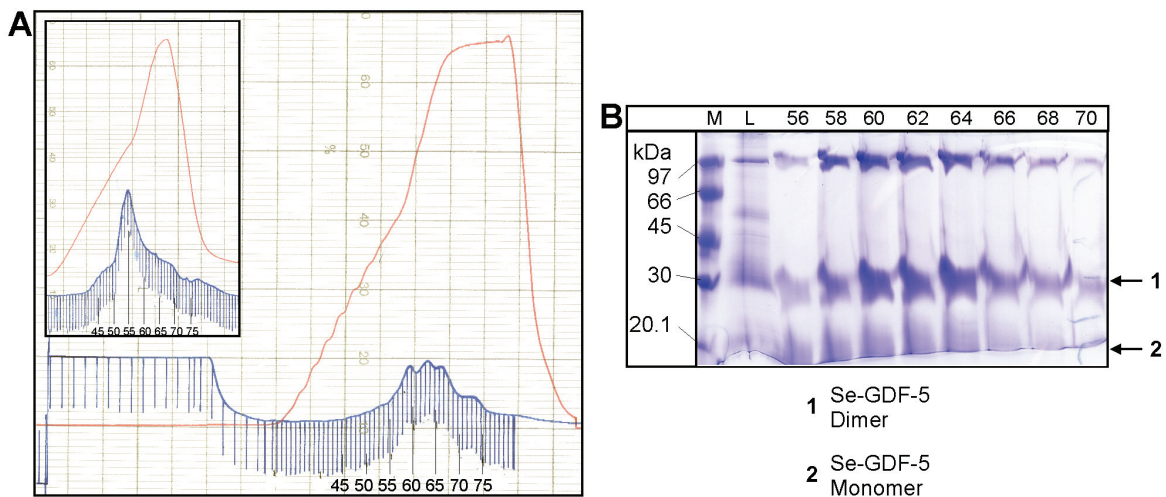


Abbildung IV-14: Kationenaustauschchromatographie von Se-GDF-5. **A:** Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie mit Se-GDF-5. Das große Bild zeigt den zur SDS-PAGE in **(B)** gehörenden Chromatographielauf, das kleine Bild einen zweiten Lauf mit einem deutlicheren Elutionspeak. **B:** SDS-PAGE der Gelfiltrations-Fraktionen. Die Laufeigenschaften der Proteine auf dem Gel werden durch den 30%igen Gehalt an Isopropanol in den Proben beeinträchtigt. **Bahnen:** M...Marker, L...injiziertes Protein, Nummern...Fraktionen nach Gelfiltration; alle Bahnen nichtreduzierende Bedingungen.

Die massenspektrometrische Analyse des Se-GDF-5 zeigte eine sehr uneinheitliche Markierung mit Se-Met (Abbildung IV-16, S. 82). Anders als bei Se-BMP-IBec fanden sich bei Se-GDF-5 sehr viele Signale im Massenspektrum, welche sich in ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis nur geringfügig unterscheiden. Dies weist auf multiple Spezies hin, welche beispielsweise durch unvollständigen Einbau von Se-Met, aber auch durch Kreuzmarkierung von Cysteinresten mit Se entstanden sein könnten. Dimeres GDF-5 enthält zehn Methioninreste, davon zwei am N-Terminus. Bei vollständiger Markierung von GDF-5 mit Se-Methionin ergibt sich deshalb ein Molekulargewicht von 27230,462amu. Dem Massenspektrum ist zu entnehmen, dass im präparierten Se-GDF-5-

Ansatz eine Spezies mit 11 oder 12 Se-Atomen dominierte (27277,925amu bzw. 27324,855amu), was auf den Einbau von Selenocystein hinweist.

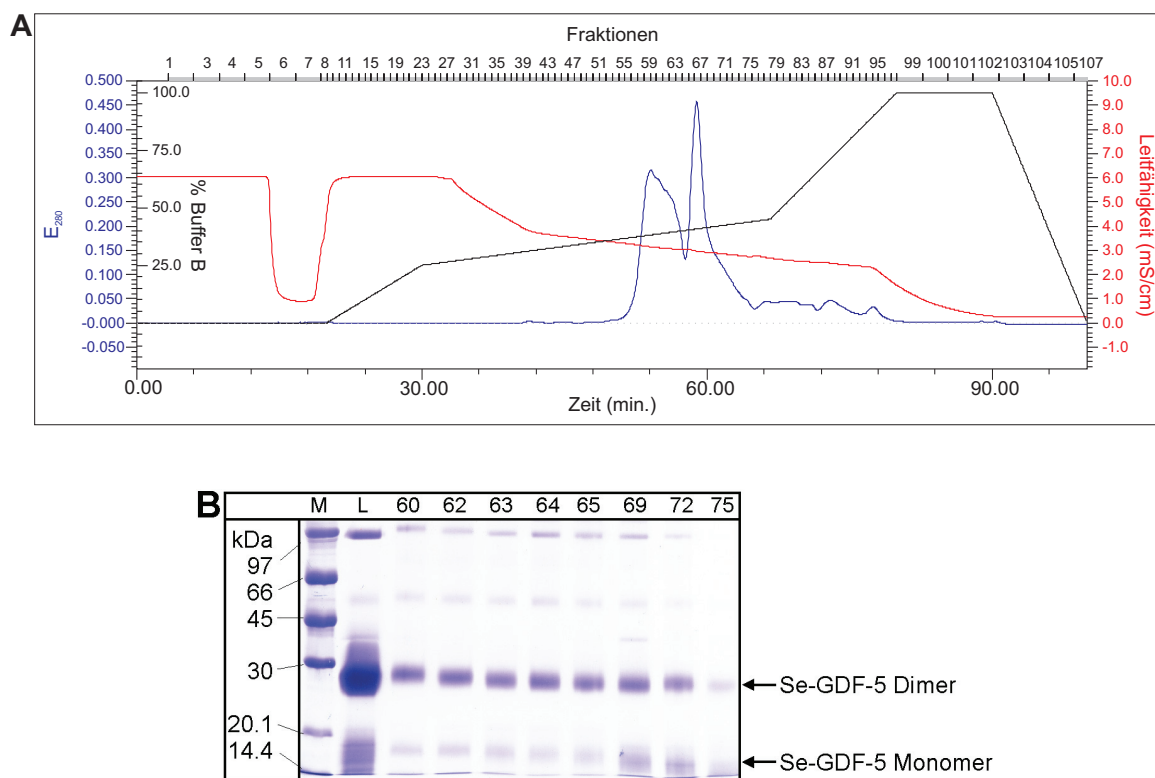


Abbildung IV-15: Präparative RP-HPLC von Se-GDF-5. **A:** Chromatogramm der präparativen RP-HPLC. **B:** SDS-PAGE der Fraktionen. **Bahnen:** M...Marker, L...Injiziertes Protein, Nummern: Fraktionen nach der RP-HPLC; alle Bahnen nichtreduzierende Bedingungen.

Trotz Wiederholung der Präparation konnte kein homogeneres Se-GDF-5 erhalten werden. Fraglich bleibt, warum nur bei der Markierung von Se-GDF-5, nicht aber BMPR-IBec derartige Probleme auftraten. Das hergestellte Se-GDF-5 zeigte trotz mangelnder Homogenität eine dem unmarkierten GDF-5 vergleichbare Aktivität und wies zusätzlich eine erhöhte Löslichkeit in Gegenwart von Salzen auf. Die Ausbeuten in parallel durchgeführten Komplexpräparationen von GDF-5 und Se-GDF-5 mit BMPR-IBec bzw. BMPR-IA/IB^cec waren vergleichbar hoch.

Fermentation	Zellnassgewicht	Einschlusskörper	Gelfiltration	Kationenaustauschsäule	HPLC
3,8g pro L M9	9,0g	0,3g/g	23,8mg/g	- ^a	3,2mg/g

^a Wegen Eintrübung der Lösung konnte die Menge nicht bestimmt werden. Die Trübung konnte nicht durch Zentrifugation beseitigt werden.

Tabelle IV-8: Reinigungstabelle für Se-GDF-5.

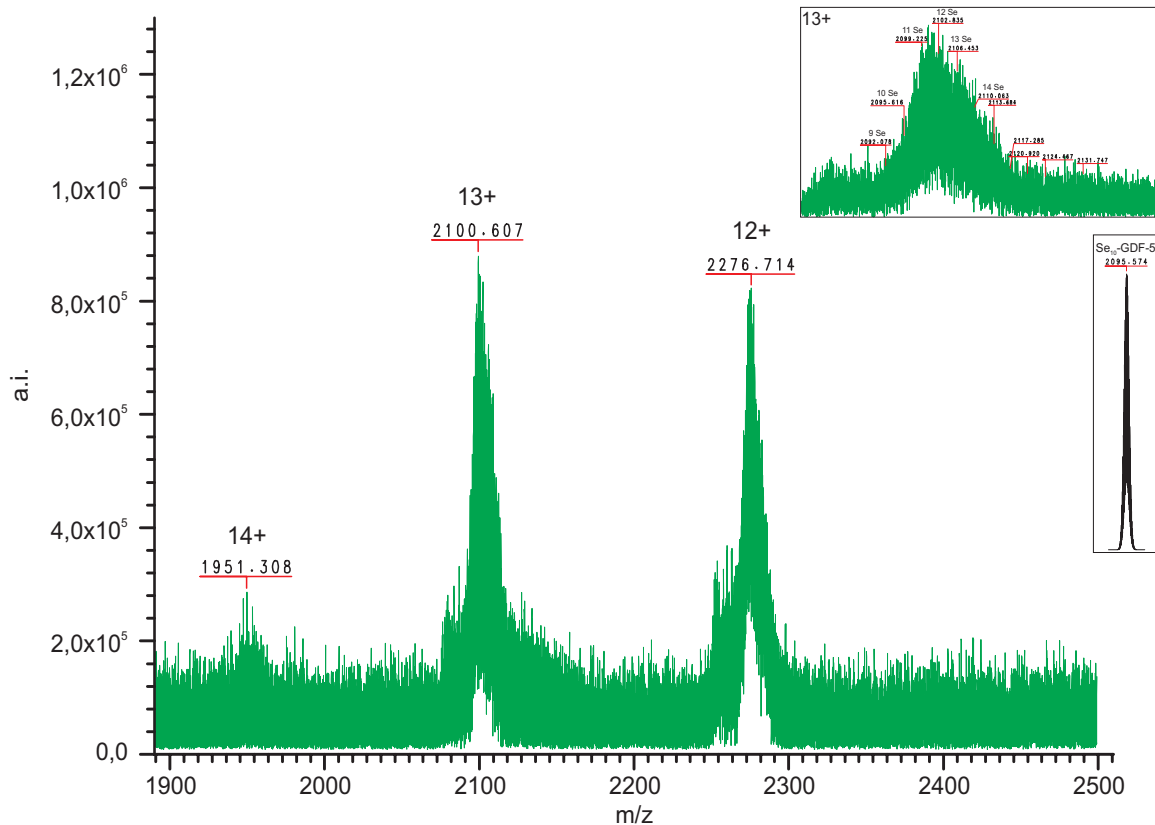


Abbildung IV-16: Massenspektrum von Se-GDF-5. Das theoretische Masse-Ladungsverhältnis für 13fach positiv geladenes Se₁₀-GDF-5 ist 2095,574amu (kleines Bild Mitte rechts). Tatsächlich überwiegen in der Probe die Spezies mit 11 und 12 Selenatomen pro dimerem GDF-5, während Se₁₀-GDF-5 in deutlich geringeren Mengen vorhanden war (kleines Bild oben rechts). Die vielen Signale im MS-Spektrum lassen auf eine hohe Anzahl von Se-markierten GDF-5-Spezies schließen, weshalb das präparierte Se-GDF-5 nicht homogen ist. Auf die Bindungsaktivität zu den Typ I Rezeptoren hatte dies keinen Einfluss.

IV.2. Biophysikalische Charakterisierung der präparierten Proteine

IV. 2. 1. Massenspektrometrie

Alle präparierten Proteine wurden durch Massenspektrometrie auf ihre Identität geprüft (III. 12. 7.). Eine Tabelle mit den berechneten und experimentell bestimmten Molekulargewichten der in dieser Arbeit diskutierten Proteine findet sich im Anhang (Tabelle IX-1, S. 230). Besonderheiten betreffend die Markierung von Proteinen mit Isotopen (¹⁵N, ¹³C) oder Schweratomen (Se) werden jeweils im entsprechenden Kapitel behandelt.

IV. 2. 2. Messung der Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen

Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz-Messungen (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) unter Verwendung des Biacore 2000 Systems durch Dr. J. Nickel bestimmt (III. 12. 9.). Für die Bildung des BMP-2•BMPRII-Komplexes

wurden zudem thermodynamische Parameter der Interaktion durch isothermale Mikrokolorimetrie (engl. isothermal titration calorimetry, ITC) gemessen (III. 12. 11.).

IV. 2. 2. 1. Oberflächenplasmonresonanz (SPR, Biacore)

Alle im Rahmen dieser Arbeit präparierten Proteine wurden hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber Partnermolekülen charakterisiert. Grundsätzlich wurden die extrazellulären Domänen der BMP Rezeptoren immobilisiert. Die Dissoziations-konstanten (K_D) wurden aus den Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeiten (k_{off}) berechnet. Sind letztere nicht messbar, kann K_D alternativ aus der Dosisabhängigkeit des Bindungsgleichgewichts berechnet werden. Hierzu werden analog zur Enzymkinetik nach Michaelis-Menten die jeweils reziproken Werte der Massenzunahme (engl. Resonance Units, RU) bei den sechs Analytkonzentrationen (c_A) aufgetragen und aus dem Anstieg der Geraden der Wert für $K_{D,eq}$ ermittelt (Gleichung 1). Voraussetzung hierfür ist, dass sich die Reaktion im chemischen Gleichgewicht befindet.

$$\frac{1}{[RU]} = \frac{K_{D,eq}}{[RU]_{max}} \cdot \frac{1}{c_A} + \frac{1}{[RU]_{max}} \quad (1)$$

Im Anhang sind die Bindungsdaten aller in dieser Arbeit diskutierten Proteine zusammengefasst (Tabelle IX-2, Tabelle IX-3 auf den Seiten 234 und 235).

BMPR-IAec-Varianten

Die Präparation, vielmehr jedoch die Kristallisation und Strukturanalyse eines Komplexes zwischen BMP-2 und BMPR-IBec erwies sich in vorherigen Arbeiten als sehr schwierig, weil zwar große Proteinkristalle erhalten werden konnten, diese jedoch sehr heterogene Beugungseigenschaften zeigten und somit kein Datensatz mit Röntgenbeugungsdaten aufgenommen werden konnte (Keller, 2004). Aus diesem Grund wurde überlegt, eine den BMPR-IBec imitierende Rezeptorvariante basierend auf BMPR-IAec zu erzeugen. In dieser chimären BMPR-IAec-Variante BMPR-IA/IB^Cec wurden alle Aminosäurereste, welche im Komplex von BMPR-IAec mit BMP-2 in Kontakt mit BMP-2 sind, gegen solche von BMPR-IBec ausgetauscht, während das Grundgerüst unverändert blieb (siehe Tabelle III-16, S. 42). Der Austausch der Aminosäuren erfolgte konsekutiv in Blöcken von nahe beieinander liegenden Resten, sodass auch weitere BMPR-IAec-Varianten (B1, B12, B123, B1234) erhalten wurden und der Effekt der einzelnen Austausche bzw. Regionen auf die Bindungseigenschaften studiert werden konnte.

Diese BMPR-IAec-Varianten wurden zunächst hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber BMP-2 und GDF-5 untersucht (Tabelle IX-2, S. 234). Die Bindungscharakteristika, insbesondere die Dissoziationsgeschwindigkeiten, geben Aufschluss darüber, welche Aminosäuren an der Erkennung von BMP-2 und GDF-5 beteiligt sind. Gegenüber BMP-2 weist BMPR-IBec eine 10fach höhere Dissoziationsgeschwindigkeit auf als BMPR-IAec, während man bei GDF-5 die umgekehrte Situation findet, also BMPR-IAec etwa 2,5-4fach schneller aus einem Komplex mit GDF-5 dissoziiert als BMPR-IBec. Aus den Messdaten ergibt sich, dass die Substitutionen K88R, S90T, K92I, A93P, H95Q, T98S („B1“) und A74T, M78L, K79G, Y80L („B12“) in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife bzw. $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IAec zu für BMPR-IBec charakteristischen Bindungseigenschaften gegenüber GDF-5 führen. Bei Bindung von BMP-2 reichen die Substitutionen des B1-Blocks, um die für BMPR-IBec tabellierte Bindungskinetik zu erhalten. Die Einführung der B12-Substitutionen kompensiert diesen Effekt und erst nach dem zusätzlichen Austausch von A61T und I62M im $\beta 3$ -Strang von BMPR-IAec (BMPR-IA/IB^C) konnten wieder für den BMPR-IBec charakteristische Bindungseigenschaften

beobachtet werden. Die Bindungskurven der einzelnen Varianten veranschaulichen dies recht deutlich (Abbildung IV-17, S. 84). Erstaunlich ist hierbei, dass diese Aminosäurereste in peripheren Bereichen des Bindeepitops liegen und sich nur drei Reste (Ala74, Ala61, Ile62) in Bereichen definierter Sekundärstruktur, die anderen in teilweise unstrukturierten, die Sekundärstrukturelemente verbindenden Schleifen befinden. Die BMPR-IA/IB^C-Variante entspricht hinsichtlich ihrer Bindungscharakteristika sowohl gegenüber BMP-2 als auch GDF-5 dem BMPR-IBec und kann somit anstelle von BMPR-IBec in der strukturellen Analyse von Ligand-Rezeptor-Komplexen eingesetzt werden.

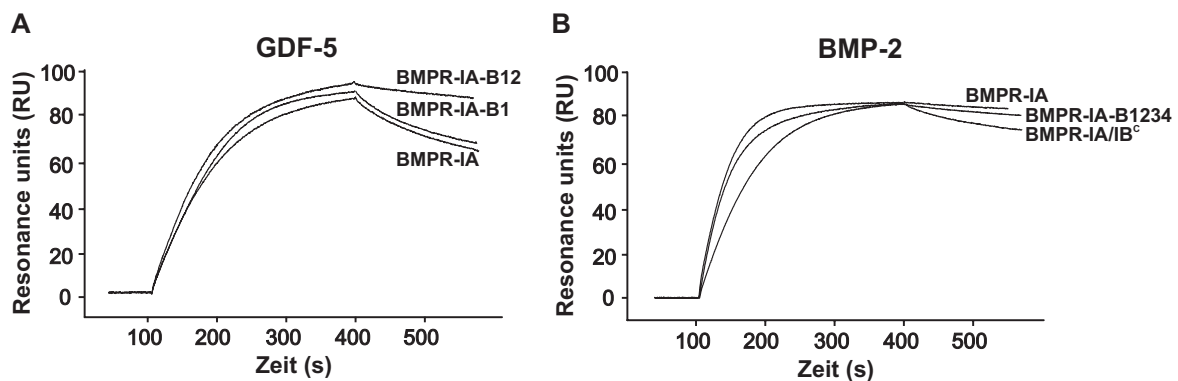


Abbildung IV-17: Bindungskurven von GDF-5 und BMP-2 an BMPR-IAec-Varianten. A: Bindungskurve von GDF-5 an immobilisierten BMPR-IAec und dessen Varianten B1 und B12. **B:** Bindungskurve von BMP-2 an immobilisierten BMPR-IAec und dessen Varianten B1234 und IA/IB^C. Die Kurven wurden einem Artikel von Nickel et al. entnommen (Nickel et al., 2005).

Die verkürzten BMPR-IAec-Varianten, welche in der NMR-Spektroskopie eingesetzt wurden, zeigten dem wildtypischen BMPR-IAec vergleichbare Bindungseigenschaften (Tabelle IX-2, S. 234). Die Abspaltung des N-terminalen, 27 Aminosäuren umfassenden Peptids hat somit keinen Einfluss auf die Affinität zu BMP-2 oder GDF-5.

Bei der BMPR-IAec-Y39G42-Variante sind drei Aminosäurereste in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife gegen solche von BMPR-IBec ausgetauscht. Tyr39 befindet sich direkt vor und Ser41 und Gly42 befinden sich innerhalb einer fünf Reste umfassenden und durch eine Disulfidbrücke eingefassten Ausbuchtung der $\beta 1\beta 2$ -Schleife. Für diese Variante wurde im Vergleich zum wildtypischen BMPR-IAec (Wildtyp: $k_{\text{off}} = 19 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; Y39G42: $k_{\text{off}} = 53 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ für die 2:1-Interaktion) eine 3fach höhere Dissoziationsgeschwindigkeit gegenüber GDF-5 gemessen, während die Bindung zu BMP-2 unbeeinflusst blieb. Weil die Mutation von Tyr39 gegen Lysin keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität hat (Kotzsch et al., 2008), ist der beobachtete Effekt allein den Substitutionen S41H und G42H zuzuschreiben. Offensichtlich verstärken sich mit der Einführung dieser zwei Histidinreste zusätzlich zum schon vorhandenen His43 sterische Probleme bei der Bindung an GDF-5. Interessant ist, dass, obwohl die Aminosäuresequenz an dieser Stelle die von BMPR-IBec widerspiegelt, hier im Gegenteil zum BMPR-IBec die Bindung an GDF-5 deutlich beeinträchtigt ist. Dies weist auf weitere an der Erkennung von BMP-2 und GDF-5 beteiligte Aminosäurereste hin, beispielsweise solche in der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife (siehe BMPR-IA/-IB-Chimären). Zwar ist diese fünfgliedrige Ausbuchtung in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife wichtig für die spezifische Erkennung von GDF-5, dies scheint jedoch abhängig zu sein von weiteren, kooperativ wirkenden Bereichen im Rezeptor. Veranschaulichen lässt sich dies mit Tabelle IV-9, S. 85). Hierbei wird deutlich, dass entweder die $\beta 4\alpha 1$ - oder die $\beta 1\beta 2$ -Schleife „flexibel“ sein müssen. Durch das Vorhandensein von Glycin werden

sterische Beschränkungen aufgehoben und damit die Anpassungsfähigkeit an die Ligandenoberfläche erleichtert. Durch das Fehlen einer Seitenkette bei Glycin findet zudem ein stärkerer Austausch bzw. Diffusion der im Bindeepitop lokalisierten Solvensmoleküle statt.

BMP Rezeptor	$\alpha 1\beta 5$ -Schleife	$\beta 4\alpha 1$ - Schleife	$\beta 1\beta 2$ - Schleife	$k_{\text{off}} [10^{-4} \text{ s}^{-1}]$	
	70-77 (89-96) ^a	59-61 (78-80) ^a	22-24 (41-43) ^a	GDF-5	BMP-2
BMPR-IAec	<u>D</u> SPK <u>A</u> QLR (g')	M <u>K</u> Y (s)	S <u>G</u> H (f)	19,2	4,7
BMPR-IAec-B1 ^c	<u>D</u> TPI <u>P</u> HQR (o')	M <u>K</u> Y (s)	S <u>G</u> H (f)	22,6	9,7
BMPR-IAec-B12 ^c	<u>D</u> TPI <u>P</u> HQR (o')	L <u>G</u> L (f)	S <u>G</u> H (f)	4,0	3,4
BMPR-IAec-Y39G42	<u>D</u> SPK <u>A</u> QLR (g')	M <u>K</u> Y (s)	H <u>H</u> H (s)	106	3,3
BMPR-IBec	<u>D</u> TPI <u>P</u> HQR (o')	L <u>G</u> L (f)	H <u>H</u> H (s)	3,7 (10,1) ^b	11,4 (20,1) ^b
BMPR-IBec-H22S/H23G	<u>D</u> TPI <u>P</u> HQR (o')	L <u>G</u> L (f)	S <u>G</u> H (f)	(12,6) ^b	(15,7) ^b
BMPR-IBec-P74A	<u>D</u> TPI <u>A</u> HQR (g')	L <u>G</u> L (f)	H <u>H</u> H (s)	(33,3) ^b	(8,3) ^b
BMPR-IBec-D70A	<u>A</u> TPI <u>P</u> HQR (o)	L <u>G</u> L (f)	H <u>H</u> H (s)	(32,9) ^b	(9,9) ^b

^a Die Nomenklatur entspricht BMPR-IBec; in Klammern ist jene für BMPR-IAec gegeben. Die unterstrichenen Aminosäuren haben vermutlich eine funktionelle Bedeutung.

^b Die in Klammern angegebenen Werte bedeuten, dass die Messungen mit aus DsbA-Fusion gewonnenem Protein durchgeführt wurden. Die Werte für k_{off} sind Tabelle IX-2 entnommen.

Schleifen mit Glycin werden zur Verbildlichung in diesem Zusammenhang als „flexibel“ („f“), die ohne Glycin als „starr“ („s“) bezeichnet. Bei Vorhandensein des Pro₁-X-Pro₂-Motivs in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife ist die Position der Aminosäure X abhängig von jener der beiden Prolinreste. Zusätzlich kann durch Pro₂ eine im Vergleich zur geschlossenen Konformation in BMPR-IA („g“) veränderte, offene Konformation in BMPR-IB bzw. BMPR-IA/IB^c („o“) induziert werden. Ein Aspartat am C-Terminus der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife könnte stabilisierend wirken („g“ und „o“ mit Apostroph).

Grau hinterlegt sind die wildtypischen Rezeptoren, die von GDF-5 spezifisch, von BMP-2 promisk gebunden werden.

^c Aus Kotzsch et al. (Kotzsch et al., 2008), siehe hierzu auch IV. 8. 1., S. 160.

Tabelle IV-9: Einfluss der $\beta 1\beta 2$ -, $\beta 4\alpha 1$ - und $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen auf die Dissoziationsgeschwindigkeiten bei Bindung der Rezeptoren an BMP-2 und GDF-5.

BMPR-IBec und Varianten

Die für BMPR-IBec und dessen Varianten erhaltenen Bindungsdaten sind in Tabelle IX-2, S. 234, zusammengefasst. Bei Messung der Bindungsaffinität von BMP-2 bzw. GDF-5 zum immobilisierten BMPR-IBec mittels Biacore war festzustellen, dass bei gleicher Beladung des Sensorchips mit BMPR-IBec (DsbA) bzw. BMPR-IBec (Trx) im Fall von BMPR-IBec (DsbA) zum Teil nur etwa 40-50% der Massenzunahme von BMPR-IBec (Trx) erreicht wurde (Abbildung IV-18, S. 86). Teilweise entsprach hierbei auch der Verlauf der Dissoziationskurven von BMPR-IBec (DsbA) einer biphasischen Bindungsreaktion. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des biotinylierten und auf dem Sensorchip immobilisierten BMPR-IBec (DsbA) nicht bindungsaktiv ist. Die biphasische Dissoziation resultiert möglicherweise aus der unterschiedlich ausgeprägten Avidität; Ligandmoleküle, welche nur an einen BMPR-IBec gebunden sind, dissoziieren schneller als solche, welche zwei immobilisierte BMPR-IBec verbrücken. Liegen also aktive und inaktive Spezies gemischt vor, sollten wie beobachtet zwei Dissoziationsgeschwindigkeiten vorliegen. Ähnlich wie hier für den BMPR-IBec aus der DsbA-Fusion beschrieben, war auch nach Standardprotokollen aus Sf9-Insektzellen gewonnener BMPR-IBec nur zu etwa 20% aktiv, während beispielsweise die Aktivität entsprechender BMPR-IAec-Ansätze näherungsweise 100% entsprach (J. Nickel, persönliche Mitteilung). Die experimentell ermittelten Bindungsdaten für BMPR-IBec (DsbA)

unterschieden sich hinsichtlich der Bindungskinetik geringfügig von denen für BMPR-IBec (Trx). Gegenüber BMP-2 und GDF-5 konnte für BMPR-IB (DsbA) eine etwas schnellere Dissoziation des Komplexes beobachtet werden (BMP-2•BMPR-IBec: $k_{\text{off, Trx}} = 11,4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off, DsbA}} = 20,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; GDF-5•BMPR-IBec: $k_{\text{off, Trx}} = 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off, DsbA}} = 10,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Aus diesem Grund sind auch die Bindungsaffinitäten von BMPR-IBec (DsbA) niedriger als die für BMP-2-affinitätsgereinigten BMPR-IB (Trx) gemessenen (Tabelle IX-2, S. 234). Die Biacore-Kurven für die verschiedenen BMP-2- und GDF-5-Konzentrationen, aus denen die kinetischen Parameter ermittelt wurden, finden sich im Anhang (Abbildung IX-7, S. 238, und Abbildung IX-8, S. 238). Wegen der sichtbaren, gleichwohl geringen Unterschiede in den Bindungskonstanten werden in dieser Arbeit die mittels DsbA-Fusion hergestellten BMPR-IBec-Varianten hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften zu GDF-5 und BMP-2 nur untereinander, nicht jedoch mit den mittels Trx-Fusion hergestellten BMPR-IBec-Varianten verglichen. Auf Aussagen über den Effekt einzelner Punktmutationen hat dies jedoch keinen Einfluss, weil als Referenz Bindungsdaten für wildtypischen BMPR-IBec (DsbA) zur Verfügung stehen.

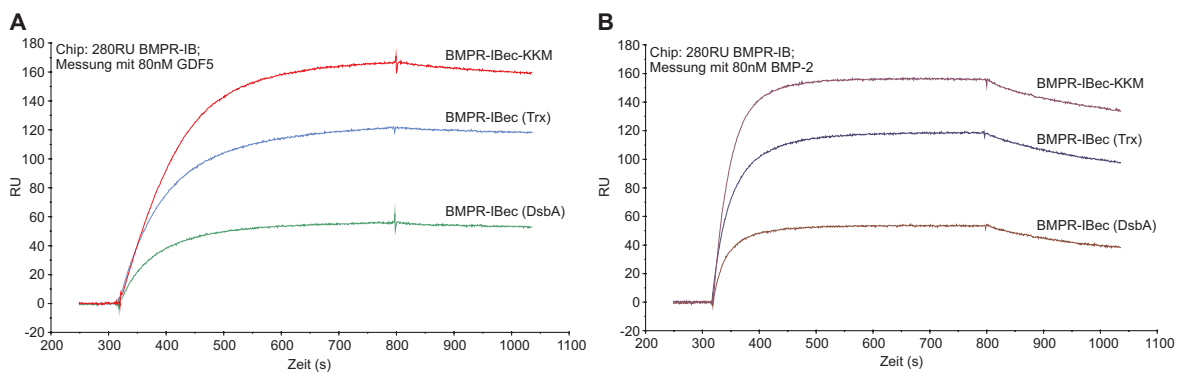


Abbildung IV-18: Biacore-Kurven der Interaktionen immobilisierten BMPR-IB mit GDF-5 und BMP-2. Messung der Bindung von BMPR-IB-KKM, BMPR-IB (beide aus Trx-Fusion) und BMPR-IB (aus DsbA-Fusion) gegenüber (A) GDF-5 und (B) BMP-2.

Insbesondere die Analyse von zwei Varianten von BMPR-IBec, in denen Phe66 bzw. Gln67 zu Alanin ausgetauscht wurden, liefert ein überraschendes Ergebnis. Durch den Austausch von Phe66 gegen Alanin wird sowohl die Bindungsfähigkeit an BMP-2 als auch GDF-5 aufgehoben, während für die Substitution von Gln67 gegen Alanin allenfalls eine verringerte Bindungsaffinität gemessen werden kann (Q67A: $K_{\text{D, BMP-2}} = 21,7 \text{ nM}$, $K_{\text{D, GDF-5}} = 8,2 \text{ nM}$; Wildtyp: $K_{\text{D, BMP-2}} = 4,9 \text{ nM}$, $K_{\text{D, GDF-5}} = 1,1 \text{ nM}$). Diese Beobachtung steht in Kontrast zu Experimenten mit entsprechenden BMPR-IAec-Varianten, bei denen die F85A-Variante eine ~20fach und die Q86A-Variante eine ~90fach niedrigere Bindungsaffinität gegenüber BMP-4 bzw. BMP-2 aufweist (Hatta et al., 2000; Keller et al., 2004). Anders als Phe85 in BMPR-IA kann deshalb Phe66 in BMPR-IB eine herausragende Bedeutung für die Bindung zu BMP-2 und GDF-5 zugeschrieben werden, während Gln67 einen weitaus geringeren Beitrag zur Bindungsenergie leistet. Die BMPR-IBec-Varianten mit Alanin-Substitutionen in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife (D70A, P74A) zeigen bei Bindung an GDF-5 vor allem signifikante Änderungen in den jeweiligen Dissoziationsgeschwindigkeiten (D70A und P74A: $k_{\text{off, GDF-5}} \sim 3,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; Wildtyp: $k_{\text{off, GDF-5}} \sim 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), welche damit annähernd denen der BMPR-IBec-Q67A-Variante entsprechen. Interessanterweise ist bei Bindung an BMP-2 genau das Gegenteil zu beobachten. Dabei wird für die BMPR-IBec-D70A- und BMPR-IBec-P74A-Varianten eine mindestens 2fach niedrigere Dissoziationsgeschwindigkeit (D70A und P74A: $k_{\text{off, BMP-2}} \sim 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$;

Wildtyp: $k_{\text{off, BMP-2}} \sim 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) und damit auch entsprechend höhere Affinität (D70A und P74A: $K_{\text{D, BMP-2}} \sim 2,5 \text{ nM}$; Wildtyp: $K_{\text{D, BMP-2}} = 6,0 \text{ nM}$) gemessen, was die Bedeutung der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife für die Erkennung von BMP-2 und GDF-5 unterstreicht und sowohl mit den oben für die BMPR-IAec-Varianten beschriebenen Bindungsdaten als auch bereits publizierten Ergebnissen korreliert (Kotzsch et al., 2008). Insbesondere ein in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB lokalisiertes Pro-X-Pro-Motiv und das C-terminal gelegene Asp70 könnten für die Erkennung von Bedeutung sein (Tabelle IV-9, S. 85). Die Substitutionen E62A ($\beta 4\alpha 1$ -Schleife) und H22S, H23G ($\beta 1\beta 2$ -Schleife) haben weder auf die Bindung an BMP-2 noch an GDF-5 einen deutlichen Effekt. Zum einen scheint die Wasserstoffbrücke zwischen Glu62 (BMPR-IBec) und Asn64 (GDF-5) keinen Einfluss auf die Orientierung des Rezeptors auf der Oberfläche von GDF-5 oder die Stärke der Wechselwirkung zu haben. Zum anderen stützen die wildtypischen Bindungseigenschaften der BMPR-IBec-H22SH23G-Variante die oben erwähnte Kooperativität einzelner Bereiche im Rezeptor (siehe Tabelle IV-9, S. 85).

GDF-5 und Varianten

Die für die einzelnen GDF-5-Varianten ermittelten Bindungsdaten an BMPR-IAec und BMPR-IBec sind in Tabelle IX-3 zusammengefasst. Die Mutationen R57L, L60P und DP wurden als Ursache für verschiedene Skelettkrankheiten beschrieben (siehe I.5.). Die DP-Mutation umfasst die Deletion von Leu56 und die Substitutionen S58T sowie H59L. Um den Effekt der einzelnen Variationen zu ermitteln, wurden zusätzlich die GDF-5-Varianten GDF-5-del56L, GDF-5-S58T und GDF-5-H59L hergestellt, welche jedoch nicht natürlich auftreten.

BMPR-IIec wurde von den natürlich auftretenden GDF-5-Varianten sowie den GDF-5-S58T- und GDF-5-H59L-Varianten gebunden, was auf eine korrekte Faltung des „knuckle“-Epitops hinweist. Es ist deshalb anzunehmen, dass in diesen Varianten auch die strukturelle Integrität des „wrist“-Epitops gewährleistet ist und prinzipiell Typ I Rezeptoren gebunden werden können. Die GDF-5-del56L-Variante bildet eine Ausnahme. Obwohl diese Variante erfolgreich renaturiert werden konnte, war keine Bindungsaffinität zu BMPR-II messbar. Faltungsstudien an GDF-5-del56L zeigten keine Auffälligkeiten im Vergleich zum wildtypischen GDF-5, sodass der Grund für die fehlende Bindungsaffinität zu BMPR-II unklar bleibt. Die Ergebnisse der Zirkulardichroismus- (CD-) Messungen bestätigen, dass sich auch die anderen Varianten in ihrer Sekundärstruktur nicht wesentlich vom wildtypischen GDF-5 unterscheiden (siehe IV. 2. 3.). Die hohe Ähnlichkeit der CD-Spektren im nahen und fernen UV-Bereich, nur geringe Unterschiede der Schmelztemperaturen und die Bindung zu BMPR-II sprechen dafür, dass bis auf die GDF-5-del56L-Variante alle GDF-5-Varianten eine dem wildtypischen GDF-5 entsprechende „native“ Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen. Änderungen im Bindungsverhalten gegenüber BMP Typ I Rezeptoren sollten deshalb allein auf die jeweiligen Aminosäuresubstitutionen zurückzuführen sein.

Auffallend ist der komplette Bindungsverlust der GDF-5-DP-Variante sowohl gegenüber BMPR-IAec als auch BMPR-IBec. Frühere Untersuchungen zeigten, dass der Wegfall einer zweizähligen Wasserstoffbrücke zwischen Gln86 in BMPR-IA und Leu51 in BMP-2 deren Bindungsaffinität ~ 90 fach verringert (Keller et al., 2004). Übertragen auf die Situation mit GDF-5 liefert dies jedoch nicht die alleinige Erklärung für die Inaktivität der DP-Variante. Die Einführung eines Alanin-Restes an Stelle von Gln67 in BMPR-IBec hatte nur eine vergleichsweise geringe Auswirkung auf die Bindungsaffinität zu GDF-5 ($K_{\text{D}} = 8,2 \text{ nM}$). Eine BMPR-IAec-Q86A-Variante konnte GDF-5 ähnlich wie BMP-2 zwar mit deutlich verringerter, aber noch messbarer Bindungsaffinität binden (J. Nickel, persönliche Mitteilung). Umgekehrt verstärkten geringe sterische Veränderungen in der pre-Helix-

Schleife von BMP-2 bei Mutation von Leu51 zu Prolin den Verlust an Bindungsaffinität zu BMPR-IA infolge der fehlenden Wasserstoffbrücke drastisch (~ 8000 fach) (Keller et al., 2004). Das gleiche gilt für die entsprechende GDF-5-L56P-Variante (J. Nickel, persönliche Mitteilung), was zeigt, dass Leu56 (GDF-5) für die Ausbildung einer zum Rezeptor passenden Bindungsfläche und einer optimalen Konformation der pre-Helix-Schleife eine wichtige Rolle spielt. Möglicherweise aus diesem Grund konnten die zwei anderen in der GDF-5-DP-Variante vorkommenden Mutationen S58T und H59L den durch Deletion von Leu56 verursachten Bindungsverlust nicht kompensieren. Für die GDF-5-Varianten R57L und L60P konnten mit Angaben in der Literatur (Seemann et al., 2005) übereinstimmende Bindeparameter gemessen werden (Tabelle IX-3, S. 235). Dabei war der Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Bindung zu BMPR-IAec und BMPR-IBec ähnlich. Eine Verkürzung der Arginin-Seitenkette um die Guanidiumgruppe in der GDF-5-R57L-Variante führte sowohl für BMPR-IAec als auch für BMPR-IBec zu einer 2-4fach höheren Bindungsaffinität (BMPR-IAec: $K_{D, GDF-5-R57L} = 4,2\text{nM}$, $K_{D, GDF-5} = 16,2\text{nM}$; BMPR-IBec: $K_{D, GDF-5-R57L} = 0,7\text{nM}$, $K_{D, GDF-5} = 1,3\text{nM}$). Diese resultierte aus einer verringerten Dissoziationsgeschwindigkeit. Durch Einführung eines Prolin-Restes für Leu60 wurde die Bindungsaffinität zu BMPR-IAec (Messkurven nicht auswertbar, siehe Abbildung IV-19) und BMPR-IBec ($K_{D, GDF-5-L60P} = 42,6\text{nM}$) stark verringert. Wie bei der R57L-Mutation war auch hierbei die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes entscheidend, welche bei der L60P-Mutation um den Faktor 75 größer war als beim Wildtyp (BMPR-IBec: $k_{\text{off}, GDF-5-L60P} = 2,6 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}, GDF-5} = 3,4 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$).

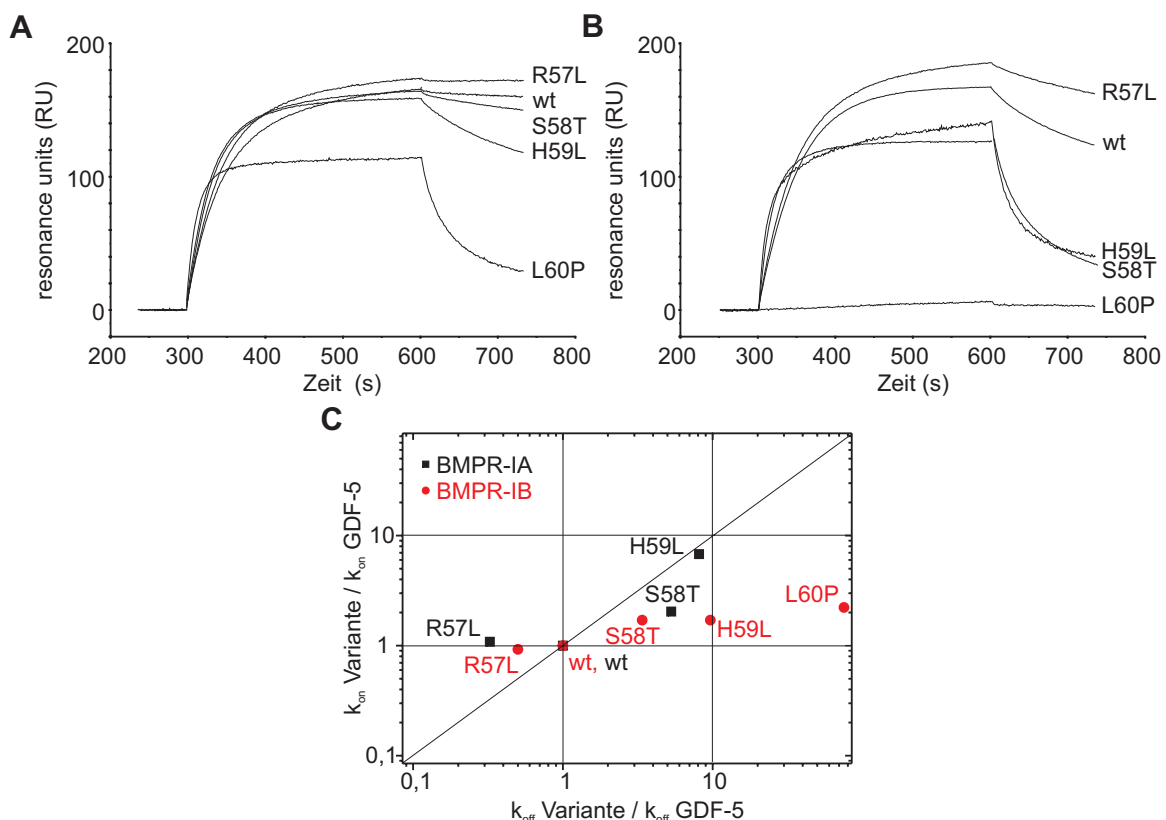


Abbildung IV-19: Bindungskurven von GDF-5-Varianten an BMPR-IAec und BMPR-IBec. A: Bindungskurven von GDF-5-Varianten an BMPR-IBec. **B:** Bindungskurven von GDF-5-Varianten an BMPR-IAec. **C:** Veränderung der Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeiten (k_{off}) der GDF-5-Varianten bei Bindung an wildtypischen BMPR-IAec (schwarz) und BMPR-IBec (rot).

Interessanterweise konnte ein ähnlicher Effekt auch bei den zusätzlich hergestellten GDF-5-Varianten S58T und H59L beobachtet werden (Tabelle IX-3, S. 235). Sowohl bei Bindung an BMPR-IAec als auch an BMPR-IBec zeigten beide Varianten im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhte Dissoziationsgeschwindigkeiten. Während jedoch die Assoziationsgeschwindigkeiten von GDF-5-S58T und GDF-5H59L an BMPR-IBec annähernd konstant bleiben und sich somit auch die Bindungsaffinität verringert, steigen bei der Komplexbildung von GDF-5H59L mit BMPR-IAec Dissoziations- und Assoziationsgeschwindigkeit um annähernd den gleichen Betrag, weshalb sich für die GDF-5-H59L-Variante eine wildtypische Bindungsaffinität ergibt. Zudem weist diese Variante eine dem wildtypischen GDF-5 entsprechende Gleichgewichtsbindung auf. Die Situation lässt sich veranschaulichen, indem die Veränderung in der Assoziation ($k_{\text{on, Variante}} / k_{\text{on, Wildtyp}}$) mit der Veränderung in der Dissoziation ($k_{\text{off, Variante}} / k_{\text{off, Wildtyp}}$) graphisch verglichen wird (Abbildung IV-19, S. 88). Während bei den meisten Varianten die Dissoziationsgeschwindigkeit deutlich stärker ansteigt als die Assoziationsgeschwindigkeit und sich deshalb die Werte entlang der Abszisse bewegen, verändern sich bei der H59L-Variante sowohl die Verhältnisse $k_{\text{on, Variante}} / k_{\text{on, Wildtyp}}$ als auch $k_{\text{off, Variante}} / k_{\text{off, Wildtyp}}$ in ungefähr gleichem Umfang. Trotz der unveränderten Bindungsaffinität führt dies zu einer in kinetischer Hinsicht deutlich schnelleren Gleichgewichtsreaktion zwischen Bildung und Zerfall des GDF-5-H59L•BMPR-IA-Komplexes. Die höheren Dissoziationsgeschwindigkeiten von GDF-5-S58T, GDF-5-H59L und GDF-5-L60P führen außerdem zu einer verringerten Stabilität der Ligand-Rezeptor-Komplexe, was direkte Auswirkungen auf die biologische Aktivität dieser Varianten hat (IV. 3. 2.).

IV. 2. 2. 2. Mikrokalorimetrie (ITC)

Die Ergebnisse der einzelnen, in Tabelle III-14 (S. 39) zusammengestellten Messungen finden sich in Tabelle IV-10 (S. 90). Die Anzahl der äquivalenten Bindungsstellen sollte bei Titration von BMPR-IAec in eine BMP-2-Lösung $N = 2,0$ betragen, wenn jeweils beide Bindungsstellen besetzt werden. Außer für Messung Nr. 6 bei 37°C wird dieses molare Verhältnis bei allen Messungen ungefähr erhalten. Eine Beispieltitrationskurve von Messung Nr. 1 ist in Abbildung IV-20 (S. 91) dargestellt.

ITC-Messungen, bei denen eine BMP-2-Lösung (Lösungsmittel: dH₂O) in eine BMPR-IA-Lösung (Lösungsmittel: HBS₅₀₀ plus 0,01-0,1% CHAPS) titriert wurde, ergaben stärkere Signale bei der Titration, jedoch abweichende Ergebnisse mit stark negativen Enthalpie- und Entropiewerten (-36kcal mol⁻¹ bzw. -89cal mol⁻¹ K⁻¹). Die freie Enthalpie stimmt mit den hier präsentierten Ergebnissen annähernd überein (-9kcal mol⁻¹). Diese unterschiedlichen Messergebnisse sind auf Ionisierungseffekte zurückzuführen, die entstehen, wenn BMP-2 aus einer wässrigen Lösung in eine Hochsalzlösung titriert und darin verdünnt wird. Referenzmessungen mit BMP-2 als Titrant waren wegen der schlechten Löslichkeit von BMP-2 in salzhaltigen Lösungen nicht möglich. Zudem war bei Zusatz von CHAPS korrelierend mit Biacore-Analysen (J. Nickel, persönliche Mitteilung) eine Änderung der Bindungsaffinität und Komplexstöchiometrie zu beobachten. Vermutlich maskiert das Detergenz CHAPS hydrophobe Bindungsstellen in den Rezeptorbindeepitopen und muss erst vom Rezeptor „verdrängt“ werden.

Die aus den experimentell ermittelten thermodynamischen Bindungsparametern berechnete freie Enthalpie ΔG weist mit -9,0 bis -9,4kcal mol⁻¹ bei allen Messungen einen ähnlichen Wert auf. Die Dissoziationskonstante des BMP-2•BMPR-IAec-Komplexes liegt mit ~130-150nM im Bereich von Werten, die mit Biacore-Messungen erhalten werden (1:1-Interaktion: $K_D=47\text{nM}$). Bei 31°C und 37°C wurden leicht niedrigere Bindungsaffinitäten gemessen (Tabelle IV-10, S. 90). Aus der Temperaturabhängigkeit der Bindungsenthalpie ΔH kann zusätzlich die Wärmekapazität ΔC_p

ermittelt werden, die mit etwa $-900 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ einen stark negativen Wert hat (Abbildung IV-20, S. 91). Der experimentell für ΔC_p bestimmte Wert stimmt interessanterweise fast mit dem theoretischen ΔC_p -Wert überein, der mit Hilfe semi-empirischer Formeln basierend auf den bei Komplexbildung bedeckten Oberflächen von BMP-2 und BMPR-IAec berechnet werden kann. Der negative Wert für die Bindungsenthalpie ($\Delta H = -9,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) lässt sich auf die Bildung von Wasserstoffbrücken zurückführen. Im BMP-2•BMPR-IA-Komplex werden 20 Wasserstoffbrücken gebildet; zusätzliche intramolekulare Wasserstoffbrücken entstehen bei Bildung der α -Helix in BMPR-IA bei Bindung von BMP-2. Nach Scholtz et al. ist eine „random coil“-Helix-Transformation mit einer Enthalpieänderung von $\sim 1 \text{ kcal mol}^{-1}$ pro Aminosäurerest verbunden (Scholtz et al., 1991). Für die 1,6 Umdrehungen der α -Helix ist demnach ein Beitrag von $\sim 12 \text{ kcal mol}^{-1}$ zu vermuten, wenn, wie NMR-Analysen (IV. 7. 4.) bestätigen, die α -Helix erst bei Bindung von BMP-2 gebildet wird. Zusammen mit den intermolekularen Wasserstoffbrücken ergibt sich ein größerer enthalpischer Beitrag als experimentell bestimmt, was beispielsweise einem kompensatorischen Beitrag der Solvatisierungsenthalpie zugeschrieben werden kann (Luke et al., 2005). Die Gesamtentropie der Komplexbildung ist bei 25°C mit $0,1\text{-}0,7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ leicht positiv; bei höheren Temperaturen ist die Bindung von BMP-2 und BMPR-IAec entropisch nicht begünstigt. Mit Hilfe der in III. 12. 11. angegebenen Gleichungen lässt sich die Gesamtentropie der Komplexbildung in Konformations-, Solvatisierungs- und Translations- sowie Rotations-Entropieterme aufgliedern. In Tabelle IV-10 (S. 90) sind die entsprechenden Werte für Messung Nr. 1 zusammengefasst.

ITC-Messungen						
Nr. ^a	T [K]	Anzahl äquivalenter Bindungsstellen	K_D [nM] ^b	ΔH° [kcal mol ⁻¹]	ΔS° [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG° [kcal mol ⁻¹]
1	298,15	1,8	131	$-9,2 \pm 0,3$	0,7	-9,4
3	298,15	2,4	153	$-9,3 \pm 0,4$	0,1	-9,3
5	304,25	2,3	385	$-14,5 \pm 0,7$	-18,1	-9,0
6	310,15	3,1	320	$-20,1 \pm 0,4$	-35,0	-9,2

^a Die Nummern entsprechen den Messbedingungen in Tabelle III-14, S. 38.

^b Die Dissoziationskonstante der BMP-2•BMPR-IA-Interaktion beträgt 47nM (immobilisiertes BMP-2). Die freie Standardenthalpie ergibt sich aus: $\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K_D$. Eine Kalorie (1cal) entspricht 4,186J.

Analyse der entropischen Beiträge zur Gesamtentropie

	T (K)	ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS_{Solv} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS_{Conf} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS_{rt} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
Theorie ^a	298,15	-884,6	226,1	-228,2	-8
Experiment ^b	298,15	$-899,8 \pm 20,4$	230,0	-237,3	-8

^a Die polaren ($\Delta \text{ASA}_{\text{pol}}$) und apolaren ($\Delta \text{ASA}_{\text{apol}}$) Oberflächen beider Bindeepitope, die bei der BMP-2•BMPR-IAec-Komplexbildung bedeckt werden, lassen sich mit Hilfe der Kristallstrukturdaten (RCSB-Eintrag 1REW) bestimmen: $\Delta \text{ASA}_{\text{pol}} = -1752 \text{ \AA}^2$, $\Delta \text{ASA}_{\text{apol}} = -2978 \text{ \AA}^2$, $\Delta \text{ASA}_{\text{ges}} = -4730 \text{ \AA}^2$. Die Wärmekapazität und die einzelnen Entropiewerte werden wie in III.12.11 angegeben berechnet. Grundlage hierfür ist Messung 1 aus Tabelle IV-10 (S. 89).

^b Die Wärmekapazität ergibt sich aus experimentellen Daten (Abbildung , Tabelle IV-10, S. 89). Die einzelnen Entropiewerte werden wie in III.12.11 angegeben berechnet. Grundlage hierfür sind die Messungen 3, 5 und 6 aus Tabelle IV-10 (S. 89).

Tabelle IV-10: Ergebnisse der ITC-Messungen von BMP-2 und BMPR-IAec.

Die Solvatisierungsentropie ($\Delta S_{\text{Solv}} = 230,0 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), die die Verdrängung von Wassermolekülen aus der Kontaktfläche beschreibt, wird durch die Konformationsentropie ($\Delta S_{\text{Conf}} = -237,3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) kompensiert, die die Umordnung von Aminosäureresten innerhalb der den Komplex bildenden Proteine charakterisiert. Damit ist die Bildung des Komplexes entropisch nicht begünstigt. Dies ist ungewöhnlich, weil normalerweise die Solvatisierungsentropie wegen der Bedeckung von vorher dem Lösungsmittel zugänglichen hydrophoben Flächen und der damit einhergehenden Freisetzung von Lösungsmittelmolekülen als treibende Kraft bei Protein-Protein-Interaktionen angesehen wird (Chothia and Janin, 1975). Die Bindungsenthalpie, welche sich aus bei der Komplexbildung entstehenden nichtkovalenten Wechselwirkungen generiert, muss die Differenz zwischen konformationeller Entropie und Solvatisierungsentropie mindestens kompensieren und besitzt daher einen negativen Wert. Die Analyse der thermodynamischen Parameter deutet auf signifikante strukturelle Veränderungen in BMP-2 und BMPR-IA während der Komplexbildung hin; wahrscheinlich werden große Teile des Bindeepitops bei Bindung fixiert, was mit den Ergebnissen der NMR-Spektroskopie korreliert (IV. 7. 4.). Die stark negative Änderung der Wärmekapazität deutet darauf hin, dass die Assoziation von BMP-2 und BMPR-IA durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt.

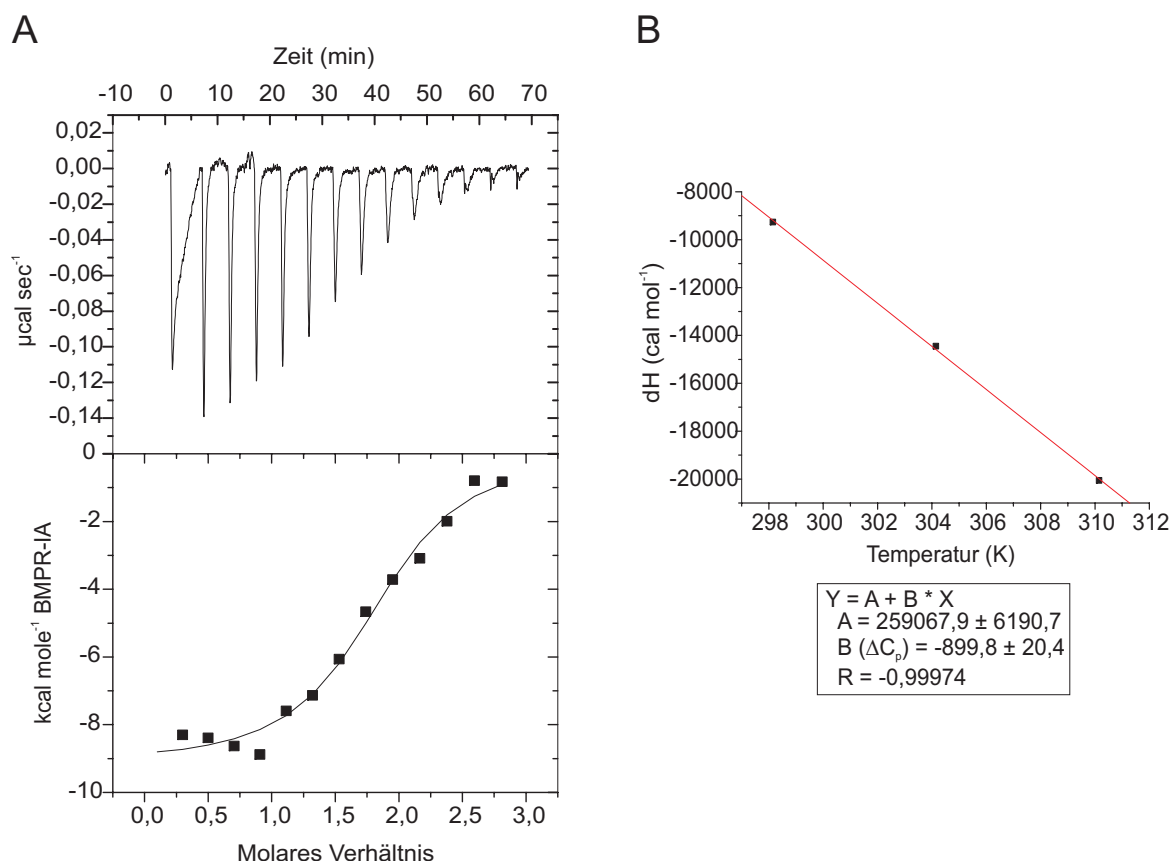


Abbildung IV-20: ITC-Analyse der BMP-2•BMPR-IAec-Interaktion. **A:** Darstellung der bei der Komplexbildung entstehenden Wärme ($\mu\text{cal sec}^{-1}$) nach Abzug der Leertitration. Gezeigt ist Messung Nr. 1 aus Tabelle IV-10 (S. 89). Das untere Diagramm zeigt die Messpunkte nach Integration der Peakflächen aus dem oberen Diagramm. Eine nichtlineare Regression der Datenpunkte nach der Methode der kleinsten Quadrate („least square regression“) ergibt die Enthalpie und die Bindungsaffinität; freie Enthalpie und Entropie lassen sich mit der Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnen. **B:** Diagramm der Reaktionsenthalpie der BMP-2•BMPR-IAec-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Temperatur. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden lässt sich die Wärmekapazität ΔC_p bestimmen.

IV. 2. 3. Messungen der Proteinfaltung mittels Zirkulardichroismus

Die rekombinant hergestellten Proteine wurden mittels Zirkulardichroismus (CD-Spektroskopie) auf die korrekte Faltung der Sekundärstruktur geprüft (III. 12. 10.). BMP Rezeptoren wurden nur im fernen UV-Bereich (240-185nm) untersucht, GDF-5 sowohl im fernen als auch nahen UV-Bereich (340-250). Zusätzlich wurden CD-Spektren von BMP-2 und BMPR-IA vom CD-Spektrum des binären Komplexes subtrahiert und ein Differenzspektrum ermittelt, dass ein starkes Signal bei Wellenlängen aufweist, die charakteristisch für α -helikale Strukturen sind ($\lambda \sim 210$ -225nm, (Kelly et al., 2005)).

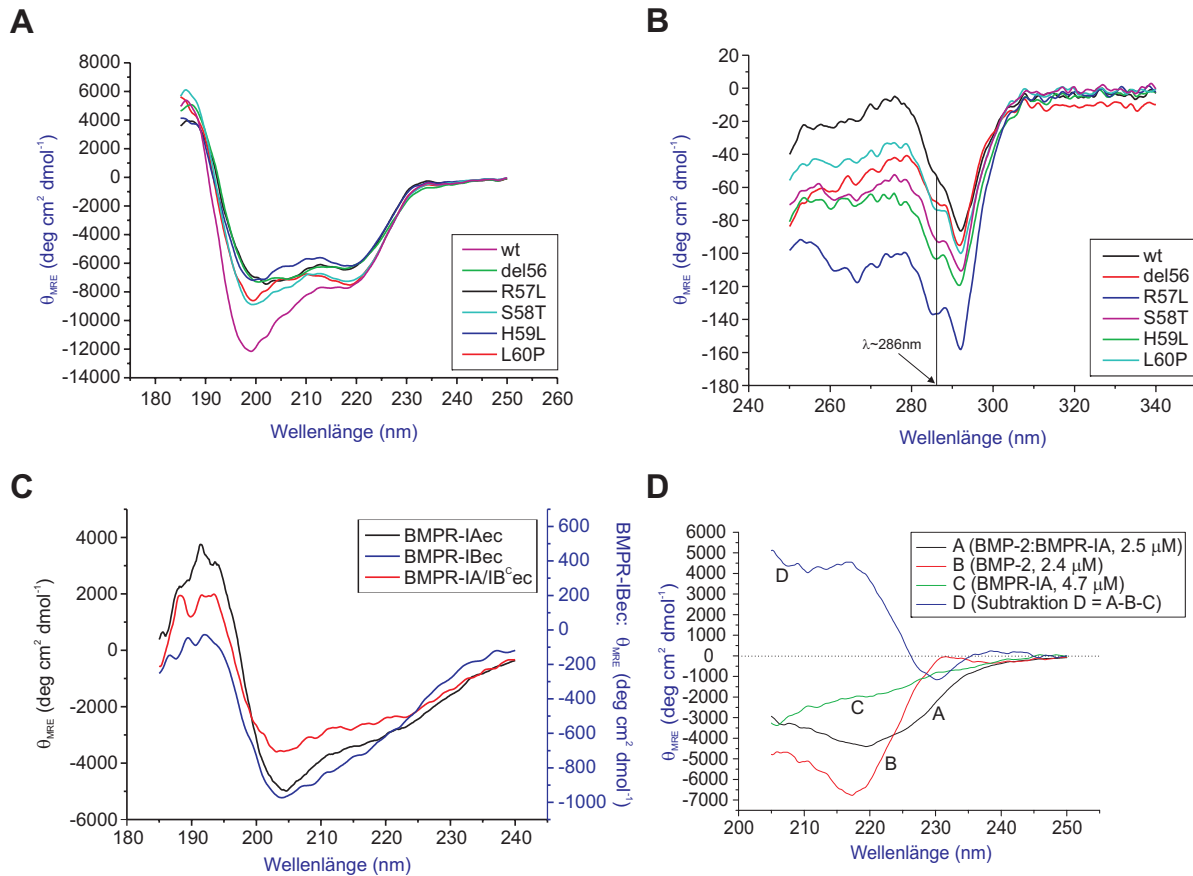


Abbildung IV-21: CD-Spektren von GDF-5, dessen Varianten und BMP Rezeptoren. **A:** Far-UV-CD-Spektren von GDF-5 und dessen Varianten. **B:** Near-UV-CD-Spektren von GDF-5 und dessen Varianten. **C:** Far-UV-CD-Spektren von BMPR-IAec, BMPR-IA/IB^Cec (jeweils linke Skala) und BMPR-IBec (rechte Skala). **D:** Differenz-CD-Spektrum nach Subtraktion der CD-Spektren von BMP-2 und BMPR-IAec vom CD-Spektrum des binären Komplexes. Alle Spektren wurden in HBS₅₀₀ gemessen. Die Konzentrationen sind angegeben und entsprechen der erwarteten Komplexstöchiometrie. **Abkürzungen:** θ_{MRE} ... Molare Elliptizität bezogen auf alle Aminosäurereste.

Wie aus Abbildung IV-21 (S. 92) ersichtlich ist, zeigen alle CD-Spektren der untersuchten GDF-5-Varianten den gleichen Verlauf, was auf ähnliche Sekundärstrukturmerkmale schließen lässt. Die Minima der Kurven bei 198nm und 218nm sowie das Maximum der Kurve bei 186nm weisen auf α -helikale und β -Faltblatt-Strukturen hin. Ähnliches gilt für BMPR-IAec, BMPR-IBec und BMPR-IA/IB^Cec, nur dass deren Sekundärstrukturelemente nicht so stark ausgeprägt sind und die Kurven flacher verlaufen. Die mittlere molare Elliptizität (θ_{MRE}) war für BMPR-IBec allgemein geringer als für die beiden anderen Rezeptoren, was mit dem geringen Extinktionskoeffizienten von BMPR-IBec erklärbar wäre. Während die BMPR-IA/IB^Cec-Kurve mit der BMPR-IAec-Kurve vergleichbar ist,

verläuft die BMPR-IBec-Kurve noch einmal deutlich flacher, was möglicherweise auf größere flexible Bereiche oder eine dynamischere Veränderung der Sekundärstrukturen im BMPR-IBec deuten könnte. Auch die um 5°C niedrigere Schmelztemperatur (Tabelle IV-11 auf S. 93 und Abbildung IV-22 auf S. 94) lässt auf eine höhere Flexibilität und geringere Stabilität von BMPR-IBec im Vergleich mit BMPR-IAec schlussfolgern. Dies korreliert mit praktischen Erfahrungen bei der Reinigung und Handhabung von BMPR-IBec, beispielsweise der starken Tendenz zur Aggregation. Überraschenderweise zeigte die BMPR-IA/IB^Cec-Variante, welche zwar die Bindungseigenschaften von BMPR-IBec (IV. 2. 2. 1), aber ein BMPR-IAec-Grundgerüst besitzt, eine stark erhöhte Schmelztemperatur von mindestens 87°C. Dies steht im Gegensatz zu strukturellen Untersuchungen am BMP-2•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex, bei welchen eine erhöhte Flexibilität in der α 1 β 5-Schleife von BMPR-IA/IB^Cec festgestellt wurde (IV. 8. 1.).

Protein	Puffer	Protein-konzentration	Wellenlängenbereich (nm)	T _m (°C)
BMPR-IAec	10mM KPP pH7,2	10,2 μ M	240-185	67,6 ^a
BMPR-IBec	10mM KPP pH7,2	26,0 μ M	240-185	62,6 ^a
BMPR-IA/IB ^C ec	10mM KPP pH7,2	10,2 μ M	240-185	87,2 ^a
GDF-5	dH ₂ O	3,7 μ M; 75 μ M	240-185; 340-250	69,9 ^b
GDF-5-del56L	dH ₂ O	3,7 μ M; 75 μ M	240-185; 340-250	66,6 ^b
GDF-5-R57L	dH ₂ O	3,7 μ M; 75 μ M	240-185; 340-250	85,3 ^b
GDF-5-S58T	dH ₂ O	3,7 μ M; 75 μ M	240-185; 340-250	70,6 ^b
GDF-5-H59L	dH ₂ O	3,7 μ M; 75 μ M	240-185; 340-250	68,7 ^b
GDF-5-L60P	dH ₂ O	3,7 μ M; 75 μ M	240-185; 340-250	71,5 ^b
GDF-5-DP	dH ₂ O	3,7 μ M; 75 μ M	240-185; 340-250	68,6 ^b

^a Denaturierungskurve wurde bei $\lambda = 202\text{nm}$ aufgenommen.
^b Denaturierungskurve wurde bei $\lambda = 222\text{nm}$ aufgenommen.

Tabelle IV-11: Ergebnisse der CD-Spektroskopie für ausgewählte Proteine

Im nahen UV-Bereich ergaben sich für GDF-5 und dessen Varianten ähnlich verlaufende CD-Spektren. In diesem Bereich absorbieren aromatische Aminosäuren (Trp: Peak bei 290nm, Feinstruktur 290-305nm; Tyr: Peak bei 275-282nm; Phe: Feinstruktur bei 255-270nm) und Disulfidbrücken (breite, schwache Bande bei 260nm), wobei sich die Feinstruktur der Signale aus Übergängen zwischen unterschiedlichen, feinaufgespaltenen (vibronischen) Energieniveaus des angeregten Zustands ergibt (Kelly, 2000). Die Ausprägung dieser Signale hängt von der „Festigkeit“ und den biochemischen Eigenschaften des Proteins ab (Wasserstoffbrücken, andere aromatische Reste, polare Gruppen). Bedingt durch Auslöschung oder Verstärkung von Signalen innerhalb der räumlichen Struktur ergibt sich ein für jedes Protein charakteristisches CD-Spektrum. Die CD-Spektren von GDF-5 zeigen klar die Absorptionsbande von Trp (290nm), an welche sich eine in einigen GDF-5-Varianten stärker ausgeprägte Peakschulter bei 286nm anschließt (Abbildung IV-21, S. 92). Im Bereich zwischen 255 und 275nm ist nur für die GDF-5-R57L-Variante eine vergleichsweise starke Absorption zu erkennen, was auf eine andere chemische Umgebung für die vier Phenylalanin-Reste im Protein hinweist und möglicherweise mit der um etwa 15°C höheren Schmelztemperatur zusammenhängen könnte.

Die Schmelztemperatur der GDF-5-del56L-Variante war mit 66,6°C nicht wesentlich niedriger als die von wildtypischem GDF-5 (69,9°C). CD-Spektren dieser Variante im fernen UV-Bereich zeigen

ebenfalls keine Abnormalitäten, sodass auch die GDF-5-del56L-Variante eine definierte Tertiärstruktur aufweisen muss. Anders als bei den anderen Varianten ist jedoch anzunehmen, dass die „knuckle“- und „wrist“-Epitope von GDF-5-del56L strukturell verändert sind, weil in Biacore-Experimenten BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-II nicht gebunden werden (Tabelle IX-3, S. 235).

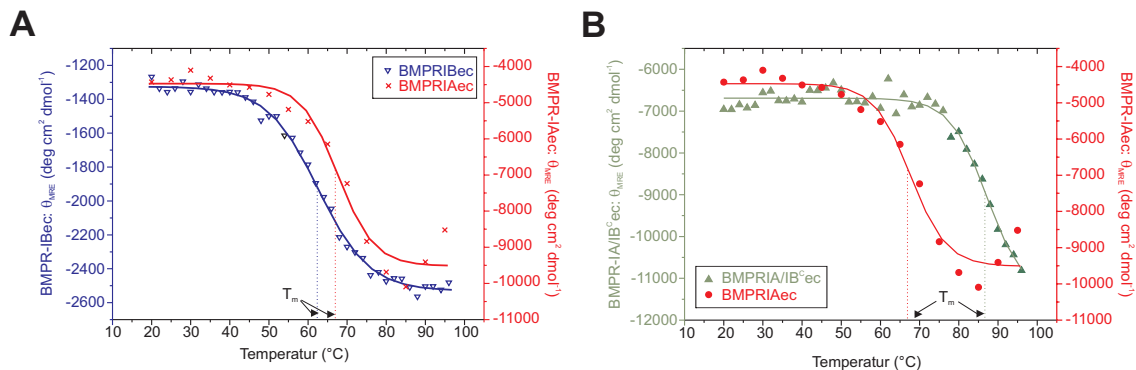


Abbildung IV-22: Thermische Denaturierungskurven von BMP Rezeptoren. **A:** Thermische Denaturierung von BMPR-IAec und BMPR-IBec bei $\lambda=202\text{nm}$. **B:** Thermische Denaturierung von BMPR-IAec und BMPR-IA/IB^cec bei $\lambda=202\text{nm}$. **Abkürzungen:** T_m ...Schmelztemperatur, θ_{MRE} ...Molare Elliptizität bezogen auf alle Aminosäurereste. **Werte für die Schmelztemperatur bei 50% Entfaltung:** T_m (BMPR-IAec) = 67,6°C, T_m (BMPR-IBec) = 62,6°C, T_m (BMPR-IA/IB^cec) ~ 87,2°C.

IV.3. Zellbiologische Arbeiten

Die biologische Aktivität der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Rezeptoren und GDF-5-Liganden wurde mit Hilfe von Zellassays in verschiedenen Zelllinien bestimmt. Die experimentellen Arbeiten wurden maßgeblich von J. Nickel und A. Seher (beide am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II am Biozentrum der Universität Würzburg) unterstützt.

IV. 3. 1. Luciferase-Reportergen-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität der verwendeten BMP-Rezeptoren

Die biologische Aktivität der rekombinant hergestellten Rezeptoren BMPR-IAec, BMPR-IBec und BMPR-IA/IB^cec wurde durch Reportergen-Assays in einer stabil mit einem BMP-Reporter-Konstrukt (p(BRE)₂-Luc) transfizierten Zelllinie C3H10T1/2 (zur Verfügung gestellt von P. ten Dijke, Universität Leiden, Niederlande (Logeart-Avramoglou et al., 2006)) überprüft. Dabei sollten die dem Zellkulturmedium supplementierten extrazellulären Rezeptordomänen, welche wegen der fehlenden transmembranen und intrazellulären Domänen kein Signal in das Innere der Zellen übermitteln können, mit dem endogen exprimierten Rezeptor um BMP-2-Bindestellen kompetitieren und die gemessene Signalaktivität konzentrationsabhängig reduzieren. Wie Abbildung IV-23 auf S. 95 zeigt, konnte durch Zugabe von 6 μM BMPR-IAec das BMP-2-Signal fast komplett inhibiert werden, während sich letzteres durch Zugabe von BMPR-IBec oder BMPR-IA/IB^cec um maximal 50% erniedrigen ließ. Alle extrazellulären Rezeptordomänen zeigten eine konzentrationsabhängige Inhibition des BMP-2-Signals, was deren biologische Aktivität – die Bindung von BMP-2 – auch *in vivo* bestätigte. Für BMPR-IAec würde sich bei Annahme einer sigmoidal verlaufenden Inhibitionskurve eine inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von weniger als 500nM ergeben. Für BMPR-IBec und BMPR-IA/IB^cec sollte dieser Wert bei etwa 500nM liegen. Zusammengefasst konnte die durch BMP-2 induzierte Luciferase-Signalaktivität mit BMPR-IBec und BMPR-IA/IB^cec

auch bei hohen Rezeptorkonzentrationen nur auf etwa 25% des Ausgangssignals (Kontrolle ohne Rezeptor) reduziert werden, was sich möglicherweise mit der 10fach höheren Dissoziationsgeschwindigkeit der jeweiligen BMP-2•Rezeptor-Komplexe im Vergleich zum BMP-2•BMPR-IA-Komplex erklären ließe (Tabelle IX-2, S. 234). Diese Experimente zeigen, dass die BMPR-IA/IB^{Cec}-Chimäre nicht nur hinsichtlich der Bindungsparameter, sondern auch der biologischen Aktivität dem BMPR-IB gleichwertig ist.

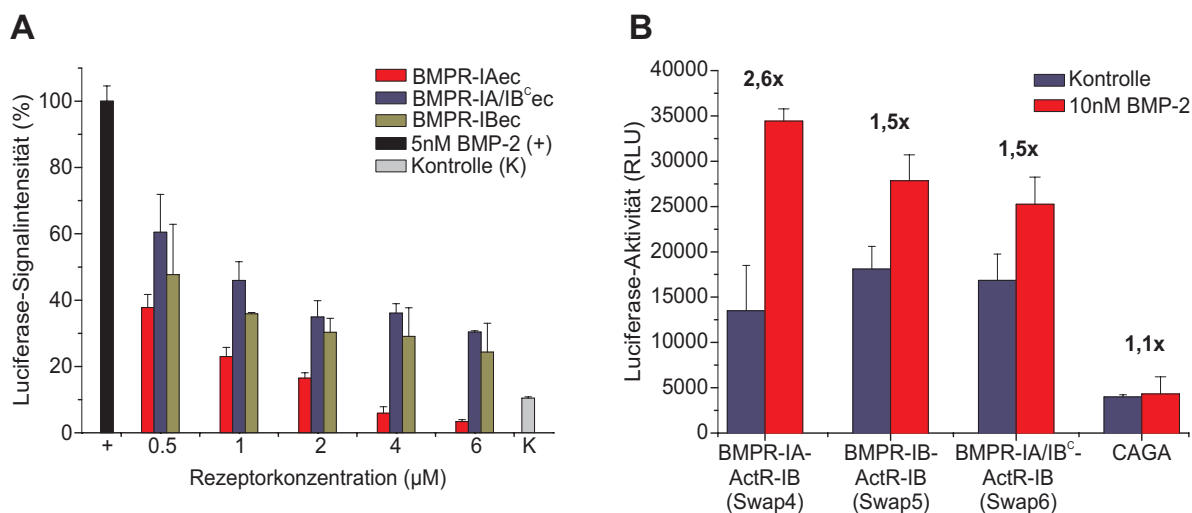


Abbildung IV-23: Biologische Aktivität von BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-IA/IB^{Cec}. **A:** Kompetitionsassay in stabil mit BRE-Luc transfizierten C3H10T1/2-Zellen. Die extrazellulären Rezeptordomänen wurden dem Zellkulturmedium in einer Konzentrationsreihe zusammen mit 5nM BMP-2 zugesetzt und auf die Inhibition der durch endogene Rezeptoren übermittelten BMP-2-Signalaktivität geprüft. Wie die stark verringerte Luciferase-Aktivität zeigt, konnte durch Zugabe von 6µM BMPR-IA^{ec} die Signalübermittlung fast vollständig unterdrückt werden, während BMPR-IB^{ec} und BMPR-IA/IB^{Cec} offenbar weniger effizient mit endogenem BMP Typ I Rezeptor konkurrieren konnten. **B:** HEK293TSA-Zellen wurden mit BMPR-I-ActR-IB-Chimären und einem CAGA-Luc-Reporter gen transfiziert und auf Smad2/3-Signalaktivität geprüft. Die durch die jeweiligen Rezeptorchimären vermittelte Aktivierung des Smad2/3-Signalwegs bei Zugabe von 10nM BMP-2 (rote Balken) ist derjenigen ohne Zugabe von BMP-2 (blaue Balken) gegenübergestellt. Die Stärke der Aktivierung bei Zugabe von 10nM BMP-2 ist als Faktor über den Balken angegeben. Die Kontrolle ohne Transfektion der Rezeptorchimären (CAGA) zeigt eine deutlich verringerte Luciferase-Aktivität, was die selektive Aktivierung des durch die Rezeptorchimären adressierten Smad2/3-Signalwegs hervorhebt.

Zusätzlich wurden Expressionskonstrukte hergestellt, bei denen jeweils die extrazelluläre Domäne von BMPR-IA, BMPR-IB oder BMPR-IA/IB^{Cec} mit der transmembranen und intrazellulären Domäne von ActR-IB verknüpft wurde. Diese BMPR-I-ActR-IB-Chimären wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert, HEK293TSA-Zellen mit dem erzeugten Konstrukt und dem Smad2/3-spezifischen Reporter-Gen p(CAGA)₁₂-Luc transfiziert und die Signalaktivität bei Zugabe von BMP-2 bestimmt (siehe III. 19. 2.). Während BMP Typ I Rezeptoren den Smad1/5/8-Signalweg aktivieren, erfolgt die Signalgebung der Activin und TGF-β Typ I Rezeptoren über den Smad2/3-Signalweg. Bei Verwendung der Rezeptorchimären wird nur deren Smad2/3-Signal ausgelesen. Smad1/5/8-Signale endogener Rezeptoren bleiben unberücksichtigt, sodass auch Rezeptorchimären mit Mutationen im extrazellulären Teil selektiv analysiert werden können. Ähnlich wie für die Zellassays mit den extrazellulären Rezeptordomänen beobachtet, konnte bei Expression von BMPR-IB und BMPR-IA/IB^{Cec} eine gegenüber der Kontrolle um maximal das 1,5fache, bei Expression von BMPR-IA jedoch um maximal das 2,6fache erhöhte Luciferase-Aktivität bestimmt werden (Abbildung IV-23, S. 95). BMPR-IB und BMPR-IA/IB^{Cec} aktivierten den Smad2/3-Signalweg in gleichem Ausmaß. Die Rezeptorspezifität des gemessenen

Luciferase-Signals verdeutlicht sich in der komplett fehlenden Luciferase-Aktivierung und niedrigen Basalaktivität, wenn nur das Reporterogen (p(CAGA)₁₂-Luc) exprimiert wird. Der relativ hohe Basallevel bei Expression der Rezeptoren ohne Stimulation mit BMP-2 kann eventuell endogen sekretierten BMP-Liganden zugeschrieben werden und verdeutlicht das Problem eines niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses beim Auslesen des BMP-eigenen Smad1/5/8-Signals, wenn die nativen Rezeptoren und nicht, wie hier gezeigt, Rezeptor-Chimären exprimiert werden.

Zusammengenommen haben die *in vivo* produzierten BMP-Rezeptoren eine den extrazellulären Rezeptordomänen vergleichbare biologische Aktivität. Die zwischen BMPR-IA und BMPR-IB bzw. BMPR-IA/IB^{cec} gemessenen Unterschiede in der Stärke der Signalaktivierung könnten mit den Bindungscharakteristika gegenüber BMP-2 (Komplexstabilität) zusammenhängen, aber beispielsweise auch auf unterschiedliche Internalisierungsraten der jeweiligen Rezeptoren bzw. Komplexe (Endocytose) (Hartung et al., 2006) zurückzuführen sein.

IV. 3. 2. Alkalische Phosphatase (ALP) und Luciferase-Reporterergen-Assays zur Bestimmung der Aktivität von GDF-5 und GDF-5-Varianten

IV. 3. 2. 1. ALP-Assays mit ATDC5- und RobC26-Zellen

Im Rahmen der Arbeit wurden GDF-5-Varianten mit einem phenotypischen Erscheinungsbild hergestellt und charakterisiert. In den bereits in IV. 2. 2. vorgestellten Bindungsstudien fällt auf, dass einige der Varianten zwar eine zum wildtypischen GDF-5 vergleichbare Bindungsaffinität, aber stark veränderte Kinetik der Komplexbildung aufweisen (Abbildung IV-19, S. 88). Zur Klärung der Frage, ob die veränderten Bindungsparameter der GDF-5-Varianten einen Einfluss auf deren biologische Aktivität haben, wurde unter anderem die Eigenschaft von ATDC5- und RobC26-Zellen ausgenutzt, bei Stimulation mit extrazellulär zugegebenen BMP-Liganden zu differenzieren und Alkalische Phosphatase zu produzieren. Über welche intrazelluläre Signalkette die Produktion Alkalischer Phosphatase bei Stimulation von responsiven Zellen durch BMP Liganden letztlich induziert wird, ist derzeit unbekannt. Möglicherweise geschieht dies über eine autokrine Rückkopplung mit dem Wnt/LRP5-Signalweg. Experimente zeigten, dass BMP-2 die Menge an β -catenin in C3H10T1/2-Zellen erhöht und die Produktion von Wnt-3a induziert (Fischer et al., 2002). Wnt-3a kontrolliert über die kanonische β -catenin Signalkaskade die Expression von Alkalischer Phosphatase (Rawadi et al., 2003), was auf synergistische Effekte zwischen den BMP-2- und Wnt-3a-Signalwegen hinweist. Wie Kompetitionsexperimente mit einem BMPR-IA-spezifischen, neutralisierenden Antikörper zeigten, werden in ATDC5-Zellen GDF-5-Signale durch BMPR-IA in das Zellinnere übermittelt, obwohl BMPR-IB als typischer Rezeptor für GDF-5 gilt (J. Nickel, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde die Knorpelvorläuferzelllinie RobC26 verwendet, um auf die durch BMPR-IB vermittelte GDF-5-Signalaktivität zu prüfen. In der Literatur sind Crosslink- und Immunopräzipitationsexperimente unter Verwendung von ¹²⁵I-GDF-5 beschrieben, mit denen ¹²⁵I-GDF-5•BMPR-IB-Komplexe in RobC26-Zellen nachgewiesen werden konnten (Erlacher et al., 1998; Nishitoh et al., 1996). Dies lässt vermuten, dass trotz gleichzeitiger Expression von BMPR-IA und ActR-I in diesen Zellen die Signalgebung von GDF-5 über BMPR-IB verläuft, was wahrscheinlich auch auf andere Liganden wie BMP-6 und BMP-7 zutrifft (Ebisawa et al., 1999; Tamaki et al., 1998). Folglich lassen die ATDC5-Zellassays Aussagen über die BMPR-IA-vermittelte GDF-5-Signalgebung zu, während sich mit RobC26-Zellassays vermutlich die durch BMPR-IB vermittelte Zellantwort auf GDF-5-Signale bestimmen lässt.

Die biologische Aktivität der untersuchten GDF-5-Varianten korreliert nur teilweise mit den Biacore-Bindungsdaten dieser Varianten gegenüber BMPR-IA und BMPR-IB. Während die GDF-5-R57L-Variante in ATDC5-Zellen im Einklang mit der etwa 4fach höheren Bindungsaffinität zu BMPR-IA eine im Vergleich zum GDF-5 etwas niedrigere effektive Konzentration (EC_{50}) aufweist (GDF-5-R57L: $EC_{50} = 19\text{nM}$; GDF-5: $EC_{50} = 28\text{nM}$), konnten für die anderen GDF-5-Varianten keine (GDF-5-H59L, -L60P, -DP, -del56L) oder nur deutlich niedrigere (GDF-5-S58T, $EC_{50} > 100\text{nM}$) ALP-Aktivitäten bestimmt werden (Abbildung IV-24, S. 97). Mit Ausnahme der Varianten mit Deletion von Leu56 (GDF-5-DP, -del56L) steht dies im Kontrast zu den Ergebnissen aus der Bindungsanalyse (Tabelle IX-3, S. 229), die angesichts der allenfalls geringfügigen Unterschiede in den Bindungsaffinitäten zu BMPR-IA und BMPR-IB kaum einen derart drastischen *in vivo* Effekt vermuten lassen. Nicht untersucht wurde zudem, ob beispielsweise GDF-5-H59L, aber auch andere Varianten, in den Zellassays als Antagonisten von GDF-5 fungieren können.

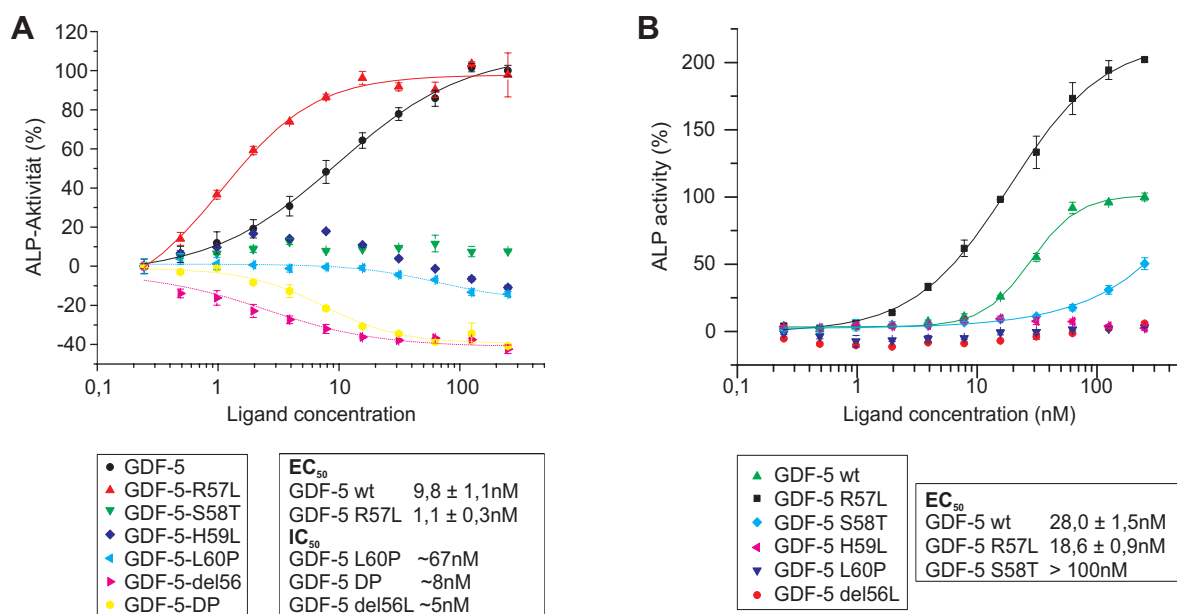


Abbildung IV-24: ALP-Assays in RobC26- und ATDC5-Zellen. **A:** Konzentrationsabhängige Stimulation der ALP-Produktion durch GDF-5-Varianten in RobC26-Zellen, in denen die Signaltransduktion vermutlich über BMPR-IB erfolgt. Trotz annähernd wildtypischer Bindungsaffinität der GDF-5-S58T- und GDF-5-H59L-Varianten zu BMPR-IA und BMPR-IB findet keine ALP-Induktion statt, während die GDF-5-R57L-Variante eine mit der höheren Bindungsaffinität korrelierende niedrigere EC_{50} aufweist. Die GDF-5-L60P, GDF-5-del56L und GDF-5-DP-Varianten zeigen einen leicht dominant negativen Effekt. Die effektiven und inhibitorischen Konzentrationen sind jeweils angegeben. **B:** Konzentrationsabhängige Stimulation der ALP-Produktion durch GDF-5-Varianten in ATDC5-Zellen, in welchen die Signaltransduktion über BMPR-IA stattfindet. In dieser Zelllinie ist eine geringe Aktivität der GDF-5-S58T-Variante zu beobachten. Die GDF-5-R57L-Variante zeigt nicht nur eine niedrigere EC_{50} , sondern auch eine um 100% höhere ALP-Aktivität. Die Bestimmung der effektiven bzw. inhibitorischen Konzentrationen (EC_{50} , IC_{50}) erfolgte durch einen Boltzmann-Fit der Datenpunkte. Alle Meßwerte wurden auf die ALP-Aktivität von GDF-5 normiert.

Ein Blick auf die Bindungsparameter, also Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten der Komplexe, lässt auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Komplexdissoziation und der biologischen Aktivität der GDF-5-Varianten schließen. Auffällig ist, dass die GDF-5-S58T-Variante mit einer Dissoziationsgeschwindigkeit des binären Komplexes von $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ gerade noch ALP-Aktivität zeigt, die allerdings selbst bei GDF-5-Konzentrationen von 250nM nur etwa 40% der ALP-Aktivität von GDF-5 erreichte (Abbildung IV-24, S. 97). Höhere Dissoziationsgeschwindigkeiten, beispielsweise bei Komplexen der GDF-5-H59L- und GDF-5-L60P-

Varianten (H59L: $2,7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$; L60P: nicht bestimmbar), korrelieren mit einem kompletten Verlust der Fähigkeit, ALP zu induzieren. Dies gilt nicht nur für die Signalübermittlung durch BMPR-IA in ATDC5-Zellen, sondern auch für durch BMPR-IB vermittelte GDF-5-Signale. In RobC26-Zellen wird ALP nur durch GDF-5 und GDF-5-R57L induziert, während andere GDF-5-Varianten keine stimulierende Aktivität zeigen. Im Gegenteil, die GDF-5-DP- und GDF-5-del56L-Varianten verursachen einen leicht negativen Effekt und unterdrücken die Basalaktivität der endogen exprimierten Liganden mit inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) von $\sim 5\text{-}8\text{ nM}$ (Abbildung IV-24, S. 97). Der inhibitorische Effekt ist besonders bemerkenswert, weil GDF-5-del56L anders als GDF-5-DP weder mit BMPR-IA und BMPR-IB noch mit BMPR-II interagiert (Tabelle IX-3, S. 235). Die effektiven Konzentrationen von GDF-5 und GDF-5-R57L in RobC26-Zellen sind mit 10nM bzw. 1nM um das 3-20fache niedriger als die in ATDC5-Zellen gemessenen, was mit der höheren Bindungsaffinität gegenüber BMPR-IB erklärt werden kann. Vergleicht man die Ergebnisse der ALP-Assays in ATDC5- und RobC26-Zellen, so ließe sich ein Grenzwert der Dissoziationsgeschwindigkeit binärer Komplexe ($k_{\text{off}}^{\#}$) und deren Halbwertszeit auf der Zelloberfläche (τ) definieren, oberhalb dessen keine ALP-Aktivität induziert werden kann. Für BMPR-IA läge dieser Grenzwert bei $k_{\text{off}}^{\#} > 180 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($\tau \sim 39\text{ s}$ für die 2:1-Interaktion) und für BMPR-IB bei $k_{\text{off}}^{\#} > 10 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($\tau \sim 700\text{ s}$ für die 2:1-Interaktion). Die Dissoziationsgeschwindigkeiten der 1:1-Interaktion sind ungefähr 10fach schneller, sodass wahrscheinlich von noch niedrigeren Grenzwerten für die Halbwertszeit ausgegangen werden kann (Tabelle IV-12). Ligand-Rezeptor-Komplexe anderer Wachstumsfaktoren oder Zytokine weisen der wildtypischen GDF-5•BMPR-IB-Interaktion ähnliche Dissoziationsgeschwindigkeiten auf. Als Beispiele seien der IL4•IL4R α -Komplex ($k_{\text{off}, 1:1} \sim 10 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; (Shen et al., 1996)) und der PRL•PRLR-Komplex ($k_{\text{off}, 1:1} \sim 14 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; (Keeler et al., 2007)) genannt. Die Dissoziationsgeschwindigkeit des EGF•EGFR-Komplexes ($k_{\text{off}, 1:1} \sim 600 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; (Zhou et al., 1993)) entspricht in der Größenordnung derjenigen des GDF-5•BMPR-IA-Komplexes.

	GDF-5-R57L	GDF-5	GDF-5-S58T	GDF-5-H59L	GDF-5-L60P
BMPR-IA					
$k_{\text{off}} [10^{-4} \text{ s}^{-1}]^{\text{a}}$	11,0 (72)	33,8 (220)	179 (1164)	274 (1781)	-
$\tau [\text{s}]^{\text{b}}$	630 (97)	205 (32)	39 (6)	25 (4)	-
$EC_{50} [\text{nM}]^{\text{c}}$	18,6	28,0	> 100	-	-
BMPR-IB					
$k_{\text{off}} [10^{-4} \text{ s}^{-1}]^{\text{a}}$	1,7 (9,5)	3,4 (19,0)	11,5 (64,4)	32,8 (184)	256 (1434)
$\tau [\text{s}]^{\text{b}}$	4077 (730)	2039 (364)	603 (108)	211 (38)	27 (5)
$EC_{50} [\text{nM}]^{\text{d}}$	1,1	9,8	-	-	-

^a Werte sind Tabelle IX-3 entnommen und gelten für die 2:1-Interaktion. In Klammern sind auf die 1:1-Interaktion umgerechnete Werte angegeben. Der Umrechnungsfaktor ergibt sich aus den Bindungsdaten des wildtypischen GDF-5: $f = k_{\text{off}} [1:1] / k_{\text{off}} [2:1]$. Für BMPR-IA lassen sich $f_{\text{BMPR-IA}} = 6,5$ und für BMPR-IB $f_{\text{BMPR-IB}} = 5,6$ berechnen (siehe Tabelle IX-3 und Tabelle IX-4).

^b Die Halbwertszeit des GDF-5-Rezeptorkomplexes wurde mit der Gleichung $\tau = \ln 2 / k_{\text{off}}$ berechnet. Die Werte in Klammern gelten wie in (a) gezeigt für die 1:1-Interaktion.

^c Ermittelt in ATDC5-Zellen.

^d Ermittelt in RobC26-Zellen.

Tabelle IV-12: Vergleich der *in vitro* Dissoziationsgeschwindigkeiten und *in vivo* ALP-Signalaktivitäten der GDF-5-Varianten.

IV. 3. 2. 2. Reportergergen-Assays mit ATDC5- und C3H10T1/2-Zellen

Um den Effekt der GDF-5-Mutanten auf die Auslösung des Smad1/5/8-Signalwegs zu ermitteln, wurden neben den ALP-Assays Luciferase-Reportergergen-Assays in ATDC5- und C3H10T1/2-Zelllinien durchgeführt. Diese Versuche ergaben mit den ALP-Assays korrelierende Ergebnisse. Sowohl für GDF-5 als auch GDF-5-R57L wurde jeweils eine konzentrationsabhängige Aktivierung des Smad1/5/8-Signalwegs ermittelt, während die anderen untersuchten GDF-5-Varianten selbst bei hohen Ligand-Konzentrationen keine über den Basallevel hinausgehende Aktivität zeigten (Abbildung IV-25, S. 99). Nur die GDF-5-S58T-Variante bildet eine Ausnahme, induziert jedoch erst ab einer Konzentration von 500nM im Zellkulturmedium die Bildung von Luciferase. Anders als in den ALP-Assays spiegelt sich die höhere Bindungsaffinität der GDF-5-R57L-Variante weniger eindeutig in der effektiven Konzentration wider. Die geschätzten EC_{50} -Werte mit >100nM (GDF-5) bzw. >70nM (GDF-5-R57L) in mit BRE-Luc transfizierten ATDC5-Zellen sind wesentlich höher als in ALP-Assays mit der gleichen Zelllinie.

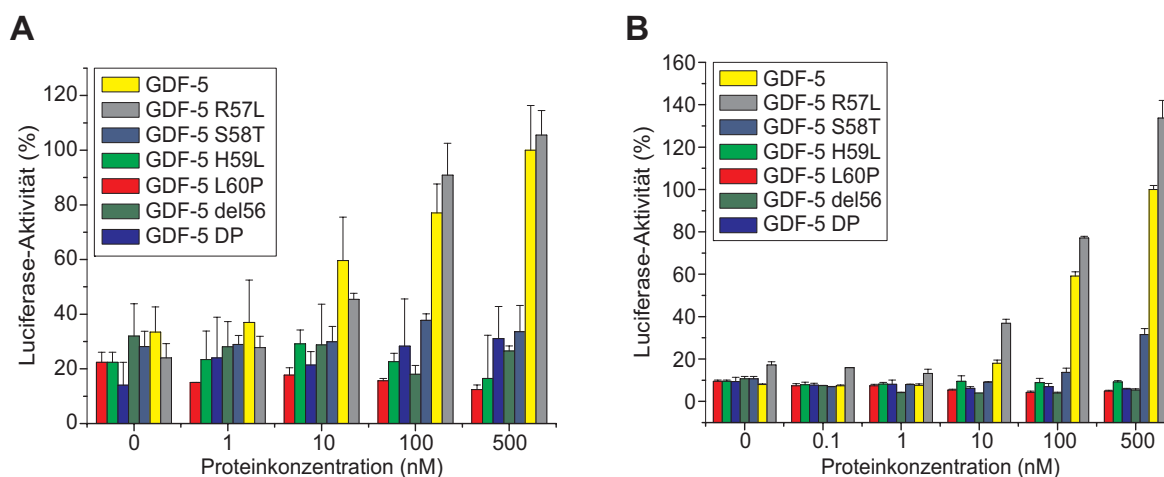


Abbildung IV-25: Reportergergen-Assays der GDF-5-Varianten in verschiedenen Zelllinien. Konzentrationsabhängige Stimulation der Luciferase-Produktion in (A) ATDC5-, (B) C3H10T1/2-Zellen. A, B: Die BRE-Reportergergen-Assays mit ATDC5- und C3H10T1/2-Zellen spiegeln den Effekt der GDF-5-Varianten im ALP-Assay wider. GDF-5 und GDF-5-R57L induzierten über den Smad1/5/8-Signalweg die Luciferase-Aktivität, während die anderen untersuchten Varianten keinen Effekt zeigten.

IV.4. Präparation von Ligand-Rezeptor-Komplexen

IV. 4. 1. Binärer Komplex aus BMP-2 und ^{15}N -BMPR-IAec bzw. ^{15}N -BMPR-IAsf

Binäre Komplexe aus BMP-2 und (isotopenmarkierten) BMPR-IAsf wurden wie in der Literatur für den BMP-2•BMPR-IAec-Komplex angegeben präpariert (Keller, 2004; Kirsch et al., 2000b; Weber, 2006), nur dass dem Komplexpräparationspuffer 0,2% (w/v) CHAPS zugesetzt wurde. Durch die Gelfiltration konnte freies CHAPS, nicht jedoch nichtkovalent an den Proteinkomplex gebundenes CHAPS, abgetrennt werden. Die Ausbeuten der Komplexpräparation von BMP-2 mit BMPR-IAsf bei Zusatz von CHAPS waren vergleichbar zu denen mit BMPR-IAec und lagen bei 69% direkt nach der Gelfiltration. Allerdings wurde beim Einengen des Komplexes nach der Gelfiltration auf höhere Konzentrationen eine starke Tendenz zur Präzipitation des Komplexes beobachtet, sodass sich letztlich nur eine Ausbeute von etwa 29-38% ergab.

Beim Einengen des BMP-2-¹⁵N-BMPR-IAec-Komplexes vor der Gelfiltration bildete sich vergleichsweise massiv Niederschlag. Nach der Gelfiltration des Überstandes konnten bezüglich der eingesetzten Menge BMP-2 nur 17% Komplex isoliert werden (15,2nmol Komplex aus 90nmol BMP-2). Diese Lösung wurde gegen 10mM KPP-Puffer pH6,5, 100mM NaCl dialysiert und dann eingengt, wodurch etwa 1/7 des Proteins durch Präzipitation verloren gingen. Weil die Menge an erhaltenem Komplex (~100µg) nicht für die NMR-Analyse ausreichte, wurde ein Komplex aus BMP-2 und ¹⁵N-BMPR-IAec hergestellt (Abbildung IV-26, S. 100).

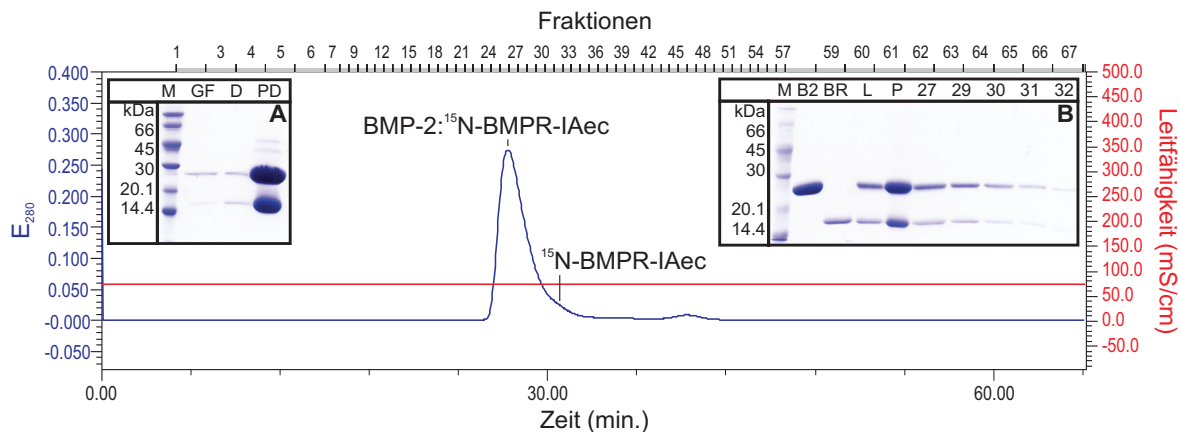


Abbildung IV-26: Präparation des BMP-2-¹⁵N-BMPR-IAec-Komplexes. Chromatogramm der Gelfiltration des BMP-2-¹⁵N-BMPR-IAec-Komplexes. **A:** SDS-PAGE des Komplexes nach der Gelfiltration in Laufpuffer (GF), des Komplexes nach Dialyse gegen NMR-Puffer (D) und des bei der Dialyse entstandenen Pellets (P). **B:** SDS-PAGE des Gelfiltrationslaufs. **Bahnen:** B2...BMP-2, BR...¹⁵N-BMPR-IAec, L...Injiziertes Protein, P...Pellet beim Einengen vor der Gelfiltration.

Hierbei lag die Ausbeute nach der Gelfiltration bei 50% (45nmol Komplex aus 90nmol BMP-2). Während der Dialyse gegen 25mM KPP pH6,0, 150mM NaCl präzipitierten etwa 50% des binären Komplexes. Das Pellet konnte durch Zugabe von 10mM MES pH6,0, 700mM NaCl fast komplett gelöst werden und wurde zusammen mit der löslichen Fraktion gegen 25mM Na₂HPO₄ pH6,6, 50mM NaCl, 0,2% (v/v) CHAPS (Ilangoan et al., 2004) dialysiert, wobei nur wenig Niederschlag entstand. Nach dem Einengen konnten 310µl einer 81µM BMP-2-¹⁵N-BMPR-IAec-Lösung (25nmol) der NMR-Analyse zur Verfügung gestellt werden.

Protein	Retentionszeit (min)	Apparentes M _w (Da)	Berechnetes M _w (Da)
¹⁵ N-BMPR-IAec	26,0	20412	11401
¹⁵ N-BMPR-IAec	23,9	33034	14834
BMPR-IA/IB ^C ec	24,6	28136	14757
BMPR-IBec	24,5	28770	13194
BMP-2- ¹⁵ N-BMPR-IAec	23,0	39746	48612
BMP-2- ¹⁵ N-BMPR-IAec	21,1	61246	55478
GDF-5•BMPR-IBec	21,4	57413	51788
GDF-5•BMPR-IA/IB ^C ec	21,1	61383	54914

Komplexe mit Se-Met-markierten Komponenten eluierten mit gleichen Retentionszeiten.

Tabelle IV-13: Retentionszeiten der binären Proteinkomplexe in der Gelfiltration.

IV. 4. 2. Binäre Komplexe aus GDF-5 und BMPR-IBec bzw. BMPR-IA/IB^Cec

Binäre Komplexe aus GDF-5 und BMPR-IBec bzw. BMPR-IA/IB^C wurden nach dem in III. 15. 1. vorgestellten Verfahren hergestellt. Beim Mischen von GDF-5 und BMPR-IBec wurde nur eine geringfügige Trübung der Lösung beobachtet. Das resultierende Pellet enthielt sowohl GDF-5 als auch BMPR-IBec. Etwa 90% des eingesetzten Proteins blieb löslich und wurde auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Das Chromatogramm zeigt einen Hauptpeak mit einer kleinen Schulter, welche auf die Gegenwart von BMPR-IBec-Multimeren zurückzuführen ist (Abbildung IV-27, S. 101). Der binäre Komplex eluierte bei einer Retentionszeit von 21,4min, was einem apparenten Molekulargewicht von 57413Da entspricht (Tabelle IV-13, S. 100). Überschüssiger monomerer BMPR-IBec mit einer Retentionszeit von 24,5min konnte nur in geringen Mengen detektiert werden.

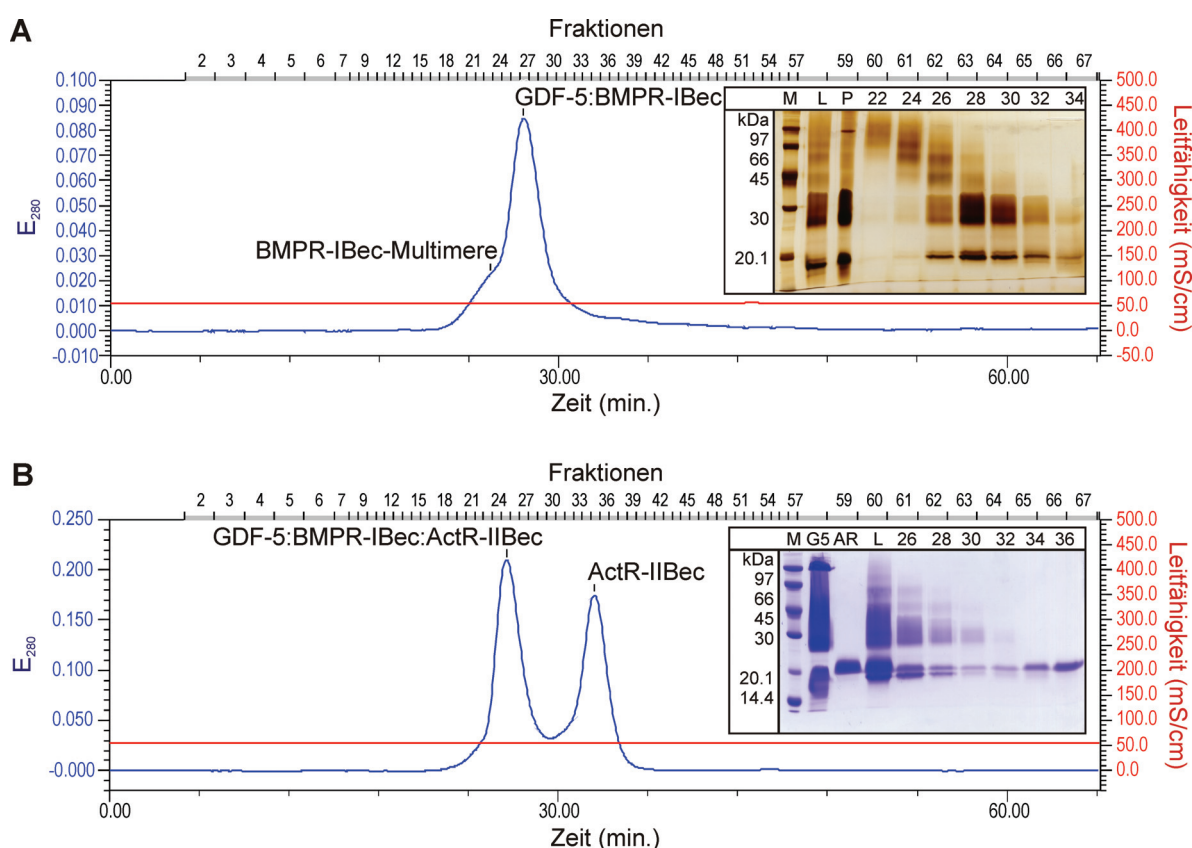


Abbildung IV-27: Präparation des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes. A: Chromatogramm und SDS-PAGE der Reinigung von GDF-5•BMPR-IBec. **B:** Chromatogramm und SDS-PAGE der Reinigung von GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec. Die ActR-IIBec-Bande erschien knapp über der BMPR-IBec-Bande. **Bahnen:** M...Marker, L...Injiziertes Protein, P...Pellet nach Einengen vor Gelfiltration, G5...zur Präparation eingesetztes GDF-5, AR...zur Präparation eingesetzter ActR-IIBec, Nummern...Fraktionen aus der Gelfiltration.

Eine Präparation mit 20nmol GDF-5 ergab etwa 5,4nmol (~280µg) GDF-5•BMPR-IBec-Komplex, was bezogen auf eingesetztes GDF-5 einer Ausbeute von 27% entspricht, die mit vorherigen Ergebnissen korreliert (Keller, 2004). Die niedrige Ausbeute könnte auf eine erhöhte Dissoziation des Komplexes auf der Gelfiltrationssäule zurückzuführen sein, was bei den Pufferbedingungen zur sofortigen Ausfällung von GDF-5 führen würde. Für die Präparation unter Verwendung von Se-GDF-5 bzw. Se-BMPR-IBec ergeben sich ähnliche Laufeigenschaften und Ausbeuten der beteiligten

Proteine. Alternativ zu affinitätsgereinigtem BMPR-IBec wurde der BMPR-IBec-Ansatz nach der zweiten Ni-NTA-Säule zur Komplexpräparation eingesetzt, weil so der Schritt der BMP-2-Affinitätschromatographie vermieden werden konnte. Da der Ni-NTA-Ansatz nur zu etwa 20% aus aktivem BMPR-IBec bestand, wurde die 5fache Menge zur Komplexbildung verwendet und der überschüssige monomere, jedoch inaktive Rezeptor durch die Gelfiltration abgetrennt (nicht gezeigt). BMPR-IBec-Multimere wurden dabei nicht beobachtet. Allerdings stellte sich später heraus, dass derartig hergestellte Komplexe unter den in IV. 5. 1. beschriebenen Kristallisationsbedingungen keine Kristalle ausbilden. Die Ausbeuten der Komplexpräparation bei Verwendung des Ni-NTA-Ansatzes entsprechen denen bei Verwendung des affinitätsgereinigten BMPR-IBec. Das gleiche gilt für die Retentionszeiten in der Gelfiltration.

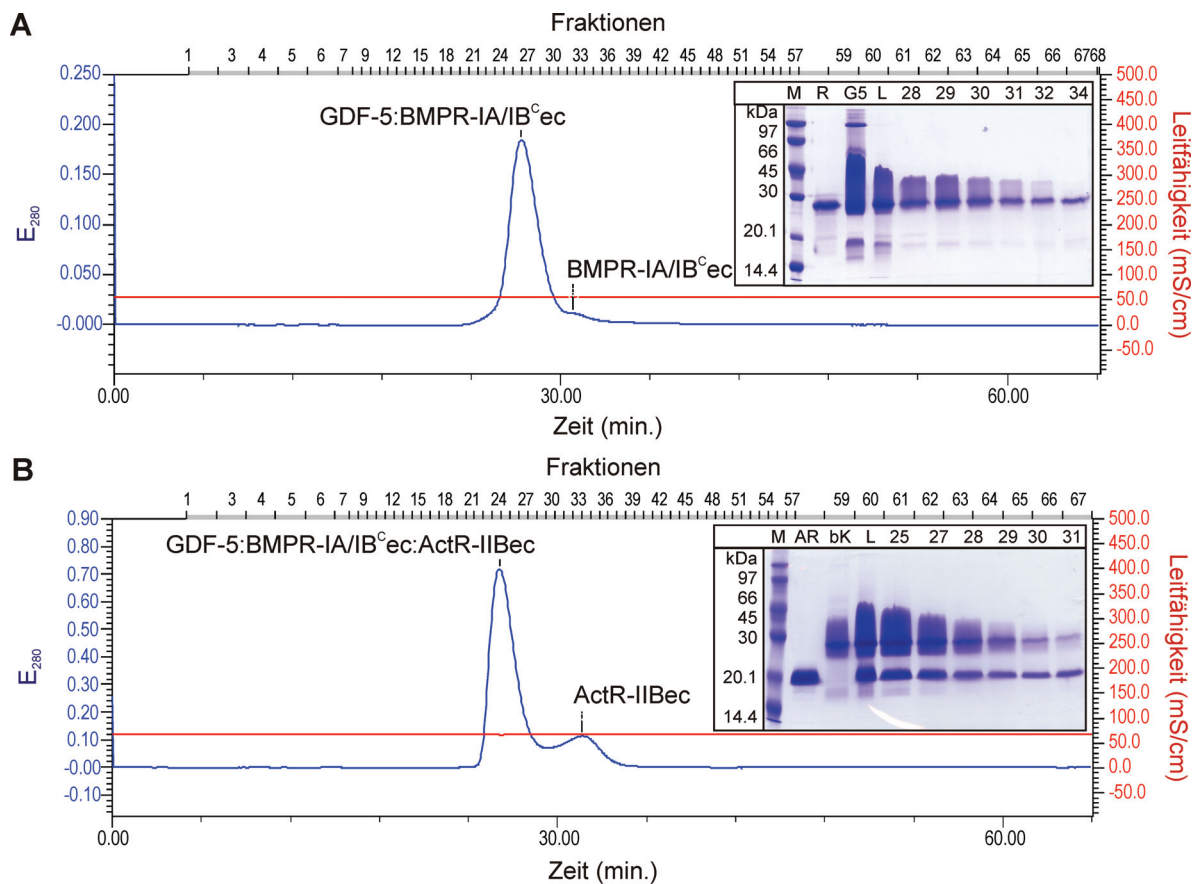


Abbildung IV-28: Präparation des GDF-5•BMPR-IA/IB^cec•ActR-IIBec-Komplexes. **A:** Chromatogramm und SDS-PAGE der Reinigung von GDF-5•BMPR-IA/IB^cec. **B:** Chromatogramm und SDS-PAGE der Reinigung von GDF-5•BMPR-IA/IB^cec•ActR-IIBec. **Bahnen:** M...Marker, R...BMPR-IA/IB^cec, G5...GDF-5, L...Injiziertes Protein, AR...ActR-IIBec, bK...binärer Komplex, Nummern...Fraktionen aus der Gelfiltration.

Im Vergleich zum GDF-5•BMPR-IBec-Komplex konnten vom GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Komplex sowie dessen Se-Met-Derivat bei Ausbeuten von 59% deutlich größere Mengen gewonnen werden. Offensichtlich hängt die Stabilität der einzelnen binären Komplexe unter den Bedingungen der Gelfiltration nicht nur von der Bindungsaffinität, sondern auch von strukturellen oder chemischen Eigenschaften des jeweiligen BMP Typ I Rezeptors ab. Wie in Abbildung IV-28, S. 102, zu sehen ist, überlagern sich in der SDS-PAGE die Banden von BMPR-IA/IB^cec (28kDa) und GDF-5 (30kDa). Die Retentionszeit des Komplexes (21,1min) war deutlich geringer als die Retentionszeit von BMPR-

IA/IB^{Cec} (24,6min), sodass es sich bei der Bande im Gel um den binären Komplex und nicht die Einzelkomponenten handelt. Für den GDF-5•BMPR-IA/IB^{Cec}-Komplex ergibt sich ein nahe dem errechneten Molekulargewicht liegendes apparentes Molekulargewicht von 61,4kDa (Tabelle IV-13, S. 100).

IV. 4. 3. Ternärer Komplex aus GDF-5, BMPR-IBec bzw. BMPR-IA/IB^{Cec} und ActR-IIbec

Die Präparation der ternären Ligand-Rezeptor-Komplexe erfolgte im Anschluss an die Herstellung der binären Komplexe (siehe IV. 4. 2.). Dazu wurden die vereinigten Fraktionen nach der Gelfiltration mit ActR-IIbec versetzt und dessen Überschuss in einem zweiten Gelfiltrationsschritt abgetrennt. ActR-IIbec wird von GDF-5 mit der höchsten Bindungsaffinität unter den Typ II Rezeptoren gebunden (2:1-Interaktion: $K_D = 4\text{nM}$). Die Bindungsaffinität ist nur etwa zwei- bis vierfach schlechter als für BMPR-IBec oder BMPR-IA/IB^{Cec}, weswegen der ternäre Komplex aus GDF-5, BMPR-IBec bzw. BMPR-IA/IB^{Cec} und ActR-IIbec erfolgreich rekonstituiert werden konnte. Der ternäre Komplex eluiert in der Gelfiltration bei einer Retentionszeit von 20,5min, also 1min früher als der binäre Komplex (Abbildung IV-27, S. 101). Für den GDF-5•BMPR-IA/IB^{Cec}•ActR-IIbec-Komplex ergibt sich eine Retentionszeit von 19,9min (Abbildung IV-28, S. 102). Daraus lassen sich mit den berechneten Werten vergleichbare Molekulargewichte von 70,2kDa bzw. 80,5kDa ermitteln (Tabelle IV-14, S. 103). Die Ausbeuten für den GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIbec-Komplex betragen 14% (bezogen auf GDF-5) bzw. 53% (bezogen auf den binären Komplex), sodass mit anfänglich 20nmol GDF-5 etwa 2,8nmol (220µg) GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIbec-Komplex isoliert werden können. Der GDF-5•BMPR-IA/IB^{Cec}•ActR-IIbec-Komplex wird mit einer höheren Ausbeute von 39% (bezogen auf GDF-5) bzw. 59% (bezogen auf binären Komplex) erhalten.

Protein	Retentionszeit (min)	Apparentes M_w (Da)	Berechnetes M_w (Da)
ActR-IIbec	26,4 ^a /25,4 ^b	18838 ^a /23541 ^b	13082
GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIbec	20,5	70166	77952
GDF-5•BMPR-IA/IB ^{Cec} •ActR-IIbec	19,9	80563	81078

Komplexe mit Se-Met-markierten Komponenten eluierten mit gleichen Retentionszeiten.

^a...Retentionszeit bei Reinigung des GDF-5•BMPR-IBec:ActR-IIbec-Komplexes

^b...Retentionszeit bei Reinigung des GDF-5•BMPR-IA/IB^{Cec}:ActR-IIbec-Komplexes

Die Ursache für die unterschiedlichen Retentionszeiten von ActR-IIbec in Abhängigkeit vom gereinigten Komplex ist nicht bekannt, aber experimentell reproduzierbar.

Tabelle IV-14: Retentionszeiten der ternären Proteinkomplexe in der Gelfiltration.

IV.5. Kristallisation der Ligand-Rezeptor-Komplexe

IV. 5. 1. Kristallisation vom GDF-5•BMPR-IBec-Komplex

IV. 5. 1. 1. Sparse-Matrix-Screens

Für den GDF-5:BMPR-IBec-Komplex konnten in vorherigen Arbeiten Kristallisationsbedingungen optimiert werden, die zu dreidimensionalen, etwa 100-300µm grossen Kristalle führten (Keller,

2004). Als Fällungsmittel wurden Natriumazetat, Natriumformiat bzw. K-Na-Tartrat bei saurem oder basischem pH-Wert verwendet. Einzelne Kristalle konnten an einer Drehanodenmesseinrichtung vermessen werden, zeigten jedoch eine sehr geringe und uneinheitliche Streukraft bis maximal 20Å. Pufferbedingungen mit Polyethylenglycolen oder verwandten Fällungsmitteln führten nur zum Wachstum von Mikrokristallen. Ziel dieser Arbeit war es daher, durch Verwendung von Sparse-Matrix-Kristallisationscreens neue Pufferbedingungen für das Wachstum von Einzelkristallen des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes zu finden und diese zu optimieren. Die Tatsache, dass von S. Keller zwar scharfkantige, große Kristalle erhalten wurden, diese aber mangels Röntgenbeugung nicht verwendbar waren, führte zu der Überlegung, eine zusätzliche Proteinkomponente einzuführen, um so neue Kristallkontakte im Kristall zu erzeugen und damit eine höhere Ordnung im Kristallgitter zu erreichen. Dazu wurde der ternäre GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex präpariert und kristallisiert. Wegen der geringen Ausbeute an ternärem Komplex von 220µg pro Ansatz konnten nicht alle Sparse-Matrix-Screens getestet werden. Aus diesem Grund wurden anhand bekannter Kristallisationsbedingungen verwandter binärer oder ternärer Komplexe Erfolg versprechende Pufferbedingungen ausgewählt. Eine Orientierung waren insbesondere die Ergebnisse der Sparse-Matrix-Screens mit dem in guten Ausbeuten erhaltenen GDF-5•BMPR-IA/IB^cec•ActR-IIBec-Komplex (IV. 4. 3.). Von diesem Komplex wurde bei einer Proteinkonzentration von 8mg/ml und einem Mischungsverhältnis von 1µl Proteinlösung und 1µl Reservoirlösung (1:1) eine umfangreiche Suche unter Verwendung der Crystal Screens I und II, des Index-Screens, SaltRx-Screens, Crystal Screens Cryo, Crystal Screens LITE, und PEG-Ion-Screens (alle Hampton Research) durchgeführt.

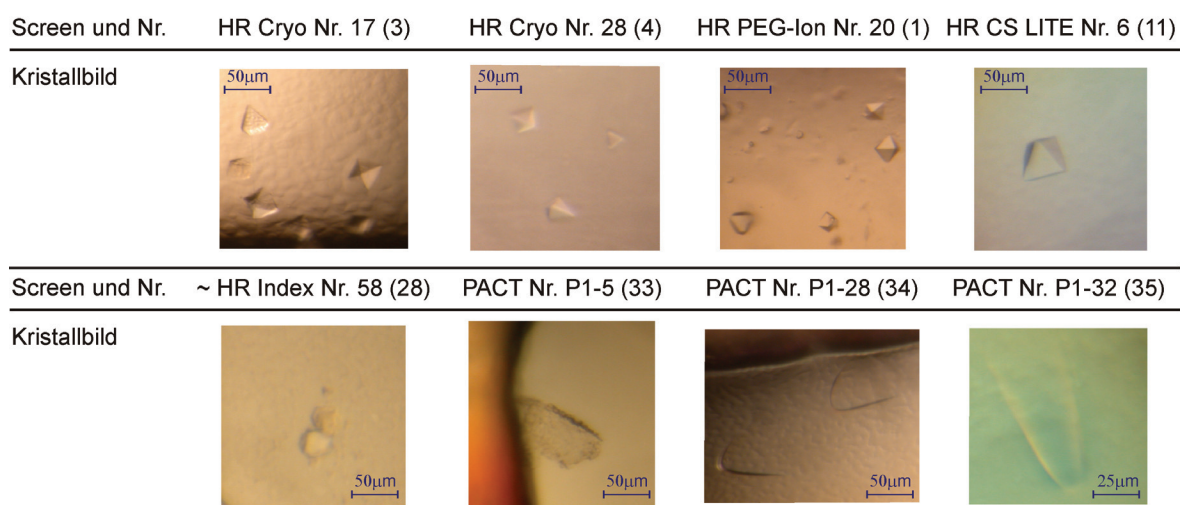


Abbildung IV-29: Erste Kristalle des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes. Die Nummern in Klammern beziehen sich auf den ersten Grob-Screen.

Pufferbedingungen, bei denen Kristallcluster oder einzelne Kristalle beobachtet werden konnten, wurden für das Screening des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes übernommen. Das gleiche galt für bereits optimierte Bedingungen des GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Komplexes (IV. 5. 2.). Ferner zeigten Arbeiten von D. Weber zur Kristallisation des BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplexes, dass Pufferbedingungen mit Polyalkoholen zum Wachstum von Einzelkristallen führen (Weber, 2006; Weber et al., 2007). Durch Optimierung der Bedingung Nr. 58 aus dem Index-Screen konnten mit 0,1M Bis-Tris pH5,5 bis pH6,25 und 40% bis 45% Polypropylenglycol 400 (PPG400) Einzelkristalle mit sehr guten Beugungseigenschaften erhalten werden. Aus diesem Grund wurde

diese Bedingung auch für die Kristallisation des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIB-Komplexes getestet. Der basierend auf den vorangehend beschriebenen Überlegungen zusammengestellte erste Kristallisationsscreen ist in Tabelle IX-6, S. 240, wiedergegeben. Zusätzlich wurde der PACT-Premier-Screen (Molecular Dimensions) verwendet, bei dem unter vier Pufferbedingungen das Wachstum von Kristallen beobachtet werden konnte (Tabelle IX-6). Der GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex wurde in allen Kristallisationsexperimenten mit einer Konzentration von 4,8mg/ml und einem Mischungsverhältnis von 1:1 (Protein:Kristallisationspuffer) eingesetzt.

Unter den Bedingungen 1, 4 und 28 des ersten Kristallisationsscreens konnten nach 6-11d, unter Bedingungen 3 und 11 erst nach 40d bis 4 Monaten einzelne Kristalle beobachtet werden (Abbildung IV-29, S. 104). Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden die Pufferbedingungen mit sehr langen Kristallisationszeiten nicht weiter verfeinert. Alle im ersten Kristallisationsscreen erhaltenen Kristalle waren klein und scharfkantig, während die im PACT-Premier-Screen beobachteten Kristalle eher eine rundliche und flache Form aufwiesen. Bei den restlichen Bedingungen waren kaum Veränderungen im Kristallisationsansatz feststellbar, was möglicherweise an der relativ niedrigen Proteinkonzentration von 4,8mg/ml gelegen haben könnte.

Soweit möglich, wurden den Kristallisationsansätzen Einzelkristalle entnommen und deren Röntgenbeugung bei -180°C auf einer Drehanodenmesseinrichtung bestimmt. Für die aus dem ersten Screen gewonnenen Kristalle konnten keine Beugungsreflexe detektiert werden, was auf die geringe Größe der Kristalle ($x \sim y \sim z \sim 10\text{-}20\mu\text{m}$) zurückgeführt werden kann. Wegen des größeren Durchmessers des Röntgenstrahls ($d=208\mu\text{m}$) besteht die Möglichkeit, dass potentielle Beugungsreflexe geringer Intensität im Hintergrundrauschen verschwinden. Deshalb wurden die Kristallisationsbedingungen 1, 4 und 28 des ersten Screens mit der „Hanging Drop“-Methode optimiert, um einerseits auf Reproduzierbarkeit der Kristallisation zu prüfen und andererseits größere, besser analysierbare Proteinkristalle zu erzeugen. Zusätzlich wurden die Originalbedingungen aus den jeweiligen Hampton-Screens (Tabelle IX-6, S. 240) als Positivkontrolle verwendet.

IV. 5. 1. 2. Optimierung der ersten Kristallisationsbedingungen

In allen Optimierungen (Tabelle IV-15) konnten Einzelkristalle erhalten werden, wobei in Abhängigkeit der Kristallisationsbedingung zwei unterschiedliche Kristallformen beobachtet wurden. Während Bedingungen mit Polyethylenglycol als Fällungsmittel oktaedrische Kristalle ergaben, wuchsen in Gegenwart von Polypropylenglycol längliche, klingenförmige Kristalle. Letztere bildeten sich ausschließlich aus einem amorphen Gebilde in der Mitte des Kristallisationstropfens (Abbildung IV-30, S. 107).

Bei der Optimierung von Bedingung 28 des HR Cryo Screens wurden viele kleine, oktaedrische Kristalle erhalten, die wegen der geringen Größe nicht auf Röntgenbeugung untersucht werden konnten. Unter der Originalbedingung aus dem HR Cryo Screen bildeten sich größere, in allen drei Dimensionen etwa $50\mu\text{m}$ große Kristalle (Abbildung IV-30, S. 107). Von einem dieser Kristalle konnte am Synchrotron (BESSY) ein Datensatz mit einer Auflösung von maximal $6,5\text{\AA}$ aufgenommen werden ($\lambda=0,9796\text{\AA}$, 114 Aufnahmen bei einer Rotation von 1° pro Aufnahme und 60s Belichtung; siehe IV.6.). Die Indexierung der Reflexe ergab eine Einheitszelle tetragonaler Symmetrie mit den Dimensionen $a=b=132,96\text{\AA}$, $c=204,06\text{\AA}$ und den Gitterwinkeln $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Die in der Optimierung von Bedingung 20 des HR PEG-Ion-Screens erhaltenen, ebenfalls oktaedrischen Kristalle hatten eine für die Beugungsanalyse geeignetere Größe von etwa $100 \times 50 \times 50\mu\text{m}$ und

wurden an der Drehanodenanlage gemessen (Abbildung IV-30, S. 107). Bis zu einer Auflösung von 9\AA wurde ein regelmäßiges Beugungsmuster erhalten, das jedoch wegen unscharfen, verschwommenen Reflexen stark unterschiedlicher Intensität nicht zuverlässig analysiert werden konnte. Die in Abbildung IV-30 (S. 107) angegebenen Zellkonstanten stellen deshalb in diesem Fall Näherungswerte dar.

Originalbedingung ^a	x-Achse ^b	y-Achse ^b
HR PEG-Ion Nr. 20	0,1-0,35M (0,05) Mg-Formiat Nach 12-32d keine Kristalle sichtbar. Nach 3 Monaten einzelne oktaedrische Kristalle in C2, D4 und D5. Leicht verschwommene Reflexe in einem regelmäßigen Beugungsmuster bis maximal 9\AA .	pH 5,6-6,5 (0,3)
HR Cryo Nr. 28 (a)	0,01-0,21M (0,04) NaOAc Aus der Phasentrennung heraus in einigen Bedingungen (C3-C6, D3-D6) sehr kleine oktaedrische Einzelkristalle von etwa $10\mu\text{m}$ Größe.	pH 5,5-7,0 (0,5)
HR Cryo Nr. 28 (b)	0,01-0,21M (0,04) NaOAc Aus der Phasentrennung heraus in einigen Bedingungen (C5, C6, D4) sehr kleine oktaedrische Einzelkristalle von etwa $10\mu\text{m}$ Größe. Einzelkristalle bei der Originalbedingung zeigten ein regelmäßiges, jedoch anisotropes Beugungsmuster bis $6,5\text{\AA}$ am Synchrotron.	16,5-25,5% (3,0) PEG8000
HR Index Nr. 58	35-50% (5) PPG400 Aus einem Cluster herauswachsende mittelgroße Einzelkristalle von etwa $100\times 20\times 20\mu\text{m}$ Größe in A4, B4, C4 und D4 beugten in einem gleichmäßigen Muster bis zu $3,2\text{\AA}$ an der Drehanodenanlage.	pH 5,5-6,25 (0,25)

^a Für die Zusammensetzung der Originalbedingung siehe Tabelle IX-6 (S. 240). Es wurden nur die jeweils angegebenen Parameter variiert.

^b Werte in Klammern geben die pH-Wert- oder Konzentrationsschritte an: Für die x-Achse ergeben sich maximal 5 Intervalle (Werte 1-6), für die y-Achse maximal 3 Intervalle (Werte A-D) und daraus maximal eine 6×4 -Matrix (24-Well-Platte)

Tabelle IV-15: Optimierung von Kristallen des GDF-5•BMPr-IBec•ActR-IIbec-Komplexes.

Anders als die beiden vorangehend beschriebenen Kristallisationsbedingungen führte Bedingung Nr. 58 des HR Index-Screens zu Kristallen mit einem etwas uneinheitlichem Aussehen ähnlich einem Tannenzapfen. Das Wachstum dieser Kristalle erfolgte aus einem amorphen Cluster heraus. Aus dem Cluster entfernte einzelne Kristalle zeigten Röntgenbeugung bis zu einer Auflösung von $3,2\text{\AA}$. Das Beugungsmuster ist einheitlich und weist Röntgenbeugungsreflexe gleichmäßiger Intensität auch in den hohen Auflösungsschalen auf (Abbildung IV-30). Die Indexierung der Beugungsdaten lässt drei mögliche Raumgruppen zu: (1) orthorhombisch primitiv ($P2_12_12_1$), (2) orthorhombisch zentriert (C222) und (3) tetragonal primitiv ($P4_22_12_1$). C222 und $P2_12_12_1$ sind gleichzeitig nicht-isomorphe Untergruppen von $P4_22_12_1$. Für C222 ergibt sich im Vergleich zu $P4_22_12_1$ bzw. $P2_12_12_1$ eine leicht größere Einheitszelle mit $a=107,8\text{\AA}$, $b=108,3\text{\AA}$, $c=81,9\text{\AA}$ und $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ (in $P4_22_12_1$ bzw. $P2_12_12_1$: $a=b=76,5\text{\AA}$, $c=81,9\text{\AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$). Mit einem Volumen von $0,5 \cdot 10^6\text{\AA}^3$ bis $1,0 \cdot 10^6\text{\AA}^3$ ist diese Einheitszelle – und damit abhängig von der Kristallsymmetrie die Größe der asymmetrischen Einheit – jedoch deutlich kleiner als die Einheitszelle der oktaedrischen Kristalle aus Bedingung 28 des HR Cryo Screens ($V_E=3,6 \cdot 10^6\text{\AA}^3$). Am Synchrotron (SLS) konnten für die klingenförmigen Kristalle aus der Bis-Tris/PPG400-Bedingung Datensätze mit Auflösungen zwischen $2,5\text{\AA}$ bis $2,6\text{\AA}$ aufgenommen werden (siehe IV.6.). Die Bedingung mit PPG400 als Fällungsmittel wurde dennoch weiter optimiert, um Kristalle mit noch besseren Beugungseigenschaften zu erzeugen.

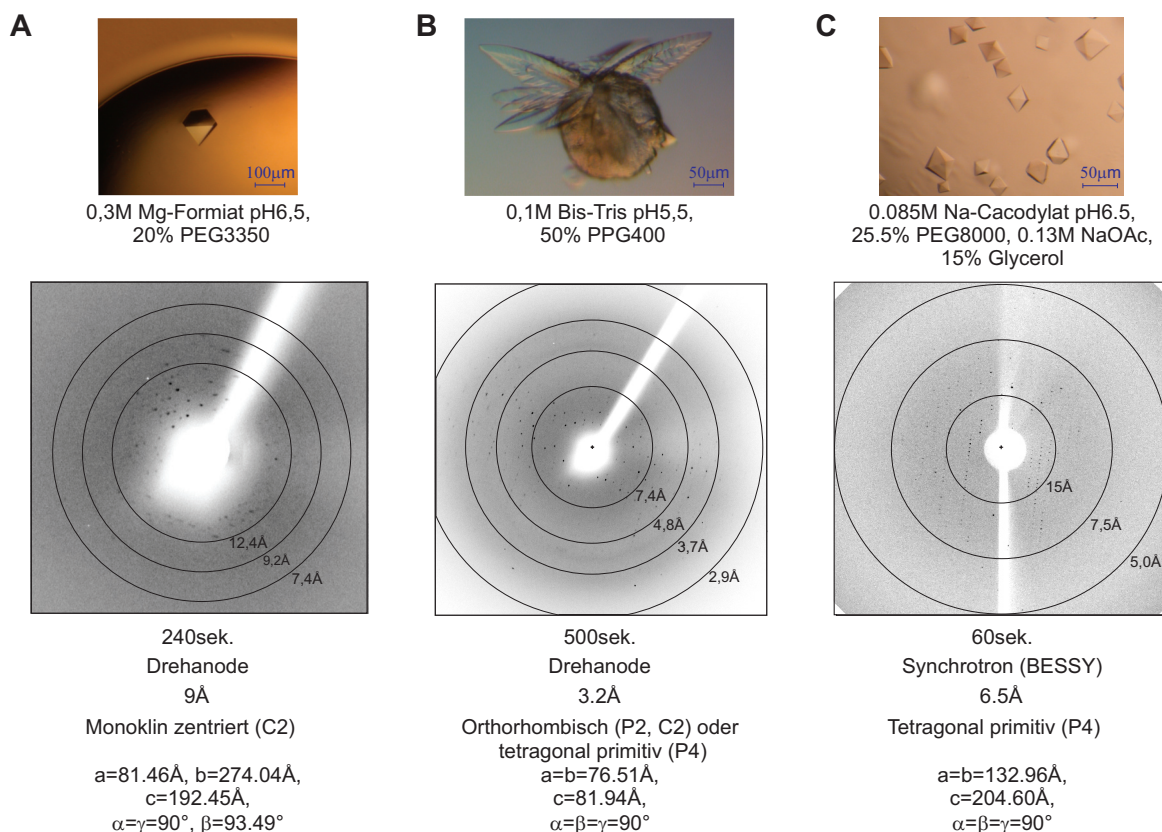


Abbildung IV-30: Beugungsdaten von ersten Kristallen des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes. Die unter den Beugungsbildern stehenden Angaben sind in der Reihenfolge (oben nach unten): Belichtungsdauer, Messeinrichtung, Maximale Auflösung, Symmetrie, Gitterkonstanten.

IV. 5. 1. 3. Optimierung der PPG400-Bedingung

Zur Verbesserung der Beugungseigenschaften der klingenförmigen Kristalle wurde ein umfangreiches Additiv-Screening basierend auf dem bereits beschriebenen Kristallisationspuffer (0,1M Bis-Tris pH5,5, 50% PPG400) durchgeführt. Dazu wurden die in Tabelle IV-16, S. 108, zusammengestellten Additive einer ausgewählten Ursprungsbedingung zugesetzt und die Pufferbedingungen anhand der Kristallgröße und -form evaluiert. Von den divalenten Kationen führten vor allem Magnesiumsalze zu isomorphen Kristallen mit glatten Oberflächen ohne Einkerbungen und scharfen Kanten. Damit scheinen Magnesiumionen ein wichtiges Ko-Präzipitans zu sein, was sich auch im Zusammenhang mit der Kristallisation anderer Komplexe, z.B. des GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Komplexes, bestätigt. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte dabei anders als bei CaOAc₂ als Additiv nicht beobachtet werden (siehe Abbildung IX-9). Dieses Salz schien bei Konzentrationen größer als 35mM die Bildung von Kristallen zu inhibieren. Der Zusatz von Salzen monovalenter Kationen führte zu vergleichsweise kleinen, kreuzförmigen Clustern aus jeweils vier Einzelkristallen. Nur in Gegenwart von Azetationen konnten größere, wenn auch etwas zerklüftete Kristalle ähnlich denen aus Abbildung IV-30 (S. 107, B) erhalten werden, was auch ein Grund war, das Puffersalz Bis-Tris durch Natriumazetat zu ersetzen. Bei Verwendung von Natriumazetat als Puffersalz bildeten sich im direkten Vergleich zu Natriumcitrat, Bis-Tris, K-Na-Phosphat, MES und Natriumcacodylat (Citrat und Cacodylat 50mM, alle anderen Puffer 100mM, pH5,5) die Kristalle mit dem homogenstem Aussehen. Mit Citrat und Phosphat konnten keine, mit MES und Cacodylat nur stark zerklüftete bzw. fragmentierte, scheinbar aus mehreren kleineren Kristallen zusammengesetzte, Kristalle erzeugt werden. Mit Polyethylenglycolen als Additiv konnten keine

Kristalle, sondern allenfalls Mikrokristalle oder kleine Cluster beobachtet werden. Bis auf DMSO führten andere Zusätze ebenfalls zu keinen Verbesserungen.

Für die Additive DMSO, MgSO_4 , CaOAc_2 und Mg-Formiat wurden anschließend Konzentrationsreihen mit Bis-Tris und NaOAc als Puffersalz angesetzt. Unter den meisten Pufferbedingungen konnten ausreichend große, für die Aufnahme von Datensätzen geeignete Kristalle erhalten werden (Abbildung IX-9, S. 241). Die Entnahme von Kristallen aus Bedingungen mit DMSO als Additiv wurde durch die schnell eintretende Phasentrennung im Tropfen erschwert. Offenbar bildete sich während der Inkubation bzw. Lagerung der Kristallisationsplatte ein metastabiles Gleichgewicht mit nur einer Phase, welches durch Temperaturveränderung oder Bewegung bei der Kristallentnahme gestört wurde. Bei erneuter Lagerung der Kristallisationsplatte verschwand die Phasentrennung. Zusätzlich wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Proteinlösung und Reservoirlösung getestet. Dabei war festzustellen, dass nur Mischungsverhältnisse von 1:1 (Protein:Puffer) zu einem Kristallwachstum führen.

Additivklasse	Verbindungen	Konzentration
Divalente Kationen	Mg-, Mn-, Ca-Sulfate, Azetate, Chloride	je nach Löslichkeit 30-50mM
Monovalente Kationen	Li-, Na-Chloride, Azetate, Nitrate	50mM
Polyalkohole	PEGs aller Größen	je nach Löslichkeit 1,5%, 2,5%, 5% (w/v oder v/v)
Alkohole	Ethylenglycol, MPD, Glucose, Sucrose, Xylitol	5% (w/v oder v/v)
Anderer	DMSO, PVP-K15, Malonat	5% (v/v)

Kristallbilder der am meisten Erfolg versprechenden Pufferbedingungen

0,1M Bis-Tris pH5,25, 52,5% PPG400 plus

30mM MgSO_4

5% DMSO

50mM CaOAc_2

50mM Mg-Formiat

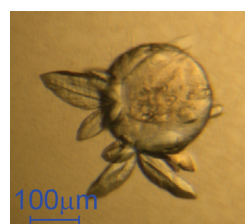
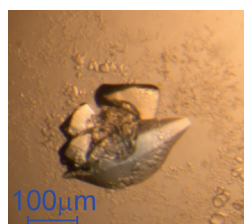
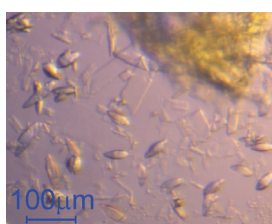


Tabelle IV-16: Zusammenstellung des Additiv-Screens für den ternären Komplex.

Ein Vergleich der Beugungsdaten zeigt, dass Kristalle aus Ansätzen mit Additiv die Aufnahme von Datensätzen mit höherer Auflösung von bis zu $2,7\text{\AA}$ (Drehanodenanlage) bzw. $2,1\text{\AA}$ (Synchrotron) ermöglichten. Durch die Additive konnten demnach die Beugungseigenschaften von klingenförmigen Kristallen deutlich verbessert werden (Abbildung IV-31, S. 109). Kristalle aus einer Pufferbedingung mit 0,1M NaOAc pH5,25, 50% PPG400, 45mM Mg-Formiat zeigten an der Swiss Light Source (SLS) eine Auflösung von $2,1\text{\AA}$, wobei einzelne Reflexe in höheren Auflösungsschalen bis $1,95\text{\AA}$ detektierbar waren.

Neben der Kristallisation des ternären Komplexes wurde versucht, den binären Komplex aus GDF-5 und BMPR-IBec zu kristallisieren. Die Herstellung des binären Komplexes erfolgte wie für den ternären Komplex beschrieben, jedoch mit dem BMPR-IBec-Ni-NTA-Ansatz ohne abschließende BMP-2-Affinitätsreinigung (siehe IV. 1. 2.). Inaktives BMPR-IBec-Monomer im Ansatz der

Komplexpräparation wurde durch die sich anschließende Gelfiltrationschromatographie abgetrennt. Kristallisiert wurde unter verschiedenen, für andere binäre BMP-Ligand-Rezeptor-Komplexe bzw. in vorherigen Arbeiten (Keller, 2004) beschriebenen Pufferbedingungen mit einer 3,1mg/ml Proteinlösung im Mischungsverhältnis 1:1 bei Raumtemperatur. In keinem der Ansätze konnten Kristalle, sondern allenfalls Mikrokristalle oder kleine Cluster bzw. Spherulite beobachtet werden. Interessanterweise traf ähnliches auch für die Kristallisation des ternären Komplexes zu, wenn mit dem nicht BMP-2-affinitätsgereinigten BMPR-IBec-Ni-NTA-Ansatz präpariert wurde. Unter den optimierten Pufferbedingungen mit Natriumazetatpuffer und PPG400 als Präzipitans konnten in diesem Fall keine Kristalle erhalten werden. Obwohl SDS-PAGE-Analysen die Bildung der binären und ternären Komplexe bei Verwendung des BMPR-IBec-Ni-NTA-Ansatzes bestätigen, wird die Bildung von Kristallen offensichtlich durch die unvollständige Abtrennung inaktiver, monomerer BMPR-IBec-Moleküle verhindert.

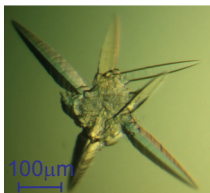
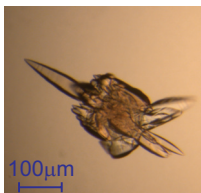
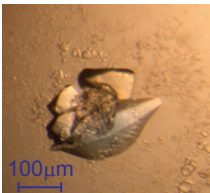
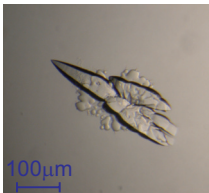
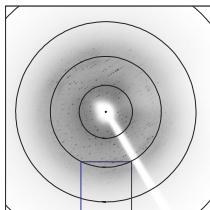
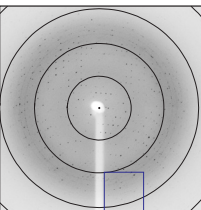
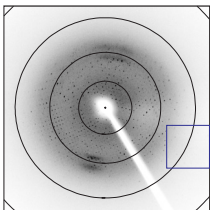
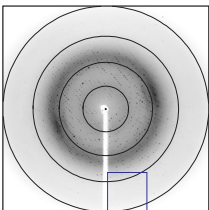
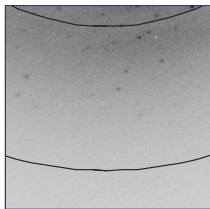
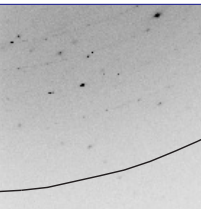
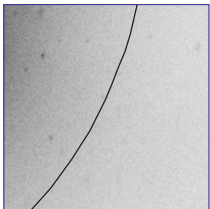
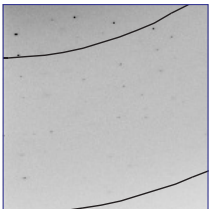
Pufferbedingung	0.1M BisTris pH5.5, 45% PPG400, 0.2M NaCl	0.1M BisTris pH5.75, 50% PPG400	0.1M BisTris pH5.25, 52.5% PPG400, 5% DMSO	0.1M NaOAc pH5.25, 50% PPG400, 30mM MgSO ₄
Kristallbild				
Beugungsbild				
Ausschnitts des Beugungsbilds				
Höchste Auflösung (Messeinrichtung) - Einzelne Reflexe bis	3,0Å (Drehanode) 2,8Å	2,6Å (SLS) 2,4Å	2,7Å (Drehanode) 2,5Å	2,1Å (SLS) 1,95Å
Gitterkonstanten	a=76.14, b=76.56Å, c=83.13Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=77.13Å, b=77.48Å, c=84.50Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=76.33Å, b=76.45Å, c=82.82Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=b=76.46Å, c=82.78Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$

Abbildung IV-31: Beugungseigenschaften von Kristallen des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes in Abhängigkeit vom Additiv und der Strahlenquelle. Die Auflösungsringe in den Beugungsbildern entsprechen von innen nach außen: Bei den Spalten 1, 3 und 4: 8,0 – 4,0 – 2,7 – 2,0Å; bei Spalte 2: 8,8 – 4,4 – 2,9 – 2,2Å. Die blau eingerahmten Flächen sind darunter stark vergrößert.

IV. 5. 1. 4. Kristalle von Se-GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec

Um Phasen experimentell zu bestimmen, wurden sowohl GDF-5 als auch BMPR-IBec mit Selenomethionin markiert (IV. 1. 2. 4, IV. 1. 4.). Es wurden Komplexe mit jeweils einer markierten Komponente, GDF-5:Se-BMPR-IBec:ActR-IIBec und Se-GDF•BMPR-IBec•ActR-IIBec, hergestellt und kristallisiert. Zunächst konnten unter keiner der in Abschnitt IV. 5. 1. angegebenen Pufferbedingungen Kristalle erhalten werden. Dies lag an der Verwendung von Se-GDF-5, das durch

Repression der Methionin-Biosynthese in *E.coli* BL21 (DE3) produziert wurde, und an der Verwendung von (Se-) BMPR-IBec, der nicht abschließend durch BMP-2-Affinitätschromatographie gereinigt wurde. Durch Expression von Se-GDF-5 im Methionin-auxotrophen Stamm *E.coli* B834 (DE3) konnte homogeneres Se-GDF-5 isoliert werden, dessen Komplexe mit BMP Rezeptoren bessere Kristallisationseigenschaften aufwiesen. Durch BMP-2-Affinitätschromatographie konnte biologisch nicht aktiver BMPR-IBec abgetrennt werden. Wurden Se-GDF-5 und BMPR-IBec entsprechend gereinigt, konnte der ternäre Se-GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIB-Komplex erfolgreich konstituiert und bei einer Konzentration von 3mg/ml und einem Mischungsverhältnis von 1:1 (Protein:Puffer) unter den für den unmarkierten Komplex beschriebenen Pufferbedingungen kristallisiert werden. Im Vergleich zur großen Anzahl von Kristallen für den unmarkierten Komplex bildeten sich jedoch unter den gleichen Bedingungen nur in einigen wenigen Ansätzen einzelne Kristalle des Se-Met-markierten Analogons (Tabelle IV-17). Magnesiumformiat war dabei essentiell für die Bildung der Kristalle. Mit anderen Additiven wie DMSO, MgSO₄ und CaOAc₂ wurden keine Kristalle beobachtet. Die erhaltenen Kristalle beugten am Synchrotron bis zu Auflösungen von 2,5Å. Von mehreren Kristallen wurden Datensätze bei jeweils drei Wellenlängen (peak, inflection, remote; Tabelle IV-19, S. 119) gemessen, wobei die Beugungsdaten durch einsetzende Strahlenschäden mit zunehmender Messdauer an Qualität verloren.

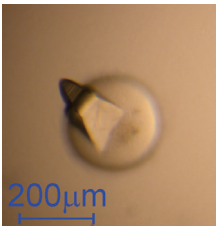
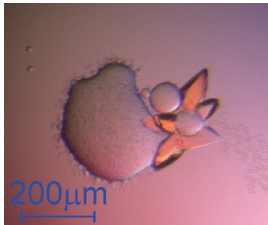
Pufferbedingung	Dauer	Kristallbild	Beugungsdaten; Auflösung
0,1M NaOAc pH5,25, 50% PPG400, 50mM Mg-Formiat	19d		Datensatz am Synchrotron (BESSY) gemessen; Auflösung: 2,5Å (peak), 2,9Å (inflection) und 2,9Å (remote)
0,1M NaOAc pH5,0, 50% PPG400, 35mM Mg-Formiat	5d		Datensatz am Synchrotron (BESSY) gemessen; Auflösung: 2,5Å (peak), 2,5Å (inflection) und 2,7Å (remote)

Tabelle IV-17: Kristallisation des Se-GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes.

IV. 5. 2. Kristallisation vom GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex

Der GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex konnte in ausreichenden Mengen isoliert werden, um ein umfangreiches Sparse-Matrix-Screening durchzuführen. Dazu wurden Kristallisationsansätze einer 3,2mg/ml Proteinlösung in MES-Puffer in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (Protein:Puffer) unter Verwendung des Index Screens, der Crystal Screens I und II, des PEG-Ion-Screens, SaltRx-Screens, Crystal Screens Cryo und Crystal Screens Lite (alle Hampton Research) präpariert. Mit den in Tabelle IV-18 (S. 111) angegebenen Bedingungen wurden Optimierungen angesetzt, bei denen sich dreidimensionale und scharfkantige Kristalle von 400µm bis 800µm Größe in allen drei Dimensionen und hexagonal zylindrischer Form bildeten (Abbildung IV-32, S. 112). Kristalle aus allen aufgeführten Bedingungen wurden an der Drehanodenanlage auf Röntgenbeugung untersucht. Von Nachteil war, dass keine der Bedingungen ausreichend Gefrierschutzmittel enthielt, sodass die

Kristalle zuerst in steigenden Konzentrationen Gefrierschutzmittel gebadet werden mussten. Für Bedingungen mit PEG wurden die Kristalle vor dem Einfrieren schrittweise in Bedingungen mit erhöhter PEG-Konzentration (bis 30%) überführt. Für Bedingungen mit Salzen als Präzipitans wurde die Reservoirlösung mit Reagenzien aus dem CryoPro-Kit (Hampton Research) gemischt, die jeweilige Lösung auf Kryofähigkeit getestet und anschließend der Kristall in drei Schritten in diese Pufferbedingung äquilibriert. Als Gefrierschutzmittel wurden meistens Sucrose oder Glucose (beide 35% Endkonzentration), in manchen Fällen auch Na-Malonat pH7,0 (2,2M Endkonzentration) oder Mg-Azetat (2,2M Endkonzentration) verwendet. Um das nachträgliche Waschen der Proteinkristalle mit kryofähigen Pufferbedingungen zu vermeiden, wurde zusätzlich versucht, Bedingungen aus dem Sparse-Matrix-Screen direkt durch Zusatz von Gefrierschutzmittel kryofähig zu machen und direkt kryofähige Kristalle zu erzeugen. Dazu konnte meist Glucose in Konzentrationen von 10-35% (w/v) zur Sparse-Matrix-Bedingung gegeben werden (Tabelle IV-18).

Keiner der untersuchten Kristalle zeigte Röntgenbeugung an der Drehanodenanlage. Bei einigen Bedingungen konnten wenige Reflexe bis zu einer Auflösung von 15-20Å detektiert werden. In Kapillaren montierte, bei Raumtemperatur gemessene Kristalle zeigten bis auf wenige Reflexe keine Röntgenbeugung, was auf ein ungeordnetes Kristallgitter und Heterogenität der Kristalle schließen ließ. Interessanterweise konnten große Kristalle des GDF-5•BMPr-IA/IB^Cec-Komplexes direkt aus der für die Kristallisation eingesetzten Lösung ohne weiteren Zusatz von Fällungsmitteln erhalten werden (Abbildung IV-32, S. 112). Einige Kristalle von 400x400x400µm³ Größe wurden dem Reaktionsgefäß mit der Pipette entnommen, ein kleiner Tropfen der Proteinlösung inklusive Kristall auf ein Deckgläschen gesetzt und bei 4°C schrittweise über 1ml HBS-Puffer und HBS-Puffer mit 10%, 20% und 35% Glucose äquilibriert. Der so behandelte Kristall zeigte nach dem Einfrieren ein Beugungsmuster mit einer Auflösung von 12-15Å.

Nr.	Puffer	pH-Wert	Fällungsmittel	Additiv	Dauer
1 ^a	0,1M Bis-Tris	5,7 bis 7,2	0,5M bis 0,7M Mg-Formiat	-	14d
2 ^b	0,1M Tris	8,2 bis 9,0	0,6M bis 1,0M MgSO ₄	-	14d
3 ^b	0,1M Tris	7,8 bis 9,0	15% PEG4000	0,2M bis 0,3M MgCl ₂	14d bis 49d
4 ^b	0,1M Tris	7,8 bis 9,0	2,0 bis 3,0M NH ₄ Cl	-	20d bis 42d
5 ^b	0,1M Tris	7,8 bis 9,0	0,6M bis 0,8M K-Na-Tartrat	(0,5% PEG MME 5000)	5d bis 42d
6 ^c	0,1M Hepes	7,0 bis 8,0	12-16% PEG3350	0,2M NaCl	4d bis 17d

^a Proteinkonzentration 3,8mg/ml, Mischungsverhältnis 2:1, Protein in MES-Puffer
^b Proteinkonzentration 2,4mg/ml, Mischungsverhältnis 3:1, Protein in MES-Puffer
^c Proteinkonzentration 7,7mg/ml, Mischungsverhältnis 1:1, Protein in HBS-Puffer
 Glucose kann den angegebenen Bedingungen in folgenden Konzentrationen zugegeben werden (w/v):
 Nr. 1: 10%, Nr. 3: 15%, Nr. 4: 20%, Nr. 5: 35%

Tabelle IV-18: Kristallisationsbedingungen des GDF-5•BMPr-IA/IB^Cec-Komplexes.

Um die Beugungseigenschaften und Kryoeigenschaften der Kristalle zu verbessern, wurde mit Additiven auf andere Kristallformen getestet. Hierzu wurden Pufferbedingungen (Nr. 2, 3, 4, 6 aus Tabelle IV-18) mit 20% Glucose, 25% Ethylenglycol, 25% Propylenglycol, 25% PEG400, 25% MPD und 25% Glycerin versetzt und anschließend mit einer 6mg/ml Proteinlösung bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 kristallisiert. Bei zwei der getesteten 24 Pufferbedingungen bildeten

sich Proteinkristalle, wobei nur eine der beiden Bedingungen eine neue Kristallform hervorbrachte (Abbildung IV-33, S. 113). Durch Zusatz von 25% MPD zur Bedingung mit Magnesiumchlorid und PEG4000 bildeten sich statt der in Abbildung IV-32 (C, S. 112) gezeigten hexagonalen Kristalle neuartige Kristalle, bei denen zwei konische Außenseiten in einem dicken, hexagonal zylindrischen Mittelstück zusammenlaufen (Abbildung IV-33, S. 113). Teilweise wurden auch Kristalle ohne Mittelstück, also einzelne, beidseitig konische Kristalle beobachtet.

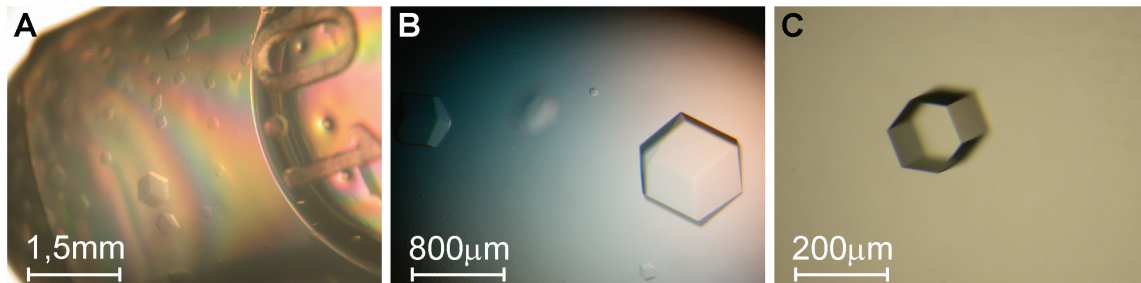


Abbildung IV-32: Kristalle des GDF-5•BMPR-IA/IB^c-Komplexes. **A:** Die Kristallisation fand auch aus der Proteinlösung (HBS-Puffer, 8-10mg/ml) heraus im Reaktionsgefäß statt. **B:** Proteinkristall aus einer Bedingung mit 0,1M Tris pH7,8, 2,5M NH₄Cl. **C:** Proteinkristall aus einer Bedingung mit 0,1M Tris pH9,0, 15% PEG4000, 0,25M MgCl₂.

Die durch Zusatz von MPD erhaltenen neuen, etwa $80 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$ großen Kristalle wurden bei -180°C an der Drehanodenanlage auf Röntgenbeugung getestet. Dabei zeigte sich ein regelmäßiges Beugungsmuster mit einer Auflösung von 8\AA , was eine deutliche Verbesserung gegenüber vorherigen Ergebnissen mit Kristallen ohne MPD-Zusatz darstellt. Daraufhin wurden in zwei Optimierungsschritten die Abhängigkeit des pH-Werts von der MgCl₂-Konzentration und die Abhängigkeit der PEG400-Konzentration von der MPD-Konzentration getestet. Die dabei erzeugten, mit $200 \times 80 \times 80 \mu\text{m}$ leicht größeren Kristalle (Bedingung: 0,1M Tris pH8,2, 15% PEG4000, 0,25M MgCl₂, 25% MPD) zeigten ein anisotropes Beugungsmuster mit einer Auflösung von $4,5\text{\AA}$ an der Drehanodenanlage, was die Bestimmung der Raumgruppe und Gitterkonstanten erlaubte (Abbildung IV-33, S. 113). Das Indexieren der Beugungsdaten deutete auf eine trigonale oder hexagonale Raumgruppe und eine vergleichsweise große Einheitszelle mit den Abmessungen $a=b=107,64\text{\AA}$ und $c=195,48\text{\AA}$ ($\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$). Mit einem weiteren, etwa $300 \times 200 \times 200 \mu\text{m}^3$ großen Kristall aus einem Puffer mit einem niedrigeren MPD-Gehalt (0,1M Tris pH8,0, 15% PEG4000, 0,25M MgCl₂, 15% MPD) konnten Röntgenbeugungsdaten mit einer verbesserten Auflösung von $3,6\text{\AA}$ aufgenommen werden (Abbildung IV-33, S. 113). Beide Kristalle zeigten jedoch ein stark anisotropes Beugungsverhalten. Aus vorherigen Versuchen war bekannt, dass MPD in hohen Konzentrationen zur Dissoziation der binären BMP Ligand-Rezeptor-Komplexe führt (T. Müller, persönl. Mitteilung). Zudem ist die hier vorgestellte Kristallisationsbedingung vom GDF-5•BMPR-IA/IB^c-Komplex der für GDF-5 publizierten Kristallisationsbedingung (0,1M Natriumcitrat pH4,0, 25% MPD) sehr ähnlich (Mueller et al., 2005). Einige Kristalle wurden deshalb mittels SDS-PAGE analysiert, um zu prüfen, ob der binäre Komplex oder nur der Ligand kristallisierte. Aus der SDS-PAGE-Analyse (Abbildung IV-34, S. 114) geht nicht klar hervor, ob es sich bei den erzeugten Kristallen um den GDF-5•BMPR-IA/IB^c-Komplex handelt, weil die Banden von GDF-5 und BMPR-IA/IB^c nicht aufgetrennt werden. Die Analyse von Kristallen aus Ansätzen mit gleichen Pufferbedingungen, bei denen jedoch zusätzlich die Protease Subtilisin in den Kristallisationstropfen

gegeben wurde, zeigt die Anwesenheit von GDF-5 als auch BMPR-IA/IB^Cec (siehe auch Abbildung IV-34, S. 114).

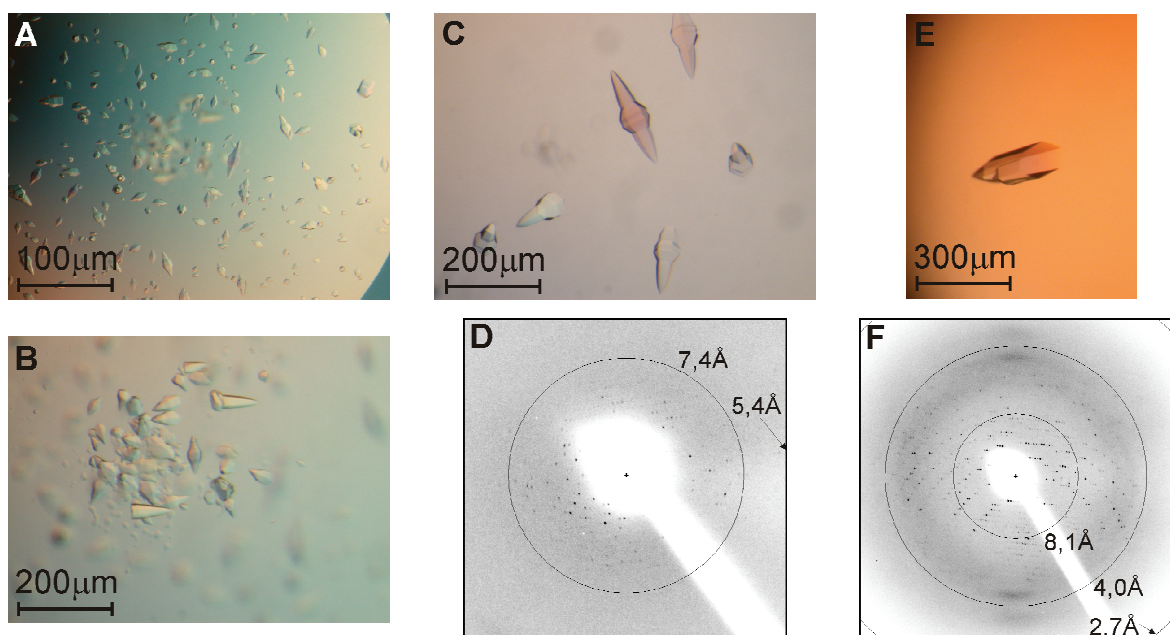


Abbildung IV-33: Optimierung von Kristallen des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes. *A, B*: Kristalle nach Zusatz von 25% MPD zur ursprünglichen Bedingung. Man beachte den Unterschied in der Kristallmorphologie im Vergleich zu Kristallen aus Puffern ohne MPD (Abbildung IV-32, S. 111). *C, D*: Kristall aus 0,1M Tris pH8,2, 15% PEG4000, 0,25M MgCl₂, 25% MPD und dazugehöriges Beugungsbild. Einzelne Reflexe sind bei 4,5-5,0Å zu beobachten. *E, F*: Kristall aus 0,1M Tris pH8,0, 15% PEG4000, 0,25M MgCl₂, 15% MPD und dazugehöriges Beugungsbild. Die starke Anisotropie führt horizontal zu einigen Reflexen bis 3,6Å während die vertikale Auflösung höchstens 5,0Å beträgt.

In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, um Beugungseigenschaften von Proteinkristallen zu verbessern (Heras and Martin, 2005). Im Rahmen der Kristallisation des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes wurde versucht, durch reduktive Methylierung, *in situ* Proteaseverdau, chemische Quervernetzung, Dehydrierung und Cryo-annealing besser beugende Kristalle zu erhalten, um so zumindest in einen Auflösungsbereich von 3Å oder besser vorzudringen. Die chemische Quervernetzung von Proteinkristallen mit Glutaraldehyd erhöhte deutlich deren Stabilität. Beim Äquilibrieren von chemisch behandelten Proteinkristallen in Lösungen mit gesteigertem Gehalt an Gefrierschutzmittel bildeten sich deutlich weniger Risse und auch oberflächliche Auflösungserscheinungen waren wesentlich reduziert. Offenbar wird durch die Einwirkung von Glutaraldehyd das Kristallgitter fixiert, weshalb durch das Waschen und Einfrieren induzierte Umordnungen der Kristallstruktur vermieden werden. Auf die Beugungseigenschaften der Kristalle hatte diese Behandlung jedoch keinen Einfluss. Auch die Verringerung des Wassergehalts in Kristallen des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes durch Waschen der Kristalle in Puffern mit sukzessive erhöhten Präzipitanskonzentrationen führte nicht zu verbesserten Beugungseigenschaften. Bei einer Testmessung am Free Mounting System (FMS) (Kiefersauer et al., 2000) der Firma Proteros konnten auch Kristalle des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes untersucht werden. Das FMS erlaubt die exakte Kontrolle der Feuchtigkeit in einem den Proteinkristall umströmenden Luftstrom und damit die Einstellung des Wassergehalts im Proteinkristall. So können eventuelle Veränderungen der Röntgenbeugungseigenschaften in Abhängigkeit von der Kristallfeuchte ermittelt werden. Für GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Kristalle aus der Bedingung mit Ammoniumchlorid ohne Gefrierschutzmittel wurde beispielsweise ein Wassergehalt von 92,5%

bestimmt. Bei einer graduellen Absenkung des Wassergehalts verschwanden ab etwa 82% Luftfeuchtigkeit die wenigen, bis maximal 20Å auftretenden Reflexe. Ähnlich verhielten sich Kristalle aus der Kristallisationsbedingung mit 0,1M Hepes pH8,2, 15% PEG4000, 0,225M MgCl₂ und 25% MPD. Im Verlauf eines Gradienten von 87,2% Startfeuchte auf 77,2% Endfeuchte wurde eine erste Verschlechterung der Beugungseigenschaften, eine Verringerung der Auflösung von 3,9Å auf 7Å, bei etwa 84-85% Wassergehalt festgestellt. Bei 79% Wassergehalt waren nur noch Beugungsreflexe bei 12Å oder schlechter zu detektieren. Die anschließende, schrittweise Erhöhung des Wassergehalts in den Kristallen auf 87,2% führte zu einer partiellen Rückgewinnung der ursprünglichen Beugungseigenschaften. Aus diesem Grund wurde der Wassergehalt eines Kristalls nicht gesenkt, sondern von 87,2% schrittweise auf 92%, 95%, dann 97% erhöht. Ab einer Kristallfeuchtigkeit von 94-95% verbesserte sich die Auflösung des Beugungsmusters drastisch von 12Å auf 3,8Å. Die Beobachtungen veranschaulichen, dass die Kristalle des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes sensitiv gegenüber Änderungen der Feuchtigkeit sind. Entgegen üblicher Vorstellungen führt in diesem Fall nicht das Trocknen, sondern die Befeuchtung der Kristalle zu einer Verbesserung der Beugungseigenschaften.

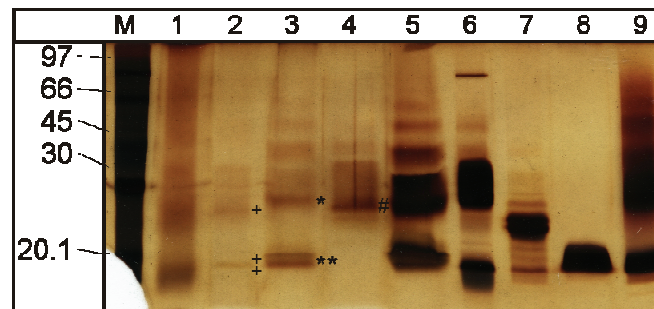


Abbildung IV-34: SDS-PAGE-Analyse von Kristallen der GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec- und GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexe. Alle Kristalle wurden vor der SDS-PAGE mindestens dreimal in Reservoirlösung gewaschen. **Bahnen:** 1, 3, 5...GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Kristalle aus der Bedingung BisTris/PPG400. GDF-5 (+) kann klar identifiziert werden, während BMPR-IBec und ActR-IIBec (**) wegen des sehr ähnlichen Molekulargewichts nicht aufgetrennt werden können. Die höhermolekularen Banden stammten von PPG-Addukten. 2, 4...GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Kristalle ohne Proteolyse (4) und nach *in situ* Proteolyse mit Subtilisin (2), jeweils aus der PEG4000/MgCl₂/MPD-Bedingung. Bei Zusatz von Subtilisin sind zwei Banden, für Ligand (+) und Rezeptor (++), identifizierbar, während ohne Proteolyse GDF-5 und BMPR-IA/IB^Cec im Gel nicht aufgetrennt werden können (#). 6...GDF-5, 7...BMPR-IA/IB^Cec, 8...ActR-IIBec, 9...GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex vor Kristallisation.

Eine andere Methode zur Verbesserung von Beugungseigenschaften, insbesondere der Kristallmosaizität, aber auch der Auflösung, besteht im Kryo-Annealing von Kristallen (Harp et al., 1999). Dabei wird der Kältestrom kurz gestoppt, bis die Flüssigkeit um den Kristall in der Nylon-Schleife des Kupferpins taut, und erneut auf -180°C schockgefrostet. Wie Abbildung IV-35 (S. 115) veranschaulicht, konnte diese Methode erfolgreich für Se-GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Kristalle bei der Aufnahme von Beugungsdaten am Synchrotron (BESSY) angewendet werden. Durch Kryo-Annealing ließen sich Schärfe (Abgrenzung vom Hintergrund) und Intensität (Signal-Rausch-Verhältnis) der Beugungsreflexe vor allem in den höheren Auflösungsschalen deutlich verbessern. Zusätzlich wurde eine höhere Auflösung und geringere Anisotropie der Beugungsdaten beobachtet. Die reduktive Methylierung von Lysin-Resten im GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex (Ausbeute an methyliertem Komplex etwa 30%) wirkte sich kaum auf das Kristallwachstum oder die Kristallform aus und führte zu keiner Verbesserung der Beugungseigenschaften der Kristalle. Aus unbekanntem

Gründen wiesen jedoch Kristalle des Selenmethionin-markierten Komplexes (Se-GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec) bessere Beugungseigenschaften als Kristalle des unmarkierten Komplexes (GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec) auf.

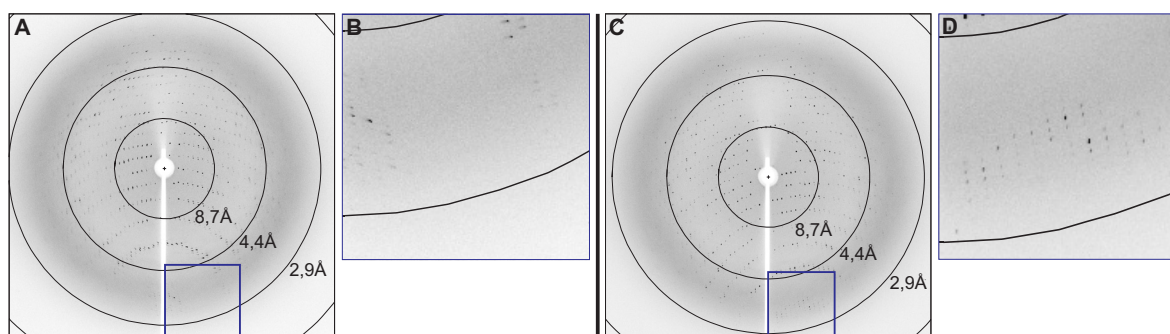


Abbildung IV-35: Kryo-Annealing mit GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Kristallen. **A, C:** Röntgenaufnahmen vor (**A**) und nach (**B**) Kryo-annealing bei einer Belichtungszeit von 15s pro 1° Rotation und einer Wellenlänge von 0,97949Å am Synchrotron (BESSY). Die Auflösungsschalen sind als Ringe angegeben. **B, D:** Vergrößerungen des jeweils blau eingerahmten Ausschnitts in Aufnahmen A und C verdeutlichen den Effekt des Temperaturschocks auf die Beugungseigenschaften des Kristalls (aus 0,1M HEPES pH8,2, 15% PEG4000, 0,225M MgCl₂, 25% MPD; Größe etwa 300x100x100µm³).

IV. 5. 2. 1. *In situ* Proteolyse mit Subtilisin

Eine limitierte Proteolyse des zu kristallisierenden Proteins während der Kristallisation („*in situ*“) wirkte sich bei einigen in der Literatur beschriebenen Fällen vorteilhaft auf die Kristallisation von Proteinen aus (Bai et al., 2007; Gaur et al., 2004; Hoedemaeker et al., 1997; Johnson et al., 2006). Die Überlegung dabei ist, durch Entfernung flexibler Bereiche neue Kristallkontakte zu ermöglichen, um so ein besser geordnetes Kristallgitter und bessere Beugungseigenschaften zu erhalten. Dazu wurde der GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex in Lösung (HBS-Puffer) mit drei Proteasen – Trypsin, Subtilisin A und Subtilisin (alle Sigma) – umgesetzt und der Fortschritt der Reaktion in festgelegten Abständen mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung IV-36, S. 115).

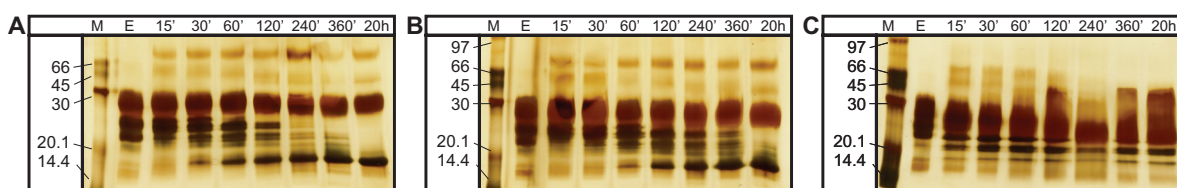


Abbildung IV-36: SDS-PAGE-Analyse vom proteolytischen Verdau des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes. **A:** Verdau mit Subtilisin. **B:** Verdau mit Subtilisin A. **C:** Verdau mit Trypsin. Die Zeiten der Probenahme nach Zugabe der jeweiligen Protease sind über den Bahnen angegeben. Auf allen Bahnen wurden die gleichen Proteinmengen in nichtreduzierendem Puffer aufgetragen.

Mit Subtilisin oder Subtilisin A werden nach Inkubation über Nacht (20h) definierte Endprodukte erhalten. Während GDF-5 keine Proteolyse zeigt, wird BMPR-IA/IB^Cec über mehrere Zwischenschritte in ein kleineres Fragment geschnitten. Der verkürzte BMPR-IA/IB^Cec weist in der SDS-PAGE dann Laufeigenschaften auf, die denen für BMPR-IA^{ec} oder BMPR-IB^{ec} entsprechen. Die Reaktion mit Subtilisin A ist zwar langsamer, die Größe der Zwischen- und Endprodukte stimmt jedoch mit denen aus dem Subtilisin-Verdau überein. Gut erkennbar ist die Zeitabhängigkeit der Reaktion. Erst nach einer Inkubationsdauer von 20h sind keine Zwischenprodukte mehr sichtbar. Ferner ist keine Abnahme der Intensität der Proteinbanden zu beobachten, was auf ausreichende Stabilität des so erzeugten verkürzten Proteinkomplexes gegenüber einem weiteren Abbau durch

Subtilisin hinweist, möglicherweise weil potentielle Proteaseschnittstellen im Inneren des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes nicht zugänglich sind. Das durch Behandlung mit Subtilisin bzw. Subtilisin A entstandene BMPR-IA/IB^Cec-Fragment kann im Verdau mit Trypsin nicht beobachtet werden. Allerdings erscheint eine Bande etwas niedrigeren Molekulargewichts nach 15-minütiger Inkubationsdauer.

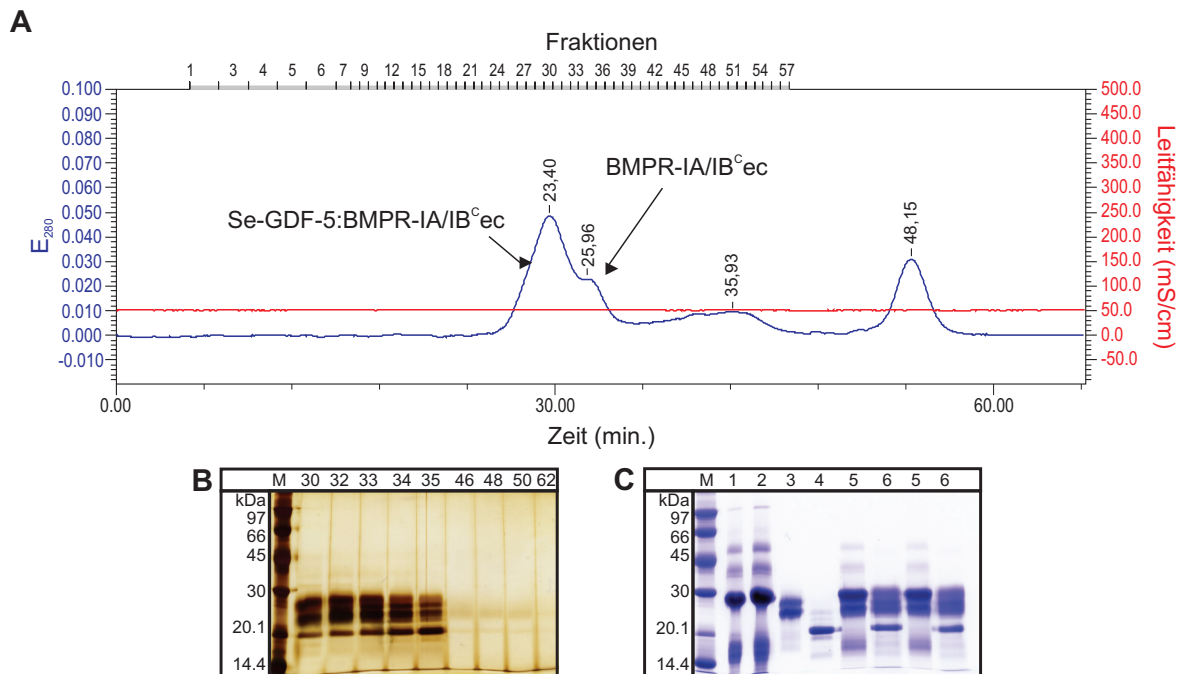


Abbildung IV-37: Gelfiltration des mit Subtilisin behandelten GDF-5•BMPR-IB^Cec-Komplexes. A: Chromatogramm der Gelfiltration des Se-GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes nach Subtilisin-Verdau. Über den Peaks sind die Retentionszeiten in Minuten angegeben. Eine Retentionszeit von 35,93min entspricht etwa 2252Da, 48,15min entsprechen etwa 148Da. Die Retentionszeiten des Komplexes und des Rezeptors liegen etwa 1,5-2min über denen für den nativen Komplex. Für den binären Komplex ergibt sich gemäß der Kalibrierung ein apparentes Molekulargewicht von 36764Da, für BMPR-IA/IB^Cec ein apparentes Molekulargewicht von 20779Da. **B:** SDS-PAGE-Analyse des Gelfiltrationslaufs in (A). Die Nummerierung entspricht den Fraktionen im Chromatogramm. **C:** SDS-PAGE-Analyse des Subtilisin-Verdau vor der Gelfiltration (nichtreduzierende Bedingungen). 1 und 2 ...Se-GDF-5 vor (1) und nach (2) dem Verdau mit 1/1000 (w/w) Subtilisin in dH₂O. 3 und 4 ...BMPR-IA/IB^Cec vor (3) und nach (4) dem Verdau mit 1/1000 (w/w) Subtilisin in TN₁₅₀-Puffer. 5 und 6...Se-GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex vor (5) und nach (6) dem Verdau mit 1/1000 (w/w) Subtilisin in HBS-Puffer. Das Protein aus Bahn sechs wurde anschließend durch Gelfiltration gereinigt.

Der nach einer präparativen Proteolyse mit Subtilisin gewonnene GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex wurde mittels Gelfiltration gereinigt. Dabei eluiert der verkürzte Komplex mit einer um 2,3min und der verkürzte Rezeptor mit einer um 1,4min erhöhten Retentionszeit im Vergleich zum unbehandelten Komplex. Zusätzlich sind zwei weitere Fragmente beobachtbar, deren Retentionszeiten Peptiden von ungefähr 2250Da und 150Da entsprechen (Abbildung IV-37, S. 116). Die Ausbeute der Präparation des verkürzten Komplexes ist geringer als beim unbehandelten Komplex (20% statt 59%), was auf eine erhöhte Dissoziation bzw. Instabilität des Komplexes zurückzuführen ist. Die reduzierte Stabilität des binären Komplexes von GDF-5 mit verkürztem BMPR-IA/IB^Cec korreliert mit den Beobachtungen bei der Herstellung des BMP-2•¹⁵N-BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes (siehe IV. 4. 1.). Mit einer 4,2mg/ml Lösung des mit Subtilisin behandelten und durch Gelfiltration gereinigten GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes wurde eine Kristallisation mit den in

Tabelle IV-18 (S. 111) angegebenen Pufferbedingungen angesetzt. Dabei bildeten sich nur in Bedingungen ohne MPD kleine Kristallcluster, deren Einzelkristalle ihrer Morphologie nach den Kristallen des unbehandelten Komplexes unter den gleichen Pufferbedingungen ähnlich waren. Dennoch konnte für diese Kristalle keine Röntgenbeugung am Synchrotron (SLS) festgestellt werden. Deshalb wurde versucht, eine Verbesserung durch die direkte Zugabe von Subtilisin, Subtilisin A und Trypsin in den Kristallisationstropfen („in situ“) zu erreichen. Dabei wurden die Proteasen im Massenverhältnis 1:1200 (Protease:Protein) und einem Mischungsverhältnis von 2:2:1 μ l (Protein:Puffer:Protease) im Kristallisationstropfen eingesetzt und letzterer über einer Reservoirlösung bestehend aus 0,1M Tris pH8,4, 2M NH₄Cl, 20% Glucose äquilibriert. Für Trypsin und Subtilisin A konnte ein Trend zu einer höheren Anzahl kleinerer, morphologisch unveränderter Kristalle beobachtet werden, während in Gegenwart von Subtilisin gewachsene Kristalle gegenüber der Kontrolle ohne Protease eine veränderte Morphologie zeigten (Abbildung IV-38, S. 117).

Aus diesem Grund wurde Subtilisin auch für Kristallisationen über Reservoirlösungen mit 0,1M HEPES pH8,2, 15% PEG4000, 0,225M MgCl₂, 25% MPD getestet. Mischungsverhältnisse von 2:1:1, 3:1:1 und 4:1:1 (jeweils Protein:Puffer:Subtilisin) im Kristallisationstropfen ergaben Einzelkristalle veränderter Morphologie und ungefähr 400x200x200 μ m³ Größe (Abbildung IV-38, S. 117) nach einer sehr kurzen Inkubationsperiode von 1-3d. Derartig erzeugte Kristalle des Se-GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Komplexes lieferten sowohl an der Drehanodenanlage als auch am Synchrotron Beugungsdaten mit Auflösungen von bis zu 2,8Å, wobei einige Beugungsreflexe auch in höheren Auflösungsschalen bis 2,6Å detektiert werden konnten.

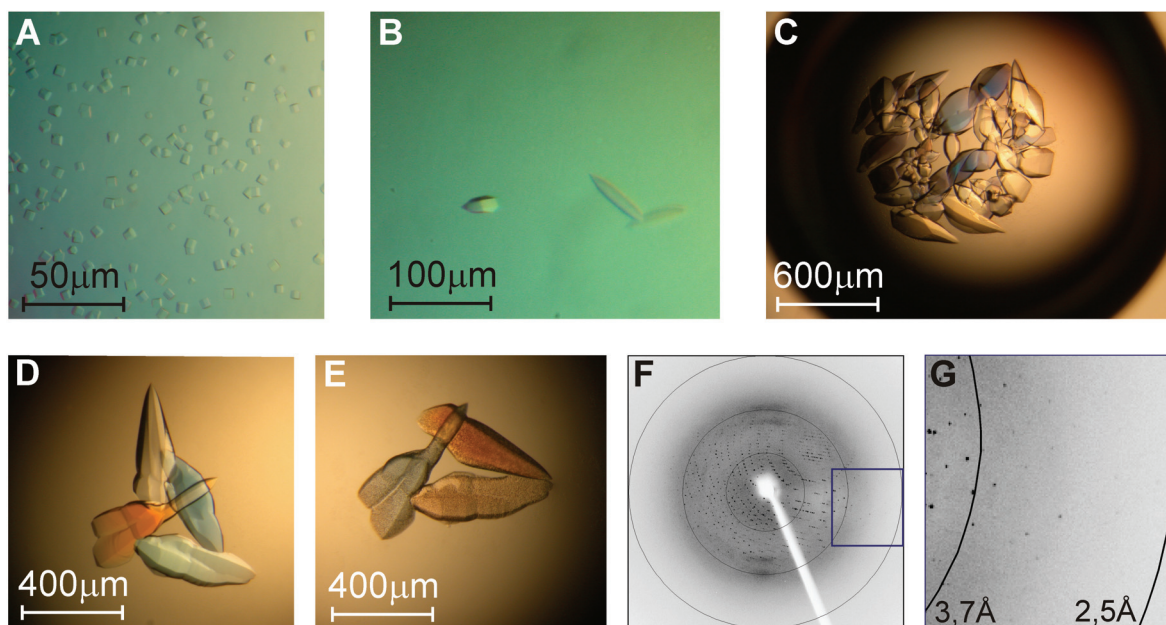


Abbildung IV-38: Kristalle des GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Komplexes nach *in situ* Proteolyse und deren Beugung am Röntgenstrahl. Kristalle des Komplexes aus 0,1M Tris pH8,4, 2M NH₄Cl, 20% Glucose ohne (A) und mit 1/1000 (w/w) Subtilisin (B) im Kristallisationstropfen. Die Änderung der Morphologie ist gut erkennbar. C-E: Kristalle von Se-GDF-5•BMPR-IA/IB^cec aus 0,1M HEPES pH8,2, 15% PEG4000, 0,225M MgCl₂, 25% MPD, angesetzt in einem Mischungsverhältnis von 4:1:1 (Protein:Puffer:Subtilisin) (C). Nach 3d fand kein Kristallwachstum mehr statt (D). Nach 16d zeigten diese Kristalle erste oberflächliche Auflösungserscheinungen, welche sich in der Folgezeit weiter verstärkten (E). F, G: Von einem der drei Tage alten Kristalle konnte ein Datensatz an der Drehanodenanlage mit Beugungsdaten besser als 3Å aufgenommen werden. Die Belichtungsdauer betrug 6min pro 1° Rotation. Der blau eingerahmte Abschnitt ist in (G) stark vergrößert und zeigt, dass einzelne Beugungsreflexe bis 2,6Å auftreten. Die Kreise in (F) entsprechen folgenden Auflösungsschalen (von außen nach innen): 1,9 – 2,5 – 3,7 – 7,4Å.

IV.6. Datensätze aus der Vermessung von Proteinkristallen

Von unmarkierten Kristallen der GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec- und GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Komplexe wurden Datensätze bei einer Wellenlänge gemessen. Von Se-markierten Kristallen der Proteinkomplexe wurden pro Kristall drei Datensätze bei drei unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen. Um diese drei Wellenlängen der MAD-Datensätze (engl. peak, inflection, remote) zu bestimmen, wurde von einem Se-markierten Proteinkristall ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Der Einbau von Selen in Form von Selenomethionin in den Proteinkomplex führt zu charakteristischen Absorptionsbanden im Fluoreszenzspektrum, aus denen die Röntgenenergie (Wellenlänge) hervorgeht, bei der das stärkste Se-Signal zu erwarten ist. In Abbildung IV-39 (S. 118) sind beispielhaft am Synchrotron (BESSY) gemessene Fluoreszenzspektren von Kristallen Se-markierter Komplexe gezeigt. Deutlich ist zu erkennen, dass Selen-Atome in klingenförmigen Kristallen des Se-GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes bei einer Energie von 12656,5eV bzw. 12656,05 eV ($\lambda=0,97962\text{\AA}$ bzw. $\lambda=0,97965\text{\AA}$) zur Fluoreszenz angeregt werden, was der sogenannten K_{α} -Kante entspricht. Mit Hilfe des Programms CHOOCH (Evans and Pettifer, 2001) können aus dem Fluoreszenzspektrum die anomalen Streufaktoren (f' und f'') bestimmt werden. Die in Abbildung IV-39 (S. 118) obere Kurve entspricht f'' , die untere Kurve dem aus f'' berechneten Streufaktor f' . Die Wellenlänge des „peak“-Datensatzes ergibt sich aus dem Maximum der f'' -Kurve, während der „inflection“-Datensatz bei der Wellenlänge gemessen wird, bei der die f' -Kurve ein Minimum zeigt. Die Aufnahme des „remote“-Datensatzes erfolgt bei einer 1000eV höheren Röntgenenergie als die Messung des „peak“-Datensatzes. Grundsätzlich wurde zuerst der Datensatz bei der „peak“-Wellenlänge, anschließend der Datensatz bei der „inflection“-Wellenlänge und zuletzt der Datensatz bei der „remote“-Wellenlänge aufgenommen.

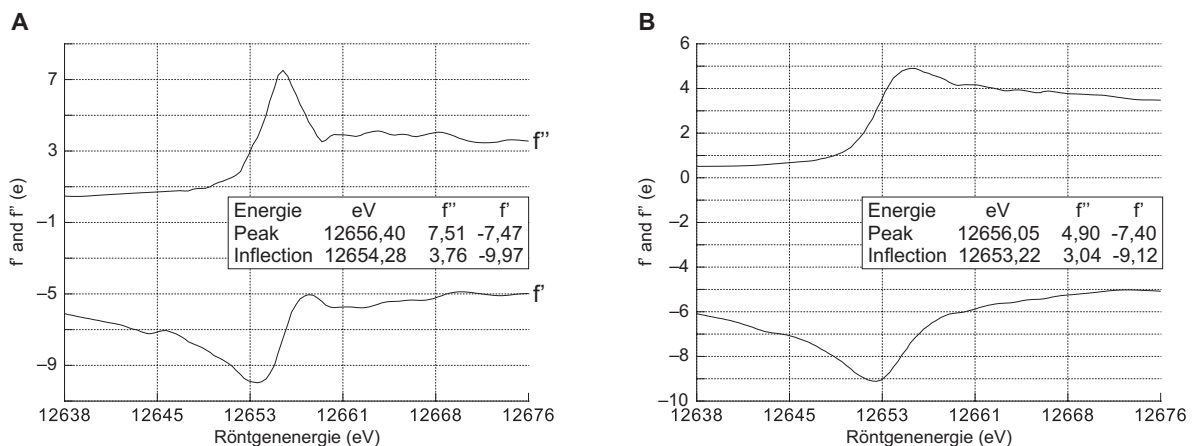


Abbildung IV-39: Fluoreszenzspektren von Kristallen mit Selenomethionin-Markierung. A: Se-GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Kristalle. **B:** Se-GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Kristalle. Gezeigt sind die nach Transformation der Fluoreszenzspektren erhaltenen Kurven für die anomalen Streufaktoren f' und f'' in Abhängigkeit von der einfallenden Röntgenenergie. Die Werte für f' und f'' werden für die Berechnung der Phasen benötigt.

IV. 6. 1. Aufnahme und Prozessierung von Datensätzen

IV. 6. 1. 1. Klingenförmige GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Kristalle

Im Rahmen der kristallographischen Untersuchungen am GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex wurde eine Reihe von Datensätzen sowohl an der hausinternen Drehanodenanlage als auch am

Synchrotron aufgenommen. Wie schon ausgeführt, beugten die unmarkierten Kristalle der PPG400-Bedingung an der Drehanodenanlage bis ungefähr 2,7Å und am Synchrotron bis ungefähr 1,95Å, während Datensätze Se-markierter Proteinkristalle mit Auflösungen bis 2,5Å am Synchrotron erhalten werden konnten. In Tabelle IV-19 sind die am Synchrotron für die klingenförmigen Kristalle gemessenen Datensätze zusammengestellt. Die grau hinterlegten Datensätze wurden zur Strukturlösung herangezogen. Für letztere sind in Tabelle IX-7 (S. 242) die Parameter und die Statistik der Datenprozessierung zusammengestellt. Die dazugehörigen Kristall- und Beugungsbilder sind in Abbildung IV-31 (S. 109, Spalte 4) und in Tabelle IV-17 (S. 110, Reihe 1) zu finden.

Strahlenquelle	Bezeichnung	Drehung	Belichtung	Art	Maximale Auflösung (Å)
SLS	r2g4, box108b5	100°	2s pro 1°	Nativ	2,2
SLS	r2g5, box108b6	100°	2s pro 1°	Nativ	2,2
SLS	r2y4, box108d4	125°	2s pro 1°	Nativ	2,0
SLS	r2y5, box108d4	100°	2s pro 1°	Nativ	2,1
BESSY	r2a4, box147a4	90°	3s pro 1°	MAD	2,5 (pk) - 2,9 (if, rm)
BESSY	r2a5, box143d5	45°	2,4s pro 1°	MAD	2,5 (pk, if) - 2,7 (rm)
BESSY	r2c4, box147a4	53°	3s pro 1°	MAD	3,2 (pk, if, rm)
BESSY	r2c5, box147a4	97°	2,4s pro 1°	MAD	3,0 (pk, if, rm)

Abkürzungen: Nativ...Unmarkierte Kristalle bei einer Wellenlänge, MAD (Multiwavelength Anomalous Dispersion)...Se-markierte Kristalle bei drei Wellenlängen: pk (peak), if (inflection) und rm (remote). Die Werte für die Wellenlängen, bei denen die zur Strukturlösung verwendeten Datensätze (gelb hinterlegt) gemessen wurden, finden sich in Tabelle IX-7, S. 242 (Anhang).

Tabelle IV-19: Übersicht über für GDF-5•BMPr-IBec•ActR-IIBec-Kristalle (PPG) gemessene Datensätze.

Die Datensätze wurden mit der Software CrystalClear (Rigaku MSC) indexiert, integriert und skaliert. Für die MAD-Datensätze wurden die Friedel- (Bjovet-) Paare (I+, I-) getrennt gespeichert, während bei der Skalierung der nativen Daten über I+ und I- gemittelt wurde. Der Datensatz des unmarkierten Proteinkristalls konnte in den Raumgruppen C222, P₂₁₂₁₂ und P₄₂₂₁₂ indexiert werden. Ob sich Kristallgitter orthorhombischer und tetragonaler Symmetrie überlagerten, also gleichzeitig Reflexe für beide Gittertypen mit hoher Redundanz vorhanden waren („Twinning“), konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Datenqualität ausgedrückt als Skalierfaktor R_{merge} , Signal-Rausch-Verhältnis $I/\sigma(I)$ und Multiplizität war für alle drei Raumgruppen etwa gleich hoch, sodass allein daraus keine Rückschlüsse auf eine spezielle Raumgruppe gezogen werden konnten. Für P₄₂₂₁₂ und P₂₁₂₁₂ ergaben sich identische Gitterkonstanten ($a=76.46\text{Å}$, $b=76.46\text{Å}$, $c=82.78$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; Volumen: $4,8 \cdot 10^5 \text{Å}^3$), während für C222 eine doppelt so große Einheitszelle ($a=107.82\text{Å}$, $b=108.07\text{Å}$, $c=82.76$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; Volumen: $9,6 \cdot 10^5 \text{Å}^3$) gefunden wurde. Die Raumgruppe C222 erfordert wie P₄₂₂₁₂ acht asymmetrische Einheiten in jeder Einheitszelle. Die Hälfte, vier asymmetrische Einheiten pro Einheitszelle, ergibt sich für Kristalle der Raumgruppe P₂₁₂₁₂. Aus dem Volumen der Einheitszelle, der Symmetrieminformation und dem Molekulargewicht des Komplexes lässt sich der jeweilige Lösungsmittelgehalt und damit die Packungsdichte im Kristall ermitteln (Kantardjiev and Rupp, 2003; Matthews, 1968). Untersuchungen an publizierten Proteinstrukturen zeigen, dass der Lösungsmittelgehalt in den meisten Proteinkristallen zwischen 27% und 65% schwankt, wobei das statistische Mittel bei 43% liegt (Matthews, 1968).

Bei Berechnung des Matthews-Koeffizienten unter Verwendung des Molekulargewichts des GDF-5•BMPr-IBec•ActR-IIBec-Komplexes ($M_w=77952\text{Da}$) ergibt sich ein ungewöhnlich niedriger

Lösungsmittelgehalt von etwa 21% für die Raumgruppen $P2_12_12$ und $C222$, jedoch ein unrealistischer Wert für $P4_22_12$. Demnach setzt sich das Kristallgitter vermutlich nicht aus dem kompletten ternären Komplex, sondern aus einem Komplex mit weniger Komponenten zusammen, welcher beispielsweise durch die Dissoziation eines Rezeptortyps entstanden sein könnte. Wegen der nahezu identischen Laufeigenschaften von BMPR-IBec und ActR-IIBec bei der SDS-PAGE war nicht ersichtlich, ob beide Rezeptoren im Kristall enthalten sind (Abbildung IV-34, S. 114). Mit Blick auf vorherige Untersuchungen am BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplex (Weber et al., 2007) bestand die Möglichkeit, dass jeweils ein BMPR-IBec und ein ActR-IIBec aus dem Komplex dissoziierten und so ein tetraheteromerer Komplex mit einem Molekulargewicht von $\sim 53000\text{Da}$ kristallisierte. Für das Molekulargewicht eines tetraheteromeren Komplexes ergeben sich in den Raumgruppen $P2_12_12$ und $C222$, nicht aber $P4_22_12$, realistische Matthews-Koeffizienten von $V_M=2,28\text{\AA}^3\text{Da}^{-1}$, was einem Lösungsmittelgehalt von $\sim 46\%$ entspricht. In der asymmetrischen Einheit der Raumgruppe höchster Symmetrie $P4_22_12$ ist basierend auf der Matthews-Analyse nur die Hälfte eines heterotetrameren Komplexes mit einem Molekulargewicht von etwa 26500Da zu erwarten. Ein monomeres GDF-5-Molekül mit einem Molekulargewicht von 13388Da sowie ein Rezeptormolekül mit einem Molekulargewicht von $\sim 13100\text{Da}$ müssen darin die asymmetrische Einheit bilden. Der komplette Komplex ergibt sich aus der inhärenten Kristallsymmetrie. Deshalb konnte nur ein Rezeptortyp – BMPR-IBec oder ActR-IIBec – in einem Komplex mit GDF-5 kristallisiert sein. Bei den klingenförmigen Kristallen handelt es sich somit nicht um die eines ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes, sondern um die eines binären GDF-5•Rezeptor-Komplexes. ActR-IIBec hat eine geringfügig niedrigere Bindungsaffinität zu GDF-5 als BMPR-IBec (siehe Tabelle IX-2, S. 234). Weiterhin konnte mittels molekularen Ersatz (engl. Molecular Replacement) (Hoppe, 1957; Rossmann and Blow, 1962) keine Suchlösung für potentielle ActR-IIBec-Moleküle, jedoch eindeutige Suchlösungen für BMPR-IBec und GDF-5 gefunden werden. Demnach kristallisierte der GDF-5•BMPR-IBec-Komplex, sodass ActR-IIBec während der Kristallbildung aus dem anfänglich ternären Komplex dissoziiert sein musste. Weil in Kristallisationsansätzen mit binärem GDF-5•BMPR-IBec-Komplex keine Kristalle erhalten werden konnten (IV. 5. 1. 3), ist zu schlußfolgern, dass ActR-IIBec die Bildung von Kristallen des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes vermittelt und damit ein obligater Bestandteil des Kristallisationsansatzes ist. Die Reinigung des ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes durch Gelfiltration ist insofern wichtig, um die zur Kristallbildung notwendige Stöchiometrie zwischen GDF-5, BMPR-IBec und ActR-IIBec zu gewährleisten. Ein Überschuss an ActR-IIBec führte unter den Pufferbedingungen nicht zur Kristallisation. Die Konzentration von ActR-IIBec im Kristallisationsansatz muss demnach definiert sein, um ein für die Kristallbildung optimales Gleichgewicht aus Assoziation und Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes zu erhalten. Fraglich blieb, ob die höhere Symmetrie in der Raumgruppe $P4_22_12$ nicht möglicherweise eine Pseudosymmetrie der nicht-kristallographischen Symmetrie in der asymmetrischen Einheit des Komplexes in den Raumgruppen $P2_12_12$ und $C222$ darstellte. Ein mögliches Twinning der Beugungsdaten hätte sich in diesem Fall nur schwer aus den prozessierten Daten ableiten lassen (siehe dazu Referenzen in (Dauter et al., 2005; Zwart et al., 2008)).

Molekularer Ersatz und Verfeinerung der GDF-5•BMPR-IBec-Struktur

Die in der Raumgruppe $P4_22_12$ prozessierten Daten wurden zur Strukturlösung mittels molekularen Ersatz eingesetzt. Die Struktur des freien GDF-5 ist bekannt (RCSB-Eintrag: 1WAQ). Für BMPR-IBec ist bisher kein Strukturmodell vorhanden. Mit dem im Komplex mit BMP-2 kristallisierten

Chimär BMPR-IA/IB^c_{ec} (RCSB-Eintrag: 2QJB) steht jedoch die Struktur eines sehr ähnlichen Rezeptors zur Verfügung. Für den molekularen Ersatz wurde das Programm Phaser (McCoy et al., 2007) verwendet. Für das monomere GDF-5- und BMPR-IBec-Molekül wurden eindeutige Strukturösungen mit hohen Z-Werten für die Rotations- und Translationsfunktionen sowie einem hohem LLG-Wert gefunden. Der Z-Wert gibt die Anzahl von Standardabweichungen über dem Mittelwert an. Der LLG-Wert (engl. Log Likelihood Gain) beschreibt den Unterschied zwischen der Wahrscheinlichkeit des MR-Strukturmodells und der Wahrscheinlichkeit einer Wilson-Verteilung der Atome, also wieviel besser die Daten mit dem MR-Strukturmodell als mit einer Zufallsverteilung der gleichen Atome interpretiert werden können. Hohe Z- und LLG-Werte deuten auf eine realistische Suchlösung beim molekularen Ersatz. Die Analyse des ersten Strukturmodells zeigt, dass sich in der asymmetrischen Einheit wie vermutet ein GDF-5-Monomer und ein BMPR-IBec befinden. BMPR-IBec kontaktiert die innere, konkave Seite der beiden Finger des GDF-5-Monomers. Der vollständige binäre Komplex wird durch eine mit der Raumgruppe P₄₂₁₂ vorgegebene Symmetrieoperation – einer zweifachen Schraubenachse (2₁-Achse) – gebildet.

Die Korrektheit dieser Strukturösung wird durch Berechnung einer ersten Elektronendichtekarte mit dem Programm FFT (Ten, 1973) der CCP4-Suite (1994) und durch die Analyse aller symmetrieverwandten Moleküle der Einheitszelle bestätigt. Die Hauptketten der Komplex-Moleküle werden durch die experimentelle Elektronendichte sehr gut eingehüllt, während in den Zwischenräumen des Kristallgitters – charakterisiert durch das Lösungsmittel – keine Elektronendichte beobachtet werden kann. Auch an der äußeren, konvexen Seite der beiden Finger von GDF-5 ist keine Elektronendichte sichtbar, sodass die Anwesenheit von ActR-II_{Bec} definitiv ausgeschlossen werden kann. Weiterhin stehen alle symmetrieverwandten Moleküle in Kontakt zueinander und bilden ein regelmäßig aufgebautes Gitter (Abbildung IV-40, S. 121).

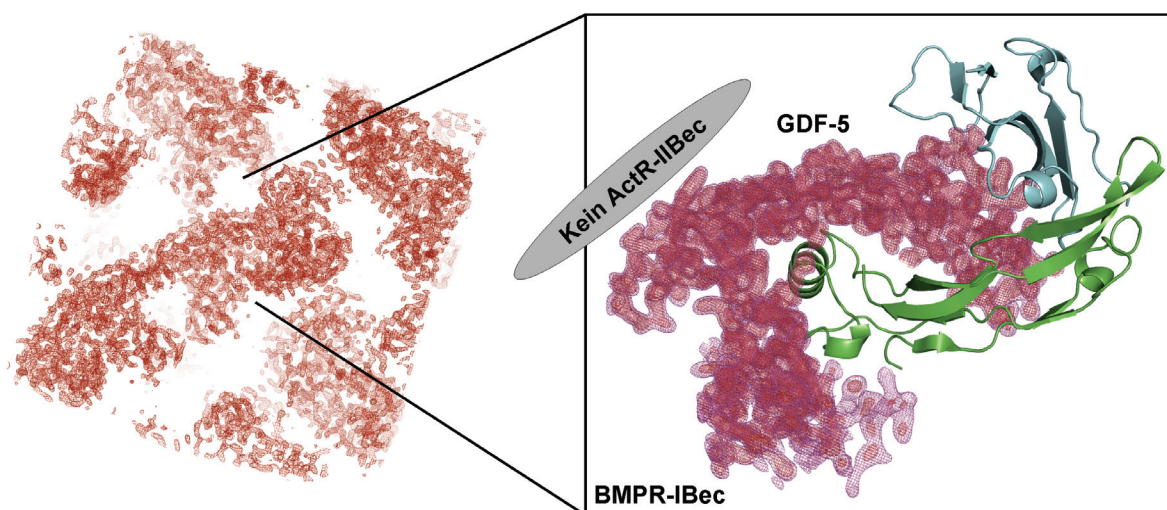


Abbildung IV-40: Kristallgitter und Elektronendichte des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes. Gezeigt ist das Kristallgitter (*links*), welches sich aus der asymmetrischen Einheit bestehend aus einem GDF-5-Monomer und einem BMPR-IBec (*rechts*) zusammensetzt. Klar sind die mit Lösungsmittel gefüllten Zwischenräume der Kristallpackung erkennbar. Die asymmetrischen Einheiten kontaktieren einander über Kristallkontakte, sodass eine regelmäßige Packung entsteht. Für ActR-II_{Bec}, welcher an der konvexen (Außen-) Seite der Finger von GDF-5 zu erwarten wäre, ist keine Elektronendichte vorhanden. Stattdessen bilden jeweils die Aminosäuren 103 bis 107 im β 7-Strang (Finger 2) von GDF-5 untereinander sowie die C-terminalen Aminosäuren von BMPR-IBec mit den Aminosäuren im β 4-Strang von GDF-5 die Kontakte des Kristallgitters.

Im XBuild/AutoFit-Modul des Programms QUANTA (Accelrys) wurden zunächst die Hauptkettenkonformationen und Aminosäuresequenzen von GDF-5 und BMPR-IA/IB^Cec an den Elektronendichteverlauf angepasst. Für GDF-5 ergeben sich vor allem im Bereich der zwei Fingerspitzen und in den N- und C-terminalen Bereichen der α -Helix größere strukturelle Veränderungen im Vergleich zum ungebundenen Liganden. Alle im BMPR-IA/IB^Cec auszutauschenden Aminosäurereste weisen eine eindeutige Elektronendichte für die Seitenketten auf. Für den daraus modellierten BMPR-IBec waren nur geringfügige Änderungen an der Hauptkette vorzunehmen. Dieses initiale Strukturmodell des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes wurde schrittweise durch manuelle und automatische Verfahren verfeinert (engl. Refinement). Die manuelle Verfeinerung des Strukturmodells erfolgte mit dem XBuild/AutoFit-Modul des Programms QUANTA (Accelrys). Die automatische Verfeinerung erfolgte mit dem Programm REFMAC (Murshudov et al., 1997), welches nach der Methode der größten Wahrscheinlichkeit (engl. Maximum-Likelihood) beobachtete und berechnete Intensitäten auf Basis eines Strukturmodells korreliert und aufeinander optimiert. Im zur Verfeinerung mit REFMAC verwendeten „TLS & restrained refinement“ werden die Atomkoordinaten des anfänglichen Strukturmodells unter Berücksichtigung geometrischer Parameter (Bindungslängen und -winkel, Abstände, Atomkontakte, Temperatur- (B-) Faktoren), an die experimentell gewonnenen Daten angepasst, bis ein globales Energieminimum erreicht ist. Anisotropie in den Daten wird durch Definition von TLS-Gruppen (Translatorischer, oszillatorischer (L) und zusätzlicher, unsymmetrischer (S) Tensor für das „rigid-body refinement“ einzelner Aminosäureketten berücksichtigt (Schomake.V and Trueblood.Kn, 1968; Winn et al., 2001). Bei der Verfeinerung mit REFMAC wurde für jede Aminosäurekette in der asymmetrischen Einheit mindestens eine TLS-Gruppe definiert. Für GDF-5 bildeten die Reste 17 bis 120 eine TLS-Gruppe, während die BMPR-IBec-Kette in mehrere TLS-Gruppen (Reste 16-21, 31-45, 50-72, 77-100) unterteilt wurde. Der Fortschritt der Verfeinerung bzw. die Qualität oder Genauigkeit des resultierenden Strukturmodells ließen sich mit dem kristallographischen R-Wert (R_{cryst}), dem freien R-Wert (R_{free}) und dem Wichtungsfaktor FOM (engl. figure of merit, Maß für den Phasenfehler) evaluieren (Brunger, 1992; Brunger et al., 1987; Read, 1986). Zur Berechnung des freien R-Wertes wurden 5% der Daten („test set“) vom Refinement ausgeschlossen (Brunger, 1992). Beide R-Werte konvergierten nach mehreren Runden manueller und automatischer Verfeinerung gegen jeweils konstante Werte. Für das dementsprechend verfeinerte GDF-5•BMPR-IBec-Strukturmodell des an der SLS gemessenen und in der Raumgruppe $P4_22_12$ prozessierten Datensatzes wurde abschließend ein R_{cryst} von 19,1%, ein R_{free} von 26,6% und eine FOM von 85,4% berechnet. Bei Verwendung des gleichen, aber in der Raumgruppe $P2_12_12$ prozessierten Datensatzes wurde unter Definition strikter nicht-kristallographischer Symmetrie für beide GDF-5-Monomere ein GDF-5•BMPR-IBec-Strukturmodell mit $R_{\text{cryst}} = 21,4\%$, $R_{\text{free}} = 24,6\%$ und $FOM = 79,6\%$ gefunden.

Bestimmung experimenteller Phasen

Im Laufe der Verfeinerung des Strukturmodells stellte sich heraus, dass einige Bereiche von BMPR-IBec trotz der hohen Auflösung nicht eindeutig über die Elektronendichte definiert waren. Weil die Lösung der BMPR-IBec-Struktur letztlich auf den Phasen der BMPR-IA/IB^Cec-Struktur beruhte und damit beeinflusst durch dieses Startmodell war (engl. model bias), wurde vermutet, größere konformationelle Änderungen allein durch den molekularen Ersatz nicht auflösen zu können. Aus diesem Grund wurden die Phasen experimentell bestimmt, indem Kristalle aus Selenomethionin-markiertem GDF-5:BMPR-IBec-Komplex bei verschiedenen Wellenlängen gemessen und mittels der MAD-Methode ausgewertet wurden. Unter Verwendung des MAD-Datensatzes (Tabelle IX-7,

S. 242) wurden die Anzahl und Positionen der Selen-Atome mit Hilfe der unter der graphischen Benutzeroberfläche HKL2MAP (PAPE, 2003) bedienbaren Programme SHELXC und SHELXD bestimmt (Schneider and Sheldrick, 2002; Sheldrick, 2008). Mit SHELXC wurde zunächst die Datenqualität überprüft, indem die anomalen Differenzen der drei Datensätze analysiert wurden (Abbildung IV-41, S. 123, A-C). Daten mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (d'/σ) von größer 1-1,5 können für die Strukturlösung verwendet werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Differenzen der Strukturfaktoren der drei getesteten Datensätze sollte dabei größer als 30% sein. Die Diagramme verdeutlichen, dass die remote- und inflection-Datensätze kein nennenswertes anomales Signal zeigen, während für den peak-Datensatz Daten bis zu einer Auflösung von 4,6Å zur Bestimmung der Phasen herangezogen werden kann (Abbildung IV-41, S. 123). Möglicherweise wären deshalb hier auch die SIRAS- (engl. single isomorphous replacement and anomalous scattering) oder SAD-Verfahren (engl. single anomalous dispersion) erfolgreich anwendbar gewesen. Eine Harker-Sektion der anomalen Patterson-Karte des peak-Datensatzes ($z = 0,5$) zeigt mehrere, offensichtlich symmetrieverwandte Peaks und verdeutlicht die Qualität der anomalen Daten zur Bestimmung der Phasen (Abbildung IV-42, S. 124).

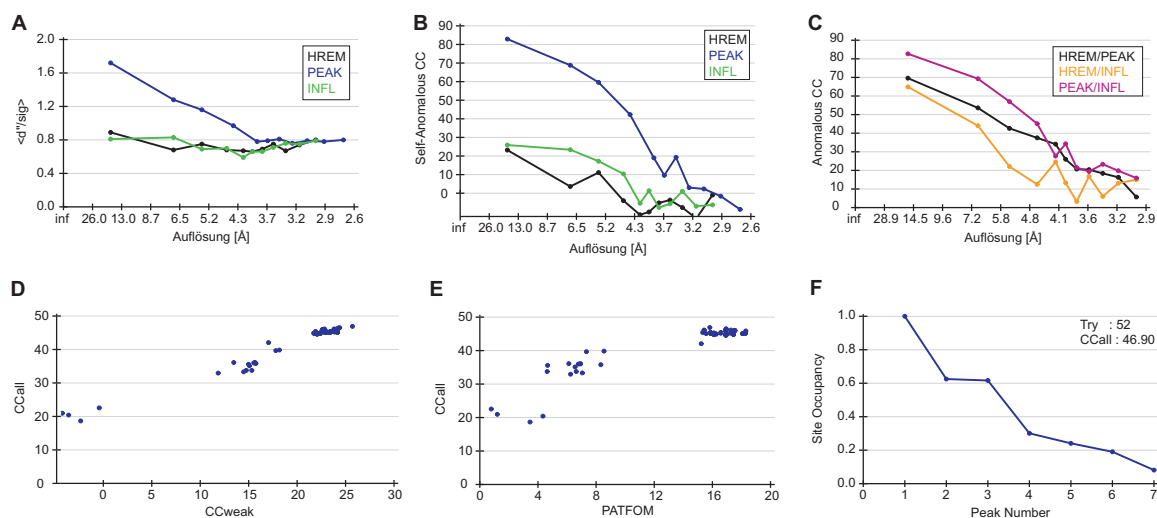


Abbildung IV-41: Bestimmung des anomalen Signals und der Selenatom-Positionen mittels SHELXC und SHELXD. **A-C:** SHELXC. **A:** Anomales Signal-zu-Rausch-Verhältnis der drei MAD-Datensätze. Werte unter 1,0 sind Rauschen. **B:** Anomaler Korrelationskoeffizient der drei MAD-Datensätze. Daten mit Werten über 30% können zur Bestimmung der Phasen verwendet werden. **C:** Anomaler Korrelationskoeffizient im Vergleich der drei Datensätze zueinander. Deutlich ist zu erkennen, dass nur der peak-Datensatz ein anomales Signal lieferte. **D-F:** SHELXD. **D:** Korrelationskoeffizient CCall vs. CCweak. Korrekte Lösungen häufen sich bei hohen CCall- und CCweak-Werten und grenzen sich klar von den falschen Lösungen ab. **E:** Korrelationskoeffizient CCall vs. Gewichtungsfaktor PATFORM. Korrekte Lösungen sind durch hohe CCall- und PATFORM-Werte gekennzeichnet. Oft wird eine bimodale Verteilung beobachtet. **F:** Identifizierung der Selen-Atome aus der besten Lösung in (A) und (B). Selen-Atome mit einem Besetzungsgrad größer als 50% gelten als identifiziert. Ein klarer Abfall des Besetzungsgrades deutet auf die richtige Lösung. Hier können drei Selen-Atome identifiziert werden.

Die Anzahl und Positionen der Selen-Atome wurden anschließend mit SHELXD (Parameter: patterson search, Versuche: 100, E-value: 1,2, Auflösung: bis 4,6Å) bestimmt. Da nur ein GDF-5-Monomer in der asymmetrischen Einheit ist, sind fünf Selen-Atome zu erwarten. In den in Abbildung IV-41 (S. 123, D-F) gezeigten Diagrammen heben sich korrekte Lösungen durch hohe Korrelationskoeffizienten (CCall~47%, CCweak~26%) und Gewichtungsfaktoren (PATFORM~18%) hervor. Es lassen sich drei Selen-Atome mit Besetzungsgraden von 62-100% identifizieren. Somit konnten drei der fünf Selen-Atome im monomeren GDF-5 und demnach der asymmetrischen

Einheit identifiziert werden. Die Positionen (Koordinaten) dieser Selen-Atome dienten als Ausgangspunkt zur experimentellen Bestimmung der Phasen und weiteren Verfeinerung mit dem Programm SHARP (Bricogne et al., 2003; La Fortelle, 1997).

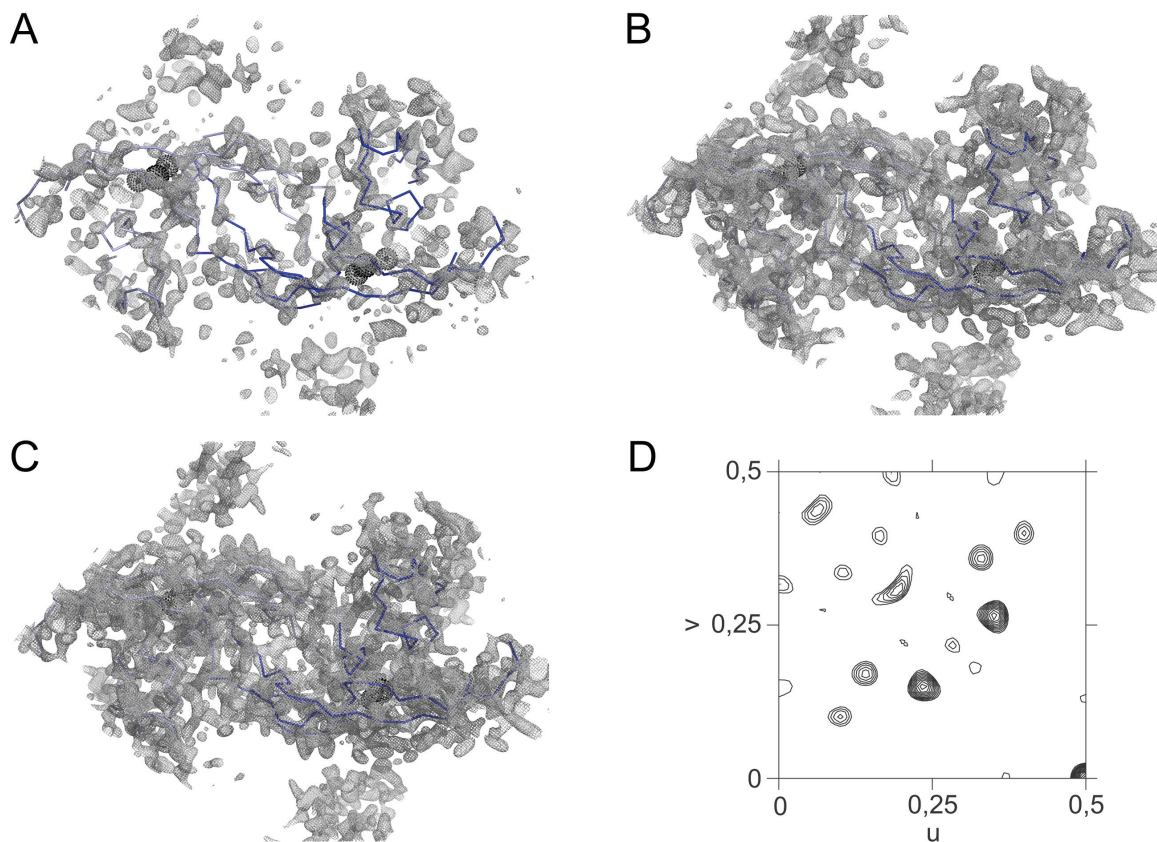


Abbildung IV-42: Verbesserung der auf Basis experimentell bestimmter Phasen berechneten Elektronendichtekarten. In (A-C) sind Elektronendichtekarten bei einem Konturgrad von 2σ als graues Gitternetz um die mit ARP/wARP ermittelte, als blaues Ribbon-Modell dargestellte Polypeptidkette dargestellt. Die drei mit SHELXD detektierten und mit SHARP verfeinerten Selen-Atome sind in schwarz mit gepunkteter Sphäre gezeichnet. Deutlich ist die Verbesserung der Elektronendichtequalität zu erkennen. **A:** Elektronendichte nach SHARP. **B:** Elektronendichte nach SHARP und Lösungsmittelkorrektur (engl. solvent flattening) und Dichtemodifikation (DM). **C:** Finale Elektronendichte nach abgeschlossener Verfeinerung. **D:** Harker-Sektion einer anomalen Patterson-Karte. Zu sehen sind mehrere Harker-Peaks bei $z = 0,5$ (Sektionen $z = 0$, $x = 0,5$ und $y = 0,5$ sind nicht gezeigt), welche symmetrieverwandte Peaks auf speziellen Positionen der Patterson-Karte repräsentieren. Die Patterson-Karten wurden mit dem Programm CNS (Brunger et al., 1998) berechnet.

In SHARP wurde das Szenario „MAD+native“ gewählt, bei dem sowohl die drei MAD-Datensätze als auch der hoch aufgelöste native Datensatz kombiniert werden. Dazu werden zwei Kristalle („compounds“) definiert, weil sich der native (S-Met) vom MAD- (Se-Met) Datensatz chemisch unterscheiden. Die resultierende, auf experimentell bestimmten Phasen basierende *ab initio* Elektronendichte aus SHARP wurde anschließend durch Dichtemodifikation (engl. density modification) mit dem Programm DM (Cowtan, 1994) verfeinert. Der Lösungsmittelgehalt wurde mit 51,7% berechnet. Abschließend wurde das Programm ARP/wARP (Lamzin, 1999; Perrakis et al., 1999) verwendet, um Polypeptidketten automatisiert in der resultierenden Elektronendichte zu positionieren (engl. automated tracing). Der Verlauf der Polypeptidketten als auch die Positionen der drei Selen-Atome – und damit die entsprechenden Methionin-Reste im GDF-5 – ergaben erste Anhaltspunkte zum strukturellen Aufbau des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes. Die Sekundärstruktur der mit ARP/wARP erhaltenen Polypeptidketten war ausreichend, um das schon bekannte

Strukturmodell des binären Komplexes in der experimentell bestimmten Elektronendichtekarte zu platzieren (Abbildung IV-43, S. 125).

Die Statistik der Phasenbestimmung findet sich in Tabelle IX-7 (S. 242). Der Vorteil des „MAD+native“-Verfahrens liegt darin, von Beginn an mit hoher Auflösung arbeiten zu können, ohne zunächst die niedrig aufgelöste MAD-Struktur verfeinern zu müssen. Dies erleichterte erheblich die Identifizierung einzelner Aminosäuren. Kritisch war hierbei jedoch die Skalierung der Daten aus nativem und MAD-Datensatz, weil an unterschiedlichen Strahlenquellen aufgenommen wurde. Die finale Strukturverfeinerung erfolgte nach wenigen Zyklen manueller und automatischer Verfeinerung unter Verwendung der kombinierten Beugungsdaten nur noch auf Grundlage der nativen, hoch aufgelösten Beugungsdaten. Obwohl sich für einige Bereiche im GDF-5•BMPR-IBec-Komplex, vor allem der β 1 β 2-Schleife von BMPR-IBec, auch unter Einbeziehung experimenteller Phaseninformation nur eine ungenügende Elektronendichte ergab, konnte für andere Bereiche, beispielsweise der α 1 β 5-Schleife von BMPR-IBec, eine deutliche Verbesserung der Elektronendichte festgestellt werden (Abbildung IV-43, S. 125). Weiterhin konnte durch die experimentelle Bestimmung der Phasen für den GDF-5•BMPR-IBec-Komplex ein Einfluss des MR-Suchmodells vermieden werden.

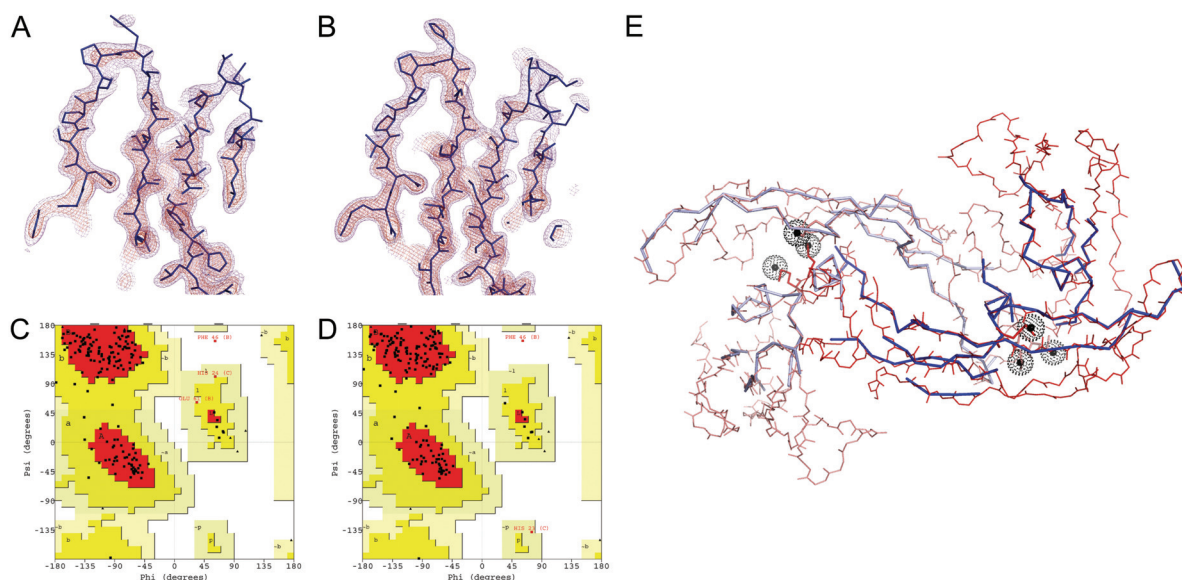


Abbildung IV-43: Verfeinerung der Struktur des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes. **A, B:** Vergleich der Elektronendichten für einen Teil der BMPR-IBec-Kette (blaue Stäbchen) bei Verfeinerung mit den nativen Daten (MR) (**A**) und bei Verfeinerung unter Verwendung der experimentell bestimmten Phasen (MAD) (**B**). Die Elektronendichten sind bei 1σ (magenta) und 2σ (rot) konturiert. Die Elektronendichte der MAD-Struktur ist in Teilen wesentlich besser und vollständiger als die der MR-Struktur. **C, D:** Ramachandran-Diagramm für die beiden Konformere des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes, offenes Konformer (**C**) und geschlossenes Konformer (**D**). Bis auf Phe46 (GDF-5) liegen alle Reste in erlaubten Bereichen des Ramachandran-Diagramms (siehe auch Tabelle IV-21, S. 125). Die Bereiche im Diagramm sind wie folgt unterteilt: rot = favorisiert, gelb = zusätzlich erlaubt, beige = generell erlaubt, weiß = nicht erlaubt. Sekundärstrukturen konzentrieren sich in a = α -helikalen, b = β -Strang-, l = linksgängig α -helikalen, p = Epsilon-Regionen. **E:** Darstellung des binären GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes im Zuge der Strukturlösung, angefangen mit Selen-Atomen (schwarze Punkte), über erste Polypeptidketten nach der automatischen Suche mit Arp/wARP (blaue CA-Kette) zur verfeinerten Endstruktur (rote Linien). Die Positionen der drei Se-Methionine Met72, Met75 und Met112 im GDF-5 (rote Stäbchen) der asymmetrischen Einheit stimmen mit den Positionen der experimentell ermittelten Selen-Atome überein.

Für eine Ausbuchtung in der $\beta_1\beta_2$ -Schleife von BMPR-IBec, in der drei aufeinanderfolgende Histidin-Reste durch zwei N- und C-terminal liegende, miteinander disulfidverbrückte Cysteine eingegrenzt werden (Sequenz Cys20-His21-His22-His23-Cys24), wurden entsprechend der beobachteten Elektronendichte zwei Konformere modelliert. Für beide Konformationen – im nachfolgenden als „offen“ und „geschlossen“ bezeichnet – wurde Elektronendichte detektiert, die sich im Laufe der Verfeinerung im Vergleich zur Ausgangsdichte deutlich verbesserte. Die Anpassung der Aminosäurekette an die jeweilige Elektronendichte wurde durch die geringen konformationellen Freiheitsgrade dieser Ausbuchtung stark erschwert. Letztlich wurden die Konformationen gewählt, bei denen alle Aminosäurereste im generell erlaubten oder bevorzugten Bereich des Ramachandran-Diagramms (Ramachandran et al., 1963; Ramakris.C and Ramachan.Gn, 1965) lokalisiert waren, also grundsätzlichen geometrischen Bedingungen hinsichtlich der Hauptketten-Torsionswinkel gehorchten (Abbildung IV-43, S. 125). In den beiden modellierten Konformeren zeigen die Seitenketten der Histidinreste in Richtung des β_4 -Strangs von BMPR-IBec und des N-Termini von GDF-5. Beide, später in Abschnitt IV. 7. 1. näher beschriebenen GDF-5•BMPR-IBec-Strukturen mit offenen und geschlossenen BMPR-IBec-Konformeren wurden in den letzten beiden Verfeinerungsrunden unabhängig voneinander mit der Software REFMAC verfeinert. Ausser im bereits diskutierten Bereich der $\beta_1\beta_2$ -Schleife von BMPR-IBec ergeben sich nur noch für den Rest Arg18 in GDF-5 geringe strukturelle Unterschiede, wobei die Guanidinium-Gruppe von Arg18 durch eine 30° umfassende Drehung um den Winkel χ_3 leicht versetzt ist. Zuletzt konnten unter Verwendung einer Differenzelektronendichte ($F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$) 52 Wassermoleküle in der asymmetrischen Einheit identifiziert und in die Struktur eingefügt werden. Die Strukturen des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes konnten mit R-Werten von $R_{\text{cryst}} = 21,5\%$ und $R_{\text{free}} = 25,6\%$ (geschlossenes Konformer) bzw. $R_{\text{cryst}} = 21,3\%$ und $R_{\text{free}} = 26,4\%$ (offenes Konformer) modelliert werden (Tabelle IV-20).

GDF-5•BMPR-IBec	Konformer 1	Konformer 2
R_{cryst} (%)	21,5 (28,9)	21,3 (28,8)
R_{free} (%)	25,6 (24,2)	26,4 (25,4)
r.m.s. deviation		
Bindungslängen (Å)	0,014	0,014
Bindungswinkel ($^\circ$)	1,340	1,310
Torsionswinkel ($^\circ$)	7,728	7,474
Mittlerer B-Faktor (Å ²)	70,9	70,5
Koordinatenfehler (Å)	0,203	0,201
<i>PROCHECK-Analyse</i>		
Reste in der am meisten favorisierten Region (%)	85,2 (138)	86,4 (140)
Reste in zusätzlich erlaubter Region (%)	13,0 (21)	12,3 (20)
Reste in generell erlaubter Region (%)	1,2 (2)	0,6 (1)
Reste in nicht erlaubter Region (%)	0,6 (1)	0,6 (1)
Werte in Klammern gelten für die höchste Auflösungsschale (R-Werte) bzw. Anzahl der in der Analyse verwendeten Aminosäurereste (PROCHECK).		

Tabelle IV-20: Geometrie der Kristallstruktur des GDF-5:BMPR-IBec-Komplexes.

Die Geometrie der Aminosäuren in den finalen Strukturen wurde mit den Programmen PROCHECK (Laskowski et al., 1993) und WHATCHECK (Hooft et al., 1996) geprüft. Mit Hilfe von WHATCHECK

wurde getestet, ob alle potentiell zur Bildung von Wasserstoffbrücken fähigen Seitenketten von Aminosäureresten so orientiert sind, dass mögliche Wasserstoffbrückenbindungen auch ausgebildet werden, beispielsweise durch Rotation des Imidazolrings eines Histidinrests. Die Sekundärstruktur von GDF-5 und BMPR-IB im binären Komplex und die geometrischen Parameter der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit dem Programm DSSP (Kabsch and Sander, 1983) bestimmt und sind in Abbildung IV-46 (S. 134) und Tabelle IV-24 (S. 140) angegeben.

IV. 6. 1. 2. Oktaedrische GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec PEG-Kristallform

Für die oktaedrischen Kristalle des ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes konnten nur niedrig aufgelöste Datensätze aufgenommen werden (Abbildung IV-44, S. 128; Tabelle IX-8, S. 243; Tabelle IV-21, S. 127). Die Gitterkonstanten sind mit $a=b=125,77\text{Å}$, $c=201,40\text{Å}$ ($\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$) deutlich größer als die für Kristalle aus der PPG400-Bedingung. Die Moleküle in der Einheitszelle sind über eine tetragonale Symmetrie (Raumgruppe $P4_1$) verknüpft, sodass sich vier asymmetrische Einheiten in der Einheitszelle befinden. Berechnungen des Matthews-Koeffizienten zufolge sind für einen ternären Komplex drei dieser Moleküle ($V_M=3\text{Å}^3$, Lösungsmittelgehalt: 59%) und für einen binären Komplex sechs dieser Moleküle ($V_M=2,5\text{Å}^3$, Lösungsmittelgehalt: 52%) in der asymmetrischen Einheit zu erwarten.

Strahlenquelle	Bezeichnung	Präzession	Belichtung	Art	Maximale Auflösung (Å)
ESRF ^b	box97b1	147°	20s pro 1°	Nativ	6,8
BESSY	box89d6	114°	3s pro 1°	Nativ	8,0 ^a

Die gelb hinterlegten Datensätze wurden zur Strukturlösung verwendet. Die Ergebnisse der Prozessierung dieser Datensätze sind in Tabelle IX-7 (S. 242, Anhang) zu finden.

^a Stark anisotrope Beugung. Bis 6,5Å sind einzelne Reflexe erkennbar. Die Datenprozessierung ergibt sehr hohe R_{merge} -Werte über den gesamten Auflösungsbereich, weshalb die Daten nicht verwendet werden können.

^b Die Datenaufnahme erfolgte durch C. Grimm (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg).

Tabelle IV-21: Übersicht über die für oktaedrische GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Kristalle (PEG) gemessenen Datensätze.

Beugungsdaten eines an der ESRF gemessenen Kristalls konnten trotz der geringen Auflösung von 6,8Å erfolgreich für den molekularen Ersatz verwendet werden. Dazu wurde zunächst auf Basis der bekannten Strukturen von GDF-5•BMPR-IBec (siehe vorheriger Abschnitt) und BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec (RCSB-Eintrag 2H62) ein Strukturmodell des ternären Komplexes erzeugt. Nur wenige Aminosäurereste von GDF-5, insbesondere im Bereich des $\beta 7$ -Strangs in Finger 2, mussten dazu an die strukturellen Gegebenheiten von ActR-IIBec angepasst werden. Am auffälligsten war die $\chi 1$ -Rotation der Seitenkette von Tyr106 in eine hydrophobe Tasche, gebildet von Tyr42, Ala43, Ser44, Lys56 und Trp60 in ActR-IIBec. Im ActR-IIBec selbst musste Phe83 im $\beta 6$ -Strang um etwa den gleichen Betrag und in die entgegengesetzte Richtung wie Tyr106 (GDF-5) gedreht werden. Sowohl Phe83 (ActR-IIB) als auch Tyr106 (GDF-5) werden im Bindeepitop des modellierten Komplexes komplett verdeckt. Das so erzeugte Modell des ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes wurde für den molekularen Ersatz mit dem Programm PHASER eingesetzt. Für drei ternäre Komplexmoleküle in der asymmetrischen Einheit konnte eine realistische MR-Lösung gefunden werden. Bei dieser Suchlösung steigen der Z-Wert für die Translationsfunktion (TFZ) und der Wert für die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Lösung (LLG) stetig von TFZ=7 (erstes Komplexmolekül) auf TFZ=17 (drittes Komplexmolekül) bzw. von LLG=44 auf LLG=361. Die

resultierende Elektronendichte konnte unter Anwendung einer dreifachen nichtkristallographischen Symmetrie mit den Programmen NCSMASK (CCP4, 1994) und DM nur geringfügig verbessert werden. Problematisch war hierbei die niedrige Auflösung, was die Berechnung einer korrekten Lösungsmittelmaske stark erschwerte. Für alle Komponenten des ternären Komplexes, also GDF-5, BMPR-IBec und ActR-IIBec konnte jedoch eindeutige, wenn auch fragmentierte, Elektronendichte detektiert werden (Abbildung IV-44, S. 128).

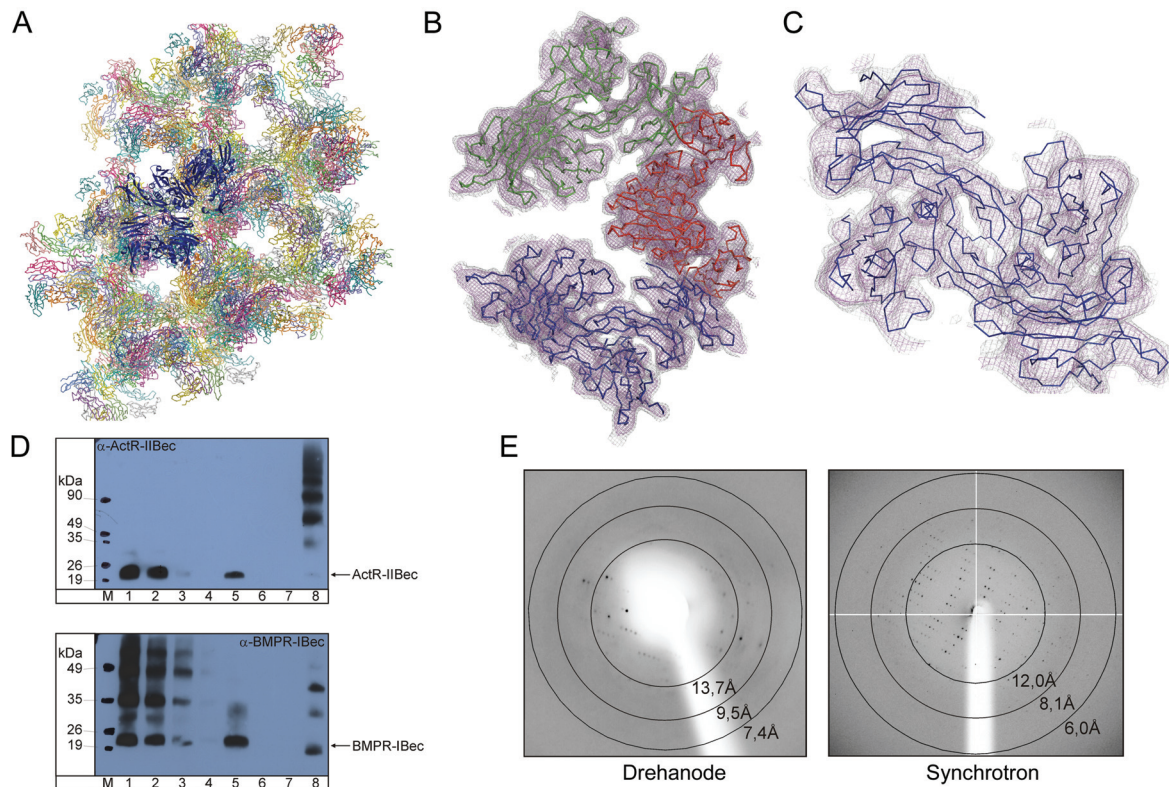


Abbildung IV-44: Beugungsdaten und Kristallgitter von Kristallen des ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes. **A:** Kristallpackung mit drei ternären Komplexmolekülen in der asymmetrischen Einheit und vier asymmetrischen Einheiten in der Einheitszelle. Gezeigt ist ein ternärer Komplex als blaues Sekundärstrukturmodell. **B:** Asymmetrische Einheit des ternären Komplexes. Die Kristallkontakte entstehen jeweils zwischen dem $\beta 2$ -Strang eines ActR-IIBec-Moleküls und der $\beta 4\beta 5$ -Schleife eines ActR-IIBec-Moleküls sowie der $\beta 1\beta 2$ -Schleife eines BMPR-IBec-Moleküls im benachbarten Komplexmolekül. **C:** Elektronendichte des mit 6,8Å nur niedrig aufgelösten Datensatzes nach MR und DM. Die Elektronendichte ist in $0,5\sigma$ (grau) und 1σ (magenta) angegeben und umhüllt das Ribbon-Modell des ternären Komplexes. Deutlich ist Elektronendichte für den an der konvexen Seite der beiden Finger von GDF-5 gebundenen ActR-IIBec erkennbar. **D:** Western Blot der Kristalle des ternären Komplexes nach Immunodetektion von ActR-IIBec (oben) und von BMPR-IBec (unten). Die höhermolekularen Banden bei den Proben des oktaedrischen Kristalls (PEG-Bedingung, jeweils letzte Bahn) sind wahrscheinlich auf PPG-Addukte zurückzuführen. **Bahnen:** M...Marker, 1-4...150ng, 100ng, 50ng und 20ng des jeweiligen Rezeptors. 5...300ng ternärer Komplex vor Kristallisation, 6...100ng ActR-IIBec (unten) bzw. BMPR-IBec (oben), 7...Probe eines klingenförmigen Kristalls, 8...Probe eines oktaedrischen Kristalls. Nichtreduzierende Bedingungen. **E:** Beugungsbilder eines oktaedrischen GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Kristalls. Bei Messung an der Drehanodenanlage wurde eine Auflösung von etwa 8-9Å erreicht (*links*). An der ESRF Mikrofokus Strahlenquelle konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 6,8Å gemessen werden (*rechts*, Datenstatistik in Tabelle IX-8, S. 243 im Anhang).

Die Anwesenheit von ActR-IIBec und BMPR-IBec in den oktaedrischen Kristallen wurde zusätzlich mittels Western Blot überprüft. Als Positivkontrolle dienten verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Rezeptoren, als Negativkontrolle der jeweils andere Rezeptor sowie im Fall vom ActR-IIBec zusätzlich Kristalle aus der PPG-Bedingung. Die Ergebnisse sind in Abbildung IV-44 (S. 128)

gezeigt. Deutlich ist das Vorhandensein von ActR-IIBec und BMPR-IBec in den Proben der Kristalle zu erkennen. Bei den höhermolekularen, ebenfalls mit den Antikörpern detektierten Proteinbanden handelt es sich vermutlich um PPG400-Addukte. Diese Addukte erscheinen auch auf silbergefärbten SDS-PAGE-Gelen der oktaedrischen Kristalle (siehe Abbildung IV-34, S. 114).

Zusammenfassend können bei der Kristallisation des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes in Abhängigkeit von der Pufferbedingung zwei Kristallformen unterschiedlicher Zusammensetzung produziert werden. ActR-IIBec dissoziiert in Anwesenheit von PPG400 aus dem Komplex und vermittelt das Wachstum von klingenartigen Kristallen des binären GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes, die hochaufgelöste Beugungsdaten liefern. In Pufferbedingungen mit PEG können oktaedrische Kristalle des kompletten ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes erhalten werden, mit denen allerdings nur niedrigaufgelöste Beugungsdaten gemessen werden können. Vermutlich lässt sich durch ein umfangreiches Additiv-Screening die Qualität der oktaedrischen Kristalle weiter verbessern, um auch für den ternären Komplex hochaufgelöste Beugungsdaten zu erhalten. Dies würde vor allem Informationen über die genaue Position von ActR-IIBec im „knuckle“-Epitop von GDF-5 liefern.

IV. 6. 1. 3. GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec MPD-Kristalle

Von Kristallen des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes aus der MPD-Kristallisationsbedingung bei *in situ* Proteolyse mit Subtilisin (siehe IV. 5. 2.) wurden sowohl Datensätze an der Drehanodenanlage als auch MAD-Datensätze am Synchrotron gemessen (Tabelle IV-22). Die maximal erreichte Auflösung beträgt dabei 2,8Å (Abbildung IV-38, S. 117). Der Komplex kristallisiert in der Raumgruppe P6₂22, wobei der binäre Komplex, bestehend aus dem GDF-5-Dimer und zwei BMPR-IA/IB^Cec-Molekülen, die asymmetrische Einheit bildet.

Strahlenquelle	Bezeichnung	Präzession	Belichtung	Art	Maximale Auflösung (Å)
BESSY	r2b4, box153d5	30°	3,2s pro 1°	MAD	2,8 (pk, if, rm)
BESSY	box153a4	60°	3,2s pro 1°	MAD	3,2 (pk, if, rm)
BESSY	r2b4, box153d5	60°	3,2s pro 1°	Nativ	2,8
Drehanode	box153a4	180°	6min pro 1°	Nativ	2,8
Drehanode	box139d4	250°	6min pro 1°	Nativ	3,0
Drehanode	box137c1	180°	6min pro 1°	Nativ	3,3
Drehanode	box136d6	66°	15min pro 1°	Nativ	3,3

Die gelb hinterlegten Datensätze wurden zur Strukturlösung verwendet. Die Ergebnisse der Prozessierung dieser Datensätze sind in Tabelle IX-8, S. 243 (Anhang) zu finden.

Tabelle IV-22: Übersicht über Datensätze von GDF-5:BMPR-IA/IB^Cec-Kristallen der MPD-Bedingung.

Zur Lösung der Kristallstruktur wurde wie im vorherigen Abschnitt für den GDF-5•BMPR-IBec-Komplex beschrieben vorgegangen, indem zuerst die experimentellen Phasen bestimmt und anschließend Strukturmodelle von GDF-5 und von BMPR-IA/IB^Cec (RCSB-Eintrag 2QJB) in die Elektronendichtekarte eingepaßt wurden. Nachdem sich die R-Werte des Strukturmodells unter Verwendung der MAD-Daten nicht weiter verbessern ließen, wurde unter Verwendung der nativen Daten weiter verfeinert. In der automatischen Verfeinerung mit REFMAC („TLS and restrained“) wurde eine strikte nicht-kristallographische Symmetrie für die beiden GDF-5-Monomere, nicht jedoch für die BMPR-IA/IB^Cec-Moleküle definiert. Als TLS-Gruppen wurden die vier Proteinketten der asymmetrischen Einheit (GDF-5: Reste 17 bis 120, BMPR-IA/IB^Cec: Reste 35 bis 118) definiert.

Die Elektronendichtekarte zeigt Lücken, sodass teilweise der Verlauf der Hauptkette und einige Aminosäuren nicht zuverlässig modelliert werden können. Andererseits tritt Elektronendichte zwischen Proteinketten auf, die in dieser Art sonst nur bei Disulfidbrücken zu erwarten ist. Während beispielsweise für einige Cystinbrücken keine Elektronendichte detektierbar ist, scheinen Sulfhydryl-Gruppen derselben Cysteine mit benachbarten Histidin-Seitenketten kovalent verknüpft worden zu sein (...). Ursache hierfür sind vermutlich Strahlenschäden am Kristall, möglicherweise auch eine insgesamt schlechte Qualität der Röntgenbeugungsdaten. Im Verlauf der Verfeinerung nahmen die R-Werte des Strukturmodells nur langsam ab. Der kristallographische R-Wert eines vorläufigen Strukturmodells wurde mit $R_{\text{cryst}}=27,2\%$, der freie R-Wert mit $R_{\text{free}}=34,4\%$ bestimmt (Tabelle IV-23). Die niedrige Qualität der Elektronendichte und die niedrige Auflösung von $2,8\text{\AA}$ lassen kaum Rückschlüsse auf intermolekulare Wechselwirkungen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen zu. Allein die Konformation strukturierter Elemente in den Molekülen und die Orientierung von Ligand und Rezeptor zueinander sind erkennbar. Die GDF-5•BMPR-IA/IB^{Cec}-Struktur kann mit der BMP-2•BMPR-IA/IB^{Cec}-Struktur verglichen werden, um potentielle strukturelle Veränderungen in BMPR-IA/IB^{Cec} bei Bindung von BMP-2 oder GDF-5 zu identifizieren.

GDF-5•BMPR-IA/IB^{Cec}	
R_{cryst} (%)	27,2 (32,2)
R_{free} (%)	34,4 (41,2)
r.m.s. deviation	
Bindungslängen (Å)	0,030
Bindungswinkel (°)	3,040
Torsionswinkel (°)	10,728
Mittlerer B-Faktor (Å ²)	49,2
Koordinatenfehler (Å)	0,631
<i>PROCHECK-Analyse</i>	
Reste in der am meisten favorisierten Region (%)	70,4 (233)
Reste in zusätzlich erlaubter Region (%)	23,6 (78)
Reste in generell erlaubter Region (%)	4,5 (15)
Reste in nicht erlaubter Region (%)	1,5 (5)
Werte in Klammern gelten für die höchste Auflösungsschale (R-Werte) bzw. Anzahl der in der Analyse verwendeten Aminosäurereste (PROCHECK, Reste insgesamt: 395).	

Tabelle IV-23: Geometrie der vorläufigen Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IA/IB^{Cec}-Komplexes.

IV.7. Strukturbeschreibung und -analyse

Ziel der Untersuchungen ist, strukturelle Merkmale der Ligand-Rezeptor-Erkennung am Beispiel des Systems aus GDF-5 und den BMP Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB zu identifizieren. BMPR-IA bindet GDF-5 mit etwa 15fach niedriger Bindungsaffinität als BMPR-IB, während die Bindung beider Rezeptoren an BMP-2 mit etwa gleichen Bindungsaffinitäten erfolgt. Ein Alaninaustausch von Arg57 in GDF-5 führt zu einer höheren Bindungsaffinität gegenüber BMPR-IA und damit zum Verlust der Bindungsspezifität gegenüber BMPR-IB (Nickel et al., 2005). Die Struktur von BMPR-IBec konnte bisher nicht aufgeklärt werden und ist nun mit der Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes zugänglich. Von BMPR-IA sind eine NMR-Struktur (siehe IV. 7. 4.) und mehrere Kristallstrukturen, in denen der Rezeptor an BMP-2 gebunden ist (Keller et al.,

2004; Kirsch et al., 2000c), bekannt. Weiterhin konnte für einen Komplex aus GDF-5-R57A und BMPR-IA die Kristallstruktur bei einer Auflösung von 2,5Å bestimmt werden (gemeinsame Arbeit mit T. D. Müller und J. Nickel, unpublizierte Ergebnisse). Die Bindung von BMPR-IA an wildtypisches GDF-5 ist damit jedoch nicht erklärbar. Auf potentielle strukturelle Unterschiede und Gemeinsamkeiten bei Bindung von BMPR-IB an BMP-2 oder GDF-5 kann nicht eingegangen werden, weil die Kristallstruktur des BMP-2•BMPR-IB-Komplexes bisher nicht gelöst werden konnte. Alternativ stehen mit den BMP-2•BMPR-IA/IB^C- und GDF-5•BMPR-IA/IB^C-Komplexen zwei Kristallstrukturen zur Verfügung, die eine entsprechende Analyse von BMPR-IA/IB^C ermöglichen. Diese Rezeptorchimäre beruht auf dem Grundgerüst von BMPR-IA, besitzt jedoch die Bindungscharakteristika und die biologische Aktivität von BMPR-IB.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden die Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes beschrieben und mit der Kristallstruktur des BMP-2•BMPR-IA-Komplexes verglichen. Für die Interaktion zwischen BMP-2 und BMPR-IA stehen bereits publizierte, umfangreiche strukturelle und biophysikalische Daten zur Verfügung, deren Aussagen teilweise auf das dem BMP-2 strukturell homologe GDF-5 übertragen werden können. Die NMR-Struktur von BMPR-IA zeigt den Rezeptor in freier Form, sodass auf strukturelle Veränderungen bei Bindung von BMP-2 geprüft werden kann.

IV. 7. 1. Die Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes

IV. 7. 1. 1. Aufbau des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes

Die Struktur des Komplexes aus GDF-5 und der extrazellulären Domäne von BMPR-IB konnte mit hoher Auflösung ermittelt werden. Die asymmetrische Einheit im Kristall setzt sich aus der Hälfte des binären Komplexes zusammen. Der komplette binäre Komplex aus einem GDF-5-Dimer und zwei BMPR-IB ergibt sich durch eine Symmetrieoperation – hier eine einfache Rotation um 180° plus eine Translation um den halben Betrag entlang einer Gitterachse senkrecht zur Rotationsachse (siehe dazu Abbildung IV-40, S. 121). Dies impliziert einen strikt symmetrischen Komplex, in dem beide Bindeepitope identisch sind. Die Komplexarchitektur stimmt mit der von bereits bekannten Komplexen aus BMPR-IA und BMP-2 überein (RCSB-Einträge 1REW und 1ES7) (Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000c). Entsprechend bindet der BMPR-IBec im „wrist“-Epitop von GDF-5. Dieses ist durch die pre-Helix- ($\beta 5\alpha 1$ -) Schleife und die folgende $\alpha 1$ -Helix des einen GDF-5-Monomers und den Fingern eins und zwei des zweiten Monomers definiert (Abbildung IV-46, S. 134). Das BMPR-IB-Epitop besteht aus den Aminosäureresten der $\beta 1\beta 2$ -, $\beta 4\alpha 1$ - und $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen sowie der $\alpha 1$ -Helix. Für einige N-terminale Aminosäuren von GDF-5 (Reste 1-16) und einige N- und C-terminale Aminosäuren von BMPR-IBec (Reste 1-15, 101-113) konnte keine Elektronendichte erhalten werden, was auf eine erhöhte Flexibilität dieser Bereiche hindeutet – ein Phänomen, welches bereits im BMP-2•BMPR-IAec-Komplex beobachtet wurde (Kirsch et al., 2000c). Der N-Terminus von BMPR-IBec befindet sich auf der membranabgewandten Seite, der C-Terminus parallel zum zentralen β -Faltblatt und der $\beta 4\beta 5$ -Schleife auf der membran zugewandten Seite des Komplexes. Die N- und C-Termini von GDF-5 liegen in der Komplexebene etwa parallel zur Membranfläche (Abbildung IV-46, S. 134).

Im Kristallgitter bilden die Reste 103 bis 107 im Finger 2 von angrenzenden GDF-5-Molekülen (Asn103, Val104, Val105, Tyr106, Lys107) die Kristallkontakte einer Raumdimension. Mittels hydrophober oder elektrostatischer Wechselwirkungen interagieren beispielsweise Asn103_A und

Lys107_B, Val104_A und Tyr106_B oder Val105_A und Val105_B. Lys29 an der Spitze von Finger 1 in GDF-5 und Asn32 in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IBec bilden die Kristallkontakte entlang der dazu senkrechten Raumachse. Weitere Kristallkontakte werden zwischen His25 und Glu44 in den $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Strängen (Finger 1) von GDF-5 und His94 am C-Terminus von BMPR-IBec ausgebildet. His25 (GDF-5) und His94 (BMPR-IBec) gehen eine sogenannte paarweise Wechselwirkung ein (Dasgupta et al., 1997), bei der die Ebenen der zwei Imidazolringe parallel zueinander angeordnet sind.

Die Temperatur- (Debye-Waller- oder B-) Faktoren (Karplus and Schulz, 1985; Vihinen et al., 1994) der GDF-5•BMPR-IBec-Struktur deuten auf eine unterschiedliche Rigidität von Ligand und Rezeptor hin. Während die Temperaturfaktoren von Resten in GDF-5 ($C\alpha$ -Atome) innerhalb eines kleinen Intervalls von 20\AA^2 schwanken, sind für Reste in BMPR-IB ($C\alpha$ -Atome) deutlich größere Unterschiede in einem Intervall von 50\AA^2 zu messen. Temperaturfaktoren einzelner Regionen in BMPR-IB sind gegenüber dem Mittelwert aller Reste ($70,8\text{\AA}^2$) stark erhöht (Abbildung IV-45, S. 132). Vor allem die $\beta 1\beta 2$ -, $\beta 3\beta 4$ - und $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen von BMPR-IB zeigen im Vergleich zum Mittelwert um bis zu 36\AA^2 (35%) erhöhte Temperaturfaktoren. Die Unterschiede in den Temperaturfaktoren zwischen den Komplexen mit offenem und geschlossenem BMPR-IB-Konformer sind vernachlässigbar. Insgesamt deuten die hohen Temperaturfaktoren auf eine bemerkenswerte inherente Flexibilität von BMPR-IB.

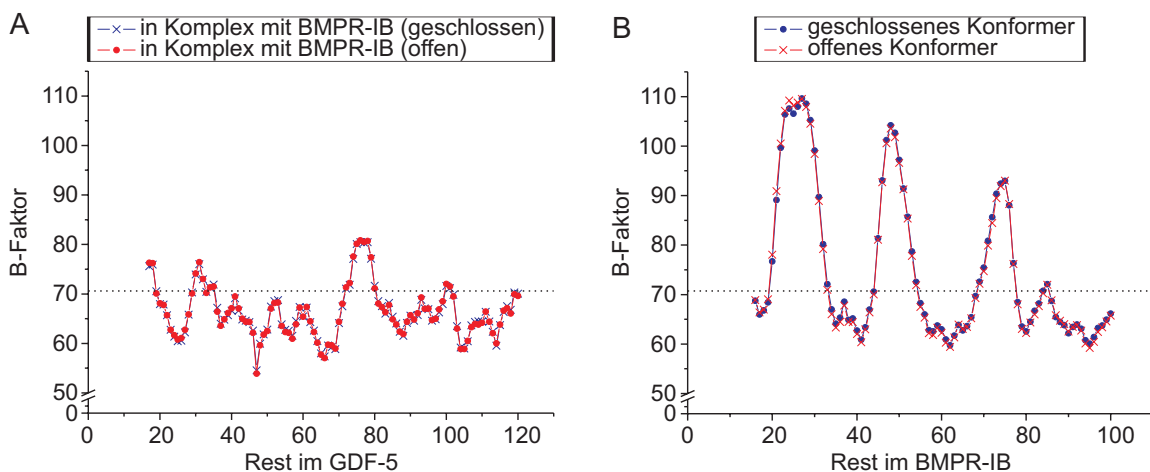


Abbildung IV-45: B-Faktor-Diagramm des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes. **A:** B-Faktoren der $C\alpha$ -Atome von GDF-5-Resten im Komplex mit dem offenen (rot) und geschlossenen (blau) BMPR-IB-Konformer. **B:** B-Faktoren der $C\alpha$ -Atome von BMPR-IB-Resten im offenen (rot) und geschlossenen (blau) Konformer. Einzelne Bereiche von BMPR-IB weisen stark erhöhte B-Faktoren – und eine erhöhte Mobilität der $C\alpha$ -Atome – auf, während die Schwankungsbreite der B-Faktoren in GDF-5 wesentlich geringer ist. Die gepunktete Linie markiert den über alle $C\alpha$ -Atome der asymmetrischen Einheit gemittelten B-Faktor ($70,8\text{\AA}^2$).

Der strukturelle Aufbau von GDF-5 ähnelt dem von BMP-2. Beide Moleküle weisen eine Sequenzidentität von etwa 52% auf (Abbildung IV-46, S. 134). In Analogie zu Scheufler et al. (Scheufler et al., 1999) kann die Struktur mit einer offenen Hand beschrieben werden, bei der die Finger 1 und Finger 2 durch die $\beta 1$ - bis $\beta 5$ -Stränge bzw. $\beta 6$ - und $\beta 7$ -Stränge und die Handfläche durch die zentrale $\alpha 1$ -Helix repräsentiert wird (Abbildung IV-47, S. 136). Die GDF-5-Monomere werden durch ein dreizähliges, konserviertes Disulfidbrückennetzwerk (Cystinknoten) stabilisiert (Sun and Davies, 1995). Eine vierte Cysteinbrücke (Cys84 in GDF-5) verknüpft beide Monomere kovalent zum Homodimer. Die Sekundärstruktur von BMPR-IB weist eine hohe Ähnlichkeit zu

BMPR-IA auf, obwohl die Sequenzidentität nur 50% beträgt (Abbildung IV-46, S. 134). Beide Rezeptoren weisen ein fünfsträngiges β -Faltblatt, eine kurze α -Helix sowie eine N-terminale kurze 3_{10} -Helix auf. Die allgemeine Struktur von BMPR-IB entspricht der „Drei-Finger-Toxin“-Faltung von Neurotoxinen wie Erabutoxin, bei der die $\beta 3$ -, $\beta 4$ -, und $\beta 5$ -Stränge ein antiparalleles zentrales β -Faltblatt und die $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Stränge ein zweites, kürzeres und ebenfalls antiparalleles N-terminales β -Faltblatt bilden (Rees and Bilwes, 1993). Eine ähnliche Tertiärstruktur wird auch bei den ActR-II- (Greenwald et al., 1999), ActR-IIB- (Thompson et al., 2003), BMPR-II- (Mace et al., 2006), T β R-II- (Boesen et al., 2002) und T β R-I- (Groppe et al., 2008) Rezeptoren vorgefunden. Die beiden β -Faltblätter sind in BMPR-IB über zwei Disulfidbrücken ($\beta 1$ - $\beta 3$: Cys19-Cys40; $\beta 2$ - $\beta 4$: Cys34-Cys58) verbunden. Zwei weitere Disulfidbrücken verknüpfen die N-terminale 3_{10} -Helix ($\beta 5$ - 3_{10} : Cys83-Cys89) und die sich zwischen den $\beta 4$ - und $\beta 5$ -Strängen befindliche kurze $\alpha 1$ -Helix ($\alpha 1$ - $\beta 5$: Cys68-Cys82). Zusätzlich befindet sich eine fünfte Disulfidbrücke in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife, die zu einer kleinen, drei Histidin-Reste umfassenden Ausbuchtung führt (Abbildung IV-47, S. 136). Diese Ausbuchtung in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife hat in BMPR-IA und BMPR-IB unterschiedliche Konformationen. Im Gegensatz zu BMPR-IA werden in BMPR-IB zwei unterschiedliche Konformationen, offen und geschlossen, beobachtet. Dies ist insofern bemerkenswert, weil andere Arbeiten zeigen, dass die $\beta 1\beta 2$ -Schleife an der Erkennung von GDF-5 durch BMPR-IB beteiligt ist (Nickel et al., 2005). Weitere konformationelle Veränderungen lassen sich in der für die Erkennung von BMP-2 wichtigen $\alpha 1\beta 5$ -Schleife feststellen. In BMPR-IB ist die $\alpha 1$ -Helix im Vergleich zu BMPR-IA um 50% zugunsten einer entsprechend längeren $\alpha 1\beta 5$ -Schleife verkürzt. Letztere hat in BMPR-IB eine deutlich andere Konformation als in BMPR-IA (r.m.s.d. der $C\alpha$ -Atome: 2,8Å), was möglicherweise auf die geringe Sequenzhomologie in diesem Nonapeptidstrang zurückzuführen ist. Die in BMPR-IB beobachtete Konformation der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife entspricht grundsätzlich derjenigen in der BMPR-IA/IB^C-Chimäre (IV.8.). Damit hat die Chimäre nicht nur dem BMPR-IB vergleichbare Bindungseigenschaften, sondern auch einen strukturell ähnlichen Aufbau. Die dem $\beta 5$ -Strang folgende Schleife ist in BMPR-IB um den Rest Glu85 erweitert, was sich weder auf die angrenzende Cysteinbrücke (Cys83-Cys89), noch auf die Position oder Länge der C-terminal folgenden 3_{10} -Helix auswirkt. In einem Vergleich der Oberflächenmodelle von BMPR-IA- und BMPR-IB scheint BMPR-IB eine kompaktere, geringere Raumauffüllung zu besitzen. Dies drückt sich in einer geringeren Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche von 5939Å² (BMPR-IB; BMPR-IA: 6468Å²) aus (Abbildung IV-48, S. 137). Die Interaktionsfläche zwischen GDF-5 und BMPR-IB verläuft entlang einer gedachten Linie von der membran zugewandten Seite ($\beta 3\beta 4$ -Schleife bzw. $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB) zur membranabgewandten Seite (N-Terminus von BMPR-IB) parallel zu der in Abbildung IV-46 (S. 134) gezeigten Rotationsachse.

Die Struktur von GDF-5 im GDF-5•BMPR-IBec-Komplex kann mit der Kristallstruktur von freiem GDF-5 (RCSB-Eintrag: 1WAQ) (Nickel et al., 2005) verglichen werden. Beide GDF-5-Strukturen lassen sich mit einer r.m.s. Abweichung von 0,5Å ($C\alpha$ -Atome) überlagern. Die größten Unterschiede zeigen sich in peripheren Bereichen der Moleküle wie den Fingerspitzen. Das zentrale Cystinknoten-Motiv ist strukturell hoch konserviert. Ausgehend von dem „zentralen“ Cystinknoten divergieren die konformationellen Unterschiede zu den Fingern des Liganden und den beiden Schleifen, die die $\alpha 1$ -

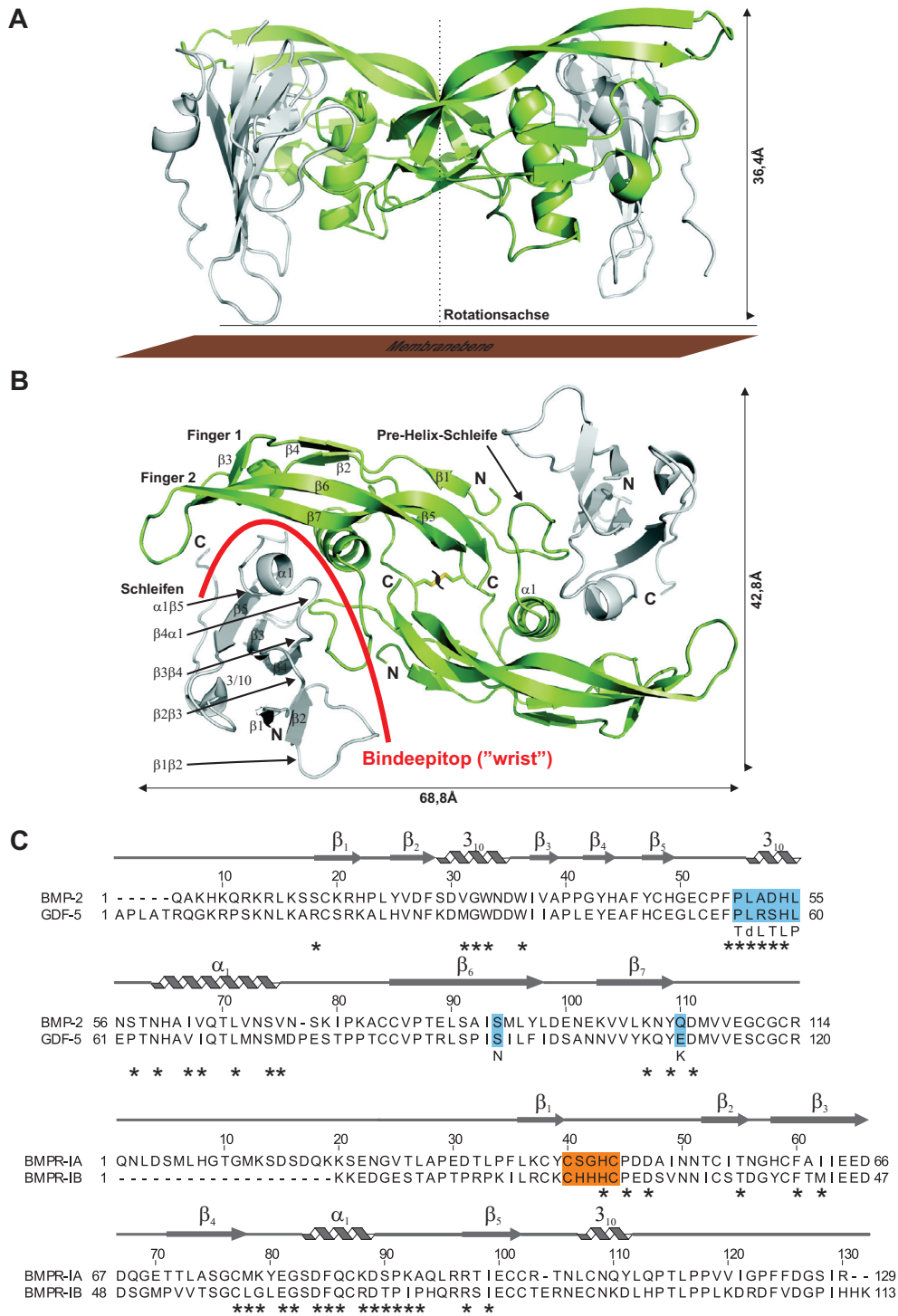


Abbildung IV-46: Struktureller Aufbau des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes und Aminosäurevergleich von BMP-2 und GDF-5 sowie BMPR-IA und BMPR-IB. A, B: Bändermodell des binären GDF-5•BMPR-IB-Komplexes. GDF-5 ist grün, BMPR-IB ist grau gefärbt. Die Sekundärstruktur wurde mit DSSP (Kabsch and Sander, 1983) bestimmt. **A:** Seitenansicht des Komplexes mit der putativen Membran (schematisch, braun) senkrecht zur Rotationsachse. **B:** Aufsicht des Komplexes mit den einzeln zugeordneten Sekundärstrukturelementen. Deutlich ist die zweifache Symmetrie zu erkennen. Die Pfeile geben die räumlichen Dimensionen des Komplexes an. **C:** Aminosäuresequenzvergleich. Sterne kennzeichnen Kontakte zwischen GDF-5 und BMPR-IB im binären Komplex (siehe A, B). Sekundärstrukturen sind über den Sequenzen angegeben. Natürlich in Menschen auftretende Mutationen in GDF-5 sind blau hinterlegt. Die in BMPR-IA und BMPR-IB rot hinterlegten Aminosäuren sind für die Liganderkennung wichtig. Der Sequenzvergleich wurde mit CLUSTALW (Larkin et al., 2007; Thompson et al., 1994) und JALVIEW (Clamp et al., 2004) erstellt.

Helix umschließen. Die größten Unterschiede treten in den Fingerspitzen auf. Dabei betragen die r.m.s. Abweichungen 2,9Å für die $\beta 2\beta 3$ -Schleife in Finger 1 und 3,4Å für die $\beta 6\beta 7$ -Schleife in Finger 2. Die $\beta 5\alpha 1$ - und $\alpha 1\beta 6$ -Schleifen zeigen ebenfalls deutliche strukturelle Veränderungen mit r.m.s. Abweichungen von 1,9Å für die post-Helix-Schleife und 1,6Å für die pre-Helix-Schleife (Abbildung IV-47, S. 136).

IV. 7. 1. 2. Induzierte Anpassung („Induced Fit“) bei Bindung von GDF-5 und BMPR-IB

Die Unterschiede zwischen freiem und gebundenem GDF-5 weisen auf eine bei Bindung von BMPR-IB erfolgende, durch BMPR-IB induzierte strukturelle Anpassung im „wrist“-Epitop von GDF-5 hin. Bei Komplexbildung verschieben sich zwei Tryptophan-Reste, Trp33 und Trp36, in Finger 1 von GDF-5 um etwa 3,1 bis 3,7Å (C α -Atome) in Richtung der BMPR-IB-Oberfläche. Zusammen mit Phe28 und Ile37 in Finger 1 sowie Ile95, Tyr109 und Met112 in Finger 2 von GDF-5 bilden Trp33 und Trp36 eine hydrophobe Tasche zur Aufnahme der Phenyl-Seitenkette von Phe66 in BMPR-IB. Diese hydrophobe Wechselwirkung wurde bereits für den BMP-2•BMPR-IA-Komplex beschrieben („knob-into-hole“-Motiv) (Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000c). Im Gegensatz zu GDF-5 erfolgt in BMP-2 bei Bindung des Typ I Rezeptors keine derartig starke Reorientierung der zwei Tryptophan-Reste, sondern nur eine leichte Verschiebung um weniger als 1,5Å, was möglicherweise auf eine unterschiedliche Bedeutung dieses Strukturmotivs in der jeweiligen Ligand-Rezeptor-Interaktion hinweist.

Die Bindungsanalyse mittels Biacore (IV. 2. 2. 1) zeigt, dass bei Mutation von Phe66 zu Alanin ein vollständiger Bindungsverlust von BMPR-IB gegenüber BMP-2 und GDF-5 auftritt. Im Vergleich dazu führt die Alaninmutation von Phe85 in BMPR-IA (Phe66 in BMPR-IB) nur zu einer 23fach niedrigeren Bindungsaffinität gegenüber BMP-2, aber keinem Verlust der Bindungsaffinität (Tabelle IX-5) (Hatta et al., 2000)). Die veränderte Affinität ist dabei auf eine niedrigere Assoziations- und höhere Dissoziationsgeschwindigkeit des BMP-2•BMPR-IA-F85A-Komplexes zurückzuführen, was auf eine duale Funktion dieses Phenylalanin-Rests schließen lässt. Einerseits könnte das Verankern von Phe66 in der hydrophoben Tasche Ligand und Rezeptor in eine Position zueinander bringen, in der die Ausbildung von weiteren nichtkovalenten, intermolekularen Wechselwirkungen begünstigt oder vielleicht erst möglich wird. Andererseits trägt das Phenylalanin zur Bindungsaffinität und somit Komplexstabilität bei. Die NMR-Struktur von BMPR-IA zeigt, dass dessen α -Helix, in der Phe85 lokalisiert ist, im freien Zustand nicht existiert (IV. 7. 4.). Erst bei Bindung an BMP-2 findet eine Umordnung der flexiblen $\beta 4\beta 5$ -Schleife in eine partiell α -helikale Konformation statt. Überträgt man die Erkenntnisse über BMPR-IA auf BMPR-IB bedeutet dies, dass bei Bildung des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes eine Umlagerung nicht nur für das Tryptophan-Motiv von GDF-5, sondern auch für Phe66 in der α -Helix von BMPR-IB erfolgt. Die Bindung von GDF-5 und BMPR-IB ist damit durch einen hoch kooperativen Anpassungsmechanismus charakterisiert.

Ein „knob-into-hole“-Motiv ist nicht nur für Phe66 in BMPR-IB, sondern auch für Phe54 am N-terminalen Ende der pre-Helix-Schleife von GDF-5 zu beobachten. Ein Vergleich von freiem und gebundenem GDF-5 zeigt, dass bei Bindung von GDF-5 an BMPR-IB Phe54 in Richtung der $\alpha 1$ -Helix von GDF-5 verschoben wird. Gleichzeitig findet eine χ_1 -Rotation der Phe54-Seitenkette um etwa 110° von der $\alpha 1$ -Helix von GDF-5 weg in Richtung des BMPR-IB-Epitops statt (Abbildung IV-47, S. 136). Nach dieser Umlagerung ragt Phe54 in eine kleine, durch Arg78, Ile80 und Met43 von BMPR-IB und Pro55, Val67 und Leu71 von GDF-5 gebildete hydrophobe Aushöhlung. Die

Alaninmutation von Phe49 in BMP-2 (Phe54 in GDF-5) führt zu einer 10fach niedrigeren Assoziationsgeschwindigkeit des BMP-2•BMPR-IA-Komplexes (Kirsch et al., 2000a). Überträgt man diese Beobachtung auf Phe54 von GDF-5 – eine GDF-5-F54A-Variante liegt nicht vor – so sollte in Analogie zu Phe66 in BMPR-IB auch Phe54 (GDF-5) zur Bindung beitragen.

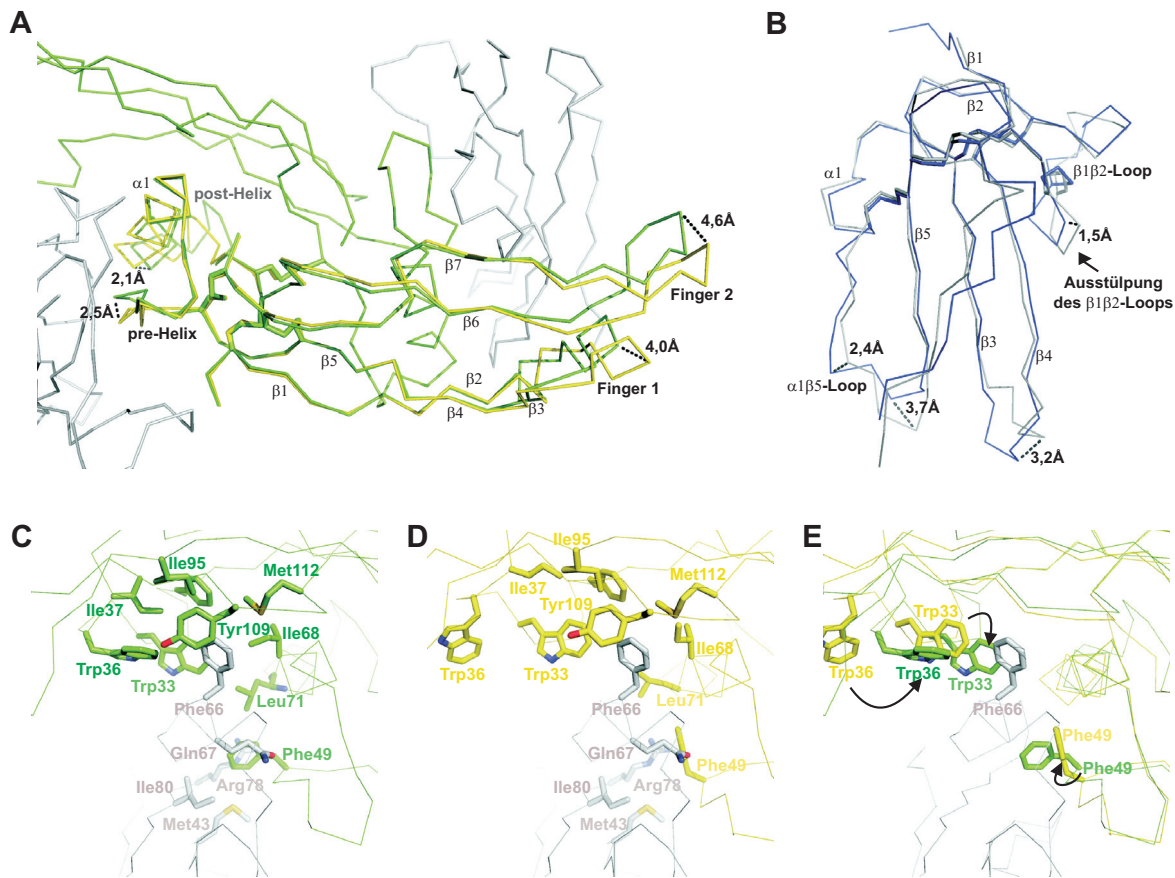


Abbildung IV-47: Induzierte Anpassung im GDF-5•BMPR-IB Bindeepitop. **A:** Die α -Atome von freiem GDF-5 (RCSB-Eintrag 1WAQ, gelb) und von gebundenem GDF-5 (grün) wurden mit der Software Pymol überlagert (r.m.s.d. α -Atome: 0,5Å; r.m.s.d. alle Atome: 1,1Å). Die größten Abweichungen treten an den Fingerspitzen und den die Helix umschließenden Schleifen auf. Die Fingerspitze von Finger 2 ist an Kristallkontakten beteiligt. **B:** Eine Überlagerung der α -Atome von BMPR-IA und BMPR-IB offenbart konformationelle Veränderungen in peripheren Schleifen (β 1 β 2-Schleife, α 1 β 5-Schleife). Die Abstände von ausgewählten, durch eine gepunktete schwarze Linie verbundenen α -Atomen sind ebenfalls gezeigt. **C:** Im GDF-5•BMPR-IB-Komplex zeigen sowohl Phe66 von BMPR-IB (grau) als auch Phe54 von GDF-5 (grün) in eine hydrophobe Tasche im jeweiligen Epitop des Bindungspartners. **D:** Bei Überlagerung der Strukturen von gebundenem GDF-5 und freiem GDF-5 (gelb) wird deutlich, dass zur Bindung von BMPR-IB (grau) eine Umlagerung im GDF-5-Epitop strikt notwendig ist, weil sonst sterische Hindernisse z.B. zwischen Trp33 und Phe66 oder Phe54 und Gln67 auftreten würden. **E:** Die Tryptophan-Reste in Finger 1 von GDF-5 verschieben sich bei Bildung des Komplexes (Pfeile) und werden Bestandteil einer hydrophoben Tasche für Phe66 (BMPR-IB). Phe54 in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 unterliegt ebenfalls einer Umlagerung und ragt im Komplex in eine hydrophobe Aushöhlung auf der BMPR-IB-Oberfläche.

Interessanterweise trägt das „knob-into-hole“-Motiv in den GDF-5•BMPR-IB- und BMP-2•BMPR-IA-Komplexen unterschiedlich stark zur Bindungsenergie bei. Offensichtlich existieren im BMP-2•BMPR-IA-Komplex zusätzliche Wechselwirkungen, die einen Verlust der „knob-into-hole“-Wechselwirkung, beispielsweise durch die Alaninmutation von Phe85 in BMPR-IA, zumindest teilweise kompensieren können. Kompensatorische Wechselwirkungen fehlen im GDF-5•BMPR-IB-Komplex, sodass die Bindungsaffinität stark von der „knob-into-hole“-Wechselwirkung abhängt. Nicht nur Phe66 (BMPR-IB) und Phe54 (GDF-5), sondern auch Aminosäuren, welche die

entsprechenden hydrophoben Taschen bilden, tragen zur Bindungsenergie bei. Auffallend ist beispielsweise, dass bei Alaninmutation von Ile62 in BMPR-IA (Met43 in BMPR-IB) die Bindungsaffinität zu BMP-2 um ungefähr den gleichen Betrag sinkt wie bei der F85A-Substitution (Tabelle IX-5, S. 237). Für Alaninmutationen der am „knob-into-hole“-Motiv beteiligten Aminosäuren Trp33, Trp36 oder Tyr109 in GDF-5 können mit Blick auf die entsprechenden Alaninmutationen in BMP-2 (W28A, W31A, Y103A) sechs- bis achtfach niedrigere Bindungsaffinitäten angenommen werden (Kirsch et al., 2000a). Für andere Reste wie Arg78 und Ile80 in BMPR-IB oder Met112 und Ile95 in GDF-5 liegen keine Daten vor. Zumindest für Arg78 ist jedoch wegen der fast parallelen Ausrichtung der Guanidinium-Gruppe zur Phenylgruppe von Phe54 und daraus resultierender π -stacking-Effekte (Flocco and Mowbray, 1994) ein Beitrag zur Bindungsstabilität zu erwarten.

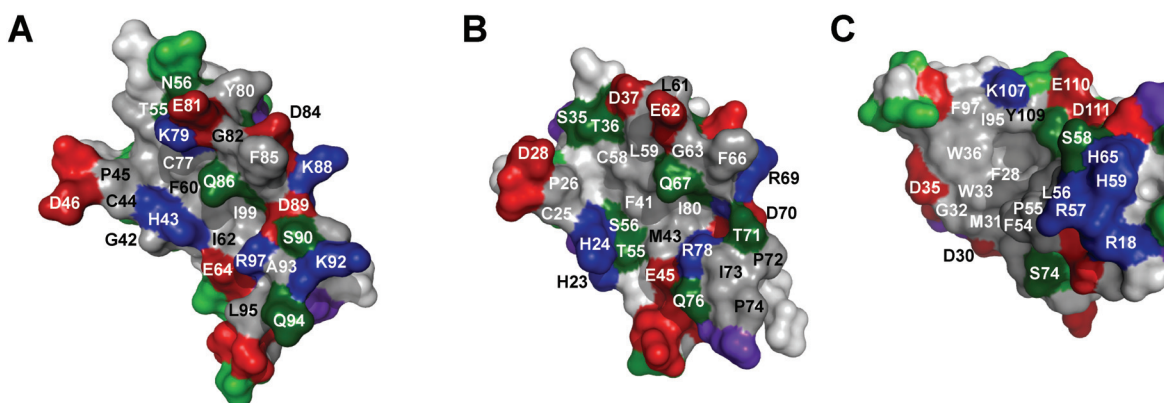


Abbildung IV-48: Oberflächendarstellung des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes. Die Oberflächenpräsentation von BMPR-IA (A), BMPR-IB (B) und GDF-5 (C) illustriert einige Unterschiede in der Architektur von BMPR-IB und BMPR-IA und veranschaulicht die Hydrophobizität im GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitop. BMPR-IB wurde um 120° entlang der Ordinate aus dem Komplex mit GDF-5 gedreht („open book view“). Anschließend wurde BMPR-IB mit BMPR-IA aus dem Komplex mit BMP-2 überlagert (α -Atome), sodass die Orientierung von BMPR-IA (A) der von BMPR-IB (B) entspricht. Die Färbung der Aminosäuren erfolgt gemäß ihrer Hydrophobizität. Dunklere Farben weisen auf Aminosäuren hin, die an der Bindung teilhaben. Polare Reste (N, Q, S, T) sind grün, negativ geladene Reste (D, E) sind rot, positiv geladene Reste (H, K, R) sind blau und hydrophobe Reste (A, C, F, G, I, L, M, P, V, W, Y) sind grau gefärbt. Deutlich ist die kompaktere Form von BMPR-IB im Vergleich zu BMPR-IA zu erkennen. Zentrale Interaktionen wie das „knob-into-hole“-Motiv von Phe66 bzw. Phe85 und die doppelzählige intermolekulare Wasserstoffbrücke von Gln67 bzw. Gln86 sind konserviert. Deutliche Unterschiede zeigen sich an der β 1 β 2-Schleife, die in BMPR-IB möglicherweise stärker positiv geladen ist und zwei unterschiedliche Konformationen annimmt. Weiterhin weist die α 1 β 5-Schleife in BMPR-IB eine deutlich höhere Hydrophobizität und eine veränderte Konformation auf, wodurch Lösungsmittel leichter in die Interaktionsfläche diffundieren kann.

Das „Einrasten“ von Phe54 (GDF-5) in die hydrophobe Vertiefung auf der Oberfläche von BMPR-IB ist verbunden mit einer Umlagerung der C-terminal folgenden Aminosäuren Glu55 bis Ser58, für die eine r.m.s. Abweichung von 1,8Å (α -Atome) bei Überlagerung von freiem und gebundenem GDF-5 bestimmt werden kann. Erst durch diese Umlagerung kommt die pre-Helix-Schleife von GDF-5 in van-der-Waals-Kontakt (4-4,5Å) zur BMPR-IB-Oberfläche, sodass eine dichte Packung im Bindeepitop gewährleistet ist. Gleiches gilt für weitere nichtkovalente Wechselwirkungen, wie die zweizählige Wasserstoffbrückenbindung zwischen Leu56 (GDF-5) und Gln67 (BMPR-IB). In der bei freiem GDF-5 beobachteten Konformation der pre-Helix-Schleife kann diese Wasserstoffbrückenbindung nicht ausgebildet werden. Weiterhin findet eine Umlagerung von Arg57 (GDF-5) statt, wodurch eine sterische Hinderung mit der β 1 β 2-Schleife von BMPR-IB

vermieden wird. Insgesamt scheinen die Veränderungen in der pre-Helix-Schleife und im Tryptophan-Motiv von GDF-5 sowie die Konsolidierung zuvor unstrukturierter Bereiche in BMPR-IB einen für die Bindung essentiellen Prozess während der Ligand-Rezeptor-Rekrutierung widerzuspiegeln.

IV. 7. 1. 3. Wechselwirkungen im GDF-5•BMPR-IB Bindeepitop

Die Kontaktfläche („buried surface area“) zwischen GDF-5 und BMPR-IB im binären Komplex beträgt 4330\AA^2 (2160\AA^2 pro Bindeepitop), wovon 2050\AA^2 (47%) Resten hydrophober Natur zugeordnet werden können. Dies bedeutet, dass im Komplex jeweils 19% der BMPR-IB-Oberfläche (1130\AA^2 ; hydrophob: 700\AA^2 , hydrophil: 430\AA^2) und der GDF-5-Oberfläche (2120\AA^2 ; hydrophob: 1330\AA^2 , hydrophil: 790\AA^2) durch den jeweiligen Bindungspartner bedeckt sind. Die Kontaktfläche der GDF-5•BMPR-IB-Interaktion ist kleiner als im BMP-2•BMPR-IAec-Komplex (2310\AA^2 pro Bindeepitop) und mit 47% hydrophoben Resten im Vergleich zu 60% hydrophoben Resten im BMP-2•BMPR-IA-Bindeepitop deutlich hydrophiler. Bei Betrachtung der Oberflächen von BMPR-IA und BMPR-IB fällt die entgegengesetzte Hydrophobizität in den $\beta_1\beta_2$ - und $\alpha_1\beta_5$ -Schleifen auf (Abbildung IV-48, S. 137). Während die $\beta_1\beta_2$ -Schleife in BMPR-IB infolge dreier Histidin-Reste (His22-His24) je nach pH-Wert des Lösungsmittels positiv geladen sein kann, setzt sich die $\alpha_1\beta_5$ -Schleife im Vergleich zu BMPR-IA aus hydrophoberen Resten zusammen, was mit dem Verlust einiger inter- und intramolekularer Wasserstoffbrücken verbunden ist. Aus Abbildung IV-48 (S. 137) und Abbildung IV-49 (S. 139) ergibt sich, dass in BMPR-IB einige Reste im β_3 -Strang, in der α_1 -Helix und in den angrenzenden β_4 - und β_5 -Strängen bei Bindung an GDF-5 zwischen 75% und 100% ihrer Lösungsmittelzugänglichkeit verlieren. Für GDF-5 trifft dies auf Reste in der N-terminalen 3_{10} -Helix, pre-Helix-Schleife und α_1 -Helix sowie einzelne Reste in den β_6 - und β_7 -Strängen zu. Vor allem hydrophobe Reste werden komplett im Bindeepitop verdeckt. Die wenigen polaren und positiv geladenen Reste, die vollständig in der Interaktionsfläche verborgen sind, setzen sich aus Gln67, Thr71, Arg78 (alle BMPR-IB) und Arg57, Ser58, Asn64 (alle GDF-5) zusammen – bis auf Thr71 und Arg78 Aminosäuren, die an Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Rezeptor beteiligt sind (Tabelle IV-24, S. 140). Die Umgebung dieser in der Interaktionsfläche verborgenen polaren Wechselwirkungen ist stark hydrophob, sodass von Wasserstoffbrücken ein hoher Beitrag zur freien Bindungsenergie zu erwarten ist. Im Gegensatz zur Situation im BMP-2•BMPR-IA-Komplex kann jedoch nur ein geringer Effekt beobachtet werden, wenn die Wasserstoffbrücke zwischen Gln67 (BMPR-IB) und Leu56 (GDF-5) durch eine Alaninmutation unterbrochen wird. Die Mutation von Gln67 (BMPR-IB) zu Alanin führt lediglich zu einer drei- bis vierfach niedrigeren Bindungsaffinität gegenüber GDF-5 und BMP-2 (IV. 2. 2. 1), was im Vergleich zur äquivalenten Mutation bei BMPR-IA (Q86A, 89fach geringere Bindungsaffinität) einen vergleichsweise geringen Bindungsverlust darstellt. Das ist umso erstaunlicher, weil die Prolinmutation von Leu56 (GDF-5) zu einem nahezu vollständigen Bindungsverlust gegenüber BMPR-IA und BMPR-IB führt (J. Nickel, persönliche Mitteilung). Durch die L56P-Mutation wird jedoch nicht nur die zweizählige Wasserstoffbrückenbindung zu Gln67 (BMPR-IB) unterbrochen; sterische Unverträglichkeiten wegen der Prolinseitenkette tragen vermutlich ebenfalls zum Verlust der Bindungsaffinität bei.

Arg57 (GDF-5) befindet sich in Nähe zu einer Ausbuchtung in der $\beta_1\beta_2$ -Schleife von BMPR-IB (Reste 21-24) und wird durch die großen Seitenketten von His24 (BMPR-IB), Arg18 und His59 (beide GDF-5) vom Lösungsmittel abgeschirmt. Zwischen der Guanidinium-Gruppe von Arg57

und den Carbonyl-Sauerstoffatomen von His23 und His24 im geschlossenen BMPR-IB-Konformer bilden sich zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Im Komplex mit dem offenen BMPR-IB-Konformer werden die Positionen der Carbonyl-Sauerstoffatome möglicherweise durch Wassermoleküle besetzt, wodurch sich ebenfalls ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Arg57 (GDF-5) und His23 und His24 (BMPR-IB) ergeben könnte. Zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Guanidinium-Gruppe von Arg18 in GDF-5 und dem Carbonyl-Sauerstoff von His24 in BMPR-IB liegen mit einer Länge von 3,4Å nur knapp oberhalb der in Tabelle IV-24 (S. 140) genannten Ausschlussgrenze. Ein weiterer Rest, dessen Umgebung sich im GDF-5•BMPR-IB-Komplex stark verändert, ist Ser58 in GDF-5. Ser58 ist an zwei Wasserstoffbrücken zu Cys58 und Thr36 in BMPR-IB beteiligt und Bestandteil einer natürlich auftretenden GDF-5-Mutation (siehe V.4.). Zusätzlich trägt Ser58 zur Abschirmung der Wasserstoffbrücke zwischen Gln67 (BMPR-IB) und Leu56 (GDF-5) bei. Alanin- und Prolinmutationen des äquivalenten Restes Asp53 in BMP-2 zeigen, dass die Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette von Asp53 und der Seitenkette von Thr55 in BMPR-IA (Thr36 in BMPR-IB) nicht zur Bindungsenergie beiträgt. Im Kontrast dazu führt die Unterbrechung der Wasserstoffbrücke zwischen dem Amid-Stickstoffatom in Asp53 und dem Amid-Sauerstoffatom in Cys77 in BMPR-IA (Cys58 in BMPR-IB) zu in einer 53fach niedrigeren Bindungsaffinität (Keller et al., 2004). Andere an intermolekularen Wasserstoffbrücken beteiligte Reste wie Asn59 in BMP-2 (Asn64 in GDF-5) tragen nicht zur Komplexstabilität bei (Kirsch et al., 2000a). Dementsprechend hat auch die Alaninmutation von Glu62 in BMPR-IB keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität zu BMP-2 oder GDF-5 (Tabelle IX-2).

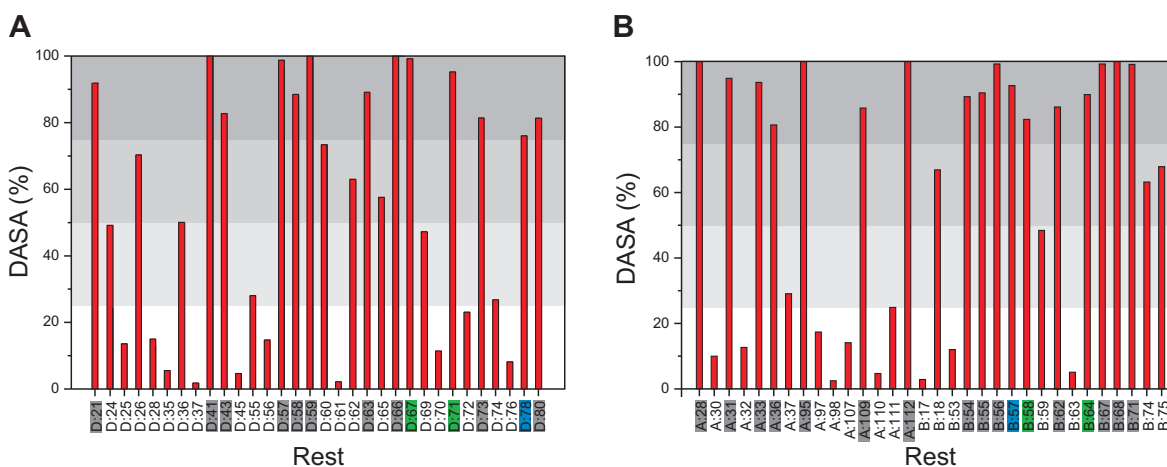


Abbildung IV-49: Lösungs zugänglichkeit von Resten in GDF-5 und BMPR-IBec im Komplex.

Angegeben ist die Veränderung der durchschnittlich vom Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche („average surface area“) von Resten in der Interaktionsfläche des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes („delta average surface area“, DASA). Ein Wert von 100% bedeutet, dass dieser Rest bei Bindung komplett im Bindeepitop vergraben ist. Ein Wert von 0% bedeutet, dass der entsprechende Rest nicht Bestandteil der Interaktionsfläche ist. Der besseren Anschaulichkeit wegen sind 25%-Abschnitte farblich hinterlegt (0, 10, 20, 30% schwarz). Reste, deren Oberfläche zu weniger als 25% dem Lösungsmittel zugänglich ist, sind gemäß ihrer Hydrophobizität farbig markiert (grau: hydrophob, grün: polar, blau: positiv geladen). **A:** Geschlossenes BMPR-IB-Konformer. Die Unterschiede zum offenen Konformer sind sehr gering. **B:** GDF-5 im Komplex mit dem geschlossenen BMPR-IB-Konformer. Wasserstoffverbrückte Reste wie Gln67 (BMPR-IB) oder Leu56 (GDF-5) sind vollständig abgeschirmt. Die am „knob-into-hole“-Motiv beteiligten Reste Phe66 von BMPR-IB und Trp33, Trp36, Ile95, Tyr109 und Met112 von GDF-5 sind ebenfalls durch eine niedrige Lösungsmittelzugänglichkeit gekennzeichnet.

Insgesamt können pro GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitop neun Wasserstoffbrückenbindungen detektiert werden, wobei diese Wasserstoffbrücken zwischen lediglich vier Resten in GDF-5 und

sechs Resten in BMPR-IB gebildet werden (Tabelle IV-24, S. 140). Drei der in GDF-5 an Wasserstoffbrücken beteiligten Reste – Leu56, Ser58 und Asn64 – befinden sich in der pre-Helix-Schleife von GDF-5. In BMPR-IB partizipieren Reste in der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife und $\alpha 1$ -Helix – Cys58, Glu62, Gly63, Asp65 und Gln67 – an Wasserstoffbrückenbindungen zu GDF-5. Zwei weitere Wasserstoffbrücken von His23 und His24 in BMPR-IB zu Arg57 in GDF-5 werden ausschließlich im Komplex mit dem geschlossenen BMPR-IB-Konformer ausgebildet. Die Wasserstoffbrücke zwischen Cys58 in BMPR-IB und Ser58 in GDF-5 involviert als einzige Hauptkettenatome. Alle anderen Wasserstoffbrücken werden zwischen Hauptketten- und Seitenkettenatomen (vier beim offenen BMPR-IB-Konformer, sechs beim geschlossenen BMPR-IB-Konformer) oder zwischen Seitenkettenatomen ausgebildet. Die Abstände und Winkel liegen alle innerhalb der Grenzen für ideale Wasserstoffbrückenbindungen (Xu et al., 1997).

BMPR-IB	GDF-5	Abstand (Å) ^b	N-O-C-Winkel (°) ^b	Wasserstoffbrücke ^c
H23 (O)	R57 (NH2)	3,0	141	MC-SC
H24 (O)	R57 (NH1)	2,4	142	MC-SC
T36 (OG1)	S58 (OG)	2,9	112	SC-SC
C58 (O)	S58 (N)	2,8	135	MC-MC
E62 (OE2)	N64 (N)	3,0	116	SC-MC
G63 (N)	N64 (OD1)	3,1	137	MC-SC
D65 (OD2)	Y109 (OH)	2,6	136	SC-SC
Q67 (NE2)	L56 (O)	3,3	130	SC-MC
Q67 (OE1)	L56 (N)	2,6	137	SC-MC

^a Die gelb hinterlegten Wasserstoffbrücken wurden nur für das geschlossene Konformer beobachtet.

^b N (O), O und C sind die wasserstoffverbrückten Donor- und Akzeptoratome. Der Mittelwert für den N-O-C-Winkel ist $149\pm 15^\circ$ für MC-MC- und $129\pm 18^\circ$ für MC-SC- und SC-SC-Bindungen (Xu et al., 1997). Die Abstände zwischen Donor- und Akzeptoratomen intermolekularer Wasserstoffbrücken kann basierend auf empirischen Untersuchungen im Mittelwert mit $2,9\pm 0,2\text{Å}$ bestimmt werden.

^c MC...Hauptkette, SC...Seitenkette

Die geometrischen Parameter wurden mit dem Programm Quanta (Accelrys) bestimmt.

Tabelle IV-24: Wasserstoffbrückenbindungen im GDF-5•BMPR-IB Bindeepitop.

Im Kern des GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitops befinden sich vier in Wasserstoffbrückennetzwerke mit den umliegenden Aminosäuren eingebundene Wassermoleküle. Zwei Wassermoleküle bilden ein „sesselförmiges“ Netzwerk um die Aminosäuren Gln67, Gly79, Glu81 (alle BMPR-IB) und Leu56 (GDF-5), zwei weitere Wassermoleküle verbrücken Cys58 (BMPR-IB), Arg57 und His58 (beide GDF-5) (Abbildung IV-50, S. 142). Die Wassermoleküle in der GDF-5•BMPR-IB-Interaktionsfläche sind im Vergleich zum BMP-2•BMPR-IA-Komplex nur schlecht vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt, sodass sie vermutlich einer erhöhten Diffusionsrate und einem stärkeren Austausch mit Solvensmolekülen unterliegen. Grund dafür ist, dass in BMPR-IB einige Reste, die in BMPR-IA die Interaktionsfläche von beiden Seiten gegenüber dem Solvens abschirmen, entweder konformationellen Veränderungen unterworfen sind oder veränderte chemische Eigenschaften besitzen. Als Beispiele seien Arg78 in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife oder Leu59, Gly60 und Leu61 in der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB genannt. Ähnlich wie für die BMPR-IA/IB^c-Chimäre gezeigt (IV. 8. 1.), nimmt die $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB eine im Vergleich zu BMPR-IA offene Konformation ein. Dadurch wird eine potentielle intramolekulare Salzbrücke zwischen Arg78 und Asp70 in BMPR-IB nicht ausgebildet. Wegen der Umlagerung von Asp70 bildet die Carboxylgruppe von Asp70 stattdessen zwei Wasserstoffbrücken zu Ser79 (OG) und Ile80 (N), wodurch die

membranzugewandte Seite des Bindepitops dem Solvens leichter zugänglich wird (Abbildung IV-50, S. 142). Im zweiten Beispiel fehlt eine räumlich anspruchsvolle Seitenkette in der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB. Anders als in BMPR-IA mit Lys79 befindet sich in der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB mit Gly60 ein Rest mit einer geringen Oberfläche. In BMPR-IA liegt die Lys79-Seitenkette ähnlich einer Klappe auf der Öffnung des Bindepitops und verhindert den Eintritt von Lösungsmittel in die Interaktionsfläche. Durch das Fehlen dieser Seitenkette in BMPR-IB wird nicht nur die membranzugewandte Seite ($\alpha 1\beta 5$ -Schleife), sondern auch die membranabgewandte Seite ($\beta 4\alpha 1$ -Schleife) des GDF-5•BMPR-IB-Bindepitops schlechter vor dem Eintritt von umgebendem Lösungsmittel geschützt.

BMPR-IB-Variante	H22S, H22G ^a	E62A	F66A	Q67A	D70A	P74A
$\Delta\Delta G^b$ (kcal mol ⁻¹)	0,6	0,4	4,7	1,0	1,0	1,1
Anteil (%) ^c	-	3,5	39,7	8,5	8,3	9,1

^a Ungefährer Wert, weil keine Alaninmutation.
^b $\Delta\Delta G = (-RT \ln K_D)_{wt} - (-RT \ln K_D)_{Variante}$ mit $R = 1,98\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ und $T = 293,15\text{K}$
^c Die freie Bindungsenthalpie ΔG° wurde zu $11,82\text{kcal mol}^{-1}$ berechnet und mit diesem Wert der jeweilige Anteil der Mutation am Gesamtbetrag ermittelt.

Tabelle IV-25: Veränderung der Bindungsenthalpie bei Alaninmutationen in BMPR-IB.

Trotz der Ausbildung von Wasserstoffbrücken in einer hoch hydrophoben Umgebung tragen diese vergleichsweise wenig zur Bindungsenergie bei, sodass die Bindungsaffinität zwischen GDF-5 und BMPR-IB zu einem Großteil auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen muss. Ein Grund könnte sein, dass das Bindepitop kaum vom Solvens abgeschirmt ist, sodass in der Interaktionsfläche lokalisierte Wassermoleküle leicht ausgetauscht und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen geschwächt werden. Die kleine Anzahl der im Bindepitop verborgenen Wassermoleküle (W1, W2, W3, W14, W16, W32, W44) sollte sich günstig auf die Entropie der Komplexbildung auswirken und zu einer Verstärkung von hydrophoben Wechselwirkungen führen. Die hohe Komplementarität der GDF-5- und BMPR-IB-Epitopoberflächen trägt über weitere nichtkovalente Interaktionen zusätzlich zur Bindungsaffinität bei. Wie die Daten in Tabelle IV-25 (S. 141) demonstrieren, kann mit dem „knob-into-hole“-Motiv von Phe66 in BMPR-IB ein Hotspot der Bindung („hot spot of binding“) (Bogan and Thorn, 1998) identifiziert werden. Diese Interaktion hat mit $4,7\text{kcal mol}^{-1}$ einen erheblichen Anteil an der freien Bindungsenthalpie, während die zweizählige Wasserstoffbrücke zwischen Gln67 (BMPR-IB) und Leu56 (GDF-5), die im BMP-2•BMPR-IA-Komplex einen Hotspot der Bindung darstellt, kaum einen Beitrag leistet. In einer der beiden Wasserstoffbrücken befinden sich Donor- (Gln67-NE2) und Akzeptoratom (Leu56-O) mit einem Abstand von $3,3\text{\AA}$ ausserhalb der für eine optimale Wechselwirkung angegebenen Grenze von $2,9\pm 0,2\text{\AA}$, was auf eine etwas schlechtere konformationelle Orientierung zwischen Gln67 (BMPR-IB) und Leu56 (GDF-5) hinweist. Der Abstand zwischen Donor- und Akzeptoratomen der zweiten Wasserstoffbrücke ist mit $2,6\text{\AA}$ vergleichsweise gering. Im Kontrast dazu weisen im BMP-2•BMPR-IA-Komplex beide Wasserstoffbrücken fast nahezu optimale geometrische Parameter auf.

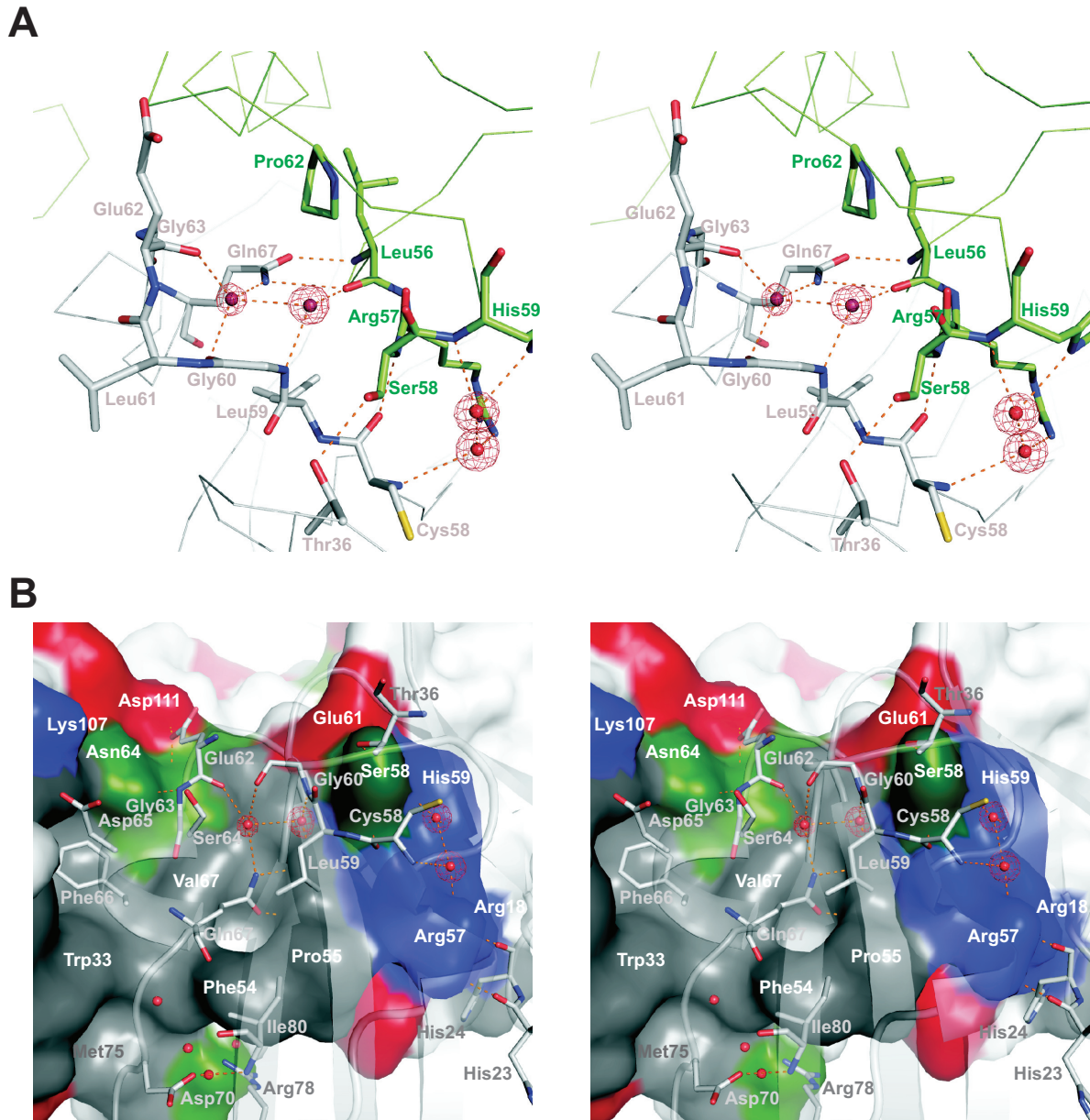


Abbildung IV-50: Wasserstoffbrücken im GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitop. **A:** Stereo-Ansicht des Bindeepitops zwischen GDF-5 (grün) und BMPR-IB (grau) um die Wasserstoffbrücke zwischen Gln67 (BMPR-IB) und Leu56 (GDF-5). Zwei Wassermoleküle (runde rote Sphären plus Elektronendichte mit 2.5σ als rotes Gitternetz) verbrücken die $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB, Gln67 von BMPR-IB und Reste in der pre-Helix-Schleife von GDF-5. Zwei weitere Wassermoleküle sind im Raum zwischen Arg57, Ser58, His59 (alle GDF-5) und Cys58, His24, Cys21, Cys25 (alle BMPR-IB, Cys21-Cys25 nicht gezeigt) lokalisiert. Die Wassermoleküle füllen Lücken in der Ligand-Rezeptor-Interaktionsfläche, die sonst von räumlich anspruchsvolleren Aminosäureresten besetzt werden können (siehe IV.8.1). **B:** Stereo-Ansicht von ausgewählten Aminosäuren in BMPR-IB auf einer Oberflächendarstellung von GDF-5. In Kontakt mit BMPR-IB stehende Reste von GDF-5 sind gemäß ihrer Hydrophobizität gefärbt und mit weißen Markierungen versehen. BMPR-IB ist als transparentes Sekundärstrukturmodell dargestellt. Ausgewählte Reste sind als graue Stäbchen gezeigt und mit grauen Markierungen versehen. Insgesamt sieben Wassermoleküle können im GDF-5•BMPR-IB-Epitop detektiert werden (runde rote Sphären). Deutlich sind die beiden „knob-into-hole“-Motive von Phe66 (BMPR-IB) und Phe54 (GDF-5) sowie das Netzwerk aus Wasserstoffbrücken zu erkennen.

IV. 7. 1. 4. Die $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB: Rotation des Rezeptors im Epitop

Wie in IV. 7. 1. 1 beschrieben, nimmt die $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB im Vergleich zur gleichen Schleife in BMPR-IA eine veränderte Konformation ein, durch die der Zugang von Solvensmolekülen zum Bindeepitop erleichtert ist. Strukturelle Untersuchungen an der Chimäre BMPR-IA/IB^{Cec} im Komplex mit BMP-2 zeigen ebenfalls zwei zu BMPR-IA unterschiedliche Konformationen der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife, wobei die Bindungseigenschaften von BMPR-IA/IB^{Cec} gegenüber BMP-2 und GDF-5 denen von BMPR-IB entsprechen (IV. 2. 2. 1). Die veränderten Konformationen der $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen in BMPR-IA/IB^{Cec} und BMPR-IB können wahrscheinlich als Ursache für die im Vergleich zur BMP-2•BMPR-IA-Interaktion 10fach höhere Dissoziationsgeschwindigkeit angesehen werden (IV. 8. 1.).

Eine der für BMPR-IA/IB^{Cec} gefundenen Konformationen der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife, die als „offen“ definiert wird, existiert in ähnlicher Form auch in BMPR-IB. Dieser „offenen“ Konformation der $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen von BMPR-IA/IB^{Cec} und BMPR-IB ist gemeinsam, dass eine potentielle intramolekulare Salzbrücke zwischen Arg78 und Asp70 (Arg97 und Asp89 in BMPR-IA) nicht ausgebildet werden kann, weil Asp70 einer Rotation in Richtung des Lösungsmittels unterworfen ist und eine neue, zweizählige Wasserstoffbrücke mit Ile80 (N) und Ser 79 (OG) entsteht. Durch die Rotation der Asp70-Seitenkette öffnet sich ein Tunnel in BMPR-IB, durch welchen Lösungsmittelmoleküle direkten Zugang zum zentralen Wasserstoffbrückennetzwerk und der Bindungstasche für Phe54 (GDF-5) erhalten. Die höhere Dissoziationsgeschwindigkeit des BMP-2•BMPR-IB-Komplexes ist auf die erhöhte Lösungsmittelzugänglichkeit zurückzuführen. Die Rotation von Asp70 in den „offenen“ Zustand beruht sehr wahrscheinlich auf einem Pro-Ile-Pro-Motiv in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife, das die Konformation der Schleife wesentlich bestimmt. Die ϕ - und ψ -Torsionswinkel von Asp70 in BMPR-IB ändern sich deutlich im Vergleich zu denen für Asp89 in BMPR-IA ($\Delta\phi=154^\circ$, $\Delta\psi=37^\circ$). Die Torsionswinkel von Pro74 in BMPR-IB und Ala93 in BMPR-IA unterscheiden sich hingegen kaum ($\Delta\phi=5^\circ$, $\Delta\psi=0,5^\circ$). Das zwischen Pro72 und Pro74 „eingeklemmte“ Ile73 kann nur eine, durch die Geometrie der beiden Proline definierte Konformation annehmen. Diese Konformation von Ile73 kollidiert mit der vermeintlichen Salzbrücke, weil notwendige geometrische Parameter nicht erfüllt werden. Die Position von Ile73 wirkt sich nicht nur nachteilig auf die erwähnte Salzbrücke aus, sondern führt möglicherweise auch zur Verschiebung von BMPR-IB im GDF-5-Bindeepitop. Bei Überlagerung der GDF-5•BMPR-IB- und BMP-2•BMPR-IA-Strukturen zeigt sich, dass die Lage von BMPR-IB und BMPR-IA im jeweiligen Ligandenepitop nicht übereinstimmt. Die Umlagerung lässt sich zunächst als eine Rotation um eine gedachte Achse zwischen den C α -Atomen von Gln67 und Ser56 veranschaulichen und mit einem Drehwinkel von $\sim 12^\circ$ quantifizieren, wobei die Seitenkette von Gln67 quasi als „Gelenk“ fungiert. Während sich die „Vorderseite“ von BMPR-IB von der Bindungsstelle in GDF-5 weg in Richtung des Lösungsmittels dreht, nähert sich die „Rückseite“ von BMPR-IB dem „wrist“-Epitop von GDF-5 (Abbildung IV-51, S. 144). Die Seitenketten von Ile73 wie auch von Pro74 zeigen direkt auf Ser74 und Met75 in der $\alpha 1\beta 6$ -Schleife von GDF-5, wodurch zwischen den genannten Resten eine im Vergleich zur molekularen Umgebung dichte Packung entsteht. Die Epitope von BMPR-IB und GDF-5 sind in diesem Bereich nicht komplementär, sodass allein der polar-hydrophobe Kontakt zwischen den Seitenketten von Ile73 in BMPR-IB und Ser74 in GDF-5 den Abstand zwischen beiden Molekülen bestimmt. In den BMP-2•BMPR-IA- und GDF-5-R57A•BMPR-IA-Komplexen sind beide Oberflächen fast komplementär zueinander; zusätzlich werden in diesen beiden Komplexen anders als im GDF-5•BMPR-IB-Komplex zwei

Wasserstoffbrücken zwischen Ser69 (BMP-2; Ser74 in GDF-5) und Gln94 sowie Arg97 (beide BMPR-IA; His75 und Arg78 in BMPR-IB) ausgebildet. Einzig die Ser69 (OG) – Arg97 (NH2) Wasserstoffbrücke wird im GDF-5•BMPR-IB-Komplex indirekt über ein verbrücktes Wassermolekül etabliert.

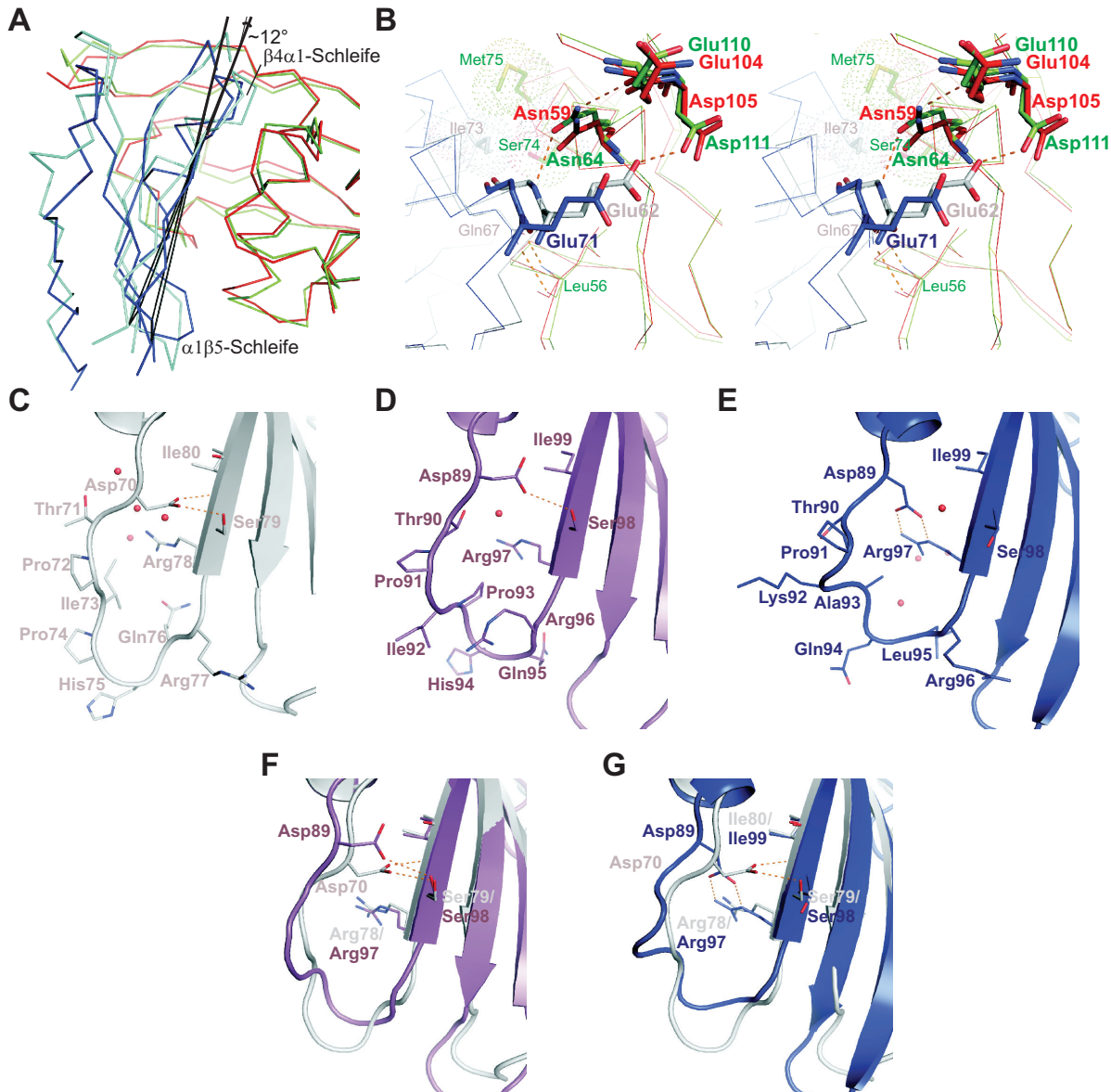


Abbildung IV-51: Einfluss der BMPR-IB- $\alpha1\beta5$ -Schleife auf die Position von BMPR-IB im GDF-5-Epitop. **A:** Darstellung des Proteinrückgrats für die übereinandergelagerten Komplexe BMP-2•BMPR-IAec (rot/blau) und GDF-5•BMPR-IBec (grün/grau). Die veränderte, gedrehte Position von BMPR-IB im GDF-5-Epitop im Vergleich zum BMPR-IA im BMP-2-Epitop entspricht einem Drehwinkel von etwa 12° (Winkel zwischen zwei Dreiecken aus Glu45, Val53 und Leu61 von BMPR-IB bzw. Glu64, Thr72 und Tyr80 von BMPR-IA). **B:** Stereo-Ansicht des GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitops entlang einer Achse von der $\beta4\alpha1$ - zur $\alpha1\beta5$ -Schleife in BMPR-IB. Die $\beta4\alpha1$ -Schleife von BMPR-IB nähert sich durch die Drehung der pre-Helix-Schleife und $\beta7$ -Strang des GDF-5 an, sodass zusätzliche Wasserstoffbrücken entstehen. Bemerkenswert ist ein hydrophober Kontakt zwischen Ile73 (BMPR-IB) und Ser74 (GDF-5), der nicht im BMP-2•BMPR-IA-Komplex zu beobachten ist. Die mögliche „Abstoßung“ könnte zu der Drehung oder Verschiebung von BMPR-IB führen. (Bildbeschreibung wird auf S. 145 fortgesetzt.)

Die Alaninmutation von Pro74 (BMPR-IB) resultiert in einer 3-4fach niedrigeren Bindungsaffinität zu GDF-5 und einer 2fach höheren Bindungsaffinität zu BMP-2 (Tabelle IX-2, S. 234), die durch eine

höhere bzw. niedrigere Dissoziationsgeschwindigkeit verursacht wird. Pro74 hat somit einen Einfluss auf die Erkennung von BMPR-IB durch BMP-2 und GDF-5 – durch Mutation zu Alanin wird die Bindungscharakteristik von BMPR-IB BMPR-IA-ähnlicher (Tabelle IX-2, S. 234). Zumindest teilweise könnten damit die sowohl sterisch als auch chemisch zueinander nicht komplementären Oberflächen der N-terminalen Reste in der $\alpha 1\beta 6$ -Schleife von GDF-5 und der Reste im Mittelteil der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB zur Verschiebung von BMPR-IB im GDF-5-Epitop beitragen. Am entgegengesetzten Ende des Epitops führt die Drehung von BMPR-IB zu einem Kontakt zwischen der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB und dem N-terminalen Teil der $\alpha 1$ -Helix von GDF-5. Die $\alpha 1$ -Helix von GDF-5 wird durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen Glu62 (BMPR-IB) und Asp111 sowie Asn64 (beide GDF-5) überbrückt. Auch die Orientierung der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB gegenüber den Resten Arg18 und Arg57 in GDF-5 ändert sich infolge der Drehung des Rezeptors. Dadurch erhöht sich der Abstand zwischen den Resten in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB und den Resten Arg18 und Arg57 am N-Terminus bzw. in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 um 1,1 bis 1,8Å.

IV. 7. 1. 5. Die $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB: Molekulare Erkennung

Für eine pentamere Ausbuchtung in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB, die drei Histidin-Reste (His22, His23, His24) und eine Disulfidbrücke (Cys21–Cys25) umfasst, sind in der Kristallstruktur trotz des hoch symmetrischen Komplexaufbaus zwei Konformere, die ähnlich einer federgespannten „Klappe“ als offen und geschlossen definiert werden können, zu erkennen. Interessanterweise zeigt die Seitenkette von Arg57 in GDF-5 – ein Rest, der die Spezifität gegenüber BMPR-IB bestimmt (Nickel et al., 2005) – genau in Richtung dieser „Klappe“, sodass sich die Frage stellt, welche strukturellen Merkmale in den $\beta 1\beta 2$ -Schleifen von BMPR-IB und BMPR-IA in welcher Art und Weise zur Bindungsspezifität beitragen. Mit der vorliegenden Struktur des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes kann diese Frage für BMPR-IB, wegen des Fehlens einer wildtypischen GDF-5•BMPR-IA-Struktur jedoch nicht für BMPR-IA beantwortet werden.

Für beide Konformationen der „Klappe“ wird Elektronendichte bei mindestens 1σ beobachtet. Wie aus Abbildung IV-52 (S. 146) ersichtlich ist, kann zudem Differenzelektronendichte für das jeweils andere Konformer detektiert werden. Normalerweise tragen flexible Bereiche in Proteinen kaum zur Röntgenbeugung bei, weil es durch die verschiedenen strukturellen Zustände zur Auslöschung von Elektronendichte kommt und die Beugungsdaten den Durchschnitt aller Einheitszellen in der zeitlichen und räumlichen Dimension repräsentieren. Dies ist eine häufige Beobachtung bei flexiblen N- oder C-Termini. Als Beispiel seien hier die N- und C-terminalen Bereiche von BMPR-IA bzw. BMPR-IB genannt, die in den Kristallstrukturen der entsprechenden Ligand-Rezeptor-Komplexe nicht interpretiert werden können. In den GDF-5•BMPR-IBec-Kristallen sind für die „Klappe“ in der

(Fortsetzung der Bildunterschrift zu Abbildung IV-51, S. 144) **C-E:** Die $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB folgt einer veränderten Konformation, in der Asp70 über zwei intramolekulare Wasserstoffbrücken mit Ser79 (OG) und Ile80 (N) in Kontakt steht (C). Eine ähnliche Konformation wird für die BMPR-IA/IB^Cec-Chimäre beobachtet (D). Beide Schleifenkonformationen werden wahrscheinlich durch das Doppelprolinmotiv von Pro72 und Pro74 (BMPR-IB) induziert, indem die sterischen Freiheitsgrade der Schleife eingeschränkt werden. Im Gegensatz dazu kann bei BMPR-IA eine zweizählige Wasserstoffbrücke zwischen Asp89 und Arg97 beobachtet werden (E). In dieser geschlossenen Konformation wird das Ligand-Rezeptor-Bindeepitop vom Lösungsmittel abgeschirmt, während die offene Konformation von BMPR-IB (C) und BMPR-IA/IB^Cec (D) weniger Schutz bietet. Wassermoleküle sind als rote Sphären dargestellt. **F, G:** Übereinanderlagerung von BMPR-IA/IB^Cec (magenta) und BMPR-IB (grau) (F) sowie BMPR-IA (blau) und BMPR-IB (grau) (G) zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Konformationen der $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen.

β 1 β 2-Schleife von BMPR-IB zwei offenbar energetisch stabile, unterscheidbare Konformere in jeweils hohen Populationen und bei gleichzeitig regelmäßiger Anordnung im Kristallgitter präsent. Dies sollte zu einem niedrigeren Besetzungsgrad („occupancy“) für die Atome der betroffenen Reste von vermutlich $\leq 0,5$ pro Konformer führen. Die $C\alpha$ -Atome dieser Schleife weisen zudem einen hohen B-Faktor auf (Abbildung IV-45, S. 132), was auf eine erhöhte Flexibilität in der Schleife deutet. Die in den Strukturmodellen von offenem und geschlossenem BMPR-IB beobachtete Elektronendichte für das jeweils andere Konformer wurde nicht mit Wassermolekülen gefüllt, weil deren Existenz nicht als gesichert gelten kann. Ausgeschlossen werden kann ferner, dass die unterschiedlichen Konformere durch Kristallkontakte induziert werden.

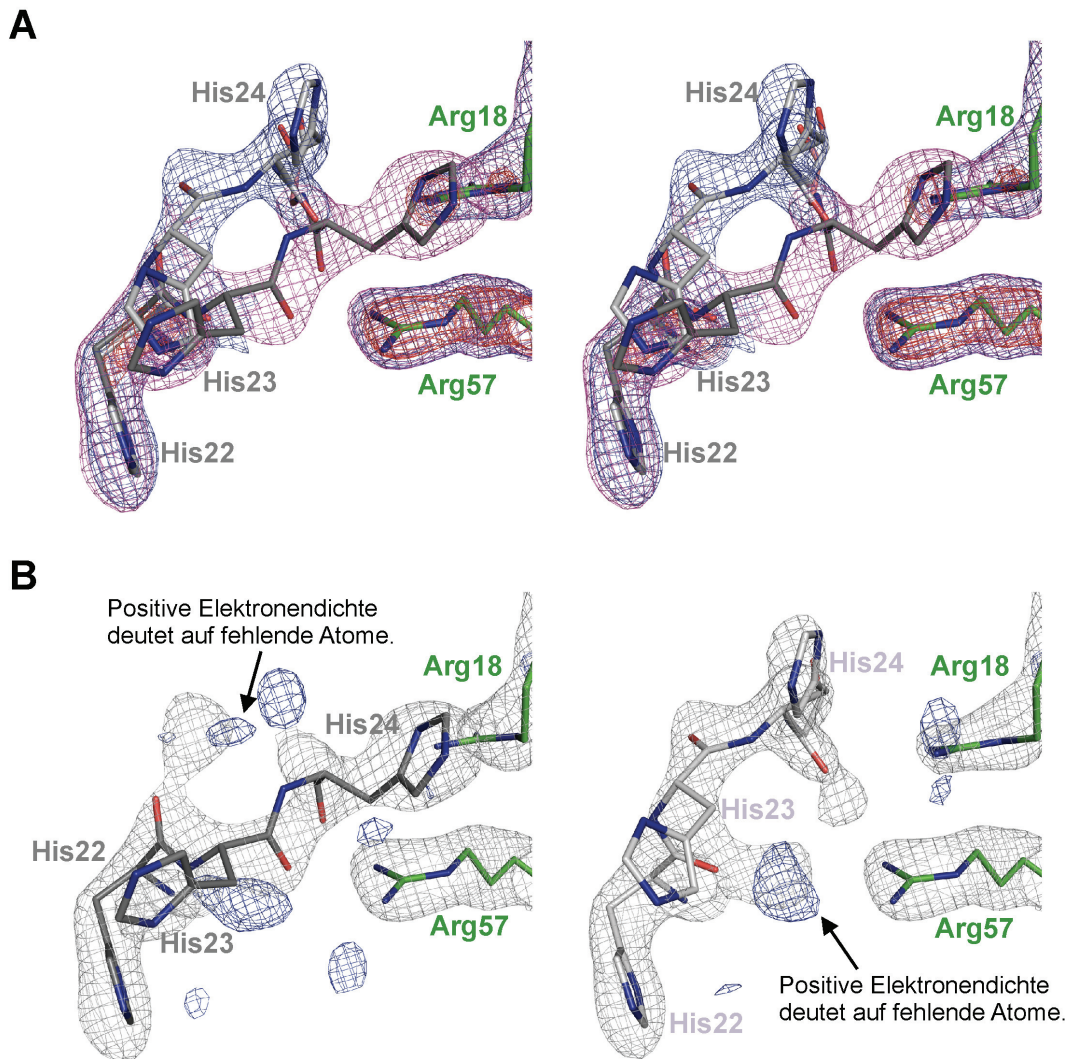


Abbildung IV-52: Elektronendichtekarten für die „Klappe“ in der β 1 β 2-Schleife von BMPR-IB. **A: Stereoansicht der Elektronendichte ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) für das cystinverbrückte Pentapeptid Cys21-His22-His23-His24-Cys25 in der β 1 β 2-Schleife in der offenen und geschlossenen Konformation bei 1σ (offen: magenta, geschlossen: grau) und 2σ (offen/geschlossen: rot). Reste von GDF-5 sind in grün gezeichnet. **B:** Elektronendichte bei 1σ für das geschlossene (links, dunkelgrau) und das offene (rechts, hellgrau) BMPR-IB-Konformer. Ansatzweise ist Elektronendichte für das jeweils andere Konformer und zusätzlich positive Differenzelektronendichte ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) bei 3σ (blau) zu erkennen. Dies weist auf fehlende Atome hin und unterstützt die Interpretation von zwei Konformeren. Die Elektronendichtekarten wurden mit dem Programm FFT (Ten, 1973) unter Verwendung der experimentellen Strukturdaten und berechneten, gewichteten Phasen (F_{obs} , $\text{Sig}F_{\text{obs}}$, PHWT bzw. PHDELWT und FOM) sowie einem „Grid-Spacing“ von $x = y = 216$ und $z = 240$ berechnet.**

Die konformationellen Freiheitsgrade des Pentapeptids in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife sind eingeschränkt. Zum Einen unterliegen die Torsionswinkel des Peptidrückgrats sterischen (und energetischen) Beschränkungen. Zusätzlich lassen sich für die drei relativ großen Histidin-Seitenketten wegen der dichten Packung der $\beta 1\beta 2$ -Schleife an den $\beta 4$ -Strang von BMPR-IB sowie die pre-Helix-Schleife und den N-Terminus von GDF-5 nicht alle möglichen Konformationen modellieren. Unter Beachtung der geometrischen Parameter von Atombindungen in Proteinen, hauptsächlich der ϕ - und ψ -Torsionswinkel von Resten im Pentapeptid (siehe Ramachandran-Plot, Abbildung IV-43, S. 125), können nur wenige Konformationen auftreten. Selbst in diesen Konformationen sind His23 (offenes Konformer) und His24 (geschlossenes Konformer) als einzige Reste des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes in generell erlaubten Regionen des Ramachandran-Plots lokalisiert ($\sim l$ und $\sim p$ Regionen nach Morris et al. (Morris et al., 1992)). Damit repräsentieren die aus dem vorliegenden Kontext (Sequenz, chemische Umgebung mit sterischen Beschränkungen) resultierenden zwei Konformationen der $\beta 1\beta 2$ -Schleife die wahrscheinlichsten energetischen Minima. Ähnlich einer unter Spannung stehenden „Klappe“ könnte das Pentapeptid zwischen diesen zwei Zuständen wechseln. Die Differenzelektronendichtekarten untermauern die Interpretation zweier Konformer, indem für das jeweils andere, „fehlende“ Konformer positive Elektronendichte detektiert wird (Abbildung IV-52, S. 146).

Die r.m.s. Abweichung zwischen den offenen und geschlossenen Konformeren beträgt $0,57\text{\AA}$ ($C\alpha$ -Atome von Cys21-Cys25). Während die beiden Cysteine und His22 nur geringe Unterschiede zeigen, weichen die Positionen der Histidine 23 und 24 in den beiden Konformationen signifikant voneinander ab (Abstand zwischen den $C\alpha$ -Atomen $\sim 2,3\text{\AA}$). Induziert wird die jeweilige Struktur in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife wahrscheinlich durch ein Umklappen der Amidbindung zwischen His22 und His23 (Drehung der Bindungsebene um etwa 159°). Die Torsionswinkel der C-terminal folgenden Reste unterscheiden sich weniger stark (Tabelle IV-26). Die Geometrie der Disulfidbrücke zwischen Cys21 und Cys25 verändert sich ebenfalls, weil sich His24 und damit auch Cys25 leicht verschieben. Die relativ großen Histidin-Seitenketten von His23 und His24 zeigen in beiden Konformeren in Richtung des Lösungsmittels. Trotz der unterschiedlichen Positionen lassen sich nur geringfügig unterschiedliche Seitenkettentorsionswinkel bestimmen (z.B. His23: $\chi_1 = -67^\circ$ und -80°).

Rest Konf.	Cys21		His22		His23		His24		Cys25	
	o	g	o	g	o	g	o	g	o	g
ϕ ($^\circ$)	-134,5	-146,9	-129,3	-122,0	-84,1	74,8	61,6	-73,1	-155,8	-127,9
ψ ($^\circ$)	151,0	131,7	-54,6	159,7	125,1	-138,2	100,9	116,1	130,8	167,8
$\Delta\phi$ ($^\circ$)	12,4		7,3		158,9		134,7		27,9	

ϕ ...Winkel zwischen $C^{i-1}-N^i-CA^i-C^i$
 ψ ...Winkel zwischen $N^i-CA^i-C^i-N^{i+1}$
 Abkürzungen: Konf...Konformer, o...offen, g...geschlossen

Tabelle IV-26: Phi- und Psi-Winkel für die Reste in den offenen und geschlossenen BMPR-IB-Konformeren ($\beta 1\beta 2$ -Schleife).

Einige Reste in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 befinden sich in unmittelbarer Nähe zu der „Klappe“ von BMPR-IB. Arg57 von GDF-5 wird von Arg18, Pro55 und His59 (alle GDF-5) umgeben. Die Seitenkette von Arg57 zeigt in eine kleine Ausbuchtung, die durch den $\beta 4$ -Strang und die „Klappe“ von BMPR-IB gebildet wird. Im geschlossenen Konformer existieren zwei Wasserstoffbrücken zwischen His24 (O; BMPR-IB) und Arg57 (NH2, GDF-5) sowie zwischen His23

(O; BMPR-IB) und Arg57 (NH1; GDF-5), die im offenen Konformer nicht ausgebildet werden (Tabelle IV-24, S. 140). Arg18 (GDF-5) und die ausladende Seitenkette von His24 (BMPR-IB) schirmen dabei Arg57 (GDF-5) und die in der Nähe von Arg57 befindlichen Wassermoleküle vom Lösungsmittel ab. Im offenen Konformer besteht kein direkter Kontakt zwischen den Histidin-Resten der „Klappe“ und Arg57 bzw. Arg18 (beide GDF-5). Vorstellbar wäre, dass in Rezeptorpopulationen mit der offenen Konformation zwei Wassermoleküle wie in Abbildung IV-53 (S. 149) dargestellt die Lücke füllen und so ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen den genannten Resten vermitteln. Arg57 (GDF-5) wird dabei allein durch die Seitenkette von Arg18 (GDF-5) vom Lösungsmittel abgeschirmt, wobei sich die kopfständigen Guanidinium-Gruppen der Arginin-Reste parallel ausrichten. Auch in der offenen Konformation ändert sich deshalb die Packungsdichte der umgebenden Reste von Arg57 (GDF-5) nur geringfügig. Während jedoch die Position von Arg57 (GDF-5) eindeutig durch Elektronendichte definiert ist, kann für Arg18 am N-Terminus von GDF-5 nur fragmentarische Elektronendichte beobachtet werden, was auf eine erhöhte Flexibilität dieses Restes hinweist. Zusätzlich zu den Hauptkettenatomen war die Position des C β -Atoms von Arg18 jedoch eindeutig definiert, sodass die Seitenkette in jedem Fall in Richtung des BMPR-IB-Bindeepitops zeigen musste.

Bei Überlagerung von BMPR-IB im GDF-5•BMPR-IB-Komplex mit BMPR-IA (aus dem Komplex mit BMP-2, RCSB-Eintrag 1REW) zeigt sich, dass His43 in der „Klappe“ von BMPR-IA und Arg57 von GDF-5 kollidieren (Abbildung IV-53, S. 149). Die Konformation der „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA ist somit nicht komplementär zur korrespondierenden GDF-5-Oberfläche. Aus diesem Grund müssen entweder Reste in der „Klappe“ von BMPR-IA oder Arg57 von GDF-5 in einem GDF-5•BMPR-IA-Komplex veränderte Konformationen einnehmen. Das Modell eines GDF-5•BMPR-IA-Komplexes offenbart, dass die Seitenkette von Arg57 (GDF-5) gedreht und in Richtung der pre-Helix-Schleife von GDF-5 zeigen könnte, ohne dass es zu Kontakten mit der „Klappe“ von BMPR-IA kommt. Alternativ könnten sich die Reste in der „Klappe“ von BMPR-IA umlagern, um den sterischen Konflikt mit Arg57 zu vermeiden. Die Aminosäurezusammensetzung der „Klappe“ von BMPR-IA ist mit Ser41, Gly42 und His43 von BMPR-IB grundsätzlich verschieden, weil das Glycin rein sterisch nicht durch geometrische Vorgaben in seinen Konformationen eingeschränkt ist. Anders als für die „Klappe“ von BMPR-IB ist deshalb für die entsprechenden Reste in BMPR-IA eine bessere Anpassungsfähigkeit an eine vorgegebene Ligandoberfläche zu erwarten. Bezüglich der Bindungseigenschaften kann die höhere Flexibilität, weil energetisch ungünstig, auch von Nachteil sein. Während die „Klappe“ von BMPR-IB in zwei passenden, gewissermaßen vorgebildeten Konformationen existiert, muss die „Bindungsfähigkeit“ im Fall der GDF-5•BMPR-IA-Interaktion erst über Umlagerungen auf Rezeptor- oder Ligandenseite hergestellt werden. Im Gegensatz zur Situation mit GDF-5 ist die Konformation der $\beta 1\beta 2$ -Schleife in BMPR-IA und BMPR-IB bei Bildung von Komplexen mit BMP-2 nicht von Bedeutung, weil in BMP-2 ein Alanin die dem Arg57 äquivalente Position einnimmt.

Die Mutation von Resten in der „Klappe“ von BMPR-IB zu den korrespondierenden Resten in BMPR-IA hat keinen Einfluß auf die Bindungsaffinität zu BMP-2 und GDF-5 (Mutationen H22S und H23G in BMPR-IB, siehe Tabelle IX-2, S. 234). Die BMPR-IBec-H22SH23G-Variante weist unveränderte Bindungsparameter auf, sodass die „Klappe“ allein nicht spezifitätsbestimmend sein kann. Möglicherweise basiert die molekulare Erkennung bzw. die Bindungsspezifität von GDF-5 und BMPR-IB auf einem kooperativen Mechanismus, bei dem drei periphere BMPR-IB-Schleifen – $\beta 1\beta 2$, $\beta 4\alpha 1$, $\alpha 1\beta 5$ – zur Ligand-Erkennung beitragen.

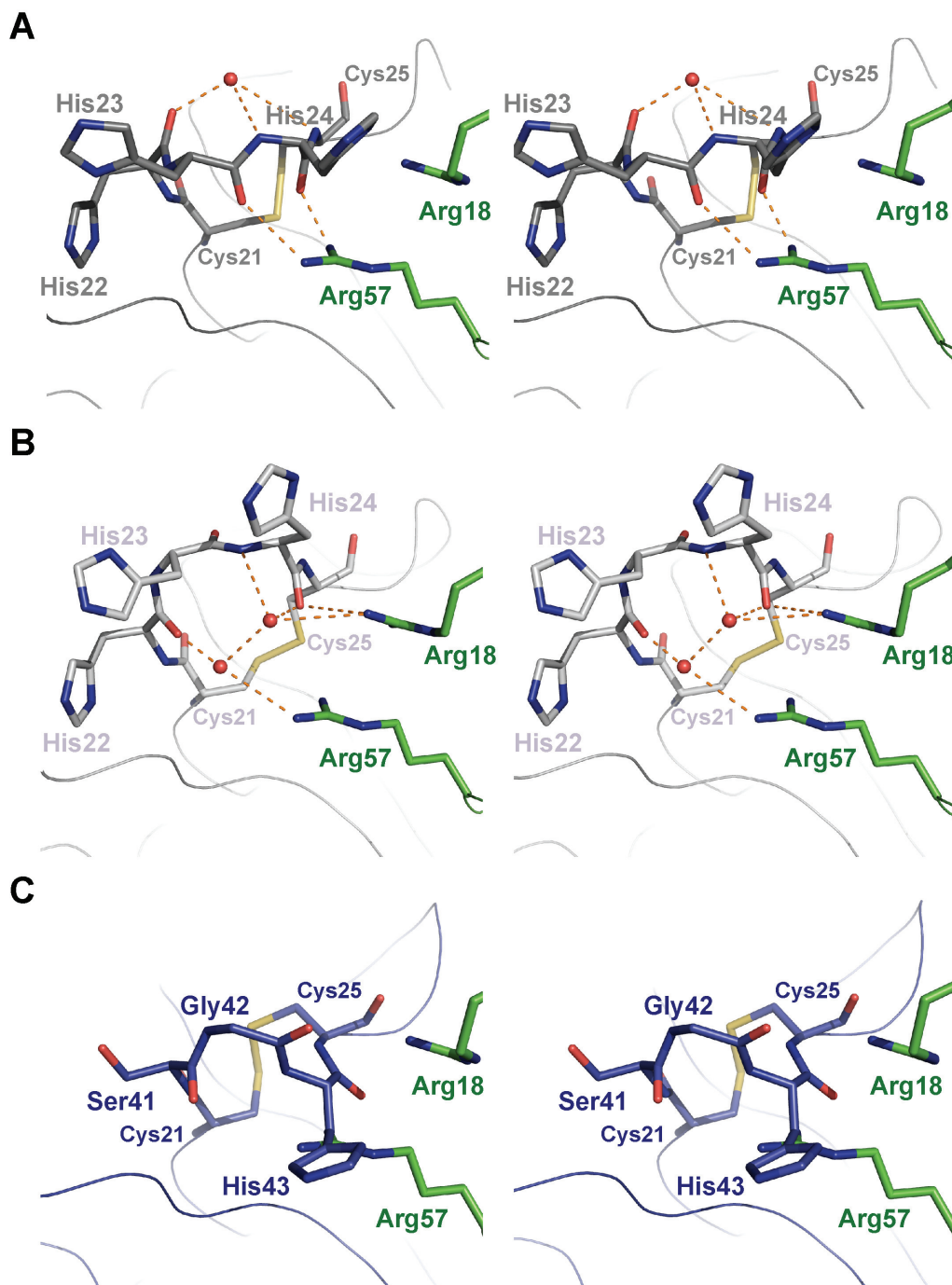


Abbildung IV-53: Die „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB in der offenen und geschlossenen Konformation. In BMPR-IB finden sich zwei vorgebildete Konformationen in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife (A, B), die beide komplementär zur GDF-5-Oberfläche sind. Im Gegensatz dazu erfordert die Bindung von BMPR-IA und GDF-5 Umlagerungen entweder von Arg57 (GDF-5) oder von den Resten in der „Klappe“ der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA (C). **A:** Stereoansicht des geschlossenen Konformers (dunkelgrau). In Molekülen mit dieser Konformation könnte ein Wassermolekül (rote Sphäre) die Hauptkettenatome verbrücken. Im Bindeepitop mit GDF-5 bilden sich zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen His23 (O), His24 (O) und Arg57 (NH1, NH2). **B:** Stereoansicht des offenen Konformers (hellgrau). Zwei Wassermoleküle könnten in Komplexen mit diesem BMPR-IB-Konformer Arg18, Arg57 (beide GDF-5) und His23 bzw. His24 (beide BMPR-IB) indirekt verbrücken. Direkte Interaktionen zwischen den genannten Resten sind nicht vorhanden, wenn von zwei unsicheren Wasserstoffbrücken zwischen Arg18 (NH1, NH2) und His24 (O) abgesehen wird, deren geometrische Parameter außerhalb der in Tabelle IV-25 angegebenen Optima liegen. **C:** Stereoansicht der entsprechenden Konformation in BMPR-IA (blau). Deutlich ist die Kollision von His43 (BMPR-IA) und Arg57 (GDF-5) zu erkennen, wenn BMPR-IA mit BMPR-IB im GDF-5•BMPR-IB-Komplex überlagert wird. In allen Abbildungen sind Reste von GDF-5 in grün dargestellt.

IV. 7. 2. Die Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes

Die Struktur des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes konnte bei einer Auflösung von 2,8Å ermittelt werden. Es werden nur auf allgemeine Unterschiede zwischen den Strukturen der GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec- und BMP-2•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexe beschrieben. Die Nomenklatur für BMPR-IA/IB^Cec entspricht der von BMPR-IA, weil beide Proteine das gleiche Grundgerüst besitzen (siehe Tabelle III-16, S. 42).

Die asymmetrische Einheit des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes setzt sich aus zwei GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Monomeren zusammen (Abbildung IV-54, S. 150). Der komplette binäre Komplex ergibt sich über Symmetriebeziehungen im Kristallgitter. Anders als die Hauptketten der beiden GDF-5-Monomere weisen die Hauptketten der beiden BMPR-IA/IB^Cec-Moleküle in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife unterschiedliche Konformationen auf, wie sie bereits für BMPR-IA/IB^Cec im BMP-2•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex beschrieben wurden (Abbildung IV-54, S. 150; siehe IV. 8. 1.). Die zwei Konformere ergeben sich nicht infolge von Kristallkontakten und geben deshalb die reale Situation im Komplex wieder. Ähnlich wie die $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB existiert die $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA/IB^Cec in einer „offenen“ und einer „geschlossenen“ Konformation. Die offene Konformation zeigt eine hohe Ähnlichkeit zur Konformation der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB (siehe IV. 7. 1. 4). Ähnlich wie durch Asp70 in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB wird durch Asp89 in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA/IB^Cec eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zu Ile99 ausgebildet. Im Gegensatz dazu wird für die geschlossene Konformation der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife in Analogie zu BMPR-IA eine intramolekulare Salzbrücke zwischen Asp89 und Arg98 beobachtet.

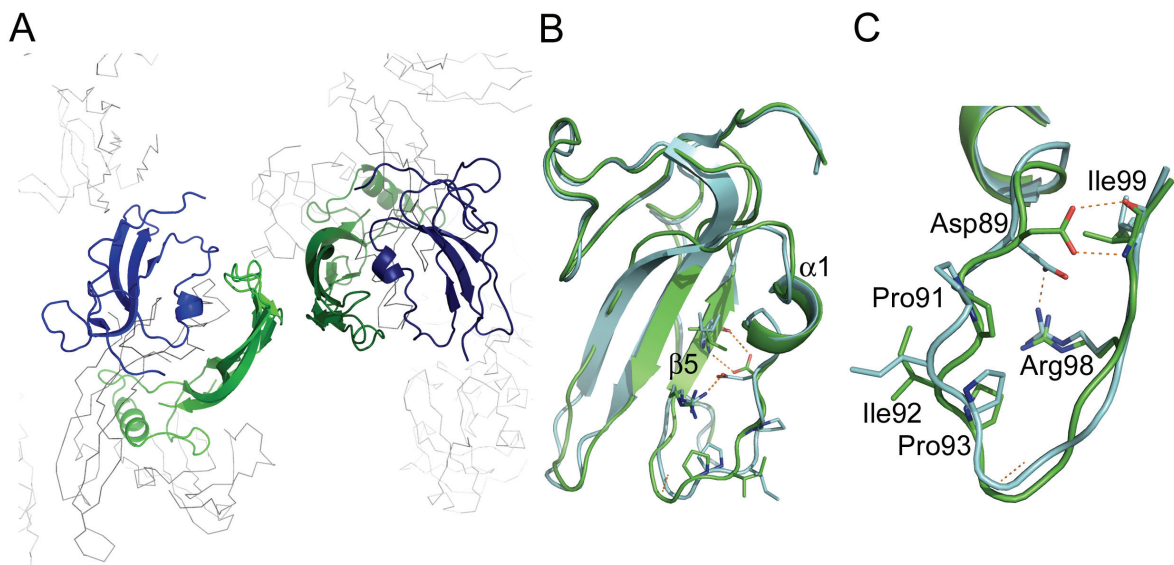


Abbildung IV-54: Struktur des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes. **A:** Asymmetrische Einheit eines GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Kristalls. Die als Sekundärstrukturen dargestellten Moleküle bilden die asymmetrische Einheit (grün: GDF-5, blau: BMPR-IA/IB^Cec). Die $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA/IB^Cec existiert in zwei Konformationen (hellblauer Rezeptor: geschlossen, dunkelblauer Rezeptor: offen). Der binäre Komplex ergibt sich aus der kristalleigenen Symmetrie (Moleküle als dunkelgraue Linien), wobei die zwei „wrist“-Epitope von GDF-5 ein offenes und ein geschlossenes BMPR-IA/IB^Cec-Konformer beherbergen. Somit ist der binäre Komplex nicht vollständig symmetrisch aufgebaut. Weitere Moleküle der Einheitszelle sind als hellgraue Linien gezeigt. **B:** Überlagerung der zwei BMPR-IA/IB^Cec-Konformere (offen: grün, geschlossen: cyan). Einzelne Reste in den $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen sind als Stäbchen dargestellt. **C:** Vergrößerung der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife aus (B). Im offenen Konformer bilden sich zwei Wasserstoffbrücken zwischen Asp89 und Ile99 (orange gestrichelt). Im geschlossenen Konformer bildet sich eine Salzbrücke zwischen Asp89 und Arg98. Eine ähnliche Situation findet sich im BMP-2•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex.

Der strukturelle Aufbau des binären GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes korreliert mit bekannten, in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Strukturen. Die C α -Atome von GDF-5 in den Komplexen mit BMPR-IB und BMPR-IA/IB^Cec lassen sich mit einer r.m.s. Abweichung von 0,9Å überlagern. In GDF-5 sind größere Abweichungen an den Spitzen des Fingers 2 (Reste 98 bis 104, r.m.s.d. 2,5Å) und an der α 1 β 6-Schleife (Reste 73 bis 81, r.m.s.d. 1,6Å) zu beobachten, während die Reste im Kern des GDF-5-Epitops um die pre-Helix-Schleife einschließlich der Seitenketten die gleichen Konformationen einnehmen. Die Unterschiede in den Fingerspitzen von GDF-5 sind auf Kristallkontakte zurückzuführen, die zwischen Ser94, Asn103, Val104, Val105, Tyr106 (alle GDF-5) eines „Monomers“ sowie Lys29, Ile38, Leu41 und Gln108 (alle GDF-5) des benachbarten „Monomers“ gebildet werden. Die Positionen der für die Erzeugung des „knob-into-hole“-Motivs wichtigen Tryptophane 32 und 36 und der anderen an diesem Bindemotiv beteiligten Reste bleiben bis auf minimale Verschiebungen von dieser Umlagerung unbeeinträchtigt. Die Änderungen in der α 1 β 6-Schleife von GDF-5 sind wahrscheinlich auf die veränderte Konformation der kontaktierenden α 1 β 5-Schleife von BMPR-IA/IB^Cec zurückzuführen. Aus diesem Grund existiert auch der im GDF-5•BMPR-IBec-Komplex beobachtete polar-hydrophobe Kontakt zwischen Ile73 von BMPR-IB (Ile92 in BMPR-IA/IB^C) und Ser74 von GDF-5 im GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex nicht.

Die Position von BMPR-IA/IB^Cec im GDF-5-Epitop stimmt mit der von BMPR-IB überein, sodass die für den BMPR-IB beschriebene Drehung im Epitop (siehe IV. 7. 1. 4) auch für den BMPR-IA/IB^C gilt und möglicherweise spezifisch für die Bindung an GDF-5 ist. Ein entsprechender Vergleich zwischen den Strukturen der GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec- und BMP-2•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexe (RCSB-Eintrag 2QJB) deutet stark darauf hin, weil BMPR-IA/IB^Cec in diesen Komplexen jeweils unterschiedlich im „wrist“-Epitop von BMP-2 bzw. GDF-5 positioniert ist. Weiterhin sind die Positionen von BMPR-IA/IB^C und BMPR-IA in Komplexen mit BMP-2 (RCSB-Einträge 2QJB und 1REW) nur geringfügig unterschiedlich.

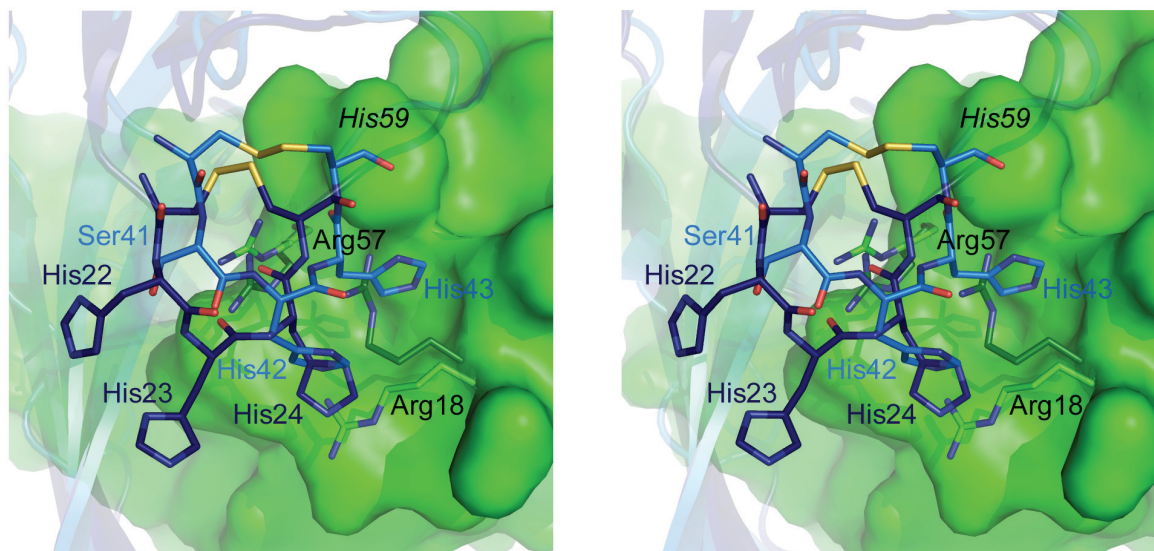


Abbildung IV-55: Vergleich der Konformation der β 1 β 2-Schleife in den GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec- und GDF-5•BMPR-IBec-Komplexen als Stereo-Ansicht. GDF-5 ist als grüne Oberfläche, Arg57 und Arg18 als grüne Stäbchen dargestellt. Die Rezeptoren sind als Sekundärstrukturmodelle in blau gezeigt. Die Reste in der „Klappe“ der β 1 β 2-Schleife sind als Stäbchen gezeichnet. Der GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplex ist dementsprechend hellgrün bzw. hellblau, der GDF-5•BMPR-IBec-Komplex dunkelgrün bzw. dunkelblau gefärbt. Die „Klappe“ von BMPR-IA/IB^Cec ist im Vergleich mit BMPR-IB um bis zu 3,4Å in Richtung der GDF-5-Oberfläche verschoben.

Strukturell ergeben sich für BMPR-IA/IB^C im Vergleich zu BMPR-IB signifikante Änderungen in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife (r.m.s.d. = 2,7Å; C α -Atome der Reste 39 bis 51 im Komplex). Im Vergleich zu BMPR-IB sind in BMPR-IA/IB^C die Reste der „Klappe“ (Cys40, Ser41, His42, His43, Cys44; entsprechen Cys21, His22, His23, His24, Cys25 in BMPR-IB) um 3,1-3,4Å in Richtung der pre-Helix-Schleife von GDF-5 verschoben, sodass direkte Kontakte zwischen His43 (BMPR-IA/IB^C), His59 und Arg18 (beide GDF-5) resultieren (Abbildung IV-55, S. 151). Anders als im GDF-5•BMPR-IBec-Komplex werden deshalb zwischen der Arg57-Seitenkette von GDF-5 und His43 (BMPR-IA/IB^C) keine Wasserstoffbrücken ausgebildet. Die Hauptketten-Torsionswinkel von Ser41, His42 und His43 in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA/IB^C entsprechen etwa denen der korrespondierenden Reste im geschlossenen BMPR-IB-Konformer. Die zusätzliche Verschiebung des Pentapeptids (Cys40-Ser41-His42-His43-Cys44) in Richtung der GDF-5-Oberfläche könnte sterische Ursachen haben.

IV. 7. 3. Die Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes

Die Kristallstruktur des ternären Komplexes aus GDF-5, BMPR-IBec und ActR-IIBec konnte nur mit geringer Auflösung bestimmt werden (siehe IV. 6. 1. 2). Im molekularen Ersatz wurde ein auf dem BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplex basierendes Modell des ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes eingesetzt. Aus der mit dem molekularen Ersatz erhaltenen, „fragmentarischen“ Elektronendichte (Abbildung IV-44, S. 128) konnten allerdings keine Informationen über mögliche Veränderungen der BMPR-IB- oder ActR-IIBec-Positionen in den entsprechenden GDF-5-Bindeepitopen gewonnen werden. Aufgrund der niedrigen Auflösung der Beugungsdaten war im molekularen Ersatz eine getrennte Suche mit den einzelnen Komponenten des ternären Komplexes (GDF-5, BMPR-IBec, ActR-IIBec) nicht möglich. Folglich bestätigt die Elektronendichte nur, dass der ternäre Komplex kristallisiert wurde.

Wie in IV. 6. 1. 2 beschrieben, mussten zur Erstellung des Strukturmodells eines ternären GDF-5-Komplexes nur wenige Reste, speziell Tyr106 im $\beta 7$ -Strang in Finger 2 von GDF-5 und Phe83 im $\beta 6$ -Strang von ActR-IIBec, angepasst werden, um ein komplementäres Bindeepitop zu erzeugen. Die Seitenketten beider Reste zeigten nach Drehung um jeweils $\chi_1 = 100^\circ$ in entsprechende hydrophobe Ausbuchtungen in der Kontaktfläche. Tyr106 von GDF-5 ist von Tyr42, Lys56, Gly58, und Trp60 (alle ActR-IIB) sowie Leu96 (GDF-5) umgeben. Phe83 von ActR-IIB zeigt in eine kleine „Tasche“ die auf einer Seite von Trp60 (ActR-IIB), Ala39 und Tyr106 (beide GDF-5) begrenzt wird und auf der entgegengesetzten Seite vom Lösungsmittel zugänglich ist (Abbildung IV-56, S. 150). Die Interaktion von Tyr106 (GDF-5) spiegelt ein klassisches, bereits in ähnlicher Form für die GDF-5•BMPR-IB-Wechselwirkung beschriebenes „knob-into-hole“-Motiv wieder. In der hydrophoben Umgebung könnten zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Hydroxylgruppe des Tyr106 von GDF-5 und Ala43 (O) und Ser44 (OG) von ActR-IIB resultieren. Wegen der vollständigen Abschirmung vom Lösungsmittel und der negativen Teilladung am Sauerstoffatom von Tyr106 (GDF-5) erfüllt diese Wasserstoffbrücke alle Voraussetzungen für einen Hotspot der Bindung, was jedoch experimentell zu beweisen ist. Interessanterweise wird ein derartiges Bindungsmotiv nicht in Komplexen von BMP-2 und ActR-IIB beobachtet (Allendorph et al., 2006; Weber et al., 2007). Andere wichtige Wechselwirkungen sind in Komplexen von BMP-2 bzw. GDF-5 mit ActR-IIB konserviert, beispielsweise die von Trp60 und von Phe83 (beide ActR-IIB). Die etwas höhere Bindungsaffinität von ActR-IIB zu GDF-5 im Vergleich zu BMP-2 könnte deshalb mit dem genannten „knob-into-hole“-Motiv zusammenhängen.

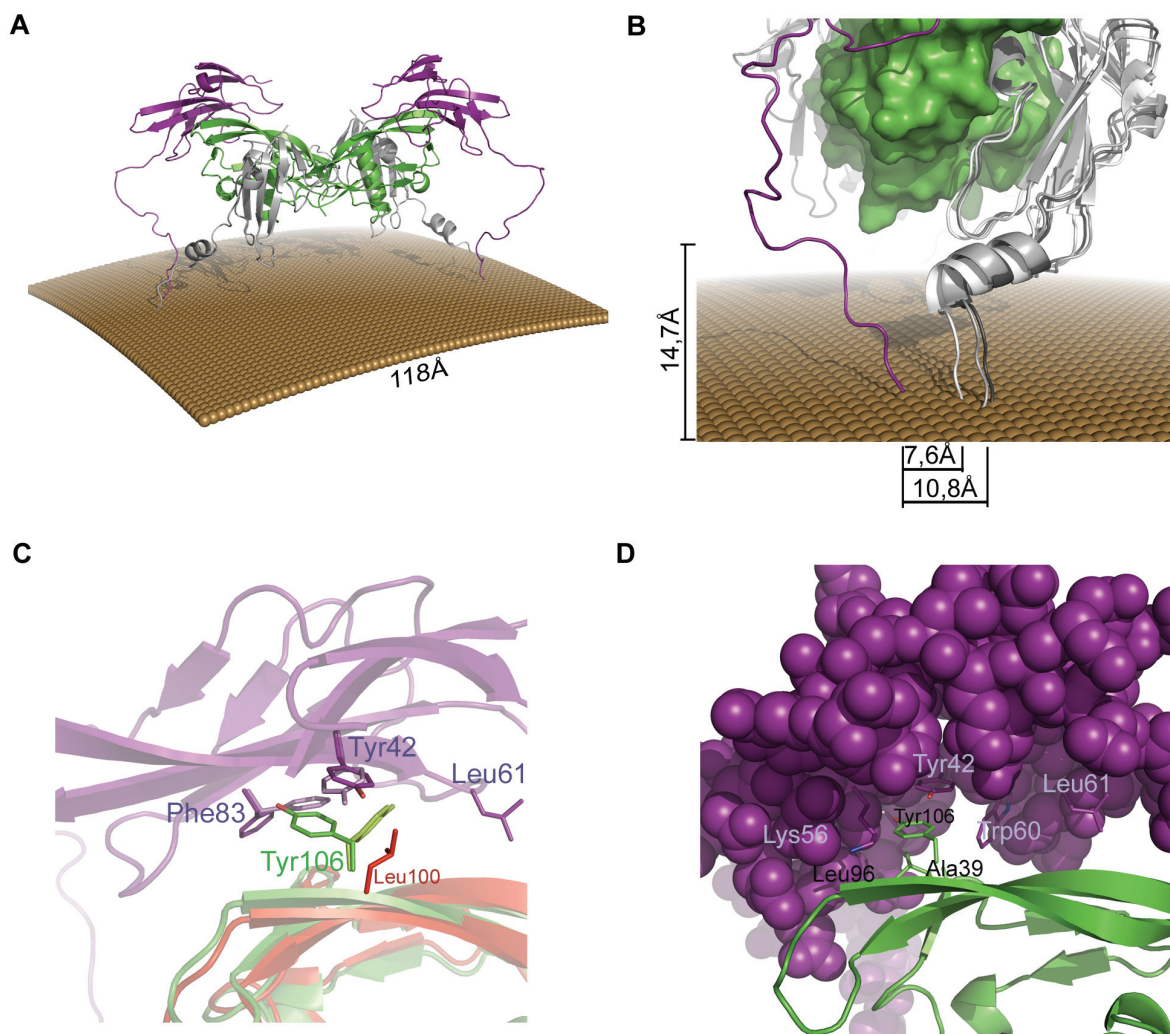


Abbildung IV-56: Strukturmodell des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIbec-Komplexes. **A:** Ansicht eines theoretischen Modells des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIbec-Komplexes als Bändermodell über einer schematisch dargestellten Membranoberfläche (GDF-5: grün, BMPR-IBec: grau, ActR-IIbec: lila, Membran: braun). Die experimentelle, mit 6,8Å niedrig aufgelöste Elektronendichte bestätigt die Gegenwart von ActR-IIbec und BMPR-IBec, und damit den ternären Komplex (siehe Abbildung IV-44). Die flexiblen, in den Kristallstrukturen nicht erkennbaren C-terminalen Reste der extrazellulären Domänen von ActR-IIB und BMPR-IB wurden mit dem Programm Quanta (Accelrys; Module Protein Design und Charmm) modelliert. Für ActR-IIbec wurde dafür eine partiell homologe Struktur verwendet (RCSB-Eintrag 2CU6) und so modelliert, dass die C-terminale Aminosäure von ActR-IIbec in der Nähe der C-terminalen Aminosäure von BMPR-IBec liegt. Der C-Terminus von ActR-IIbec ist vermutlich größtenteils flexibel. Die 12 C-terminalen Reste von BMPR-IB wurden unter Einbeziehung der Sekundärstruktur des RCSB-Eintrags 2G9Z modelliert, woraus sich – durchaus im Einklang mit Ergebnissen der NMR-Analyse von BMPR-IA (siehe IV.7.4) – eine partiell α -helikale Struktur ergibt. Die fast zur Membran parallele Position der α -Helix im Modell korreliert mit den C-terminalen, in Kristallstrukturen von BMPR-IAec bzw. BMPR-IBec noch erkennbaren Resten. Der Abstand zwischen den membranständigen C-Termini beider BMPR-IBec im Komplex mit GDF-5 beträgt etwa 94Å. **B:** Vergleich der Positionen von BMPR-IBec im GDF-5•BMPR-IBec-Komplex (mittelgrau) und in Modellen der BMP-2•BMPR-IBec- (hellgrau) und BMP-2•BMPR-IBec•ActR-IIbec-Komplexe (dunkelgrau). Zur Modellierung der letzten beiden Komplexe wurden die α -Atome von BMP-2 und GDF-5 aus bekannten Kristallstrukturen überlagert. Die durch ActR-IIbec (lila) induzierte Drehung des Typ I Rezeptors im ternären BMP-2-Komplex pflanzt sich in den C-terminalen Resten von BMPR-IBec fort, wodurch sich die Entfernung zu ActR-IIbec um etwa 3,2Å „vergrößert“ (hellgrauer und dunkelgrauer BMPR-IBec). Die beobachtete Drehung von BMPR-IBec im „wrist“-Epitop von GDF-5 (mittelgrauer BMPR-IBec) entspricht etwa der im ternären BMP-2-Komplex (dunkelgrauer BMPR-IBec), nicht jedoch derjenigen im binären BMP-2-Komplex (hellgrauer BMPR-IBec). (Bildbeschreibung wird auf S. 154 fortgesetzt.)

Angesichts der Drehung von BMPR-IB im „wrist“-Epitop von GDF-5 im Vergleich zu BMPR-IA im „wrist“-Epitop stellt sich die Frage, ob mit der extrazellulären Domäne auch die intrazelluläre (Kinase-) domäne von BMPR-IB eine veränderte Position relativ zur Kinasedomäne eines Typ II Rezeptors wie ActR-IIB einnimmt. Eine unterschiedliche Orientierung der Kinasedomänen relativ zueinander könnte die intrazelluläre Signalübermittlung beeinflussen und möglicherweise zur Erzeugung spezifischer, ligandenabhängiger Signale beitragen. Basierend auf Sekundärstrukturen von partiell homologen Proteinen aus der Proteindatenbank wurden die in den Kristallstrukturen der BMP Ligand-Rezeptor-Komplexe nicht „sichtbaren“, weil offenbar flexiblen C-terminalen Reste der extrazellulären Domäne von BMPR-IB (Reste 101 bis 113) und ActR-IIB (Reste 99 bis 119) modelliert (Abbildung IV-56, S. 150). Diese Reste besitzen bis auf einen kurzen α -helikalen Teil in BMPR-IBec (Reste Leu100 bis Gly108) keine definierte Sekundärstruktur. Anzumerken ist, dass angesichts der beobachteten Flexibilität der α -helikale Teil nur in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung ausgebildet werden könnte, beispielsweise wenn ein Teil des Rezeptors in der Membran verankert ist. Ferner zeigen NMR-Untersuchungen an freiem BMPR-IAec, dass der C-terminale Teil um den Rest 120 (Asp102 in BMPR-IB) eine helikale Sekundärstruktur annimmt, wenn mit der helix-induzierenden Verbindung Trifluorethanol (TFE) titriert wird (siehe IV. 7. 4.). Der deutlich längere C-Terminus von ActR-IIBec wurde so modelliert, dass sich dessen membrannahe Reste (Leu117-Thr119) in einem Abstand von 8Å bis 11Å ($C\alpha$ -Atome) zu den entsprechenden Resten von BMPR-IBec (His111-Lys113) befinden. Im Strukturmodell des so erhaltenen GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes befindet sich die $\beta\beta$ -Schleife von BMPR-IBec als der Membran nächster Punkt etwa 15Å über der gedachten Membranoberfläche (Abbildung IV-56, S. 153).

Abbildung IV-54 (S. 150) illustriert, wie sich Unterschiede in der Position des Typ I Rezeptors im „wrist“-Epitop des Liganden in den transmembranen und intrazellulären Teil fortsetzen könnten. Unter der Annahme, dass der Rezeptor weit gehend starr ist und sich die Lage der einzelnen Domänen relativ zueinander nicht verändert, könnte die Drehung der extrazellulären Domäne auch für die intrazelluläre Signalgebung von Bedeutung sein – aus geometrischen Erwägungen sollte sich dann der Abstand zwischen den Kinasedomänen stärker als der Abstand zwischen den C-Termini verändern. Für den ternären BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplex wurde eine der Drehung von BMPR-IB sehr ähnliche Umlagerung von BMPR-IA im „wrist“-Epitop von BMP-2 beschrieben (Abbildung IV-56, S. 153). Vermutet wurde, dass bei Bindung von ActR-IIB im „knuckle“-Epitop von BMP-2 einige Reste in den β 6- und β 7-Strängen in Finger 2 von BMP-2 strukturellen Veränderungen unterworfen sind, die sich auch auf die Innenseite der Finger, also einen Teil des „wrist“-Epitops, auswirken. Ein möglicher Einfluss der Orientierung von Typ I Rezeptoren in den „wrist“-Epitopen von Liganden auf die intrazelluläre Signalgebung ist bisher jedoch nicht experimentell untersucht worden.

(Fortsetzung der Bildunterschrift zu Abbildung IV-56, S. 153)

C: Anpassungen im „knuckle“-Epitop bei Modellierung des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes waren für Phe83 (ActR-IIBec) und Tyr106 (GDF-5) notwendig. Die ursprünglichen Konformationen dieser Reste (GDF-5 im GDF-5•BMPR-IBec-Komplex und ActR-IIBec im BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplex) sind in einem helleren Farbton angegeben, BMP-2 zum Vergleich in rot. **D:** Im theoretischen Modell des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes zeigt Tyr106 von GDF-5 (Leu100 in BMP-2) in eine hydrophobe Tasche von ActR-IIBec (van-der-Waals-Radien der Atome lila gefärbt), während Tyr106, Ala39 und Leu96 (alle GDF-5) eine hydrophobe Tasche für Phe83 (ActR-IIBec) bilden.

IV. 7. 4. Die NMR-Struktur der extrazellulären Domäne von BMPR-IA

Zur Untersuchung eines prototypischen BMP Typ I Rezeptors in freiem, ungebundenem Zustand wurde eine um den flexiblen N-Terminus verkürzte Form von BMPR-IA – BMPR-IA_{sf} – NMR-spektroskopisch untersucht. Die Experimente erfolgten im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kessler (TU München). Das isotope markierte Protein wurde wie in IV. 1. 1. 6 beschrieben hergestellt und für die NMR-Analyse vorbereitet. Anschließend wurden von J. Klages am Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München NMR-Spektren gemessen und aus den Daten die dreidimensionale Struktur von BMPR-IA_{sf} ermittelt.

IV. 7. 4. 1. Strukturbeschreibung von BMPR-IA_{sf}

Die Verkürzung von BMPR-IA_{ec} um die 28 N-terminalen Reste war notwendig, um die Qualität der Spektren zu verbessern. Anfänglich aufgenommene 2D-¹H-¹⁵N-HSQC- (engl. Heteronuclear Single Quantum Coherence) Spektren der vollständigen extrazellulären Domäne von BMPR-IA_{ec} zeigen überlappende und verbreiterte Signale, wodurch sich die Aminosäuren schwer zuordnen lassen (Abbildung IV-57, S. 156). In Spektren der verkürzten Rezeptorvariante BMPR-IA_{sf} sind die Signale hingegen deutlich abgegrenzt, sodass BMPR-IA_{sf} zur Strukturanalyse verwendet wurde (Abbildung IV-57, S. 151). Die Zuordnung von Aminosäuren und Signalen in einem 2D-¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum ist im Anhang gezeigt (Abbildung IX-10, S. 245).

Der strukturelle Aufbau von freiem BMPR-IA entspricht bis auf größere Unterschiede in den Schleifen dem von gebundenem BMPR-IA (im Komplex mit BMP-2). Das Grundgerüst aus jeweils einem antiparallelen zweisträngigen und einem antiparallelen dreisträngigen β -Faltblatt ist konserviert und wenig flexibel, wie die geringen r.m.s. Abweichungen von $0,19\text{\AA} \pm 0,07\text{\AA}$ (Rückgrat) bzw. $0,46\text{\AA} \pm 0,011\text{\AA}$ (Schweratome) innerhalb der Strukturschar von 20 BMPR-IA-Molekülen zeigen (Abbildung IV-58, S. 157). Starke strukturelle Änderungen zeigen sich für die N- und C-terminalen Reste (28-31, 118-129) und für die β 4 β 5-Schleife (Reste 81-96).

Die zwei zentralen β -Faltblätter sind über zwei Disulfidbrücken zwischen Cys38-Cys59 und Cys53-Cys77 verknüpft. Drei weitere Disulfidbrücken verknüpfen periphere Schleifen mit den β -Faltblättern. Der β 5-Strang nimmt eine zentrale Rolle ein. Sowohl die β 4 β 5-Schleife als auch die C-terminale Schleife mit einer kurzen 3_{10} -Helix werden durch den β 5-Strang über Disulfidbrücken zwischen Cys101 und Cys87 sowie Cys102 und Cys107 stabilisiert. Die Cys87-Cys101-Disulfidbrücke tritt in zwei verschiedenen, etwa gleich populierten Konformationen ($\Delta\chi_1 \sim 180^\circ$) auf, wobei Cys101 im β 5-Strang fixiert, Cys87 in der β 4 β 5-Schleife jedoch mit einer durchschnittlichen Abweichung von $2,23\text{\AA} \pm 1,15\text{\AA}$ vergleichsweise flexibel ist. Hinsichtlich der Variabilität der gesamten β 4 β 5-Schleife stellt Cys87 jedoch einen Ankerpunkt dar. Eine weitere Disulfidbrücke im fünfzähligen Disulfidbrückennetzwerk führt zu der bereits beschriebenen „Klappe“ in der β 1 β 2-Schleife (IV. 7. 1. 5), für die mit r.m.s. Abweichungen von $1,52\text{\AA} \pm 0,55\text{\AA}$ (Cys40-Cys44) nur eine geringe konformationelle Freiheit innerhalb der Strukturschar gefunden wird. Gleiches gilt für die 3_{10} -Helix und die sich anschließenden C-terminalen Reste (Leu111-Pro117). Dies könnte mit der amphiphatischen Natur der C-terminalen Region zusammenhängen, indem hydrophobe Reste an die hydrophobe Oberfläche des dreisträngigen β -Faltblatts packen. Insgesamt tragen die Disulfidbrücken zusammen mit hydrophoben Wechselwirkungen und einem Netzwerk aus 22 intramolekularen Wasserstoffbrücken wesentlich zur Stabilität und Rigidität von BMPR-IA bei,

sodass eine globuläre Struktur auch in freiem, ungebundenem Zustand aufrecht erhalten werden kann.

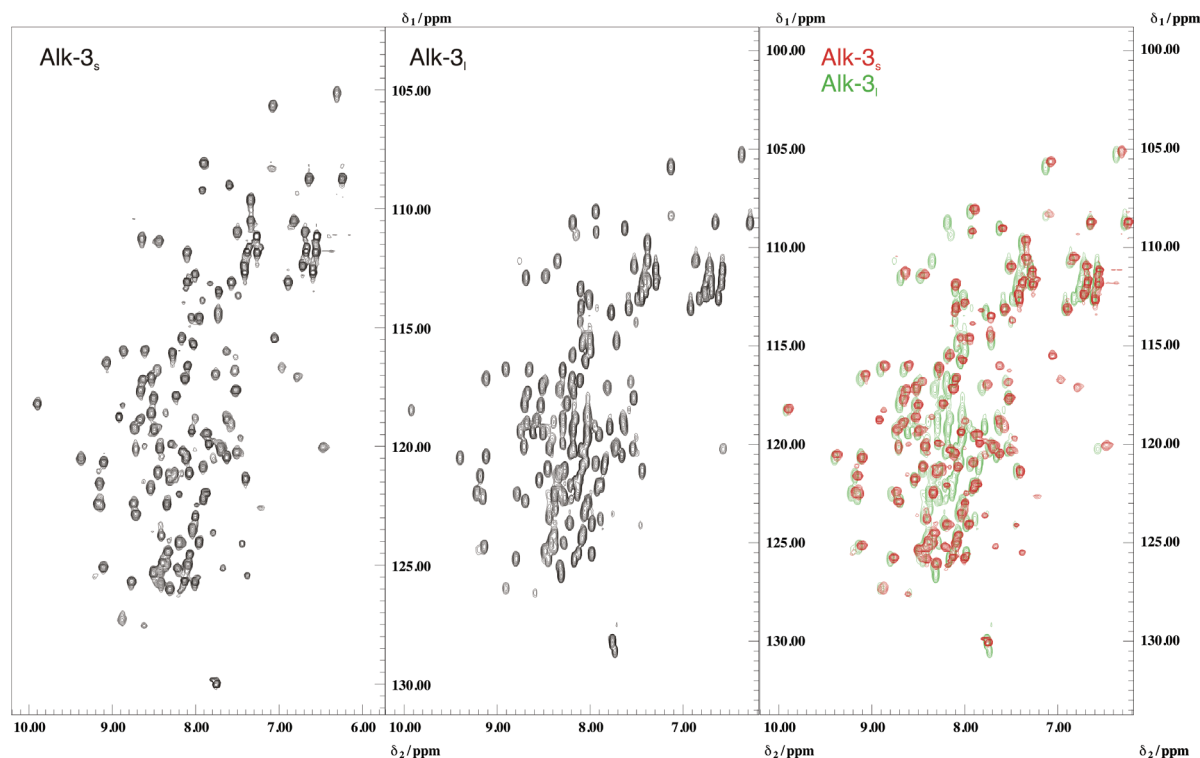


Abbildung IV-57: 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von BMPR-IAec und BMPR-IAsf. Links: BMPR-IAsf. **Mitte:** BMPR-IAec. **Rechts:** Überlagerung der Spektren von BMPR-IAec und BMPR-IAsf. Deutlich ist die Verbesserung der Spektrenqualität nach Entfernung der N-terminalen Reste zu erkennen.

IV. 7. 4. 2. Vergleich der Strukturen von freiem und gebundenem BMPR-IA

Die Strukturen von BMPR-IA in freiem und gebundenem Zustand unterscheiden sich nur wenig. Im Einklang mit der geringen Divergenz des zentralen β -Faltblatt-Grundgerüsts zwischen den BMPR-IA-Molekülen der NMR-Strukturschar ergeben sich für eine „gemittelte“ BMPR-IA-NMR-Struktur nur geringe Änderungen im Vergleich zur Kristallstruktur von BMPR-IA (r.m.s.d. der $\text{C}\alpha$ -Atome $1,35\text{\AA}$). Die größten Unterschiede zeigen sich in den $\beta 1\beta 2$ - und $\beta 4\beta 5$ -Schleifen mit r.m.s. Abweichungen von $2,1\text{\AA}$ ($\text{C}\alpha$ -Atome Cys40-Asn51) bzw. $4,1\text{\AA}$ ($\text{C}\alpha$ -Atome Lys79-Arg96). Diese beiden Schleifen spielen eine Rolle bei der Erkennung von BMP Liganden, sodass auf deren Struktur näher eingegangen werden soll.

Die Aminosäurereste Cys40-Cys44 in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA befinden sich im Komplex mit BMP-2 („gebundener Zustand“) durchschnittlich $2,7\text{\AA}$ ($\text{C}\alpha$ -Atome) näher an der BMP-2-Oberfläche (Abbildung IV-58, S. 157). Die ϕ -, ψ - und χ -Torsionswinkel dieser Reste verändern sich kaum; die Verschiebung betrifft die gesamte Schleife, was auf eine induzierte Anpassung durch energetisch attraktive Wechselwirkungen zwischen den Resten in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA und der pre-Helix-Schleife von BMP-2 hindeutet.

Am interessantesten ist das Fehlen der α -Helix, die in gebundenem BMPR-IA beobachtet wird und die Aminosäurereste Gly82-Asp89 in der $\beta 4\beta 5$ -Schleife umfasst. Im freien Zustand ist für die $\beta 4\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA keine geordnete Struktur zu erkennen (Abbildung IV-58, S. 157). Die Reste Met78 und Arg96 bilden die Ankerpunkte dieser Schleife. Für einzelne Reste wie Phe85 sind Abweichungen von bis zu $8,6\text{\AA}$ zwischen den $\text{C}\alpha$ -Atomen von freiem und gebundenem BMPR-IA

zu beobachten. Cys87 weist vermutlich aufgrund der stabilisierenden Wirkung der Disulfidbrücke zu Cys101 im $\beta 5$ -Strang die geringsten Unterschiede zwischen freiem und gebundenem Zustand auf.

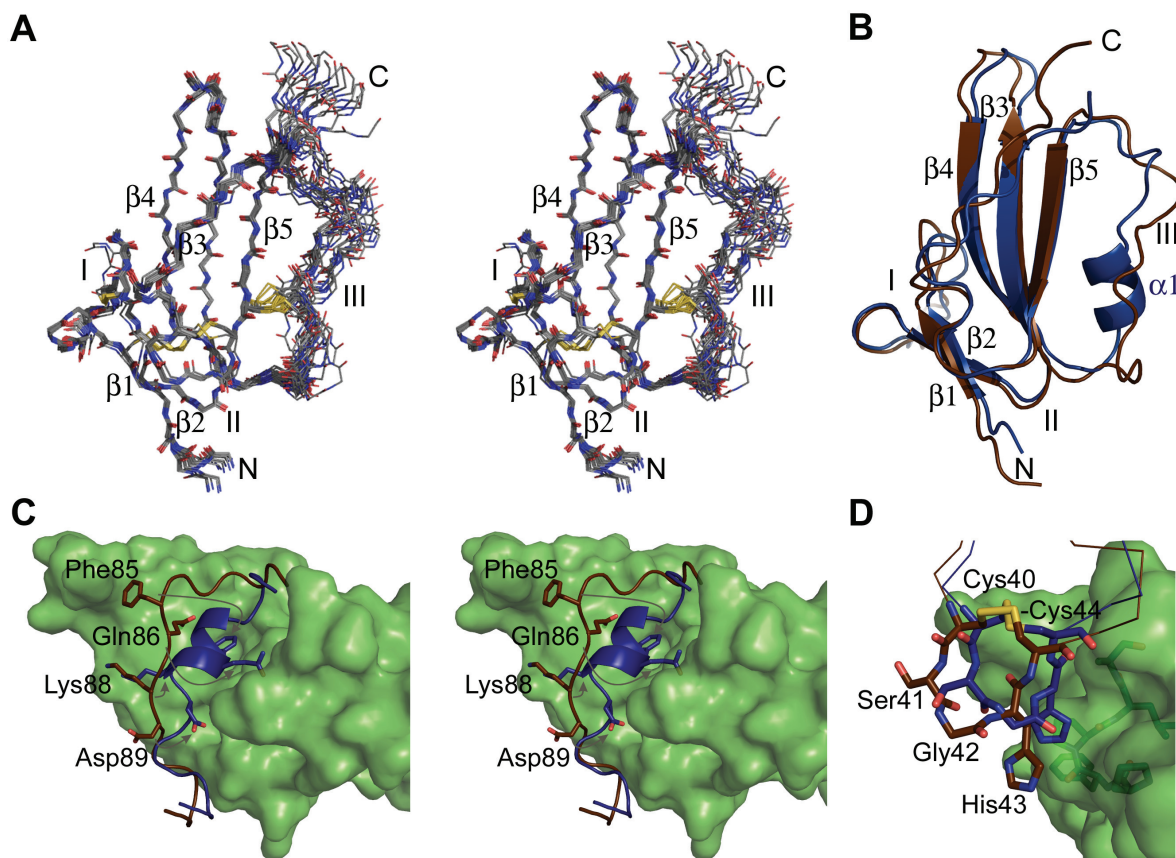


Abbildung IV-58: NMR-Struktur von BMPR-IA. **A:** Stereo-Darstellung der BMPR-IAsf-Hauptketten (C-, CA-, N-, O-Atome) von 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie, die durch „simulated annealing“-Berechnungen erhalten wurden („Strukturschar“). Offensichtlich existieren für die $\beta 1\beta 2$ -Schleife, insbesondere jedoch für die $\beta 4\beta 5$ -Schleife und die C- und N-Termini von BMPR-IA keine definierten Strukturen, sodass für diese Bereiche eine hohe strukturelle Variabilität bzw. Flexibilität resultiert. Die Schleifen sind wie folgt gekennzeichnet: I... $\beta 1\beta 2$, II... $\beta 2\beta 3$, III... $\beta 4\beta 5$. **B:** Überlagerung der NMR-Struktur (α -Atome der β -Stränge) von ungebundenem BMPR-IA (rot) und der Kristallstruktur von gebundenem BMPR-IA (blau), dargestellt als Sekundärstruktur-Präsentation. Während das Grundgerüst von freiem und gebundenem BMPR-IA strukturell weitgehend konserviert ist, zeigen sich konformationelle Änderungen in den peripheren Schleifen, beispielsweise der $\beta 4\beta 5$ -Schleife. Die α -Helix in gebundenem BMPR-IA fehlt in freiem BMPR-IA. **C:** „Induced fit“ der $\beta 4\beta 5$ -Schleife bei Bindung von BMPR-IA und BMP-2 in Stereo-Ansicht. BMPR-IA in freiem Zustand ist der Struktur von BMPR-IA im Komplex mit BMP-2 überlagert. Für die Interaktion wichtige Aminosäuren wie Phe85 und Gln86 befinden sich in der potentiellen α -Helix und sind bei Komplexbildung einer Umlagerung unterworfen. BMP-2 ist als grüne Oberfläche, die $\beta 4\beta 5$ -Schleifen von freiem BMPR-IA und gebundenem BMPR-IA sind als rote respektive blaue Linien und einzelne Aminosäuren als Stäbchen dargestellt. Asp89 von BMPR-IA bildet im Komplex mit BMP-2 eine intramolekulare Salzbrücke mit Arg97, durch die das Bindeepitop vom Lösungsmittel abgeschirmt wird. **D:** „Induced fit“ der $\beta 1\beta 2$ -Schleife bei Komplexbildung. Die Torsionswinkel der drei Reste des gezeigten Pentapeptids („Klappe“) von BMPR-IA ändern sich bei Bindung nur geringfügig. Der Abstand dieser Schleife zur BMP-2-Oberfläche ändert sich jedoch vermutlich infolge attraktiver Wechselwirkungen. His43 in der „Klappe“ liegt im Komplex in einer durch Pro48, Phe49 und Pro51 in der pre-Helix-Schleife von BMP-2 gebildeten Mulde (unter der Oberfläche durchscheinende Stäbchen).

Obwohl Cys87 in der Mitte der $\beta 4\beta 5$ -Schleife lokalisiert ist, kann kein stabilisierender Effekt auf die Konformation dieser Schleife beobachtet werden. Eine Analyse der chemischen Verschiebung der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome und $^3J_{\text{HNHA}}$ -Kopplungskonstanten der an der Helix beteiligten Reste deutet darauf hin, dass trotz der ungeordneten Struktur eine Tendenz zur Helixbildung

vorhanden ist (Abbildung IX-11, S. 246). Um experimentell zu bestätigen, dass die α -Helix in einem „werdenden“ Zustand („in statu nascendi“) existiert, wurde mit Trifluorethanol (TFE) titriert. TFE fördert die Helixbildung in Peptiden (Buck, 1998; CammersGoodwin et al., 1996), weshalb bei einer von TFE induzierten α -helikalen Umlagerung in der $\beta 4\beta 5$ -Schleife die chemische Verschiebung von beteiligten Aminosäuren verändert sein sollte. Wie Abbildung IV-59 (S. 159) zeigt, verursachen schon geringe TFE-Konzentrationen von 1% (v/v) signifikante Veränderungen in den C- und N-Termini und der $\beta 4\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA. Eine Titrationsreihe mit steigenden Konzentrationen an TFE in der BMPR-IA-Lösung ergibt die stärksten Veränderungen bei der chemischen Verschiebung der $H\alpha$ -Atome von Cys87 und Lys88 (+100ppb bei 10% (v/v) TFE). Die chemische Umgebung der benachbarten Reste Phe85 und Asp89 ändert sich in deutlich geringerem Ausmaß ($\Delta\delta (H\alpha) \sim +50$ ppb bei 10% (v/v) TFE). Weil alle Aminosäurereste in der potentiellen α -Helix Veränderungen zeigen, ist davon auszugehen, dass die α -Helix in freiem Zustand nicht ausgebildet wird. Bereits kleine Veränderungen der chemischen Umgebung – beispielsweise bei Annäherung an eine Ligandenoberfläche – reichen jedoch aus, um die Helixbildung zu induzieren. Demnach liegt die α -Helix in einem „werdenden“ (engl. nascent) Zustand vor, wie er von Dyson et al. (Dyson et al., 1988) definiert wurde. Die beschriebenen Umlagerungen und damit verbundenen konformationellen Änderungen korrelieren zudem mit den Ergebnissen aus ITC-Titrationsen (IV. 2. 2. 2). Berechnungen zum Beitrag der konformationellen Entropie an der Gesamtentropie der Komplexbildung zeigen, dass flexible Bereiche in den Bindungssepitopen von Ligand und Rezeptor bei Bindung fixiert werden. Weil BMP-2 bei Bindung des Rezeptors nur geringen strukturellen Veränderungen vor allem in der pre-Helix-Schleife unterworfen ist (Kirsch et al., 2000c), kann ein Großteil der entropisch ungünstigen konformationellen Entropie strukturellen Veränderungen in BMPR-IA zugeschrieben werden, was im Einklang mit den Ergebnissen aus der NMR-Spektroskopie steht. Energetisch kompensiert werden die Umlagerungen durch vergleichsweise starke polare Wechselwirkungen wie der zentralen zweizähligen Wasserstoffbrücke zwischen Gln86 (BMPR-IA) und Leu51 (BMP-2) (Keller et al., 2004).

Die Reste der α -Helix in der $\beta 4\beta 5$ -Schleife (Ser83-Lys88) sind zwischen BMPR-IA und BMPR-IB hoch konserviert (Abbildung IV-46, S. 134), während sich die C-terminal folgenden Reste in ihrer Identität zu fast 100% unterscheiden. Wie die Struktur des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes zeigt, ist die α -Helix in BMPR-IB auf eine einzige Umdrehung verkleinert (BMPR-IA: 1,6 Umdrehungen), was womöglich auf die veränderte Konformation der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife zurückzuführen ist. Dennoch ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass analog zu freiem BMPR-IA auch in freiem BMPR-IB die α -Helix nicht vorliegt. In beiden Fällen befinden sich die jeweils die Bindungsaffinität bestimmenden Reste Phe66 bzw. Gln67 (BMPR-IB) und Phe85 bzw. Gln86 (BMPR-IA) im helikalen Segment, sodass womöglich erst die Ausbildung der entsprechenden Interaktionen zum Liganden zur Helixbildung führen könnte.

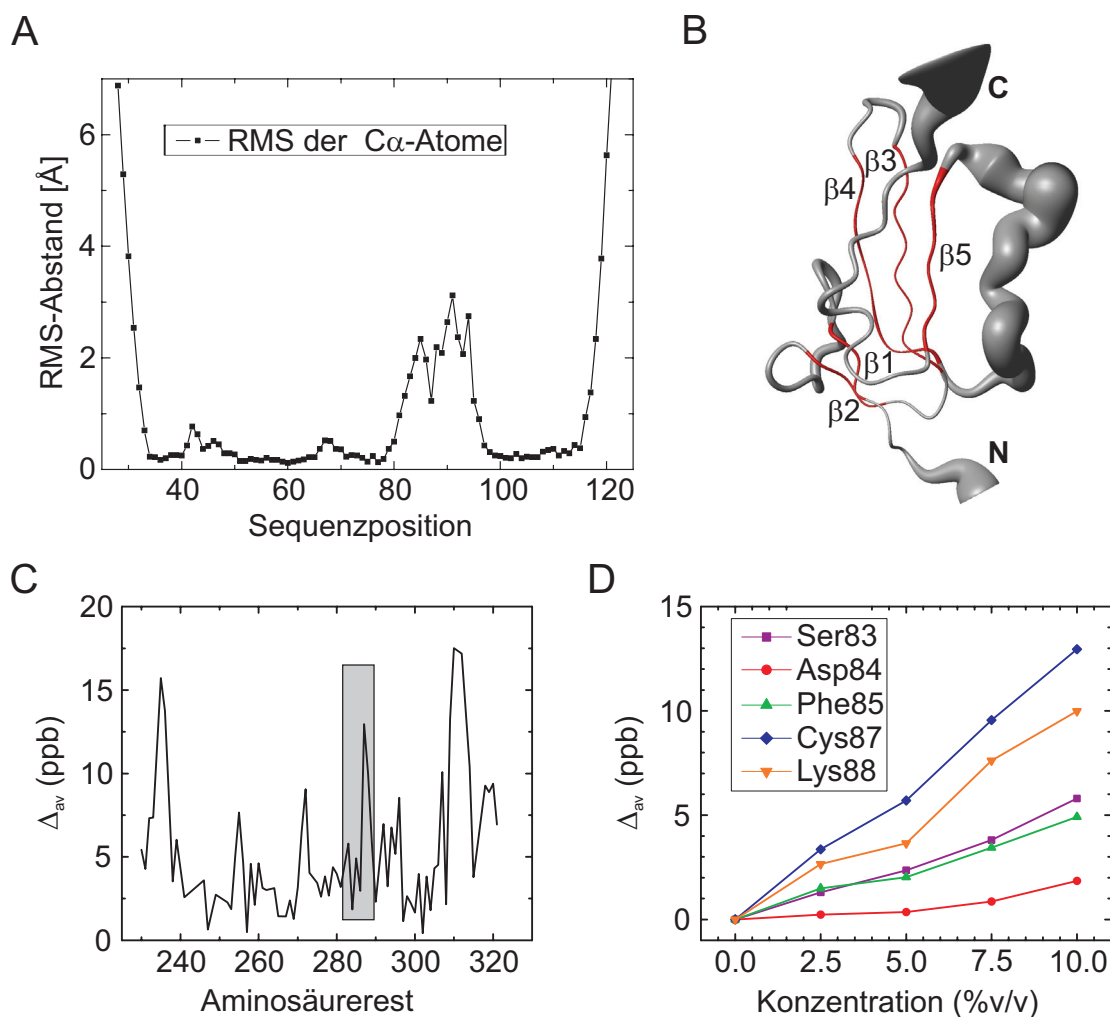


Abbildung IV-59: Flexibilität in BMPR-IA und „statu nascendi“ der α -Helix. Die Bilder wurden der Publikation von Klages et al. (Klages, 2008b) entnommen. **A, B:** Das r.m.s.d.-Diagramm (A) und die sogenannte Schlauch-Ansicht der BMPR-IA-NMR-Struktur (B) veranschaulichen die strukturelle Variabilität in der β 4 β 5-Schleife und in den N- und C-Termini von BMPR-IAsf. Je größer der Durchmesser des Schlauches, desto größer ist die strukturelle Variabilität in diesem Bereich. **C, D:** Bei Zugabe von 1% (v/v) Trifluorethanol (TFE) verändert sich die chemische Verschiebung (Δ_{av}) einiger Aminosäurereste in BMPR-IA. Insbesondere in den C- und N-Termini sowie den Schleifen, die die β -Stränge verbinden, sind deutliche Veränderungen zu verzeichnen (C). Grau hervorgehoben ist die β 4 β 5-Schleife. Im N-terminalen Bereich der β 4 β 5-Schleife existiert in gebundenem BMPR-IA eine α -Helix, die in freiem Zustand nicht ausgebildet wird, sondern in einem „werdenden“ Zustand („statu nascendi“) vorliegt. Die aufgrund der Wasserstoffverbrückung enthalpisch günstige, aber entropisch ungünstige Bildung der α -Helix erfolgt wahrscheinlich erst durch Veränderungen in der Umgebung, beispielsweise durch Kontakt zur Ligandenoberfläche. Am stärksten veränderte sich die chemische Umgebung von Cys87 und Lys88 bei Titration mit TFE (D).

IV. 7. 4. 3. 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des BMP-2•BMPR-IAsf-Komplexes

Die Veränderungen in BMPR-IA bei Bindung an BMP-2 sollten zusätzlich mittels NMR-Messungen untersucht werden. Spektren eines Komplexes aus ^{15}N -markierten BMPR-IAec und BMP-2 weisen stark verbreiterte, überlappende Peaks auf, was den flexiblen N-terminalen Resten von BMPR-IAec zuzuschreiben ist. Der entsprechende Komplex mit BMPR-IAsf konnte aus Löslichkeitsgründen nicht präpariert werden. Eine Überlagerung der 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren vom Komplex und von freiem BMPR-IAsf zeigt nicht nur Veränderungen von einzelnen, sondern fast allen NMR-Signalen,

Sequenzhomologie auf, was zu der Frage führt, weshalb trotz dieser Unterschiede BMP-2 hochaffin gebunden werden kann. Zur Erforschung der promiscuen, mit einer Bindungsaffinität von jeweils ~ 1 nM hochaffinen Bindung zwischen BMP-2 und BMPR-IA bzw. BMPR-IB wurde ein Komplex aus BMP-2 und einer den BMPR-IB imitierenden, auf dem Grundgerüst von BMPR-IA aufbauenden Rezeptorvariante strukturell charakterisiert (Kotzsch et al., 2008). Die Gründe zur Herstellung dieser BMPR-IA/IB^C-Chimäre liegen in der schlechten Qualität von BMP-2•BMPR-IB^C-Kristallen, die entweder Röntgenstrahlen nicht beugten oder nur sehr uneinheitliche, nicht auswertbare Beugungsmuster hervorbrachten (T. Müller, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu haben Kristalle des BMP-2•BMPR-IA/IB^C-Komplexes sehr gute Beugungseigenschaften, sodass mehrere Datensätze mit Röntgenbeugungsdaten aufgenommen, prozessiert und durch molekularen Ersatz analysiert werden konnten.

Obwohl der allgemeine Aufbau des BMP-2•BMPR-IA/IB^C-Komplexes dem des BMP-2•BMPR-IA-Komplexes (Keller et al., 2004) entspricht, zeigen sich im Detail strukturelle Veränderungen in einigen Schleifen der Rezeptorchimäre. Hervorzuheben sind hierbei Unterschiede in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife des Rezeptors. Diese Schleife existiert in zwei unterschiedlichen Konformationen, die als „offen“ und „geschlossen“ definiert werden, je nachdem, ob die Ligand-Rezeptor-Interaktionsfläche vom Lösungsmittel abgeschirmt wird („geschlossen“) oder nicht („offen“). Sowohl offene als auch geschlossene Konformationen in BMPR-IA/IB^C werden vermutlich von Pro93 (Ala93 in BMPR-IA^C) induziert, weil durch das resultierende Pro-X-Pro-Motiv (Pro91-Ile92-Pro93) bedingte sterische Einschränkungen möglicherweise die veränderten Konformationen in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife erzwingen. Die geschlossene Konformation der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA/IB^C weist Ähnlichkeiten mit der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA^C im Komplex mit BMP-2 auf. Im offenen Zustand wird eine Umlagerung von Asp89 beobachtet, was zum Verlust einer intramolekularen, zweizähnigen Salzbrücke mit Arg97 führt. Stattdessen kann sich durch das „Herausschwingen“ der Asp89-Seitenkette in Richtung des Lösungsmittels eine Wasserstoffbrücke zwischen Asp89 und Ile99 ausbilden. Gleichzeitig wird die Interaktionsfläche dem Lösungsmittel besser zugänglich. Experimente mit weiteren BMPR-IA/IB-Chimären (siehe Tabelle III-16, S. 42 und IV. 2. 2. 1) deuten auf einen Zusammenhang zwischen der offenen Konformation der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife und den mittels Biacore gemessenen Bindungsparametern von BMPR-IB bzw. BMPR-IA/IB^C gegenüber BMP-2. So weisen BMP-2•BMPR-IB- bzw. BMP-2•BMPR-IA/IB^C-Komplexe eine etwa 10fach höhere Dissoziationsgeschwindigkeit als der BMP-2•BMPR-IA-Komplex auf, was sich mit einer möglichen lokalen Destabilisierung durch eine schlechtere Abschirmung der Interaktionsfläche vom Lösungsmittel deckt.

Ferner zeigt ein Strukturvergleich der BMP-2•BMPR-IA/IB^C- und BMP-2•BMPR-IA-Komplexe, dass die promiscuen Bindungseigenschaften zwischen BMP-2 und beiden Rezeptoren auf in der Interaktionsfläche vergrabene Wassermoleküle zurückgeführt werden können. Einige der von Wassermolekülen besetzten Aussparungen im BMP-2•BMPR-IA-Bindeepitop werden im BMP-2•BMPR-IA/IB^C-Komplex durch Aminosäureseitenketten von BMPR-IA/IB^C besetzt. In beiden Fällen resultiert eine dichte Packung, zum einen durch vergrabene Wassermoleküle, zum anderen durch direkte Aminosäurekontakte. Die Prinzipien der promiscuen Interaktion lassen sich in vier Punkten zusammenfassen: (1) Die Bindungsdeterminanten sind in den BMP-2•BMPR-IA/IB^C- und BMP-2•BMPR-IA-Komplexen konserviert. (2) Nicht homologe Aminosäuren sind einander chemisch ähnlich, wobei leichte Änderungen der Bindungsaffinität, vor allem der

Dissoziationsgeschwindigkeit, beispielsweise durch die Modulation von Bindung-Hotspots erreicht werden. Als Beispiele sei die von hydrophoben Resten umgebene Wasserstoffbrücke zwischen Leu51 (BMP-2) und Gln86 (BMPR-IA) genannt. (3) Wassermoleküle dienen als „Platzhalter“, füllen Aussparungen in der Interaktionsfläche und verstärken elektrostatische Wechselwirkungen. (4) Sterische Änderungen an peripheren Schleifen regulieren die Solvenz Zugänglichkeit des Bindeepitops und damit die Stabilität des Komplexes, was sich in den Dissoziationsgeschwindigkeiten bemerkbar macht.

Zusätzlich können weitere Strukturmerkmale bedeutend zur Bindungspromiskuität und -spezifität beitragen, wie eine vor kurzem erschienene Publikation zur Rezeptorrekrutierung durch BMP-6 demonstriert (Saremba et al., 2008). Dabei wurde gezeigt, dass eine Glycosylierung an Asn73 (BMP-2) essentiell für die Bindungsfähigkeit von ActR-I, nicht jedoch BMPR-IA und BMPR-IB ist. Ein Strukturmodell des BMP-6•ActR-I-Komplexes lässt vermuten, dass der Zuckerrest den Rezeptor kontaktiert und möglicherweise zusätzliche Wasserstoffbrücken in der erweiterten Interaktionsfläche etabliert werden. Obwohl dieser Ligand der BMP-5-Untergruppe *in vitro* (niedrige) Bindungsaffinitäten für BMPR-IA ($K_D=1,6\mu\text{M}$), BMPR-IB ($K_D=390\text{nM}$) und ActR-I ($K_D=39\mu\text{M}$) aufweist (jeweils immobilisierte Liganden), erfolgt die Signalgebung *in vivo* überwiegend über ActR-I (Ebisawa et al., 1999), den Rezeptor mit der niedrigsten Bindungsaffinität unter den drei Rezeptoren, was nur mit Blick auf durch Korezeptoren oder Modulatorproteine vermittelte Aktivierungsmechanismen erklärbar ist.

Das extrazellulären Modulatorproteinen bei der Regulierung von BMP-Signalen eine bedeutende Rolle zukommt, wird mit der Entdeckung neuer Effektoren immer deutlicher. Diese wirken nicht nur inhibierend, wie z.B. Chordin, Follistatin oder Noggin, sondern auch stimulierend, wie beispielsweise RGMs oder Endoglin. Ein Beispiel, wie gleichzeitig agonistische und antagonistische Aktivitäten in einem Modulatorprotein „kodiert“ werden und in Abhängigkeit vom zellulären Kontext in Erscheinung treten, findet sich bei Crossveinless-2 (CV-2). Die Bindung von CV-2 an BMP-2 erfolgt durch VWC1, der N-terminal ersten von fünf aufeinanderfolgenden von-Willebrand-Faktor Typ C Domänen in CV-2. Die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur eines Komplexes aus BMP-2 und VWC1 zeigt, dass die N-terminale, 33 Aminosäuren umfassende Subdomäne („SD1“) flach auf der äußeren Seite der Finger von BMP-2 aufliegt und auf dieser Oberfläche durch eine Disulfidbrücke verankert wird (Zhang et al., 2008). Zusätzlich ragt ein kurzes, acht Aminosäuren umfassendes N-terminales Peptid („Clip“) ähnlich einer Papierklammer in das „wrist“-Epitop von BMP-2. Mutagenesedaten beweisen, dass dieser Clip essentiell für die hochaffine Bindung von VWC1 an BMP-2 ist und die hohe Bindungsaffinität nur durch die kooperative Funktion von SD1 und Clip entsteht. Mit diesen – fast minimalen – strukturellen Voraussetzungen blockiert VWC1 sowohl die Bindung von Typ I als auch Typ II Rezeptoren. Andere Antagonisten wie Noggin oder Follistatin blockieren ebenfalls beide Rezeptorbindeepitope über ähnliche Mechanismen, sind jedoch wesentlich „voluminöser“ und besitzen eine abweichende molekulare Architektur. Aus den Gemeinsamkeiten aller drei Antagonisten lassen sich strukturelle Merkmale ableiten, die erforderlich sind, um die Signalgebung von BMP-Liganden effektiv zu inhibieren.

IV. 8. 2. Strukturelle Veränderungen bei phenotypischen Mutationen in BMPR-IA

Genetische Untersuchungen an Personen mit juveniler Polyposis (engl. juvenile polyposis syndrome, JPS), einer krebsartigen Erkrankung des Kolorektums mit einem abnorm verstärktem Wachstum

von Darmpolyphen, zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen Mutationen in den Genen für BMPR-IA und Smad4 und dem Auftreten dieser Krankheit besteht (Howe et al., 2001; Howe et al., 2004). Die Inaktivierung von BMPR-IA oder Smad4 in den Epithelzellen der Darmschleimhaut führt zum Verlust von apoptischen Signalen, die durch BMPs ausgelöst werden. Damit einhergehend führt die Inaktivierung des BMP-Signalwegs zu einer erhöhten Zellproliferation, sodass BMPR-IA bzw. Smad4 eine Tumor-Suppressor-Funktion in Epithelzellen zugeschrieben werden kann (Auclair et al., 2007). Während diese pathologischen und molekularbiologischen Untersuchungen ein mittlerweile differenziertes und präzises Bild der BMP-Funktion in Darmepithelzellen zeichnen, waren bisher keine Informationen über die molekularen Effekte von Mutationen in BMPR-IA verfügbar. Während der Verlust der BMP-Signalübermittlung durch Nonsense-Mutationen in BMPR-IA, beispielsweise durch Einführung von Stop-Codons, erklärbar ist, stellte sich die Frage nach der Wirkungsweise von Missense-Mutationen im extrazellulären Teil von BMPR-IA. Aus diesem Grund wurden drei BMPR-IAec-Varianten mit den Mutationen P34R, Y39D und T55I rekombinant hergestellt und biophysikalisch analysiert sowie zusätzlich zellbiologische Untersuchungen mit transfizierten BMPR-IA-Varianten durchgeführt (Kotzsch et al., 2008). Die Experimente zeigen, dass die Varianten BMPR-IA-Y39D und -T55I keine Bindungsaffinität zu BMP-2 besitzen und dessen Signale nicht in das Zellinnere übermitteln können. Die extrazellulären Domänen von BMPR-IA-Y39D und BMPR-IA-T55I sind nicht korrekt gefaltet, was jedoch die Expression der Rezeptorvarianten, den intrazellulären Transport an die Zelloberfläche und den Einbau der Rezeptorvarianten in die Zellmembran nicht beeinträchtigt. Letzteres gilt auch für die P34R-Mutante, die im Gegensatz zu den Y39D- und T55I-Mutanten eine dem wildtypischen BMPR-IA entsprechende Faltung und Bindungseigenschaften gegenüber BMP-2 aufweist. Allerdings ist die Signalaktivität der P34R-Mutante reduziert. Dies kann möglicherweise auf eine zusätzliche Proteaseschnittstelle zurückgeführt werden, die durch die P34R-Mutation entsteht und wodurch sich die Proteinstabilität verringern könnte. Alternativ käme eine schwächere Wechselwirkung mit signalstimulierenden Modulatorproteinen wie DRAGON (RGMb) in Betracht. In den Y39D- und T55I-Mutanten ist offenbar die Bildung von Disulfidbrücken beeinträchtigt. Durch die Einführung eines Isoleucins an Position 55 von BMPR-IA wird zum Einen eine intramolekulare Wasserstoffbrücke mit der $\beta 2\beta 3$ -Schleife zerstört. Zum Anderen vertragen sich nur wenige Konformationen der Isoleucin-Seitenkette mit den sterischen Beschränkungen in der $\beta 2\beta 3$ -Schleife, was höchstwahrscheinlich zu einer Destabilisierung des Proteins während der Faltung führt. Eine Mutagenesestudie zeigte ferner, dass Ser und Val an Position 55 toleriert werden, eine BMPR-IA-T55A-Variante jedoch eine 9fach niedrigere Bindungsaffinität hat. An Position 39 ist ein hydrophober Rest für eine korrekte Faltung erforderlich. Polare Seitenketten, beispielsweise in Asp, scheinen die Konformation der $\beta 1\beta 2$ -Schleife zu destabilisieren, was sich im Falle falsch verbrückter Cysteine auf den gesamten Rezeptor auswirkt. NMR-spektroskopische Analysen an BMPR-IA zeigen, dass π - π -stacking-Interaktionen zwischen Tyr39 und Asn51 im $\beta 2$ -Strang und Gln109 in der kurzen C-terminalen 3_{10} -Helix wahrscheinlich sind. Die Mutation von Tyr39 zu Asp würde diese stabilisierenden π - π -stacking-Interaktionen unterbrechen und sich deshalb negativ auf die Faltung von BMPR-IA auswirken. Obwohl wie in IV. 8. 1. beschrieben BMPR-IA und BMPR-IB trotz nur 50%iger Sequenzidentität mit fast identischen Bindungsaffinitäten an BMP-2 binden und durch eine umfangreiche Mutagenese erfolgreich eine BMPR-IA/IB^C-Chimäre mit dem Grundgerüst von BMPR-IA erzeugt werden konnte, werden einzelne Mutationen nicht toleriert, auch wenn sie wie Y39D ausserhalb des Bindeepitops zu BMP-2 auftreten.

V. Diskussion

Prinzipiell ist die molekulare Erkennung bei makromolekularen Biomolekülen noch weitestgehend unverstanden. Die Aufdeckung von Mechanismen, die zur molekularen Erkennung von Liganden und Rezeptoren bei Protein-Protein-Wechselwirkungen führen, trägt dazu bei, gezielt Moleküle mit definierten Bindungseigenschaften zur Modulation biologischer Funktionen zu konstruieren, wie einige Beispiele vergangener Jahre (Wrighton et al., 1997) und in jüngster Zeit zeigen (Grueninger et al., 2008; Laporte et al., 2005; Liu et al., 2007). Gerade mit Blick auf die vielfältigen Funktionen von Wachstumsfaktoren können schon kleine Veränderungen von Bindungseigenschaften in signifikant abweichenden Funktionen resultieren (Kannan and Givol, 2000; Karkera et al., 2007; Riley et al., 2007; Seemann et al., 2005; Yuzawa et al., 2007). Die Extraktion eines minimalen Satzes an strukturellen Elementen aus bekannten Ligand-Rezeptor-Interaktionen und die darauf basierende *de novo* Entwicklung von funktionell maßgeschneiderten Molekülen sollte deshalb eine gezieltere Beeinflussung zellulärer Prozesse ermöglichen. Die molekulare medizinische Forschung identifiziert in der Regel zelluläre Signalketten an ihrem Ausgangspunkt, den Transmembranrezeptoren, die Signale aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere übertragen. Aus diesem Grund und wegen ihrer Lokalisierung auf der Zelloberfläche stellen Transmembranrezeptoren einen ersten Angriffspunkt dar, um Signalketten zu analysieren und zu modulieren. Eine mögliche Vervielfältigung des Signals durch mehrere intrazelluläre Aktivierungsschritte kann so ausgeschlossen werden, beispielsweise wenn wegen der hohen Stabilität eines Ligand-Kinaserezeptor-Komplexes mehrere aufeinander folgende Phosphorylierungsreaktionen möglich sind. Ferner muss nicht auf die Membrangängigkeit des Effektormoleküls geachtet werden.

Für GDF-5 konnte kürzlich gezeigt werden, dass allein der Austausch einer Aminosäure (R57A) den Verlust der Bindungsspezifität gegenüber BMPR-IB bedingt, woraus – unter Änderung der Funktion (Seemann et al., 2005) – eine erhöhte biologische Aktivität resultiert (Nickel et al., 2005). Die entsprechende Mutation in BMP-2 (A52R) führt jedoch anders als erwartet nicht zu einer erhöhten Bindungsspezifität gegenüber BMPR-IB. Auch durch den Austausch weiterer Aminosäuren in der pre-Helix-Schleife von BMP-2 kann die Bindungscharakteristik von GDF-5 nicht kopiert werden. Deshalb müssen weitere, möglicherweise periphere Bereiche im Liganden zur Rezeptor-Erkennung beitragen, sodass die Funktionsweise von Arg57 nur unter Einbeziehung der umgebenden Reste erklärt werden kann. Die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit mit hoher Auflösung erhaltene Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes erlaubt nun zusammen mit Strukturvergleichen verwandter BMP-Ligand-Rezeptor-Komplexe die Identifizierung von Ligand-Rezeptor-Kontakten, die zur Bindungsspezifität beitragen. Zusätzlich deutet die strukturelle Analyse auf Prinzipien, nach denen potentielle Effektormoleküle konstruiert sein müssen, um die Bindungseigenschaften von GDF-5 bzw. BMPR-IB nachzuahmen. In GDF-5 und BMPR-IB lassen sich Strukturelemente identifizieren, die sich von BMP-2 und BMPR-IA unterscheiden, und deren Bedeutung mit Blick auf andere Ligand-Rezeptor-Systeme der TGF- β Superfamilie diskutiert werden soll.

V.1. Expression und Reinigung von BMP Rezeptoren

Die Kristallisation des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes sowie von anderen Komplexen zwischen BMPR-IBec und den physiologisch relevanten Liganden BMP-2 und BMP-6 (Ebisawa et al., 1999;

ten Dijke et al., 1994b) scheiterte bisher an der Heterogenität und den damit verbundenen schlechten Beugungseigenschaften der erhaltenen Proteinkristalle. Auch die geringen Ausbeuten an biologisch aktivem BMPR-IBec und an binärem Komplex wirkten sich nachteilig aus (Keller, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das Reinigungsprotokoll für BMPR-IBec, das auf der Expression als Thioredoxin-Fusionsprotein beruht, modifiziert, um die Ausbeuten an biologisch aktivem BMPR-IBec zu erhöhen. Die Modifikation betraf drei Schritte des Reinigungsschemas und führte zu folgenden Veränderungen: (1) Koexpression von Hsp60/Hsp70- bzw. Tig-Chaperonsystemen, um den Anteil an aktivem, monomeren BMPR-IBec im bakteriellen Zytoplasma zu erhöhen. (2) Ersetzen der Anionenaustauschchromatographie durch Gelfiltrations- und Nickelaffinitätschromatographie, um mildere Reinigungsbedingungen und eine effizientere Abtrennung des Thioredoxins zu gewährleisten. (3) Verwendung von redox-aktiven Zusätzen während einer Inkubations- (Rückfaltungs-) Periode nach der Thrombinspaltung, um die Isomerisierung von intramolekularen Disulfidbrücken und damit Renaturierung von BMPR-IBec zu fördern, wobei die Kombination aus Corystein und GSH/GSSG am effektivsten war. Insgesamt konnte so die Ausbeute an aktivem, monomeren BMPR-IBec im Vergleich zu publizierten Daten um 500% von ~0,08mg/g (Keller, 2004) auf ~0,4mg/g gesteigert und auf eine Rückfaltung von BMPR-IBec verzichtet werden.

Zusätzlich wurde ein alternatives Reinigungsprotokoll auf Basis der Expression von BMPR-IBec als DsbA-Fusionsprotein etabliert, welches mit einem deutlich geringerem Arbeits- und Zeitaufwand für Mutagenesestudien ausreichende Mengen an biologisch aktiven BMPR-IBec liefert und ohne BMP-2-Affinitätschromatographie-Schritt auskommt. Die Ausbeuten bezüglich der Zellmasse sind dabei niedriger als mit dem modifizierten Thioredoxin-Protokoll. Indem der periplasmische Transport in *E.coli* durch Veränderung der Expressionsbedingungen verbessert und der Periplasma-Aufschluss der isolierten Zellmasse optimiert wird, kann womöglich die Ausbeute an BMPR-IBec noch gesteigert werden. Zu prüfen bleibt, ob die im Zellpellet nach dem Periplasmaaufschluss vorhandenen Mengen an DsbA-BMPR-IBec im periplasmischen oder zytosolischen Raum vorliegen. Biacore-Bindungsanalysen der aus dem DsbA-Protokoll gewonnenen BMPR-IBec-Fraktion zeigen, dass nur ein sehr geringer Anteil dieser Fraktion nicht bindungsaktiv ist. So konnte nicht die aus Messungen mit affinitätsgereinigtem BMPR-IBec (Trx) erwartete Menge an BMP-2 bzw. GDF-5 an den mit BMPR-IBec (DsbA) beladenen Sensorchip gebunden werden. Unklar bleibt, ob die teilweise Inaktivierung von BMPR-IBec auf die Biotinylierung oder Immobilisierung auf dem Sensorchip zurückzuführen ist. Bei Biacore-Messungen mit immobilisiertem BMPR-IBec aus *Sf9*-Insektenzellen wurde beispielsweise eine mit der Anzahl der Messzyklen korrelierende zunehmende Inaktivierung beobachtet (J. Nickel, persönliche Mitteilung), was auf die Empfindlichkeit von BMPR-IBec gegenüber wechselnden Pufferbedingungen und chaotropen Substanzen wie $MgCl_2$ hinweist (Arakawa et al., 1990a). Der einzige Sequenzunterschied zwischen BMPR-IBec aus den Thioredoxin- und DsbA-Protokollen liegt bei vier N-terminalen, den jeweiligen Thrombin-Schnittstellen entstammenden Aminosäureresten (Trx: GSGA~; DsbA: GS~). Möglicherweise faltet aber selbst unter den oxidierenden Bedingungen des Periplasmas und in Gegenwart des als Chaperon aktivierend wirkenden DsbA ein geringer Teil von BMPR-IBec in biologisch inaktive Konformationen. Trotz dieser Einschränkungen können die Bindungsdaten der als DsbA-Fusionsprotein präparierten BMPR-IBec-Varianten mit dem nach gleichem Protokoll hergestellten wildtypischen BMPR-IBec verglichen und Aussagen über den Einfluss einzelner Aminosäuresubstitutionen getroffen werden. Wildtypischer BMPR-IBec aus dem DsbA-Protokoll

weist die gleichen Bindungscharakteristika gegenüber BMP-2 und GDF-5 auf wie BMPR-IBec aus dem Thioredoxin-Protokoll.

Eine BMPR-IA/IB^Cec-Chimäre wurde präpariert, um die Schwierigkeiten bei der Reinigung von BMPR-IBec und der Komplexbildung mit BMP-2 bzw. GDF-5 zu umgehen. Biacore-Bindungsstudien und Zellassays bestätigen, dass es sich bei der BMPR-IA/IB^Cec-Chimäre um ein dem BMPR-IBec äquivalentes Protein handelt, das zudem in wesentlich höheren Ausbeuten zugänglich ist (BMPR-IBec: 0,4mg/g; BMPR-IA/IB^Cec: 1,6mg/g) und eine wesentlich höhere thermische Stabilität aufweist (BMPR-IBec: T_m=62,6°C; BMPR-IA/IB^Cec: T_m=87,2°C). Weil Kristalle des BMP-2•BMPR-IBec-Komplexes bisher keine auswertbaren Beugungsdaten lieferten, wurde der Komplex aus BMP-2 und BMPR-IA/IB^Cec kristallisiert und charakterisiert. Zusammen mit den Kristallstrukturen von Komplexen aus BMP-2 und BMPR-IA-B1 bzw. BMPR-IA-B12, die beide Zwischenstufen von BMPR-IA und BMPR-IA/IB^C darstellen (siehe III. 13. 2. und IV. 8. 1.), konnten weitere Bausteine zu einem grundlegenden Verständnis der Bindungspromiskuität zwischen BMP-2 und BMPR-IA bzw. BMPR-IB hinzugefügt werden (Kotzsch et al., 2008). Der Versuch, die biochemischen Eigenschaften von BMPR-IBec durch Modifikation von möglichen Kristallkontakten (BMPR-IB-KKM) und eine Verlängerung um die N-terminalen 19 Aminosäurereste von BMPR-IAec (BMPR-IB-NTerm) zu verbessern, führte jedoch zu keinem befriedigenden Ergebnis, sodass letztlich mit wildtypischem BMPR-IBec gearbeitet wurde.

Die Bestimmung der NMR-Struktur von freiem, ungebundenem BMPR-IAec erforderte die Entfernung von 28 N-terminalen Resten, die bereits in früheren Kristallstrukturen mangels Elektronendichte nicht modelliert werden konnten. Die Expression von für NMR-Untersuchungen ausreichenden Proteinmengen im verhältnismäßig stark reduzierendem Milieu von *E.coli* BL21 (DE3) gelang nur durch Koexpression der Hsp60/Hsp70- bzw. Tig-Chaperon-Systeme, welche wie bereits erwähnt standardmäßig auch bei Expression des Thioredoxin-BMPR-IBec-Fusionsproteins eingesetzt wurden. Selbst hierbei waren die Ausbeuten an isotoptenmarkiertem Protein im Vergleich zur Expression in Thioredoxinreduktase-defizienten Bakterienstämmen niedrig (¹³C, ¹⁵N-BMPR-IAsf: 0,2mg/g; BMPR-IAsf: 0,3mg/g; BMPR-IAec: 1mg/g). Zumindest teilweise könnten die niedrigen Ausbeuten auf die in IV. 1. 1. erwähnte Aggregationstendenz, Instabilität bzw. schlechtere Löslichkeit von BMPR-IAsf zurückzuführen sein. Letzteres wäre mit Blick auf die Kristallisation des freien Rezeptors jedoch von Vorteil, weil dementsprechende Versuche mit BMPR-IAec wegen der hohen Löslichkeit bisher erfolglos blieben (T. Müller, persönliche Mitteilung). Isotoptenmarkierte, auf 1,1mM konzentrierte Proben von BMPR-IAsf ergeben verglichen mit Proben von BMPR-IAec qualitativ deutlich verbesserte NMR-Spektren, weil die Signale der flexiblen N-terminalen Reste nicht mehr die Signale des strukturierten Teils überlagern. Eine ¹³C, ¹⁵N-markierte BMPR-IAsf-Probe wurde schließlich zur Datenaufnahme und für die anschließende Strukturanalyse verwendet. Die NMR-spektroskopische Untersuchung eines Komplexes aus BMP-2 und BMPR-IAsf scheiterte an der geringen Löslichkeit des Komplexes. Bei Verwendung von unverkürztem BMPR-IAec überlappten die NMR-Signale der Aminosäuren. Unterschiedliche Pufferbedingungen vom BMP-2•BMPR-IAec-Komplex und von BMPR-IAec ließen zudem keine Rückschlüsse über mögliche Veränderungen im Rezeptor bei Bindung des Liganden zu.

V.2. Kristallisation der GDF-5•BMPR-IBec- und GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexe

Der GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex konnte nur in vergleichsweise niedrigen Ausbeuten isoliert werden, sodass nicht vollständige Sparse-Matrix-Screens, sondern nur eine Auswahl an Kristallisationsbedingungen getestet werden konnte (Tabelle IX-6, S. 240). Bedingungen mit Polyethylenglycolen (PEG) erzeugten oktaedrische Kristalle, mit denen jedoch wegen schlechter Beugungseigenschaften nur eine mit 6,8Å niedrig aufgelöste Elektronendichte erhalten werden konnte. Aus diesem Grund wurde eine Bedingung mit Polypropylenglycol (PPG) verfeinert, die im ersten Screen nur sehr kleine plättchenförmige Kristalle hervorbrachte. Durch Optimierung der Kristallisationsbedingungen konnten für eine Strukturanalyse ausreichend große Kristalle produziert werden. Diese klingenförmigen Proteinkristalle wiesen sehr gute Beugungseigenschaften auf. Mit deren Beugungsdaten konnte eine mit 2,1Å hoch aufgelöste Elektronendichte berechnet und die Kristallstruktur aufgeklärt werden.

In Abhängigkeit vom Kristallisationspuffer, namentlich der Gegenwart von PEG oder PPG, können Kristalle eines binären GDF-5•BMPR-IBec- oder eines ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes erhalten werden. Das Fehlen von ActR-IIBec in Kristallen aus PPG-Bedingungen und die Präsenz von ActR-IIBec in Kristallen aus PEG-Bedingungen kann durch Western Blots mit einem polyklonalen ActR-IIB-Antikörper belegt werden. Die Gegenwart von PPG im Kristallisationspuffer führt zur Dissoziation des niedrig affin bindenden ActR-IIBec aus dem ternären Komplex, vermutlich weil die Kristallkontakte zwischen den Molekülen eines binären GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes hier eine stabilere Interaktion eingehen. ActR-IIBec wirkt allerdings als Katalysator zur Kristallisation des binären Komplexes. Der durch Gelfiltration gereinigte GDF-5•BMPR-IBec-Komplex konnte hingegen trotz identischer Kristallisationsbedingungen nicht kristallisiert werden. Aus den Bindungsaffinitäten lässt sich tendenziell ableiten, warum ActR-IIBec und nicht BMPR-IBec aus dem ternären Komplex dissoziierte (ActR-IIBec: $K_D \sim 4700\text{nM}$, BMPR-IBec: $K_D \sim 300\text{nM}$, jeweils für die 1:1-Interaktion). Schon frühere Untersuchungen an einem ternären BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplex zeigen, dass die Pufferbedingungen entscheidend für die Zusammensetzung des Proteinkristalls sind (Weber, 2006; Weber et al., 2007). PPG400 im Kristallisationspuffer des BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplexes führte dabei zu der Dissoziation von jeweils einem BMPR-IAec- und ActR-IIBec-Monomer und schließlich zum heterotetrameren Komplex. Unter Kristallisationsbedingungen mit PEG3350 wurden nur Kristalle mit wesentlich schlechten Beugungseigenschaften erhalten. Bei Verwendung einer BMP-2-KD-Variante mit 20fach höherer Bindungsaffinität zu ActR-IIBec konnte hingegen mit PEG3350 als Präzipitans der komplette heterohexamere Komplex kristallisiert werden (Weber, 2006).

Die Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes basiert auf experimentellen Phasen, die über die anomalen Beugungseigenschaften der in GDF-5 eingebauten Selenomethionine mittels MAD bestimmt wurden. Zwar war eine Strukturlösung prinzipiell auch mit molekularem Ersatz möglich, doch ergab sich durch die experimentellen Phasen vor allem für periphere Schleifen eine verbesserte Elektronendichte. Für den ternären GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex konnte letztlich keine Kristallstruktur ermittelt, sondern nur die Präsenz des zuvor modellierten ternären Komplexgebildes in den entsprechenden Kristallen durch (1) eine Lösung des molekularen Ersatzes mit einer

ausreichend dichten Packung der Komplexmoleküle im Kristall und (2) die Umhüllung aller sechs Ketten des Komplexes einschließlich der beiden ActR-IIBec-Moleküle mit Elektronendichte bestätigt werden. Abzuwarten bleibt, ob die Beugungseigenschaften der Kristalle mit ternärem Komplex in der asymmetrischen Einheit verbessert werden können. Ähnlich wie für den ternären BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplex sollte auch in diesem Fall eine GDF-5-Variante mit einer deutlich erhöhten Bindungsaffinität zum ActR-IIBec, beispielsweise durch Einführung der Y106K- und Q108D-Substitutionen („GDF-5-KD“) zum Einsatz kommen. Erste Beugungsanalysen von Kristallen eines GDF-5-KD•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplexes, die ebenfalls aus einer Kristallisationsbedingung mit PEG3350 erhalten werden konnten, sind vielversprechend (Auflösung von 3Å bei RT am Free-Mounting-System der Firma Proteros; Datensatz mit 3Å Auflösung bei -180°C). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass bei Verwendung der GDF-5-KD-Variante ein möglicherweise besser geordnetes Kristallgitter mit besseren Beugungseigenschaften resultiert. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass Kristalle des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes durch Einfrieren geschädigt werden und aus diesem Grund schlechte Beugungseigenschaften aufweisen. In diesem Fall sollte die Datenaufnahme bei Raumtemperatur stattfinden. Besser aufgelöste Beugungsdaten des ternären Komplexes ließen dann genaue Aussagen über mögliche Unterschiede im ActR-IIBec-Bindeepitop („knuckle“-Epitop) von BMP-2 bzw. GDF-5 zu, beispielsweise auch hinsichtlich einer durch den Typ II Rezeptor induzierten Rotation des Typ I Rezeptors im „wrist“-Epitop, wie sie für den ternären BMP-2-Komplex beschrieben ist (Weber et al., 2007).

Im Gegensatz zu Kristallen des GDF-5•BMPR-IBec-Komplexes beugten Kristalle des GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Komplexes trotz umfangreicher Optimierungsversuche nur mit befriedigenden Auflösungen, was vermutlich der Größe der Einheitszelle zuzuschreiben ist. Dennoch konnte eine erhebliche Verbesserung der Beugungseigenschaften von 15Å auf 2,8Å durch (1) *in situ* Proteolyse mit Subtilisin, (2) Verwendung von MPD als Ko-Präzipitans und (3) Verwendung von Se-GDF-5 erreicht werden. Dabei änderte sich jeweils beim Zusatz von MPD und beim Zusatz von Subtilisin die Kristallmorphologie, was auf Veränderungen im Kristallgitter hinweist. Interessanterweise führte die Zugabe von 25% (v/v) MPD, anders als aufgrund vorheriger Experimente zur Kristallisation von GDF-5 (Mueller et al., 2005) und Beobachtungen bei Biacore-Bindungsanalysen vermutet, nicht zur Dissoziation des binären Komplexes. Ähnlich wie bereits für PPG400 diskutiert, könnte auch MPD das Gleichgewicht zwischen Komplexbildung und -zerfall so verändern, dass sich neue, bessere Kristallkontakte ergeben. MPD könnte in der eingesetzten Konzentration geringe lokale konformationelle Änderungen in den N- und C-Termini sowie in flexiblen Schleifen des Komplexes hervorrufen (Xiao et al., 2002) oder ähnlich einem Aussalzeffekt die Proteinkonzentration lokal erhöhen (Arakawa et al., 1990b; Pittz and Timasheff, 1978). Der positive Einfluss von MPD auf die Kristallisation von Proteinkomplexen, insbesondere zur Erzeugung alternativer Gittertypen und Kristallmorphologien, wurde in einigen Beispielen beschrieben (Gilliland et al., 1994; Stura et al., 1992; Stura et al., 1989; Ultsch and de Vos, 1993). In diesen Arbeiten wurde MPD jedoch meist als Ko-Präzipitans in geringen Konzentrationen von 0,2 bis 2,0% (v/v) eingesetzt. Auch bei der Kristallisation des GDF-5-KD•BMPR-IAec•ActR-IIBec-Komplexes konnten durch Zusatz von 10% MPD zur Kristallisationsbedingung qualitativ bessere Kristalle produziert werden (nicht gezeigt). Den gleichen Effekt hatte PPG400, sodass beiden Verbindungen ähnliche Eigenschaften zugeschrieben werden können.

Der eingeschränkte proteolytische Verdau des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes wirkt prinzipiell in ähnlicher Art und Weise, indem periphere, der Protease zugängliche Bereiche in Schleifen sowie flexible, unstrukturierte N- und C-Termini entfernt werden und so neue Kristallkontakte entstehen können (Hoedemaeker et al., 1997). Wie die SDS-PAGE-Analyse der Proteolyse des GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Komplexes in Lösung als auch von GDF-5•BMPR-IA/IB^Cec-Kristallen mit und ohne *in situ* Proteolyse zeigt, entsteht bei Zusatz von Subtilisin ein definiertes Endprodukt. Interessanterweise entsprechen die Laufeigenschaften von proteolytisch behandeltem BMPR-IA/IB^Cec in der SDS-PAGE denen von BMPR-IA^{ec} bzw. BMPR-IB^{ec}. Anders als unbehandelter BMPR-IA/IB^Cec korreliert das apparente Molekulargewicht von proteolytisch behandeltem BMPR-IA/IB^Cec in der SDS-PAGE mit dem berechneten Wert. Für GDF-5 sind keine Veränderungen des apparenten Molekulargewichts festzustellen, was jedoch die einfache Spaltung von Hauptketten, d.h. eine Reaktion ohne Abspaltung eines Peptidfragments (zweifache Spaltung), nicht ausschließt. Der proteolytische Verdau von BMPR-IA/IB^Cec mit Subtilisin erfolgt ohne Bildung von stabilen Zwischenprodukten, sodass vermutlich ein einzelnes Peptidfragment von ≥ 2300 Da abgespalten wird. Die Modifizierung durch Subtilisin betrifft demnach BMPR-IA/IB^Cec und nicht GDF-5. Die Stabilität des mit Subtilisin behandelten binären Komplexes zeigt sich in der Möglichkeit, diesen mittels Gelfiltration zu reinigen. Für den verkürzten Komplex wird verglichen mit unbehandeltem Komplex ein deutlich geringeres apparentes Molekulargewicht von 36764Da, für BMPR-IA/IB^Cec von 20779Da beobachtet. Die Identität und Größe der durch die Subtilisinbehandlung entstandenen und bei der Gelfiltration abgetrennten Peptidfragmente wurde nicht geprüft.

Umfangreiche Tests zur Suche nach Kristallen mit besseren Beugungseigenschaften (Auflösung $< 2,8\text{\AA}$) blieben erfolglos, sodass nur noch zusammen mit einer zielgerichteten Modifikation der Komplexoberfläche (engl. rational surface engineering) positive Beiträge zu erwarten sind (Derewenda, 2004). Kristalle mit besseren Beugungseigenschaften könnten beispielsweise erzeugt werden, indem die Oberflächenentropie des GDF-5•BMPR-IA/IB^C-Komplexes verringert wird. Dies kann durch die Alaninmutation von positiv oder negativ geladenen Aminosäureresten mit Seitenketten hoher konformationeller Entropie wie Lysin oder Glutamat erreicht werden (Derewenda et al., 2004; Longenecker et al., 2001). Alternativ kann die Konformation flexibler Seitenketten durch eine chemische Derivatisierung von Lysin-Resten mittels reduktiver Methylierung stabilisiert werden (Schubot and Waugh, 2004). Eine entsprechend dem zur NMR eingesetzten BMPR-IA^{sf} N-terminal verkürzte BMPR-IA/IB^Cec-Variante (BMPR-IA/IB^Csf) konnte in hohen Ausbeuten hergestellt, aus Zeitgründen jedoch nicht in Komplexpräparationen mit GDF-5 und anschließenden Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden. Die Verwendung von BMPR-IA/IB^Csf könnte ebenfalls durch veränderte Kristallkontakte zu besser beugenden Kristallen führen.

V.3. Der GDF-5•BMPR-IB-Komplex

Die hier vorgestellte Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IB^{ec}-Komplexes repräsentiert die erste Struktur von wildtypischem GDF-5 im gebundenen Zustand sowie die erste Struktur der extrazellulären Domäne von BMPR-IB. Der allgemeine strukturelle Aufbau vom GDF-5•BMPR-IB^{ec}-Komplex entspricht dem BMP-2•BMPR-IA^{ec}-Komplex (Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000c). Dies ist angesichts der Sequenzhomologie von GDF-5 und BMP-2 bzw. von BMPR-IB^{ec} und BMPR-IA^{ec} (Abbildung IV-46, S. 134) sowie der strukturellen Ähnlichkeit der ungebundenen Liganden BMP-2 (Scheufler et al., 1999) und GDF-5 (Nickel et al., 2005) zu erwarten. Der

vollständige binäre GDF-5•BMPR-IBec-Komplex entsteht jedoch erst durch eine kristallimmanente Symmetrieoperation, sodass die beiden Bindeepitope zueinander exakt symmetrisch sind. Derartige Phänomene sind für Kristallstrukturen von einigen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie beschrieben, beispielsweise für BMP-2 (Scheufler et al., 1999), BMP-7 (Griffith et al., 1996a) und TGF- β 3 (Mittl et al., 1996) oder für die Komplexe TGF- β 3•T β R-Iec•T β R-IIec (Groppe et al., 2008) und BMP-7•Noggin (Groppe et al., 2002).

V. 3. 1. Lage von BMPR-IB im „wrist“-Epitop von GDF-5

BMPR-IBec besetzt im binären Komplex das „wrist“-Epitop von GDF-5, welches sich aus der konkaven, inneren Seite der beiden Finger, der pre-Helix-Schleife und der zentralen α -Helix von GDF-5 definiert. Auffällig ist die gedrehte Position von BMPR-IB im GDF-5-„wrist“-Epitop, wenn man zum Vergleich die Kristallstruktur des BMP-2•BMPR-IAec-Komplexes überlagert (Abbildung V-1, S. 171). Wie bereits ausgeführt, deckt sich die beobachtete Rotation von 12° ungefähr mit der von BMPR-IA im ternären BMP-2•BMPR-IAec•ActR-IIec-Komplex (Weber et al., 2007). Die Drehung von BMPR-IB wird jedoch im Gegensatz dazu nicht durch den Typ II Rezeptor induziert, sodass andere Mechanismen, vor allem die Beschaffenheit des „wrist“-Epitops von GDF-5, für die Drehung von BMPR-IBec verantwortlich sein müssen. Bei der Analyse des GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitops fällt die dichte Packung zwischen der α 1 β 6-Schleife von GDF-5 (Reste Ser74 und Met75) und der α 1 β 5-Schleife von BMPR-IB (Rest Ile73) auf, insbesondere der Kontakt zwischen einer polaren Seitenkette (Ser74 von GDF-5) und einer hydrophoben Seitenkette (Ile73 von BMPR-IB). Die Konformation der Ile73-Seitenkette ist durch zwei benachbarte Proline vorgegeben, sodass eine Umorientierung von Ile73 eine größere Umlagerung in der α 1 β 5-Schleife erfordern würde. Die Alaninmutation von einem der Proline, Pro74 von BMPR-IB, resultiert in einer 3fach niedrigeren Bindungsaffinität gegenüber GDF-5 und einer 2fach höheren Bindungsaffinität gegenüber BMP-2, was zwei Aussagen zulässt: (1) Zwischen BMP-2 und BMPR-IB wird sterische Spannung abgebaut. Im Modell eines BMP-2•BMPR-IBec-Komplexes auf Basis des BMP-2•BMPR-IAec-Komplexes liegt das gleiche sterische Problem zwischen Ile73 (BMPR-IB) und Ser69 (BMP-2) vor, welches durch eine Alaninmutation von Ile73 aufgelöst wird. (2) Dieser ebenfalls positive Effekt der I73A-Mutation in BMPR-IB bei Bindung von GDF-5 wird durch energetische Einbußen in anderen Bereichen des GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitops konterkariert. Möglicherweise induziert Ile73 die Drehung von BMPR-IB. Nur so kann eine optimale Passfähigkeit der GDF-5- und BMPR-IB-Oberflächen, vor allem im entgegengesetzten, membranabgewandten Teil des Bindeepitops an den β 1 β 2- und β 4 α 1-Schleifen von BMPR-IB erreicht werden, die an die pre-Helix-Schleife von GDF-5 packen, sodass eine effiziente, stabile Interaktion gewährleistet ist. Besonders mit Blick auf die eingeschränkten Konformationen der „Klappe“ in der β 1 β 2-Schleife von BMPR-IB und der mit Arg57 als zentrales Motiv in diesem Bereich vorgegebenen GDF-5-Oberfläche könnte dieses Strukturmerkmal von Bedeutung sein. Diese Sichtweise wird durch die Biacore-Ergebnisse für zwei bei der Präparation von BMPR-IA/IB^c isolierte BMPR-IA-B1- und BMPR-IA-B12-Varianten gestützt. Nur durch die Umwandlung der α 1 β 5- und β 4 α 1-Schleifen in BMPR-IA von der BMPR-IA- in die BMPR-IB-Form (siehe hierzu III. 13. 2.) kann eine dem BMPR-IB entsprechende Bindungscharakteristik gegenüber GDF-5 erzeugt werden, die durch eine ~8fach höhere Bindungsaffinität gekennzeichnet ist (Kotzsch et al., 2008; Nickel et al., 2005). Die Umwandlung der α 1 β 5-Schleife allein hat keinen Effekt. Nur wenn sich als Folge der Aminosäurezusammensetzung die Konformationen der α 1 β 5- und β 4 α 1-

Schleifen ergänzen, kann eine effiziente Packung von BMPR-IB an die GDF-5-Oberfläche gewährleistet werden.

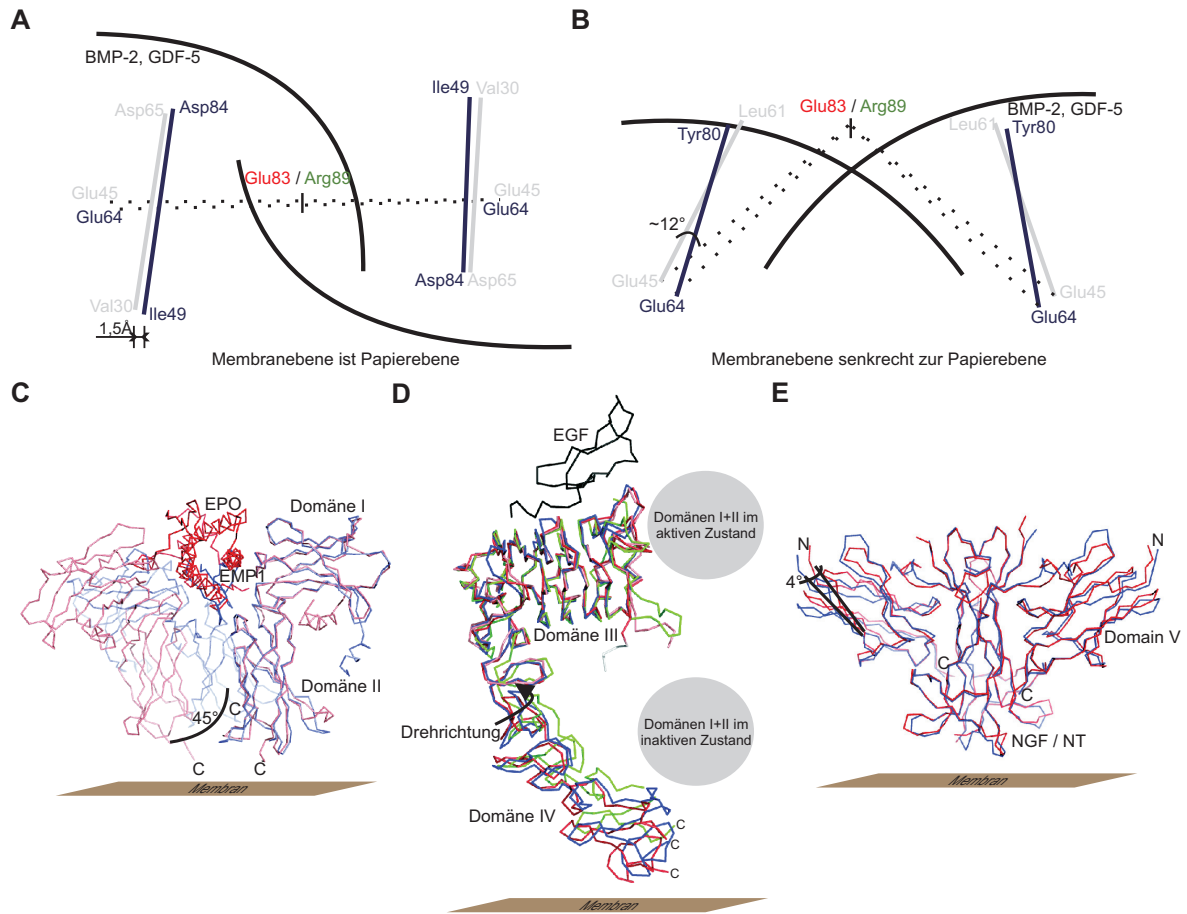


Abbildung V-1: Schematische Darstellung der Drehung von BMPR-IB im „wrist“-Epitop von GDF-5.

A, B: Aufsicht (A) und Seitenansicht (B) eines schematisch gezeichneten Ligand-Rezeptor-Komplexes mit BMP-2 bzw. GDF-5 als schwarze Linien, BMPR-IA als blaue Linie und BMPR-IB als graue Linie zwischen den genannten Resten. Der Drehwinkel zwischen zwei „Dreiecken“ (Val30, Glu45 und Asp65 von BMPR-IB im GDF-5-Epitop bzw. Ile49, Glu64, Asp84 von BMPR-IA im BMP-2-Epitop) oder zwei Linien (Leu61-Glu45 von BMPR-IB bzw. Tyr80-Glu64 in BMPR-IA) beträgt $\sim 12^\circ$, was zu einer mittleren Verschiebung der CA-Atome von $\sim 1,5\text{\AA}$ führt. Im membranabgewandten Teil (z.B. Leu61 in der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB) findet eine Annäherung, im membran zugewandten Teil (z.B. Glu45 in der $\beta 2\beta 3$ -Schleife von BMPR-IB) eine Entfernung der Reste in der Interaktionsfläche statt.

C-E: C α -Darstellung von Komplexstrukturen anderer Zytokine, für die ebenfalls eine Reorientierung von Rezeptordomänen bei Bindung eines Liganden beschrieben ist. **C:** Ein EPO-mimetisches Peptiddimer (EMP1, blau) bindet zwei EPO-Rezeptoren (EPOR, hellblau) zwar mit 100fach höherer Bindungsaffinität als Erythropietin (EPO, rot). Dennoch liegt die biologische Aktivität von EMP1 nur bei etwa 1/20 des natürlichen Liganden (Johnson et al., 1998). Die um $+45^\circ$ geänderte Rezeptororientierung (siehe Bild) wirkt sich auf die Aktivierbarkeit der intrazellulären Kinasedomänen aus (Syed et al., 1998). Ein anderes mimetisches Peptid EMP33 mit niedrigerer Bindungsaffinität rekrutiert EPOR in einer nochmals um $+15^\circ$ gedrehten Orientierung, was zum Verlust der biologischen Aktivität führt (nicht gezeigt) (Livnah et al., 1998). **D:** Bei Bindung von EGF (schwarz) an EGFR (auch Her1, ErbB1) ändert sich die Orientierung der Rezeptoren zueinander, wie ein Vergleich der Domänen IV von inaktivem EGFR (rot) (Ferguson et al., 2003) und der strukturell homologen, in der signalaktiven Konformation vorliegenden Rezeptoren Her2 (grün) aus dem Komplex mit Herceptin (Cho et al., 2003) und Her3 (blau) (Cho and Leahy, 2002) zeigt (Bouyain et al., 2005). Die Konformationen der letzten beiden Rezeptoren stimmen mit der von EGFR im Komplex mit EGF (Ogiso et al., 2002) überein, in welcher die Domäne IV ungeordnet ist. Es wurden jeweils die Domänen III überlagert.

(Fortsetzung der Bildbeschreibung auf der folgenden Seite.)

Nicht geklärt werden kann, ob ActR-IIBec ähnlich wie bei Bindung an BMP-2 auch bei Bindung an GDF-5 eine weitergehende Drehung von BMPR-IB um die gleiche Achse induziert, oder die vorhandene Drehung von BMPR-IB umkehrt. Die Struktur des ternären GDF-5-Komplexes mit den modellierten C-Termini von BMPR-IBec und ActR-IIBec suggeriert, dass sich jedwede Drehung von BMPR-IB auf den Abstand der extrazellulären, membrannahen C-Termini und möglicherweise auf die transmembranen und intrazellulären Domänen von ActR-IIB und BMPR-IB auswirkt, auch wenn die Richtung der Bewegung eine andere als hier angegeben wäre. Damit könnte in Abhängigkeit vom Liganden (BMP-2, GDF-5) eine unterschiedliche zelluläre Antwort generiert werden, wenn – dies kann nur spekuliert werden – ein Zusammenhang zwischen der Anordnung der Typ I und Typ II Rezeptoren in den ternären Komplexen und der Aktivierbarkeit des intrazellulären Smad-Signals besteht. Einen weiteren Hinweis liefert die Beobachtung, dass scheinbar nur ActR-IIB, nicht aber ActR-II die Position von BMPR-IA im ternären Komplex mit BMP-2 beeinflusst (Allendorph et al., 2006; Weber et al., 2007); inwiefern sich jedoch bei Rekrutierung von ActR-II und ActR-IIB unterschiedliche Signale ergeben, ist bisher nicht untersucht worden.

Die Möglichkeit, dass die Orientierung von Rezeptoren in Komplexen mit Liganden deren Signalkompetenz beeinflussen kann, wurde schon für andere Zytokinligand-Rezeptor-Komplexe in Betracht gezogen, z.B. von Erythropoietin (EPO) (Ballinger and Wells, 1998; Syed et al., 1998), von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) (Bouyain et al., 2005; Cho et al., 2003; Moriki et al., 2001; Schlessinger, 2002) oder neurotrophen Wachstumsfaktoren (NGF, Neurotrophin) (Banfield et al., 2001) (Abbildung V-1, S. 171). Den gezeigten Beispielen ist gemeinsam, dass zwei Rezeptoren durch Bindung an ein Ligandmolekül in einen signalaktiven Komplex rekrutiert werden. Anders als bei BMP Rezeptoren handelt es sich bei diesen Rezeptoren um Multidomänenproteine, welche bei Bindung des Wachstumsfaktors einer partiellen intramolekularen Umlagerung unterworfen sind. Die Umlagerung wirkt sich auf gegenseitige Orientierung der transmembranen und zytosolischen Domänen der Rezeptoren im Komplex aus, wie es anschaulich durch Moriki et al. (Moriki et al., 2001) mit einem „flexiblen Rotationsmodell“ für das EGF-System beschrieben wurde. Im EPO- und Neurotrophin-System wird eine unterschiedliche Orientierung beider Rezeptoren (EPOR) oder einzelner, membrannaher Domänen (Trk) hingegen nicht allein durch die Bindung des Wachstumsfaktors induziert. Die Drehung der Rezeptoren hängt hierbei auch von der Identität des komplexierten Liganden ab.

Die EGF-induzierte Aktivierung von homodimeren EGFR-Komplexen, welche bei Ligandenbindung in eine aktive Konformation wechseln, ähnelt den in der TGF- β - und BMP-Familie beobachteten sogenannten „vorgebildeten Rezeptorkomplexen“ aus homo- oder heteromeren Typ I und Typ II Rezeptoren (engl. „preformed complexes“) (Gilboa et al., 2000; Gilboa et al., 1998; Nohe et al., 2002).

(Fortsetzung der Bildbeschreibung zu Abbildung V-1, S. 171.)

Die EGFR liegen in der Zellmembran als monomere und dimere Formen vor, sind aber nicht signalaktiv. Die Aktivierung erfolgt bei Bindung des Liganden, wodurch sich zum Einen die Domänen I und II umlagern (grauer Kreis), zum Anderen die Orientierung der Rezeptoren zueinander ändert. Dies führt zur Umlagerung der transmembranen und zytoplasmischen Domänen („flexible rotation model“) (Moriki et al., 2001). Aus Übersichtsgründen ist jeweils nur ein Rezeptor dargestellt. **E:** Bei Vergleich von Komplexen des homodimeren NGF mit der Domäne V von TrkA (Tropomyosin Rezeptor Kinase A) und des strukturell homologen NT-4/5 mit der Domäne V von TrkB zeigt sich eine Reorientierung beider Rezeptordomänen (Banfield et al., 2001), ähnlich wie sie in (A, B) beschrieben ist.

Den „vorgebildeten Rezeptorkomplexen“ stehen zwei weitere Bindungsmodi gegenüber: (1) Der für BMPs relevante begrenzt kooperative Bindungsmodus, bei dem die Typ I und Typ II Rezeptoren affinitätsabhängig vom Liganden in einen heteromeren Komplex rekrutiert werden und (2) der für das TGF- β s und Activine relevante kooperative und sequentielle Bindungsmodus, bei dem zuerst der Komplex aus Ligand und Typ II Rezeptor gebildet und anschließend der Typ I Rezeptor in diesen Komplex rekrutiert wird (Greenwald et al., 2003; Massague, 1998; Sebald and Mueller, 2003). Je nach Bindungsmodus werden unterschiedliche intrazelluläre Signalwege ausgelöst. Für BMPs sind dies die Smad1/5/8- und p38-MAPK-Signalwege, je nachdem ob die Signalaktivierung über vorgebildete oder ligandeninduzierte Komplexe erfolgt (Nohe et al., 2002). Bisher wurde nicht untersucht, wie vorgebildete BMP-Rezeptor-Komplexe bei Bindung des BMP-Liganden aktiviert werden, sodass nur spekuliert werden kann, ob dem EGF- (Moriki et al., 2001) oder EPO-System (Syed et al., 1998) ähnliche Umlagerungen eine Rolle spielen. Beispielsweise besteht die Möglichkeit, dass die zur Aktivierung des Smad1/5/8-Signalwegs notwendigen Phosphorylierungsreaktionen nur bei einer bestimmten Orientierung zwischen den Kinasedomänen der Typ I und Typ II Rezeptoren ablaufen können. Dies setzt allerdings voraus, dass die Flexibilität innerhalb des Rezeptors begrenzt ist und sich die ligandenabhängige Orientierung der extrazellulären Domänen von BMPR-IB bzw. BMPR-IA in den „wrist“-Epitopen der Liganden BMP-2 bzw. GDF-5 vom membranproximalen Teil in die transmembranen und zytoplasmischen Domänen fortpflanzt, sodass sich deren Position relativ zur Position der korrespondierenden Domänen des Typ II Rezeptors verändern kann. Die Kinasedomänen der Rezeptoren vermitteln die Entstehung vorgebildeter heteromerer BMP-Rezeptorkomplexe (Nohe et al., 2002), sodass die Signalaktivierung möglicherweise auf einer derartigen Reorientierung beruht. Ähnlich wie für das EGF- oder EPO-System beschrieben, ließe sich dieser Hypothese beispielsweise über Crosslink-Experimente mit Hilfe künstlicher membranproximaler Cysteinbrücken (Watowich et al., 1994) oder mit Hilfe von Brückenmolekülen nachgehen. Für ligandeninduzierte Komplexe sollten die bereits für vorgebildete Rezeptorkomplexe diskutierten Vorgaben gelten, wobei extrazellulär auch mit BMP-Ligand-Rezeptorkomplexen interagierende Modulatorproteine, beispielsweise der RGM-Familie (Samad et al., 2005), eine bestimmte BMP-Ligand-Rezeptor-Orientierung bevorzugen könnten.

Die Drehung von Typ I Rezeptoren im „wrist“-Epitop könnte auch zu Unterschieden in der Signalstärke des vom Liganden ausgelösten Signals beitragen (siehe z.B. Abbildung IV-25, S. 99). Dafür ist nicht unbedingt eine hohe Bindungsaffinität, sondern vielmehr die Lebensdauer des Ligand-Rezeptor-Komplexes als Resultat der Dissoziationsgeschwindigkeit der Interaktion von Bedeutung, wie Untersuchungen einiger GDF-5-Varianten zeigen. Künstliche Peptide wie EMPs mit einer wesentlich höheren Bindungsaffinität zum EPO-Rezeptor im Vergleich zum natürlichen Wachstumsfaktor Erythropoietin, aber einer stark beschleunigten Bindungskinetik (hohe Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten), zeigen beispielsweise eine geringere biologische Aktivität und wirken als Antagonisten, weil der natürliche Ligand kompetitiert wird (Johnson et al., 1998; Livnah et al., 1998). Vermutlich ist die im Vergleich zu EMPs niedrige Dissoziationsgeschwindigkeit von Erythropoietin ($k_{\text{off}} \sim 2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; (Binnie et al., 1997)) für dessen viel höhere Signalkompetenz verantwortlich (Ballinger and Wells, 1998). Damit sind sowohl die Bindungskinetik der Ligand-Rezeptor-Interaktion als auch die Rezeptororientierung im Komplex mit dem Liganden für die Generierung des Signals von Bedeutung.

V. 3. 2. Molekulare Erkennung zwischen GDF-5 und BMPR-IB

Die im vorangehenden Kapitel beschriebenen molekularen Mechanismen, die mit der Drehung von BMPR-IB im „wrist“-Epitop von GDF-5 zusammenhängen, stellen einen Teil der an der spezifischen Erkennung von Ligand und Rezeptor beteiligten strukturellen Merkmale dar, deren Zusammenspiel im Folgenden erläutert werden soll. Die Bindungscharakteristik von BMPR-IA und BMPR-IB gegenüber GDF-5 deutet darauf hin, dass hinter den schnelleren Bindungsraten von BMPR-IA und den langsameren Bindungsraten von BMPR-IB ähnliche Mechanismen stehen könnten, wie in V. 4. 4. für einige GDF-5-Mutationen diskutiert – mit dem Unterschied, dass die dafür verantwortlichen Strukturmerkmale nicht auf GDF-5, sondern auf BMPR-IA bzw. BMPR-IB kodiert sind.

Eine zentrale Rolle bei der Erkennung von BMPR-IA und BMPR-IB durch GDF-5 spielt die „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife der Rezeptoren. Wie unter anderem aus Abbildung V-10 (S. 199) ersichtlich ist, können aus sterischen Gründen die Konformationen der „Klappe“ in BMPR-IA bzw. von Arg57 in GDF-5 im GDF-5•BMPR-IA-Komplex nicht denen von BMPR-IA im BMP-2•BMPR-IA- bzw. von GDF-5 im GDF-5•BMPR-IB-Komplex entsprechen. Bereits publizierte Ergebnisse belegen eine Schlüsselrolle von Arg57 (GDF-5) bei der Erkennung von BMPR-IA und BMPR-IB (Nickel et al., 2005). Die Alaninmutation dieses Restes führt zu einem Verlust der Bindungsspezifität gegenüber BMPR-IB. Die hier präsentierte Struktur des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes zeigt, dass für BMPR-IB zwei klar unterscheidbare Konformationen der „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife existieren, deren strukturelle Variabilität wegen der Aminosäurezusammensetzung dieses Pentapeptids gering ist. Für beide Konformere, als „offen“ und „geschlossen“ definiert, je nachdem, ob direkte Kontakte zur pre-Helix-Schleife und dem N-Terminus von GDF-5 bestehen, wurde Elektronendichte detektiert, was auf ein ungefähr gleiches Verhältnis zwischen offenem und geschlossenem Konformer schließen lässt. Die beiden Zustände stellen unter den prinzipiell möglichen Konformeren wahrscheinlich die mit der niedrigsten Energie dar, wobei aufgrund stereochemischer Vorgaben kaum andere Konformere mit veränderten ϕ - und ψ -Torsionswinkeln modellierbar sind. Bemerkenswert an dieser Beobachtung ist, dass die zwei Konformationen der $\beta 1\beta 2$ -Schleife im gleichen Molekül der asymmetrischen Einheit auftreten, und nicht etwa in einem zweiten Molekül derselben. Derartige Ambivalenzen bei der Elektronendichte von Proteinstrukturen sind bereits in anderen Fällen beschrieben worden, allerdings meistens bei atomarer Auflösung ($< 1,2\text{\AA}$) und zudem weniger Hauptketten- sondern mehr die Seitenkettenkonformation einzelner Aminosäuren betreffend. Beispiele hierfür sind Erabutoxin (Smith et al., 1988), Crambin (Hendrickson and Teeter, 1981), die PDZ2-Domäne von Syntenin (Kang et al., 2004) oder Calmodulin (Wilson and Brunger, 2000). Wenige Informationen finden sich hingegen für Fälle wie den hier beschriebenen, womöglich, weil derartige Phänomene wegen der uneindeutigen Elektronendichte meistens nicht weiter verfolgt bzw. interpretiert werden können.

Die beiden Konformationen der „Klappe“ von BMPR-IB sind der GDF-5-Oberfläche komplementär, die in diesem Bereich durch Aminosäurereste im N-terminalen Bereich der pre-Helix-Schleife und im N-Terminus von GDF-5 vorgegeben ist. Bei Bildung des Komplexes unterliegen die Reste in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 einer Umlagerung, die Aminosäurereste im „Zentrum“ des Bindeepitops – z.B. Phe54, Pro55 und Leu56 – in eine für die Ausbildung wichtiger hydrophober und polarer Wechselwirkungen zu BMPR-IB optimale Orientierung bringt (Abbildung V-2, S. 175). Zusätzlich ändert sich die Position von Arg57 und dessen Seitenkettenkonformation in eine Orientierung, die sich den sterischen Gegebenheiten in diesem Bereich des GDF-5•BMPR-IB-

Epitops anpasst. Die Mechanismen hinter der molekularen Erkennung (Komplementarität der Oberflächen) und der hochaffinen Bindung (Hydrophobizität) zwischen GDF-5 und BMPR-IB lassen sich demnach nicht ganz unabhängig voneinander betrachten. Die Hauptbindungs-determinante wird im GDF-5•BMPR-IB-Komplex durch Phe66 von BMPR-IB repräsentiert, wobei mit Phe54 in GDF-5 eine prinzipiell äquivalente Wechselwirkung existiert. Vermutlich wird die korrekte Orientierung von GDF-5 und BMPR-IB zueinander durch eine gleichzeitige induzierte Anpassung des Tryptophan-Motivs in den GDF-5-Fingern und von Phe66 in der α -Helix von BMPR-IB nach Arretierung der α -helikalen Struktur (siehe IV. 7. 4.) im C-terminalen Teil der BMPR-IB- β 4 β 5-Schleife vorgegeben. Der Einschluss von Phe54 in eine durch die Reste Met43, Arg78 und Ile80 von BMPR-IB gebildete hydrophobe Tasche in der Interaktionsfläche könnte die Umlagerung der pre-Helix-Schleife von GDF-5 induzieren, infolgedessen sich die Komplementarität in weiteren Bereichen der Ligand-Rezeptor-Interaktionsfläche erhöht (Abbildung V-2, S. 175).

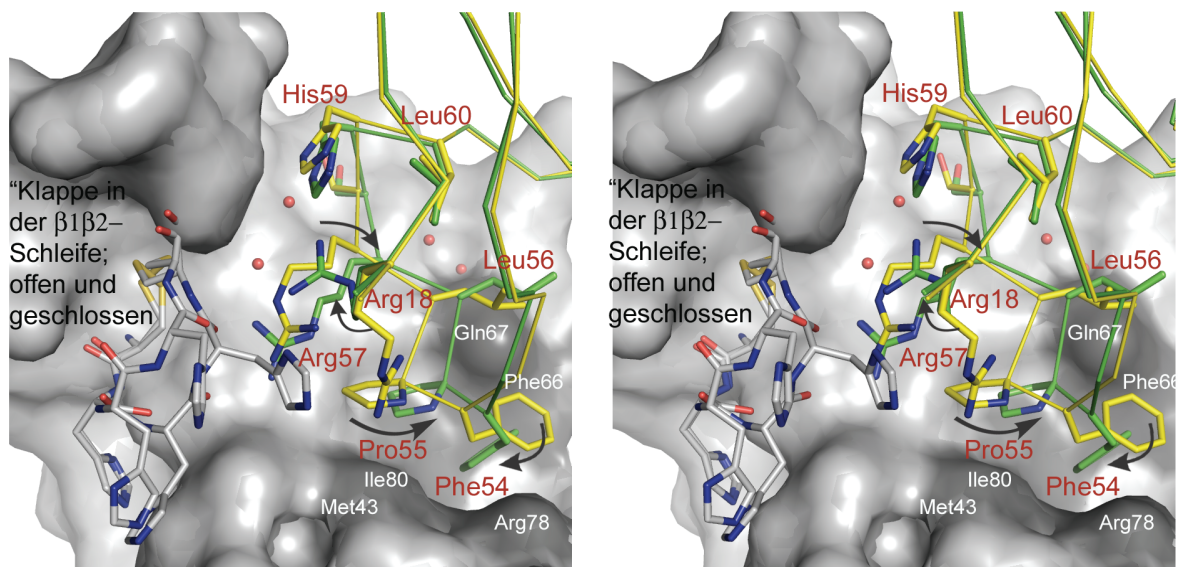


Abbildung V-2: Verknüpfung von hochaffiner Bindung und molekularer Erkennung bei der Interaktion von GDF-5 und BMPR-IB. Stereo-Ansicht der Interaktionsfläche zwischen der „Klappe“ in der β 1 β 2-Schleife von BMPR-IB (graue Oberfläche und graue Stäbchen) und der pre-Helix-Schleife und dem N-Terminus von GDF-5 (grünes Ribbon bzw. Stäbchen) im binären Komplex. Rote Kugeln repräsentieren in der Interaktionsfläche vergrabene Wassermoleküle. Gebundenes GDF-5 (grün) ist mit freiem GDF-5 (RCSB-Eintrag 1WAQ; gelb) überlagert. Erst durch die Umlagerung bei Bindung („induced fit“) und Ausbildung der Schlüssel-Schloss-Motive von Phe66 (BMPR-IB; nicht gezeigt) und Phe54 (GDF-5; im Bild) wird die Komplementarität zwischen den Interaktionsflächen des Liganden und des Rezeptors geschaffen. Die Orientierung von Arg57 (GDF-5) ändert sich dermaßen, dass sowohl die offene als auch geschlossene Konformation der „Klappe“ in der β 1 β 2-Schleife von BMPR-IB passgenau sind. Die Seitenkettenkonformation von Arg57 in freiem GDF-5 wäre mit dem geschlossenen BMPR-IB-Konformer nicht kompatibel (Kollision mit His24 von BMPR-IB).

Im Komplex ist Arg57 von Arg18, Pro55 und His59 (alle GDF-5) umgeben und „liegt“ quasi auf dem β 4-Strang von BMPR-IB. Das geschlossene BMPR-IB-Konformer ist in direktem Kontakt zur Guanidiniumgruppe von Arg57 in GDF-5, während das offene BMPR-IB-Konformer so versetzt ist, dass außer zu Arg18 in GDF-5 keine Kontakte existieren. Beiden BMPR-IB-Konformationen ist gemeinsam, dass ausreichend Freiraum für die Arg57-Seitenkette im Bindeepitop bleibt – folglich die bessere Komplementarität der Interaktionsflächen und niedrigere Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes aus GDF-5 und BMPR-IB im Vergleich zu BMPR-IA. Die Bindungsspezifität von GDF-5 für BMPR-IB kann jedoch nicht allein der „Klappe“ zugeschrieben werden, da die Mutation

von His21 und His22 in BMPR-IB zu den in BMPR-IA kodierten Resten Ser bzw. Gly keinen Verlust der spezifischen Bindungseigenschaften verursachte (Tabelle IV-9, S. 85). Der Rest Ile73 in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB, die der „Klappe“ in BMPR-IB „gegenüberliegt“, trägt möglicherweise ebenfalls zur spezifischen Erkennung bei. Ile73 ist von zwei Prolin-Resten (Pro72 und Pro74) umgeben, welche die Konformation von Ile73 bestimmen. Durch Mutation von Pro74 zu Alanin wird das Prolin-Motiv zerstört; wie bereits in V. 3. 1. beschrieben, zeigt eine BMPR-IB-P74A-Variante eine 3fach höhere Dissoziationsgeschwindigkeit und eine entsprechend niedrigere Bindungsaffinität gegenüber GDF-5, jedoch eine 2,5fach niedrigere Dissoziationsgeschwindigkeit und eine entsprechend höhere Bindungsaffinität gegenüber BMP-2 (Tabelle IX-2, S. 234). Interessanterweise wird der gleiche Effekt für die Alaninmutation von Asp70 gefunden. Asp70 von BMPR-IB bildet anders als in BMPR-IA keine intramolekulare Salzbrücke zu Arg78, sondern eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zu Ile80.

Der Verlust stereochemischer Restriktionen durch die Alaninmutation von Pro74 führt dazu, dass die Konformation von Ile73 weniger definiert ist. Mit der in Richtung von Ser74 und Met75 im N-terminalen Bereich der pre-Helix-Schleife von GDF-5 zeigenden großen Ile73-Seitenkette fehlt möglicherweise ein „Abstandhalter“ zwischen Ligand und Rezeptor, durch welchen vermutlich die Lage von BMPR-IB im und dessen Nähe zum GDF-5-Epitop reguliert wird. Eine Veränderung der Packung zwischen der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB und der post-Helix-Schleife von GDF-5 ruft am anderen „Ende“ des Bindeepitops – der $\beta 1\beta 2$ -Schleife inklusive der „Klappe“ von BMPR-IB und der pre-Helix-Schleife von GDF-5 – den gegenteiligen Effekt hervor. Die Alaninmutation von Pro74 könnte die Packungsdichte auf dieser Seite des Bindeepitops erhöhen, während sich gleichzeitig die Packungsdichte im Bereich von Arg57 in GDF-5 verringert und dessen Lösungsmittelzugänglichkeit erhöht. Die Beobachtung, dass bei Bindung von BMP-2 der gegensätzliche Effekt beobachtet wird, die BMPR-IB-P74A-Variante also fast dem BMPR-IA ähnliche Bindungsparameter aufweist, kann mit der strukturellen Plastizität der Rezeptoroberflächen erklärt werden. Bis auf die Schleifen ist die räumliche Struktur zwischen BMPR-IA und BMPR-IB trotz nur 50%iger Sequenzhomologie konserviert. Die Bindungspromiskuität zwischen BMP-Liganden und BMP-Rezeptoren basiert auf den strukturell weitgehend konservierten, stark hydrophoben Interaktionsflächen. Einzelne oder mehrere, kooperativ funktionierende Aminosäurereste in den Schleifen an der Peripherie der Ligand-Rezeptor-Interaktionsfläche erzeugen demnach die Bindungsspezifität (siehe IV. 8. 1.). Durch die BMPR-IB-P74A-Mutation könnte sich die $\alpha 1\beta 5$ -Schleife analog zur Situation in GDF-5 besser an die BMP-2-Oberfläche anpassen. Das Schließen dieser Lücke hat im Komplex mit BMP-2 einen positiven Effekt, weil der Bereich um die „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB aufgrund des Fehlens von Arg57 und Arg18 in BMP-2 keinerlei Einfluss auf die Bindungsaffinität hat.

Eine Analyse der BMPR-IA-Varianten B1 bzw. B12, in denen die $\alpha 1\beta 5$ - bzw. $\alpha 1\beta 5$ - und $\beta 4\alpha 1$ -Schleifen BMPR-IB-ähnlich sind (siehe Tabelle III-16, S. 42), deutet zusätzlich auf einen Einfluss der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife auf die molekulare Erkennung. Mutationen in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA („B1“) verändern die Bindungscharakteristik gegenüber GDF-5 nicht (Nickel et al., 2005). Erst durch den zusätzlichen Austausch von drei Aminosäuren in der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IA („B12“, M78L, K79G, Y80L) können die Bindungseigenschaften von BMPR-IB nachgeahmt werden. Damit ist klar, dass zur Erkennung von GDF-5 auch die $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB beitragen muss. Eine nähere Betrachtung der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife zeigt, dass durch die Drehung von BMPR-IB im „wrist“-Epitop von GDF-5 die Aminosäurereste Leu59, Gly60, Leu61 und Glu62 eine veränderte Position einnehmen.

Die Entfernung zwischen der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB und der GDF-5-Oberfläche (C-Terminus der α -Helix) verringert sich so im Mittel um 1,5Å.

Auch in Kristallstrukturen von GDF-5•BMPR-IA/IB^{cec}- und GDF-5-R57A•BMPR-IA^{ec}-Komplexen kann dieses Merkmal identifiziert werden. Lys79 in der $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IA entspricht Gly60 $\beta 4\alpha 1$ -Schleife von BMPR-IB; die Strukturanalyse des GDF-5-R57A•BMPR-IA^{ec}-Komplexes zeigt, dass die Konformation der entsprechenden Lysinseitenkette verändert ist. In einer energetisch ungünstigen Konformation liegt die Lys79-Seitenkette in einer „Furche“ zwischen den Resten Ser58 und Glu61 (beide GDF-5) und ist in van-der-Waals-Kontakt mit diesen Aminosäuren (Abbildung V-3, S. 180). Diese Beobachtung liefert eine mögliche Erklärung, weshalb die BMPR-IA-B12-, nicht aber die BMPR-IA-B1-Variante ein dem BMPR-IB ähnliches Bindungsverhalten gegenüber GDF-5 zeigt. Vermutlich erhöht die L79G-Mutation, möglicherweise zusammen mit M78L und Tyr80L, die Passfähigkeit der entsprechenden Ligand-Rezeptor-Interaktionsflächen; eine niedrigere Dissoziationsgeschwindigkeit und Bindungsaffinität, und damit im Vergleich zu wildtypischem BMPR-IA diskriminative Bindungseigenschaften von GDF-5 sind die Folge.

$\beta 1\beta 2$ -Schleife	Sekundärstrukturelement	
	$\beta 4\alpha 1$ - Schleife	$\alpha 1\beta 5$ - Schleife
<i>GDF-5•BMPR-IB^{ec}</i>		
Offenes und geschlossenes Konformer bedingen eine hohe Komplementarität zur GDF-5-Oberfläche, speziell Arg57.	Durch Gly60 erhöht sich die Komplementarität zur GDF-5-Oberfläche.	Geringe Packungsdichte durch einen hydrophob-polaren Kontakt zwischen Ile73 (BMPR-IB) und Ser74 (GDF-5). Offene Konformation von Asp70.
<i>GDF-5•BMPR-IA/IB^{cec}</i>		
Kontakte zur pre-Helix-Schleife und zu Arg18 von GDF-5, nicht jedoch zu Arg57 (GDF-5).	Durch Gly79 erhöht sich die Komplementarität zur GDF-5-Oberfläche.	Keine van-der-Waals-Kontakte zu den C-terminalen Resten in der α -Helix von GDF-5. Offene Konformation von Asp89.
<i>GDF-5-R57A•BMPR-IA^{ec}</i>		
Keine Kontakte.	Veränderte Konformation der Lys79-Seitenkette durch Anpassung an die GDF-5-Oberfläche.	Wasserstoffbrücken zwischen Gln94, Arg97 (BMPR-IA) und Ser69 (GDF-5). Offene Konformation von Asp89.
<i>BMP-2•BMPR-IA/IB^{cec} (2QJB)</i>		
Keine Kontakte.	Durch Gly79 erhöhte Lösungsmittelzugänglichkeit des Bindeepitops.	Offene Konformation von Asp89.
<i>BMP-2•BMPR-IA^{ec} (1REW)</i>		
Keine Kontakte.	Lys79 schirmt das Bindeepitop vom Solvens ab.	Zwei Wasserstoffbrücken zu BMP-2. Geschlossene Konformation von Asp89.

Tabelle V-1: Übersicht von Strukturmerkmalen, die der Bindungsspezifität zugrundeliegen, basierend auf den Kristallstrukturen verschiedener Komplexe.

Zusammengenommen basiert die spezifische Erkennung zwischen GDF-5 und BMPR-IB strukturell gesehen nicht auf einem einzelnen „Hotspot der Erkennung“. Im Fall von GDF-5 kann die bereits

aufgrund von Biacore-Analysen vermutete Funktion von Arg57 (Nickel et al., 2005) nun strukturell bestätigt werden. Allerdings gibt es Hinweise, dass die strukturelle Beschaffenheit der Umgebung von Arg57 Voraussetzung für dessen Funktionalität ist. Versuche, durch Austausch aller Aminosäuren in der pre-Helix-Schleife von BMP-2 gegen die entsprechenden Reste in GDF-5 dessen Bindungsspezifität zu erzeugen, schlugen fehl (Nickel et al., 2005). Möglicherweise sind weitere Aminosäuren beteiligt, beispielsweise Arg18 (GDF-5, Ser in BMP-2), das sowohl in der GDF-5•BMPR-IBec-Struktur als auch in der GDF-5•BMPR-IA/IB^cec-Struktur in Kontakt mit Arg57, His59 (beide GDF-5) und den Resten in der „Klappe“ in der β 1 β 2-Schleife des jeweiligen Rezeptors steht.

Merkmal	β 1 β 2-Schleife	β 4 α 1- Schleife	α 1 β 5- Schleife
• spezifische Bindung durch GDF-5 ^a	starr	flexibel	offen
• spezifische Bindung durch BMP-2 ^b	starr	starr	geschlossen
	flexibel	starr	geschlossen
• promiske Bindung durch GDF-5 und BMP-2 ^c	flexibel	flexibel	offen

Die Definition der aufgeführten strukturellen Merkmale ist in Tabelle IV-9 zu finden. Spezifische als auch promiske Bindung erfolgt mit hoher Affinität. Etwaige Beiträge durch das jeweilige BMPR-IA- bzw. BMPR-IB-Grundgerüst, beispielsweise infolge der Modulation von Hauptbindungsdeterminanten sind nicht berücksichtigt. Zwischenstufen, wie beispielsweise bei der BMPR-IB-P74A-Variante (starr-flexibel-geschlossen; in Richtung BMP-2-Spezifität) sind nicht angegeben.

^a Beispiel: BMPR-IB
^b Beispiel: BMPR-IA-Y39G42, BMPR-IA
^c Beispiel: BMPR-IA-B12

Tabelle V-2: Anforderungen an die Beschaffenheit der Schleifen in BMPR-IA bzw. BMPR-IB für bestimmte Bindungseigenschaften.

Für den BMPR-IB bietet sich ein etwas detailliertes Bild. Die Strukturinformationen und Bindungsdaten deuten stark darauf hin, dass die Bindungsspezifität im Rezeptor BMPR-IB durch Schleifen an den Rändern der hydrophoben Interaktionsfläche kodiert ist. Diese Schleifen regulieren die Solvenz Zugänglichkeit zum Bindeepitop und tragen positiv oder negativ zur Komplementarität der Ligand- und Rezeptoroberflächen bei. Zur Verdeutlichung des Sachverhalts lohnt ein Blick auf die in Tabelle IV-9 (S. 85) zusammengetragenen Bindungsdaten, die mit den in Tabelle V-1 (S. 177) aufgeführten Strukturmerkmalen erklärt werden können. Interessant ist die offensichtliche Dreiteiligkeit des Erkennungsmechanismus (Abbildung V-3, S. 180). Nur die kooperative Funktion der β 1 β 2- („Klappe“), β 4 α 1- und α 1 β 5-Schleifen von BMPR-IB ermöglicht die spezifische Bindung von GDF-5, möglicherweise weil nur so eine dem GDF-5 sowohl hinsichtlich stereochemischer Vorgaben als auch polarer und van-der-Waals Interaktionen komplementäre Interaktionsfläche entsteht. Tabelle IV-9 (S. 85) ist zu entnehmen, dass wenige Strukturmerkmale in den drei Schleifen wesentlich zu deren Funktion beitragen. Die β 1 β 2- und β 4 α 1-Schleifen können als „flexibel“ oder „starr“ bezeichnet werden, je nachdem, ob ein Glycin in der Schleife vorkommt. Je nach Präsenz des Pro-X-Pro-Motivs in der α 1 β 5-Schleife kann diese als „offen“ oder „geschlossen“ bezeichnet werden, sodass sich insgesamt „Mindestanforderungen“ ableiten lassen (Tabelle V-2, S. 178), die für eine spezifische Wechselwirkung mit GDF-5 notwendig sind. Betrachtet man BMPR-IB mit „starrer“ β 1 β 2-Schleife („Klappe“), „flexibler“ β 4 α 1-Schleife und „offener“ α 1 β 5-Schleife als Referenz, so weist die BMPR-IA-B12-Variante mit einer zusätzlich „flexiblen“ β 1 β 2-Schleife gegenüber GDF-5 die gleiche Dissoziationsgeschwindigkeit wie BMPR-IB auf. Zudem hat letztere Variante eine dem

BMPR-IA äquivalente Dissoziationsgeschwindigkeit gegenüber BMP-2, vereint demnach die Bindungseigenschaften von BMPR-IA als auch BMPR-IB und sollte somit auf zellulärer Ebene eine höhere Aktivität aufweisen.

Eine erhöhte Flexibilität, und damit Anpassungsfähigkeit, in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife wirkt sich positiv auf die Bindungsaffinität zu BMP-2 aus, ändert jedoch nichts an der Bindungsspezifität gegenüber GDF-5, solange die $\beta 4\alpha 1$ -Schleife anders als in BMPR-IA flexibel ist. Umgekehrt führt die Umwandlung der „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA von einer „flexiblen“ in eine „starre“ Form (BMPR-IA-Y39G42-Variante) zu einem Verlust der Bindungsaffinität zu GDF-5, während BMP-2 mit wildtypischer Bindungsaffinität gebunden wird. Eine BMP-2-A52R-Variante, bei der das in GDF-5 vorhandene Arg57 eingeführt wurde, bindet wildtypischen BMPR-IA mit 14fach (Nickel et al., 2005) und BMPR-IA-Y39G42 (Mutationen Y39K, S41H, G42H) mit 163fach niedrigerer Bindungsaffinität (Tabelle IX-4, S. 236).

V. 3. 2. 1. Modularer Aufbau des GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitops

In der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB liegt Asp70 in einer Konformation vor, die das Ligand-Rezeptor-Epitop dem Solvens öffnet. Der entstehende „Lösungsmittelkanal“ in das Zentrum des Bindeepitops, beeinträchtigt die Abschirmung des zentralen Wasserstoffbrückennetzwerks und reduziert den enthalpischen Anteil an der Bindungsenergie. Das gleiche gilt für die $\beta 1\beta 2$ - und $\beta 4\alpha 1$ -Schleifen in Abhängigkeit von deren Konformation. Ein Oberflächenmodell von BMPR-IB illustriert, dass der zentrale Bereich der Interaktionsfläche mit den Bindungsdeterminanten im GDF-5•BMPR-IB-Komplex kaum vom Solvens abgeschirmt ist. Anders als im BMP-2:BMPR-IA-Komplex wird dadurch das zentrale Wasserstoffbrückennetzwerk destabilisiert, insbesondere eine zweizählige Wasserstoffbrücke zwischen Gln67 (BMPR-IB) und Leu56 (GDF-5), die von zwei strukturell konservierten Wassermolekülen umgeben ist (Abbildung V-3, S. 180). Vermutlich tragen aus diesem Grund diese zentralen Wasserstoffbrücken nur geringfügig zur Bindungsenergie bei. Wie eine eingeschränkte Mutagenese an BMPR-IB zeigt, stellt die hydrophobe Schlüssel-Schloss-Beziehung von Phe66 (BMPR-IB) den Hotspot der Bindung im GDF-5•BMPR-IB-Komplex dar ($\Delta\Delta G \sim 4,7\text{kcal mol}^{-1}$, Tabelle IV-25, S. 141). Dies ist der Situation im BMP-2•BMPR-IA-Komplex gegensätzlich, in welchem der Hotspot der Bindung durch die oben genannte zweizählige Wasserstoffbrücke repräsentiert wird („O-Ring“-Motiv (Bogan and Thorn, 1998)). Das „knob-into-hole“-Motiv ist weniger von der erhöhten Lösungsmittelzugänglichkeit des Bindeepitops betroffen, solange die Wassermoleküle in der Bindungstasche bei Bildung des Komplexes effizient aus der Interaktionsfläche der Bindungspartner verdrängt werden. Diese Voraussetzung ist für die hydrophobe Tasche auf der GDF-5-Oberfläche, die Phe66 von BMPR-IB beherbergt, gegeben („complemented pocket“) (Li et al., 2004). Im Komplex ist Phe66 von BMPR-IB zu 100% von anderen Aminosäureresten in GDF-5 bzw. BMPR-IB umgeben, was eine notwendige, gleichwohl nicht hinreichende Voraussetzung für einen Hotspot der Bindung ist (Bogan and Thorn, 1998). Zusätzlich kann Phe66 aufgrund seiner aromatischen Seitenkette und der Aromatizität der umgebenden Reste π - π -stacking Wechselwirkungen eingehen, was zusätzlich Bindungsenergie erzeugt.

Ähnliches sollte für die weniger definierte und von Resten des Liganden und des Rezeptors ausgebildete Tasche gelten, die Phe54 von GDF-5 aufnimmt. Eine vollständige Abschirmung vom Lösungsmittel liegt anders als bei der Tasche für Phe66 jedoch nicht vor. Ungeklärt ist, ob andere hydrophobe Reste in BMPR-IB, die ähnlich wie Phe66 bei Komplexbildung komplett eingeschlossen

werden, beispielsweise Phe41 und Met43, ähnlich stark zur Bindungsenergie beitragen oder die Bindungsstärke der beiden genannten Schlüssel-Schloss-Motive modulieren. Der Phenylring von Phe41 in BMPR-IB zeigt senkrecht auf die Ebene der Guanidinium-Gruppe von Arg57 in GDF-5 und wird praktisch durch Arg57 in GDF-5 gegenüber dem Solvens abgeschirmt. Met43 im β -Strang von BMPR-IB könnte die Stärke der Phe54-Interaktion beeinflussen, worauf auch Ergebnisse aus Mutagenesestudien mit BMPR-IA deuten (Hatta et al., 2000; Kotzsch et al., 2008). Ferner deutet

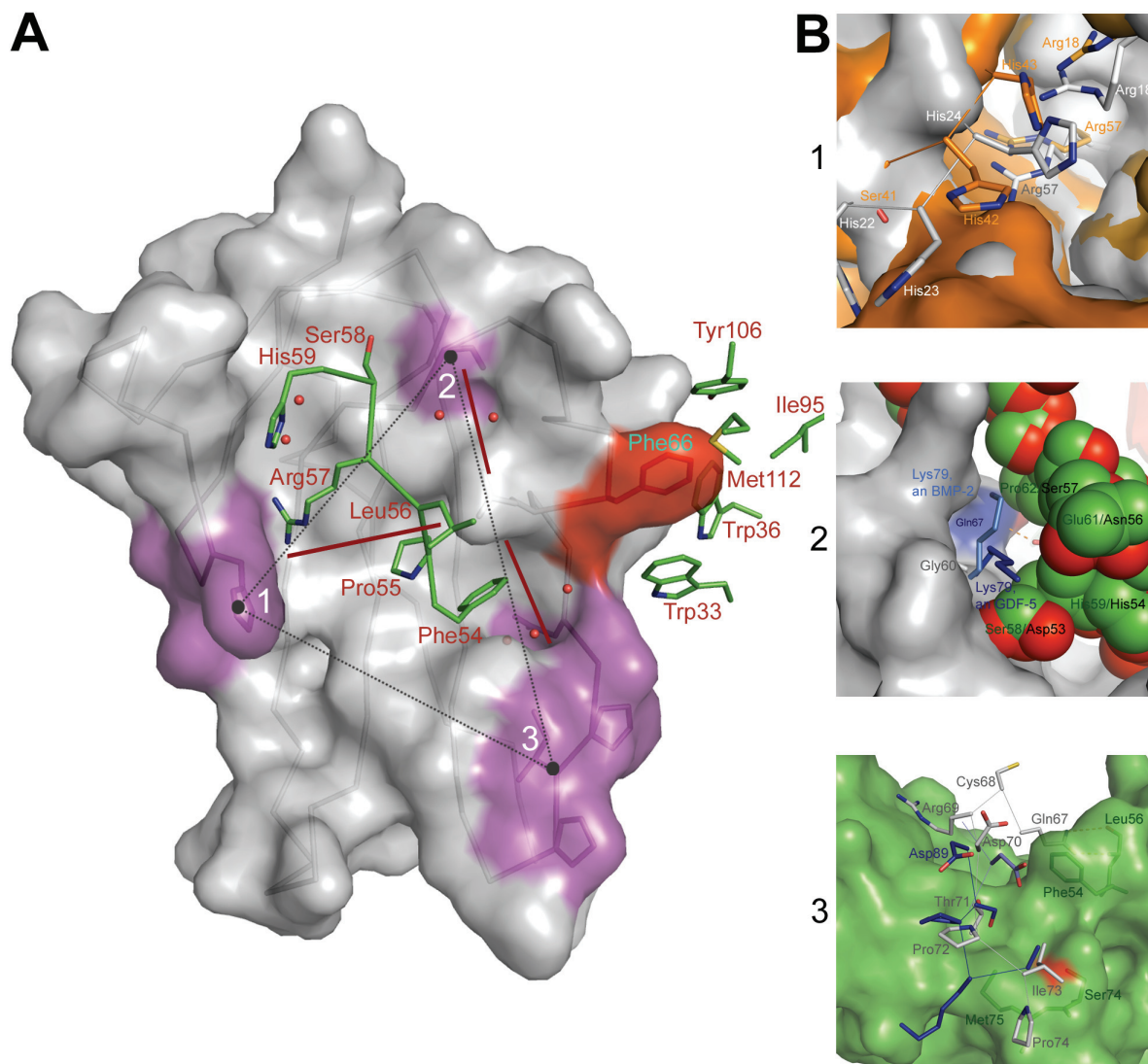


Abbildung V-3: Modularität im GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitop. **A:** Oberfläche von BMPR-IB mit durchscheinender C α -Kette (grau). Ausgewählte, in der pre-Helix-Schleife und im Finger 2 von GDF-5 lokalisierte Reste sind als grüne Stäbchen dargestellt. Schleifen von BMPR-IB, die zur Erkennung beitragen, sind magenta gefärbt (1... β 1 β 2-Schleife, 2... β 4 α 1- Schleife, 3... α 1 β 5- Schleife). Der Hotspot der Bindung der GDF-5•BMPR-IB-Interaktion – Phe66 – ist rot markiert. Gln67 in BMPR-IB (Gln86 im BMP-2•BMPR-IA-Komplex) ist als graues Stäbchen unter der Oberfläche gezeigt. Die drei BMPR-IB-Schleifen wirken kooperativ (gestrichelte Linien). Die Konformation der einzelnen Schleifen bestimmt die Spezifität der Interaktion. Gleichzeitig wird der Solvenszugang zum Zentrum des Bindeepitops (definiert als Phe66 und Gln67) reguliert. Wegen der Flexibilität der Schleifen in BMPR-IB ist das Bindeepitop, insbesondere das Wasserstoffbrückennetzwerk um Gln67 vergleichsweise wenig vom Solvens abgeschirmt (rote Linien zeigen schematisch die „Lösungsmittelkanäle“ im Bindeepitop). Vermutlich wegen der besseren Abschirmung stellt Phe66 von BMPR-IB den Hotspot der Bindung im GDF-5•BMPR-IB-Komplex. **B:** Vergrößerung der drei in (A) hervorgehobenen Schleifen in BMPR-IB (1-3) unter Einbeziehung von Kristallstrukturen anderer Komplexe, die den hier vorgestellten Mechanismus der molekularen Erkennung untermauern. (Bildbeschreibung wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.)

Thr71 in der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IB wegen der polaren Hydroxylgruppe in Thr71 und der überwiegend hydrophoben Umgebung auf ein mögliches Hotspot-Motiv. Allerdings ist unklar, ob eine potentielle, geometrisch erlaubte Wasserstoffbrücke zwischen Thr71 (BMPR-IB) und Trp33 (GDF-5), mit einem Donor-Akzeptor-Abstand von $3,3\text{\AA}$ etwas über dem Durchschnittswert (Xu et al., 1997), auch ausgebildet wird.

Nur vermutet werden kann im Moment, ob die unterschiedlichen Hauptbindungs-determinanten – in BMPR-IA Gln86, in BMPR-IB Phe66 – rezeptor- oder ligandspezifisch sind. Die BMPR-IB-F66A-Variante zeigt weder gegenüber GDF-5 noch BMP-2 Bindungsaktivität, während die BMPR-IB-Q67A-Variante eine 3-4fach niedrigere Bindungsaffinität gegenüber beiden Liganden aufweist. Bei Bindung von GDF-5 ist nur die Dissoziationsgeschwindigkeit, bei Bindung von BMP-2 sind sowohl Assoziations- als auch Dissoziationsgeschwindigkeit erhöht. Demzufolge besitzt Gln67 von BMPR-IB nur eine geringe funktionelle Bedeutung bei Bindung der Liganden. Die geringere Stabilität der Komplexe mit der BMPR-IB-Q67A-Variante ist wahrscheinlich auf eine „Lücke“ in der Interaktionsfläche zurückzuführen, die durch die fehlende Gln67-Seitenkette entsteht und welche vermutlich mit Solvensmolekülen gefüllt ist (Li et al., 2004). Eine BMPR-IA-F85A-Variante wurde von Hatta et al. präpariert (Hatta et al., 2000), jedoch nur Bindungsdaten gegenüber BMP-2 und nicht GDF-5 gemessen. Die Alaninmutation von Phe85 bedingt demzufolge eine 15fach niedrigere Bindungsaffinität zu BMP-2. Dies liegt vor allem an der 6fach niedrigeren Assoziationsgeschwindigkeit. Ähnliche Effekte wurden auf Ligandenseite bei Alaninmutationen von Val26 und Pro49 in BMP-2 (Met31 und Pro55 in GDF-5) beobachtet, die Bestandteil der hydrophoben Tasche für Phe85 (BMPR-IA) sind (Kirsch et al., 2000a). Andere Untersuchungen mit einer BMPR-IA-Q86A-Variante zeigen eine mehr als 80fach verringerte Bindungsaffinität gegenüber BMP-2 (Keller et al., 2004), für GDF-5 existieren keine entsprechenden Daten. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Bindungsaffinität rezeptorspezifisch erzeugt wird. Demnach existieren unterschiedliche Hauptbindungs-determinanten in Komplexen zwischen BMP-Liganden und BMPR-IA und zwischen BMP-Liganden und BMPR-IB. Die Liganden BMP-2 und GDF-5 „unterstützen“ hingegen beide Interaktionstypen. Welche Interaktion wichtig ist, hängt wahrscheinlich von der im Rezeptor kodierten Sekundärstruktur und der Lösungsmittelabschirmung von potentiellen Hauptbindungs-determinanten ab.

(Fortsetzung der Bildbeschreibung zu Abbildung V-3, S. 180)

B1: Vergleich der $\beta 1\beta 2$ -Schleifen in den GDF-5•BMPR-IB- (grau) und GDF-5•BMPR-IA/IB^C- (orange) Komplexen. **B2:** Vergleich der $\beta 4\alpha 1$ -Schleifen in GDF-5•BMPR-IB- (grüne Sphären und graue Oberfläche) und GDF-5-R57A•BMPR-IA- bzw. BMP-2•BMPR-IA-Komplexen. Von letzteren beiden Komplexen ist jeweils nur Lys79 von BMPR-IA gezeigt, das entweder ähnlich einem „Deckel“ den Lösungsmittelkanal zu Gln86 (BMPR-IA) verschließt (magenta), oder – wie im Komplex mit GDF-5 – wegen sterischer Einschränkungen einer Umlagerung unterliegt (blau). **B3:** Vergleich der $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen in den GDF-5•BMPR-IB- (grüne Oberfläche und graue Stäbchen) und GDF-5-R57A•BMPR-IA-Komplexen. Von letzterem ist nur ein Teil der $\alpha 1\beta 5$ -Schleife von BMPR-IA gezeigt (blau). Asp70 in BMPR-IB bildet in einer offenen Konformation zwei intramolekulare Wasserstoffbrücken mit Ser79 und Ile80 aus (nicht gezeigt). Asp89 von BMPR-IA in Komplex mit GDF-5-R57A zeigt in das Solvens (tiefblau), während im Komplex mit BMP-2 eine geschlossene Konformation (hellblau) vorliegt. Die dadurch entstehende intramolekulare Salzbrücke mit Arg97 (nicht gezeigt) schirmt das Zentrum des Bindeepitops vom Solvens ab. Die drei Schleifen erinnern an sogenannte komplementaritätsbestimmende Regionen (engl. complementarity-determining region) in Antigen-Antikörper-Komplexen (Bhat et al., 1994).

Die Aminosäuresequenzen von BMPR-IB und BMPR-IA im Bereich der α -Helix, in der sich Phe66 (Phe85) und Gln67 (Gln86) befinden, sind hoch konserviert. Der einzige Unterschied liegt in der Länge der α -Helix. In BMPR-IB ist die α -Helix um eine Windung auf die Reste Ser64 bis Gln67 verkürzt, was möglicherweise mit der veränderten Konformation von Asp70 zusammenhängt. Selbst die Disulfidbrücke zwischen Cys68 und Cys82 im strukturell definierten β 5-Strang stabilisiert die α -Helix offensichtlich nicht ausreichend. Auch die chemische Umgebung von Gln67 unterscheidet sich bis auf ein Valin an Position 67 von GDF-5 (Ile62 in BMP-2) und ein Leucin an Position 59 von BMPR-IB (Met78 in BMPR-IA) nicht von der in BMPR-IA. Entsprechend der Theorie des „O-Ring“-Motivs sollte sich die Bindungsaffinität zum Liganden durch Veränderung der Hydrophobizität um den Hotspot modulieren lassen (Bogan and Thorn, 1998); die Mutationen I62A und Leu66 in BMP-2 zeigen einen entsprechenden Effekt (Kirsch et al., 2000a). In Analogie dazu wurde beispielsweise auch für HGH•HGHbp-Komplexe gezeigt, dass die Alaninmutation hydrophober Reste um einen Hotspot der Bindung zur Destabilisierung desselben führt (Clackson et al., 1998). Interessanterweise befindet sich Gln67 von BMPR-IB in van-der-Waals-Abstand zu Phe54 von GDF-5. Somit beeinflussen sich beide Reste wechselseitig, indem die Gln67-Seitenkette ein Teil der hydrophoben Tasche für Phe54 bildet, während im Gegenzug Phe54 zur Hydrophobizität und damit zur energetischen Stabilität des „O-Ring“-Motivs beiträgt. Demnach können die bei Alaninmutation von Gln67 in BMPR-IB beobachteten Einbußen bei der Bindungsaffinität gegenüber GDF-5 auch auf eine Abschwächung der Schlüssel-Schloss-Interaktion von Phe54 zurückzuführen sein (*trans*-Effekt). Phe54 von GDF-5 kann demnach eine dreifache Funktion zugeschrieben werden, weil es (1) zur Umlagerung der pre-Helix-Schleife von GDF-5 bei Komplexbildung und (2) zur Entstehung des „O-Ring“-Motivs beiträgt, sowie (3) selbst Bestandteil des „knob-into-hole“-Motivs ist. Dementsprechend wird bei Alaninmutation von Phe49 in BMP-2 eine 10fach niedrigere Assoziationsgeschwindigkeit beobachtet (Kirsch et al., 2000a). Ähnliche Ergebnisse resultieren aus der Mutation des parallel zu Phe49 orientierten Pro50 in BMP-2 (Pro55 in GDF-5). Analog zu Phe49 könnte dieser Effekt auf eine Abschwächung der Schlüssel-Schloss-Interaktion zurückzuführen sein; Pro50 trägt jedoch wahrscheinlich auch zur Stabilisierung der pre-Helix-Schleife in der bindungsaktiven Konformation bei, ähnlich wie man es für die duale Funktion von Pro106 in HGHbp beschrieben hat (Clackson et al., 1998).

V. 3. 2. 2. Vergleich mit der molekularen Erkennung von anderen Typ I Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie

Unter BMP Rezeptoren der Subtypen IA und IB verschiedener Wirbeltiere sind nicht nur Phe66 und Gln67, sondern jeweils fast die gesamte Aminosäuresequenz der extrazellulären Domänen einander homolog, sodass keine Spezies-Spezifität existiert. Den BMP Typ I Rezeptoren entsprechende Proteine in Drosophila, Saxophon und Thickvein (Nellen et al., 1994), können beispielsweise auch durch humane BMP-Liganden rekrutiert werden (Brummel et al., 1994; Penton et al., 1994). In anderen BMP Typ I Rezeptoren wie ActR-I sind sowohl Phe66 als auch Gln67 nicht vollständig konserviert (Sequenzvergleich in Abbildung V-5, S. 186), was vermutlich mit der durchweg niedrigeren Bindungsaffinität gegenüber BMP-2, BMP-6 oder BMP-7 korreliert. Sequenzvergleiche von BMPR-IB und ActR-I sowie ein ActR-I-Modell zeigen, dass in binären Komplexen mit ActR-I die Funktionalität von Phe66 durch Methionin, die von Gln67 durch Threonin übernommen wird (Saremba et al., 2008). Die mangelnde Bindungsaffinität zwischen ActR-I und BMP-2 könnte auf entropische und sterische Ursachen sowie das Fehlen von elektrostatischen Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Dies lässt vermuten, dass die Bindungsaffinität zwischen ActR-I und BMP-6

bzw. BMP-7 (K_D : 39 μ M bzw. 55 μ M) durch eine bessere Komplementarität der Interaktionsflächen und entsprechend stärkere hydrophobe Wechselwirkungen erreicht wird. Das Fehlen der für BMPR-IA und BMPR-IB charakteristischen Hauptbindungs determinanten in ActR-I äußert sich jedoch in mindestens einer Größenordnung schnelleren Geschwindigkeitskonstanten für diesen Rezeptor, woraus auch die mikromolare Bindungsaffinität resultiert. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass ein Kohlenhydratrest (GlcNAc) an Asn73 von BMP-6 erheblich zur Bindungsaffinität gegenüber ActR-I beiträgt und einen Hotspot der Bindung darstellt (Saremba et al., 2008). Im Gegensatz dazu hängt die Bindungsaffinität von BMP-6 zu BMPR-IA und BMPR-IB nicht von der N-Glykosylierung ab, vermutlich weil der energetische Beitrag aus einer potentiellen Interaktion von peripheren Rezeptor-Schleifen mit dem Zuckerrest im Vergleich zu den Hauptbindungs determinanten marginal ist und deshalb keine Rolle spielt. In ActR-I ist nicht nur die β 1 β 2-Schleife um drei Reste verkürzt, auch die β 4 α 1-Schleife enthält einen Rest mehr (Tyr54). Über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum GlcNAc-Rest an Asn73 von BMP-6 könnte genug Bindungsenergie aufgebracht werden, um die Bindungsaffinität in den mikromolaren Bereich zu verschieben (Abbildung V-4, S. 184).

Mit der hohen strukturellen Homologie von BMP-2 (Scheufler et al., 1999), BMP-6 (Allendorph et al., 2007; Saremba et al., 2008), BMP-7 (Griffith et al., 1996b) und GDF-5 (Nickel et al., 2005) wird den Rezeptoren eine in weiten Teilen konservierte Interaktionsfläche präsentiert, auf der wichtige Erkennungsmotive in der pre-Helix-Schleife, in der α -Helix und in Finger 2 strukturelle und chemische Gemeinsamkeiten zeigen (siehe auch Sequenzvergleich in Abbildung V-5, S. 186). Wie Biacore-Messungen zeigen, bindet BMP-6 mit einer Bindungsaffinität von 0,39 μ M an BMPR-IB (1:1-Interaktion mit immobilisiertem Liganden), was etwa der Bindungsaffinität von BMPR-IA an GDF-5 entspricht (K_D = 0,37 μ M, 1:1-Interaktion). BMPR-IA wird von BMP-6 mit einer noch niedrigeren Bindungsaffinität von 1,6 μ M (1:1-Interaktion) gebunden. Die Bindungsaffinität zwischen BMP-7 und BMPR-IB ist mit 1,1 μ M (1:1-Interaktion) höher als für die Interaktion von BMP-7 mit BMPR-IA (10 μ M, 1:1-Interaktion). Dementsprechend kann eine der GDF-5•BMPR-IB-Interaktion ähnliche Bindungsspezifität auch für Komplexe von BMP-6 bzw. BMP-7 und BMPR-IB beobachtet werden. Dies führt zu der Frage, worauf die Unterschiede in der Bindung von BMPR-IA und BMPR-IB durch BMP-6 bzw. BMP-7 im Vergleich zu BMP-2 und GDF-5 (Bindungsaffinitäten der 1:1-Interaktion in Tabelle IX-4, S. 236) zurückzuführen sind.

Die Kristallstrukturen von BMP-6 und BMP-7 sind bekannt (Allendorph et al., 2007; Greenwald et al., 2003; Griffith et al., 1996b; Groppe et al., 2002; Saremba et al., 2008), Komplexe mit BMP Typ I Rezeptoren wurden bisher allerdings nicht strukturell charakterisiert. Die Kristallstrukturen zeigen, dass die „knob-into-hole“- und „O-Ring“-Motive sowie die hydrophobe Interaktionsfläche in BMP-6 und BMP-7 vorhanden sind, sodass diesbezüglich nur vergleichsweise geringe Unterschiede zu GDF-5 bzw. BMP-2 existieren. Für die diskriminativen Bindungseigenschaften von BMP-6 bzw. BMP-7 an BMPR-IA und BMPR-IB bieten sterische Behinderungen an peripheren Schleifen die wahrscheinlichste Erklärung, so beispielsweise zwischen der α 1 β 5-Schleife in den Rezeptoren und Aminosäureresten im N-Terminus der pre-Helix-Schleife von BMP-7. Die Position von Phe93 in BMP-7 (RCSB-Einträge 1LX5, 1BMP; Ser74 in GDF-5) überschneidet sich in diesem Fall mit der von Ile73 in BMPR-IB bzw. Ala93 in BMPR-IA. Möglicherweise unterscheidet sich deshalb in einem BMP-7•BMPR-IB-Komplex die Orientierung von BMPR-IB im Bindepitop nochmals von der im Komplex mit GDF-5. In der Kristallstruktur von BMP-6 werden zwei unterschiedliche Konformationen für dessen pre-Helix-Schleife beobachtet (Saremba et al., 2008). Eine dieser Konformationen in BMP-6 ist sterisch nicht mit den Konformationen der β 4 α 1-Schleife von BMPR-

IA kompatibel. Gleiches gilt für die $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA. Ähnlich wie im Strukturmodell eines GDF-5•BMPR-IA-Komplexes (siehe Abbildung V-10A, S. 199) könnte auch in einem BMP-6•BMPR-IA-Komplex eine sterische Hinderung zwischen His43 in der „Klappe“ der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA und Resten in der pre-Helix-Schleife von BMP-6 auftreten. Allerdings befindet sich an der Position von Arg57 in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 in BMP-6 ein Asparagin-Rest (siehe Sequenzvergleich in Abbildung V-5, S. 186), sodass möglicherweise andere Reste wie Pro67 (Pro55 in GDF-5) eine Rolle für die Erkennung spielen. Im Gegensatz dazu sind für die $\beta 4\alpha 1$ -Schleife und die vorgebildeten Konformationen der $\beta 1\beta 2$ -Schleife in BMPR-IB keine sterischen Konflikte zu erwarten. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass für die Erkennung von BMPR-IB und BMPR-IA durch BMP-6 ähnliche molekulare Mechanismen wie für die Erkennung durch GDF-5 in Frage kommen.

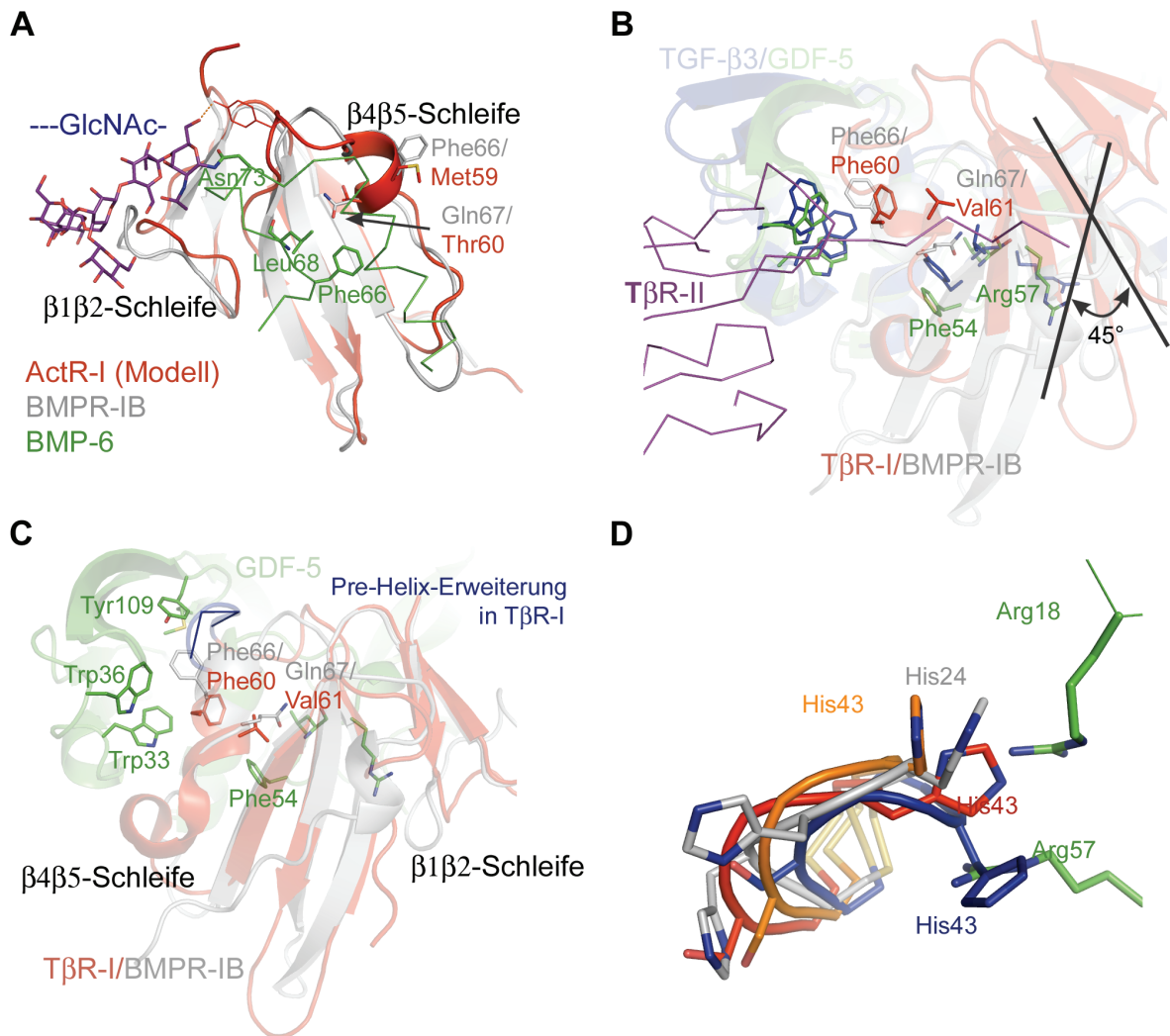


Abbildung V-4: Erkennung von Typ I Rezeptoren in der TGF- β -Superfamilie. A: Bindeepitop im Modell des BMP-6•ActR-I-Komplexes (BMP-6: grüne α -Darstellung der pre-Helix-Schleife und der α -Helix, ActR-I: rotes Bändermodell). BMPR-IB (grau) ist mit ActR-I überlagert. Wegen Unterschieden in der Aminosäuresequenz von ActR-I im Vergleich zu BMPR-IA bzw. BMPR-IB werden wahrscheinlich Wechselwirkungen wie die zentrale zweizählige Wasserstoffbrücke („O-Ring“-Motiv) nicht ausgebildet. Auch das „knob-into-hole“-Motiv ist weniger ausgeprägt (Met anstelle von Phe), was die niedrige Bindungsaffinität von ActR-I im Vergleich zu BMPR-IB erklären würde. Ohne den Zuckerrest (blaue Stäbchen) an Asn73 von BMP-6 findet keine Bindung an ActR-I statt, während BMPR-IB unverändert gebunden wird (Saremba et al., 2008).

(Bildbeschreibung wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.)

Die Frage, warum andere Typ I Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie wie T β R-I, ActR-IB oder ActR-IC trotz einiger struktureller Gemeinsamkeiten und dem vermutlich konservierten Cysteinbrückenmuster (siehe Abbildung V-5, S. 186) Liganden der BMP-Familie nicht binden können, lässt sich teilweise mit der kürzlich publizierten Kristallstruktur des TGF- β 3•T β R-I•T β R-II-Komplexes beantworten (Groppe et al., 2008). Wie bereits länger bekannt, kann T β R-I nur in den binären TGF- β 3•T β R-II-Komplex, nicht jedoch von TGF- β allein in einen potentiellen TGF- β 3•T β R-I-Komplex rekrutiert werden (Zuniga et al., 2005). Die Kristallstruktur des ternären TGF- β -Komplexes zeigt, dass sowohl TGF- β 3 als auch T β R-II Kontakte zu der pre-Helix-Erweiterung von T β R-I (siehe Sequenzvergleich in Abbildung V-5, S. 186) ausbilden, die für die Bindung von T β R-I essentiell sind (Groppe et al., 2008). Die zusätzlichen Aminosäurereste in der β 4 β 5-Schleife von T β R-I führen im Vergleich zu BMPR-IA oder BMPR-IB zu einem fast vollständigem Verlust der α -Helix. Das in T β R-I konservierte „Phe66“ befindet sich deshalb nicht in der gleichen Orientierung wie in BMPR-IB (Abbildung V-4, S. 184). Andererseits passt die Konformation von Phe60 in T β R-I zur entsprechenden hydrophoben Kontaktfläche von TGF- β 3, die zwar ähnlich wie bei den BMP-Liganden durch Trp30 und Trp32 in Finger 2 von TGF- β 3 repräsentiert wird, aber von der Struktur her nicht der aus GDF-5 oder BMP-2 bekannten hydrophoben Tasche entspricht. Dies ist womöglich einer der Gründe, weshalb BMP Typ I Rezeptoren keine Bindungsaffinität zu TGF- β -Liganden zeigen. Weiterhin unterscheidet sich die Position von T β R-I im TGF- β 3-Bindeepitop infolge einer 45°-Rotation um die lange Achse von TGF- β 3 stark von der Position, die BMPR-IB im GDF-5-Epitop einnimmt (Abbildung V-4, S. 184). Auch die pre-Helix-Schleife von TGF- β 3 ist im Vergleich zu GDF-5 um drei Reste (Ser58, His59, Leu60 in GDF-5) verkürzt (Groppe et al., 2008), was direkte Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften gegenüber den Typ I Rezeptoren haben dürfte. Umgekehrt ist die pre-Helix-Erweiterung in T β R-I wahrscheinlich für die fehlende Bindungsaffinität gegenüber BMP-Liganden verantwortlich, weil sterische Konflikte mit entsprechenden Aminosäureresten in Finger 2 der BMP-Liganden auftreten würden. Demnach weisen TGF- β Typ I Rezeptoren – repräsentiert durch T β R-I – und BMP Typ I Rezeptoren –

(Fortsetzung der Bildbeschreibung zu Abbildung V-4, S. 184.)

Die β 1 β 2- und β 4 α 1-Schleifen von BMPR-IB sind jeweils um einen Rest kürzer als in ActR-I, wodurch sich zusätzliche Kontakte zum Zuckerrest ergeben. **B:** Vergleich der Positionen von T β R-I und BMPR-IB in den Ligand-Epitopen von TGF- β 3 und GDF-5. Die Typ I Rezeptoren binden in zwei unterschiedlichen Interaktionsmodi. Während BMPR-IB infolge der dichten Packung an GDF-5 und der beschriebenen Hotspot-Wechselwirkungen hochaffin an GDF-5 bindet, kann T β R-I nur in Gegenwart von T β R-II in einen ternären Komplex (Groppe et al., 2008) rekrutiert werden. Die Packungsdichte zwischen T β R-I und TGF- β 3 ist wegen der 45°-Drehung (siehe schwarze Linien) vergleichsweise gering; die im GDF-5•BMPR-IB-Komplex beobachteten Wechselwirkungen können so nicht ausgebildet werden. Zudem weisen die pre-Helix-Schleife und die Finger von TGF- β 3 eine veränderte Konformation auf, wodurch die Bindung von BMP-Rezeptoren verhindert wird. **C:** Überlagerung von T β R-I mit BMPR-IB im Komplex mit GDF-5. Beide Rezeptoren besitzen eine sehr ähnliche Faltung. Mit Phe60 und Val61 (beide T β R-I; Phe66 und Gln67 in BMPR-IB) sind auch potentielle Bindungsdeterminanten konserviert. Die pre-Helix-Erweiterung von T β R-I führt jedoch zu einer im Vergleich mit BMPR-IB veränderten Faltung der β 4 β 5-Schleife und zu sterischen Konflikten bei Bindung von BMP-Liganden. **D:** Überlagerung der β 1 β 2-Schleifen von BMPR-IB (geschlossenes Konformer, grau), BMPR-IA (blau) und den zwei häufigsten Konformeren der NMR-Strukturschar von BMPR-IA (orange und rot) im potentiellen Komplex mit GDF-5 (grün). Die Konformation des geschlossenen BMPR-IB-Konformers (grau) ähnelt stark der von BMPR-IA in freiem Zustand (orange). Die β 1 β 2-Schleife von BMPR-IA ist flexibel.

repräsentiert durch BMPR-IA und BMPR-IB – zwei völlig unterschiedliche Bindungsmechanismen auf, die sich strukturell grundsätzlich unterscheiden. Die jeweils hohe Oberflächenkomplementarität zwischen TGF- β s und T β R-I sowie BMPs und BMPR-IA bzw. BMPR-IB sorgt dafür, dass innerhalb dieser TGF- β -Familien die Bindung promisk erfolgen kann, aber kein „Austausch“ („cross-talk“) möglich ist, also beispielsweise T β R-I durch BMP-2 rekrutiert wird. Daraus ergibt sich eine sehr hohe Spezifität für den intrazellulär aktivierten Signalweg (Smad2/3 für TGF- β s, Smad1/5/8 für BMPs).

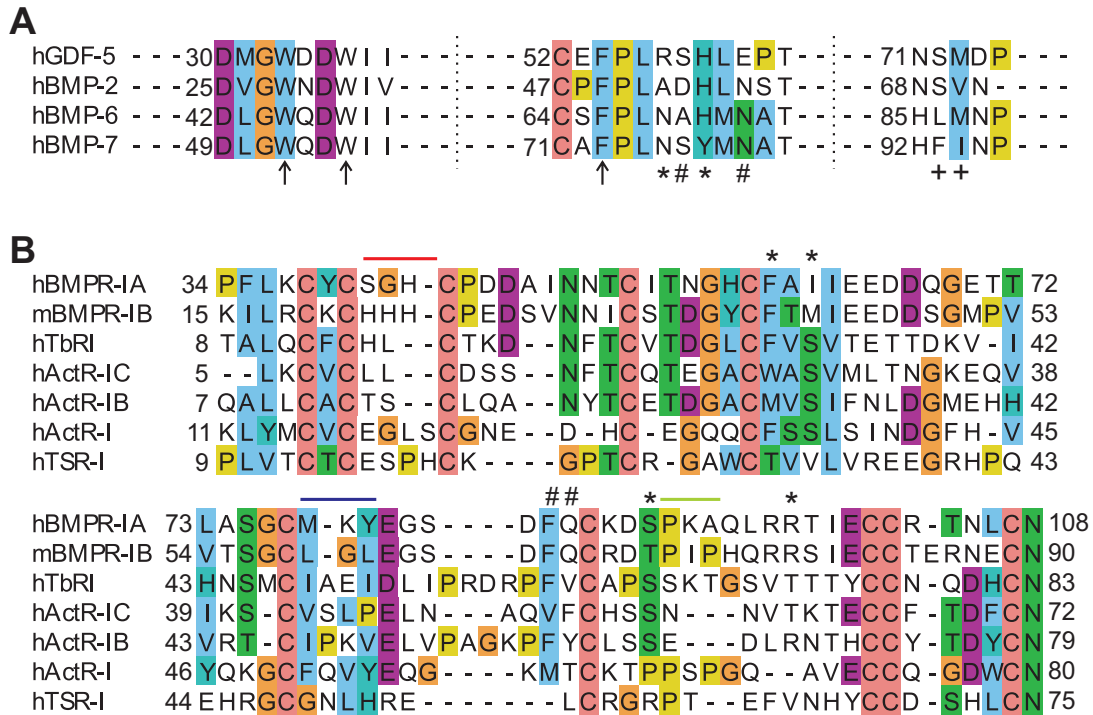


Abbildung V-5: Aminosäuresequenzvergleich ausgewählter BMP Liganden und Typ I Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie. **A:** Sequenzvergleich von GDF-5, BMP-2, BMP-6 und BMP-7. Die Farbgebung erfolgte mit ClustalX. Die Pfeile weisen auf Reste hin, die am „knob-into-hole“-Motiv beteiligt und hoch konserviert sind. Die Sterne bezeichnen Reste, die mit der β 1 β 2-Schleife von BMPR-IB, die Rauten Reste, die mit der β 4 α 1-Schleife von BMPR-IB und die Pluszeichen Reste, die mit der α 1 β 5-Schleife von BMPR-IB in Kontakt stehen. **B:** Sequenzvergleich der sieben Typ I Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie. Die Nummerierung beginnt mit der extrazellulären Domäne, das Signalpeptid wird nicht einbezogen. Die Cysteinbrücken werden als konserviert betrachtet. Ein Modell von ActR-I (Saremba et al., 2008) sowie die kürzlich publizierte Struktur von T β R-I (Groppe et al., 2008) weisen darauf hin. Sterne bezeichnen Reste, die im GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitop zu fast 100% bedeckt sind und vermutlich die Stärke der „knob-into-hole“-Motive modulieren. Rauten kennzeichnen die Bindungsdeterminanten in Komplexen von BMPR-IA bzw. BMPR-IB. Die farbigen Linien geben die drei für die molekulare Erkennung von GDF-5 und BMPR-IB wichtigen Schleifen an: rot - β 1 β 2-Schleife; blau - β 4 α 1-Schleife; grün - α 1 β 5-Schleife.

Neben T β R-I weist nur ActR-IB eine pre-Helix-Erweiterung auf (Abbildung V-5, S. 186). Vermutet wird, dass die pre-Helix-Erweiterung ein Grund dafür ist, dass ActR-IB durch Activin A in Abwesenheit eines Typ II Rezeptors nicht gebunden werden kann (Harrison et al., 2003; Harrison et al., 2004). Mutagenesestudien an Activin A und ActR-IB zeigen, dass weder die pre-Helix-Schleife von Activin A noch die potentiellen „knob-into-hole“- (Phe59 von ActR-IB; Phe66 in BMPR-IB) oder „O-Ring“-Motive (Tyr60 von ActR-IB; Gln67 in BMPR-IA) von Bedeutung für die Bildung eines signalaktiven Komplexes aus Activin A und ActR-IB sind. Die Bindungsaffinität wird vielmehr durch Aminosäuren in der Schleife nach dem β 4-Strang von ActR-IB (Ile47, Val50 und Leu52; Leu59, Leu61 und Gly63 in der β 4 α 1-Schleife von BMPR-IB) und in der pre-Helix-Erweiterung von

ActR-IB erzeugt (Harrison et al., 2003). Für Activin Ligand-Rezeptor-Komplexe muss ein dritter Bindungsmechanismus existieren, der sich von dem der BMP- und TGF- β -Familien unterscheidet, weil Activin Typ II Rezeptoren anders als TGF- β Typ II Rezeptoren auf der konvexen Seite der Finger von BMP- und Activin-Liganden und nicht an den Fingerspitzen binden (Greenwald et al., 2003; Thompson et al., 2003). Derzeit ist unklar, wie sich der aus experimentellen Befunden ableitbare kooperative und sequentielle Bindungsmodus (Tsuchida et al., 1993) strukturell auf ternäre Activin•Typ I Rezeptor•Typ II Rezeptor-Komplexe übertragen lässt, wenn Activin Typ I und Typ II Rezeptoren nicht in unmittelbarer Entfernung zueinander positioniert sind.

V. 3. 2. 3. Vergleich mit der molekularen Erkennung von Typ II Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie

Die molekulare Erkennung, welche teils zu promiskuen, teils zu hoch spezifischen Interaktionen führt, betrifft nicht nur die Bindung der Wachstumsfaktoren an Typ I Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie, sondern auch die Rekrutierung von Typ II Rezeptoren, die eine konstitutiv aktive Kinasedomäne tragen und die Typ I Rezeptoren in heteromeren Ligand-Rezeptor-Komplexen aktivieren. BMP-Liganden können BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB in einen Komplex rekrutieren, binden jedoch alle drei Typ II Rezeptoren mit deutlich niedrigeren Bindungsaffinitäten als die BMP Typ I Rezeptoren. Für ActR-II und ActR-IIB wird eine duale Aktivität beobachtet, weil neben BMP- auch Activin-Liganden gebunden werden. Die Typ II Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie weisen eine Tertiärstruktur auf, die den Schlangenneurotoxinen ähnelt (Greenwald et al., 1999) und mit Bezug auf zwei zentrale, antiparallele zweisträngige β -Faltblätter in wesentlichen Teilen derjenigen der Typ I Rezeptoren TGF- β -Superfamilie entspricht. Trotz der ähnlichen Faltung von Typ I und Typ II Rezeptoren werden zwei vollkommen unterschiedliche Bindungs epitope auf den Liganden erkannt.

Unlängst veröffentlichte Arbeiten zeigen, dass die Bindeepitope von ActR-II und ActR-IIB strukturell konserviert sind und konformationelle Änderungen von freien und gebundenen Typ II Rezeptoren bei Bildung der Ligand-Rezeptor-Komplexe auf die peripheren A- ($\beta 2\beta 3$ -) und M- ($\beta 2\beta 3$ -) Schleifen beschränkt sind. Die Hauptbindungsdeterminanten sind hingegen keinen strukturellen Änderungen bei Bindung unterworfen (Abbildung V-6, S. 188) (Allendorph et al., 2006; Greenwald et al., 2003; Thompson et al., 2003; Weber et al., 2007). Deshalb wurde den A- und M-Schleifen eine Rolle bei der spezifischen Erkennung von Liganden durch ActR-II und ActR-IIB zugewiesen. In BMPR-II findet sich im Vergleich zu den beiden Activin-Rezeptoren ähnlich der pre-Helix-Erweiterung in T β R-I eine drei Aminosäuren umfassende Insertion in der A-Schleife. Diese Insertion könnte die spezifische Bindung von BMPR-II an BMPs erlauben (Greenwald et al., 2003; Mace et al., 2006). Mutagenesedaten an BMP-2 stützen diese Vermutung (Weber et al., 2007). Das gleiche gilt umgekehrt für die Bindungsspezifität von ActR-II und ActR-IIB gegenüber Activin A infolge zusätzlicher Reste in der M-Schleife der beiden Rezeptoren (Greenwald et al., 2003). Interessant ist, dass die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Typ II Rezeptoren gegenüber BMPs und Activin A allein auf veränderten Dissoziationsgeschwindigkeiten der entsprechenden Ligand-Rezeptor-Komplexe beruhen (Greenwald et al., 2003). In Anlehnung an die Ergebnisse für die GDF-5-BMPR-IB-Interaktion kann man spekulieren, dass entweder Bindungsdeterminanten in ihrer Stärke moduliert werden oder die Komplementarität der Interaktionsflächen in Teilen des Bindeepitops variiert. Dies wurde kürzlich durch eine umfassende Mutagenese an BMP-2 und ActR-IIB bestätigt (Weber et al., 2007). Durch den Austausch zweier Reste von BMP-2 (L100, N102) zu

ihrem Gegenstück in Activin (Lys102, Asp104) konnte spezifisch die Bindungsaffinität zu ActR-IIB vom mikromolaren in den nanomolaren Bereich verschoben werden, was im Einklang mit vorherigen Mutagenesestudien an Activin steht (Wuytens et al., 1999). Die Unterbrechung einer zentralen Wasserstoffbrücke zwischen Leu61 von ActR-IIB und Ser90 von Activin A, die durch Trp60 (ActR-IIB) sowie Lys102 und Asp104 (beide Activin A) begrenzt wird, führt zu einem starken Bindungsverlust. Obwohl diese Wechselwirkung auch im BMP-2•ActR-IIB-Komplex zwischen Ser88 (BMP-2) und ActR-IIB (Leu61) beobachtet wird, tritt bei Alanin- bzw. Prolinmutation von Leu61 kein Bindungsverlust auf. In Komplex mit BMP-2 existiert diese Wasserstoffbrücke in einem „nicht-aktivem“ Zustand. Wie die L100K- und N102D-Mutationen an BMP-2 zeigen, hängt die Stärke der Wasserstoffbrücke von der chemischen Umgebung ab, die sich von Ligand zu Ligand unterscheidet.

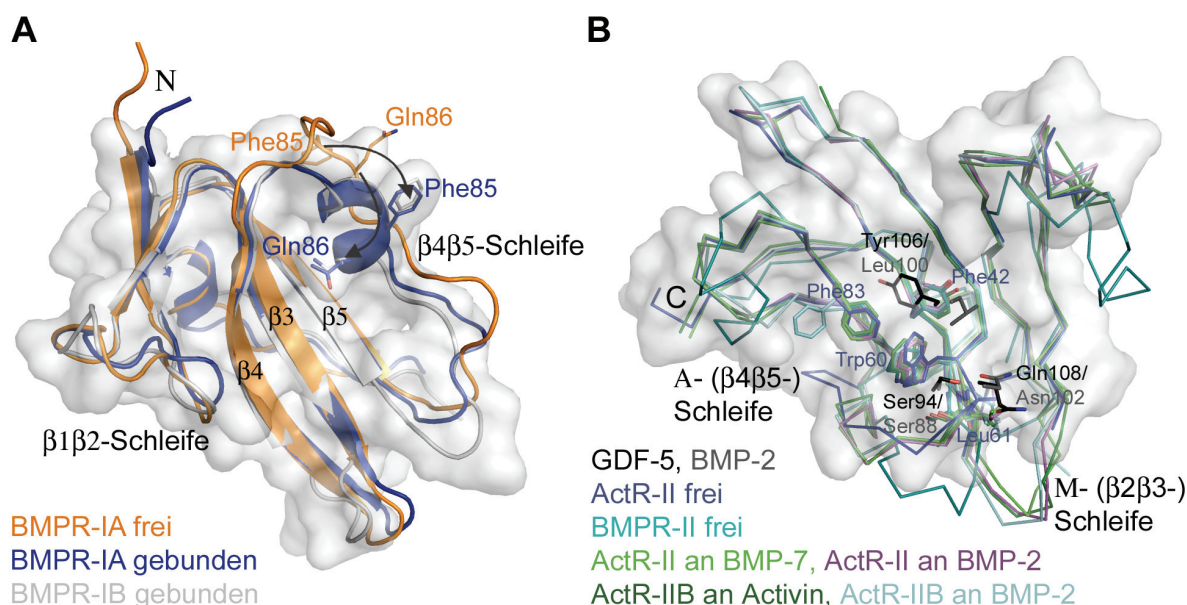


Abbildung V-6: Vergleich der Strukturmerkmale von BMP Typ I und BMP / Activin Typ II Rezeptoren. **A:** Überlagerung von BMPR-IA in freiem und in gebundenem Zustand mit BMPR-IB (CA-Fit der β -Stränge). Die Hauptbindungs determinanten Phe86 und Gln86 in der β 4 β 5-Schleife sind bei Bildung des Komplexes starken Umlagerungen unterworfen („induced fit“), ohne die ein Großteil der Bindungsenergie nicht aufgebracht werden kann (Pfeile). Kleinere Veränderungen betreffen außerdem die β 1 β 2-Schleife. Diese Situation repräsentiert einen mobilen (flexiblen) Hotspot der Bindung (Braden et al., 1995). Sowohl die β 4 β 5-Schleife als auch die β 1 β 2-Schleife spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von BMP-Liganden, was die Verknüpfung von Bindungsaffinität und spezifischen Bindungseigenschaften unterstreicht. **B:** Im Kontrast dazu findet bei den BMP / Activin Typ II Rezeptoren kein „induced fit“ der Hauptbindungs determinanten Trp60, Phe42 und Leu61 (alle ActR-II) bei Bindung des Liganden statt, was einem immobilen (festen) Hotspot der Bindung (Braden et al., 1995) entspricht. Einzig periphere Schleifen wie die A- (β 4 β 5-) und M- (β 2 β 3-) Schleifen variieren in freiem und gebundenem Zustand und könnten für Bindungspräferenzen gegenüber einzelnen Liganden verantwortlich sein. Unterschiede ergeben sich zum Beispiel zwischen BMPR-II und ActR-II bzw. ActR-IIB. Anders als in BMP-2 Leu100 trägt Tyr106 von GDF-5 über ein „knob-into-hole“-Motiv maßgeblich zur Bindungsaffinität gegenüber BMPR-II bei. Die Alaninmutation von Trp60 in ActR-II bzw. ActR-IIB, nicht jedoch BMPR-II, ist mit einem Bindungsverlust gegenüber BMP-2 verbunden (Weber et al., 2007). Ähnlich wie bei den beiden BMP Typ I Rezeptoren müssen unterschiedliche Erkennungsmechanismen existieren. Die hohe Bindungsaffinität von Activin A zu den Activin Typ II Rezeptoren wird über eine ligandenspezifisch aktivierbare Wasserstoffbrücke zwischen Ser90 (Activin, Ser88 in BMP-2) und Leu61 (ActR-II) erreicht.

Ähnlich wie Phe66 von BMPR-IB oder Gln67 von BMPR-IA repräsentieren Trp60 und Tyr42 von ActR-IIB als klassische „knob-into-hole“-Motive zugleich die Hauptbindungs determinanten, die

zudem in ActR-II und BMPR-II nahezu konserviert sind (Weber et al., 2007). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass – in Analogie zur Rezeptorspezifität der Bindungsdeterminanten in Komplexen von BMPR-IA und BMPR-IB – die strukturelle Konservierung derartiger Interaktionsmotive keine sicheren Aussagen über die von diesen Resten beigesteuerte Bindungsenergie zulässt. Anders als in ActR-IIB hat die Alaninmutation von Trp59 in BMPR-II (Trp60 in ActR-IIB) einen unterschiedlichen Einfluss auf die Bindungsaffinität zu den Liganden BMP-2, BMP-7 und GDF-5 (Yin et al., 2008). Während für GDF-5 ein kompletter Bindungsverlust zu verzeichnen ist, wird BMP-2 mit verringerter, BMP-7 mit unveränderter Bindungsaffinität gebunden. Dieser Befund ist mit den derzeit bekannten Strukturen am plausibelsten durch eine Abschwächung des „knob-into-hole“-Motivs von Tyr106 in GDF-5 (Leu100 in BMP-2; Leu125 in BMP-7) erklärbar. Tyr106 von GDF-5 zeigt hierbei in eine Tasche auf der BMPR-II-Oberfläche, die unter anderem durch Trp59 begrenzt wird (Abbildung V-6, S. 188, siehe auch Abbildung IV-56, S. 153).

V. 3. 2. 4. Assoziation des Ligand-Typ I Rezeptor-Komplexes

NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Struktur von freiem BMPR-IA und kinetische Konstanten der Ligand-Rezeptor-Interaktionen weisen auf Unterschiede in der Rekrutierung von Typ II Rezeptoren und Typ I Rezeptoren hin. Die NMR-Struktur von freiem BMPR-IA zeigt, dass alle im Komplex mit BMP-2 zur Bindungsaffinität beitragenden Aminosäuren ungeordnet sind und eine hohe Mobilität besitzen. Dies sollte auch für BMPR-IB gelten, dessen Schmelztemperatur etwa 5°C niedriger als die von BMPR-IA und dessen α -Helix im Vergleich zu BMPR-IA auf eine Windung reduziert ist. Vergleiche von freiem und an BMP-2 gebundenem BMPR-IA (Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000c) demonstrieren, dass Phe85 und Gln86 von BMPR-IA (Phe66 und Gln67 in BMPR-IB) bei Bildung des Komplexes starken Umlagerungen unterworfen sind, deren Endpunkt durch die spätere α -Helix definiert ist. Auf die physiologische Situation übertragen bedeutet dies, dass die vom Liganden präsentierte Oberfläche die Bildung dieser „werdenden“ α -Helix induziert. Gleichzeitig sind im Liganden selbst, wenn auch in weit geringerem Ausmaß, Verschiebungen in der pre-Helix-Schleife (Kirsch et al., 2000c) und, wie hier zusätzlich für GDF-5 gezeigt, in den Fingern auftreten. Bei Komplexbildung findet somit eine kooperative Anpassung der Bindeepitope von Rezeptor und Ligand statt. Die Komplementarität der Interaktionsflächen ist den Bindungspartnern nicht inherent, sondern ergibt sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Ligand-Rezeptor-Interaktion – und bildet so die Grundlage für die hohe Bindungspromiskuität innerhalb der TGF- β -Superfamilie.

Der ausgeprägte „induced fit“ äußert sich in vergleichsweise langsamen kinetischen Konstanten der Komplexbildung (BMP-2•BMPR-IA: $k_{\text{on}} \sim 3,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; GDF-5•BMPR-IB: $k_{\text{on}} \sim 3,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 2:1-Interaktion). Die Bildung von VEGF•Flt1- ($k_{\text{on}} \sim 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, (von Tiedemann and Bilitewski, 2002)), IL4•IL4R α - ($k_{\text{on}} \sim 1,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, (Shen et al., 1996)) oder Barnase•Barstar-Komplexen ($k_{\text{on}} \sim 6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, (Schreiber and Fersht, 1993)) verläuft mindestens zeh- bis hundertmal so schnell, selbst wenn elektrostatische Effekte („electrostatic steering“) berücksichtigt werden. Auch die Bildung von BMP-Ligand-Typ II Rezeptor-Komplexen erfolgt mit einer etwa 10fach höheren Assoziationsgeschwindigkeit (BMP-2•ActR-IIB: $k_{\text{on}} \sim 2,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; BMP-2•ActR-II: $k_{\text{on}} \sim 3,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 2:1-Interaktion; J. Nickel, persönliche Mitteilung). In Analogie zu Antigen•Antikörper-Komplexen (Braden et al., 1995) deuten dies auf vorgebildete Interaktionsflächen bzw. allenfalls geringe sterische Anpassungen bei Bindung und das Vorhandensein fester, immobilischer Schlüssel-Schloss-Motive, wie beispielsweise Trp60 von ActR-IIB. Mit den BMP-2 / GDF-5•BMPR-IA / IB-

Komplexen vergleichbare Assoziationsgeschwindigkeiten finden sich beispielsweise im HGH•HGHbp-Komplex ($k_{\text{on}} \sim 1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 1:1-Interaktion; (Clackson et al., 1998; Wan et al., 2004)). HGH•hPRLbp-Komplexe werden noch langsamer gebildet ($k_{\text{on}} \sim 4,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 1:1-Interaktion; (Keeler et al., 2007)). Ein Strukturvergleich von freiem HGH (RCSB-Eintrag 1HGU) (Chantalat et al., 1995) und von HGH im Komplex mit zwei HGH-Rezeptoren (HGHbp) (RCSB-Eintrag 3HHR) (Devos et al., 1992) zeigt deutliche Unterschiede in mehreren Bereichen von HGH, wovon vor allem die Änderungen im Bereich der 22 Aminosäuren umfassenden $\alpha 1\alpha 2$ -Schleife ins Auge fallen. Die $\alpha 1\alpha 2$ -Schleife von HGH kontaktiert zum Einen die Hauptbindungs determinanten in HGHbp (Clackson et al., 1998). Zum Anderen unterliegt die $\alpha 1\alpha 2$ -Schleife von HGH bedeutenden Umlagerungen bei Bindung von HGHbp, die auch bei Bindung von hPRLbp auftreten. Eine nähere Betrachtung zeigt, dass sich der C-terminale Teil der $\alpha 1\alpha 2$ -Schleife von HGH in gebundenem Zustand in eine α -helikale Konformation ordnet, was mit einer Umlagerung der N-terminal folgenden Aminosäuren um durchschnittlich $\sim 7\text{\AA}$ einhergeht. Erst durch diese Anpassungen im HGH-Bindeepitop bildet sich eine Auswölbung, welche die Bindungs determinanten des Rezeptors, Trp104 und Trp169 (Clackson et al., 1998), aufnehmen kann. Fraglich bleibt, inwiefern sich auch Veränderungen im Rezeptor bei Bindung ergeben. Dennoch ist anzunehmen, dass in Analogie zu den BMP-BMP Typ I Rezeptor-Komplexen die vergleichsweise niedrige Assoziationsgeschwindigkeit auf die starken strukturellen Änderungen bei Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes zurückgeführt werden kann.

Wie frühere Untersuchungen zeigen, verringern sich die Assoziationsgeschwindigkeiten von Antigen-Antikörper-Komplexen bei einer Erhöhung der Temperatur, was teilweise auf eine höhere kinetische Energie der Moleküle zurückzuführen ist. Sterische Veränderungen bei Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen bzw. die damit zusammenhängende niedrigere Kompatibilität solcher Interaktionsflächen werden mit einem negativen Entropiebeitrag in Verbindung gebracht, der enthalpischen (van-der-Waals-, polare und elektrostatische Wechselwirkungen, Solvatisierung; (Luke et al., 2005)) und anderen entropischen Effekten (Entropiezunahme bei Desolvatisierung der Interaktionsfläche) entgegenwirkt (Bhat et al., 1994). Wie ITC-Messungen und CD-spektroskopische Untersuchungen demonstrieren, gilt ähnliches auch für die Bildung des BMP-2•BMPR-IA-Komplexes und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für den GDF-5•BMPR-IB-Komplex. Die Konformationsentropie nimmt hier mit $-237 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ einen negativen Wert an, der nicht vollständig von der Solvatisierungsentropie ($230 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) kompensiert wird, sodass die Komplexbildung aus entropischer Sicht nicht begünstigt ist und von der Bindungsenthalpie abhängt (Tabelle IV-10, S. 90). Ein „Differenz“-CD-Spektrum des BMP-2•BMPR-IA-Komplexes nach Abzug der Einzelspektren von BMP-2 und BMPR-IA zeigt zudem ein starkes Signal bei Wellenlängen, die charakteristisch für α -helikale Strukturen sind (Abbildung IV-21, S. 92). Korrelierend mit der NMR-Struktur von freiem BMPR-IA deutet dies darauf hin, dass bei Komplexbildung Teile des Bindeepitops von einem flexiblen, mobilen in einen fixierten, starren Zustand übergehen. Weil in BMP-2 bei Bindung vergleichsweise geringe strukturelle Umlagerungen in der pre-Helix-Schleife auftreten (freier Zustand: Reste 48-56 in der pre-helix-Schleife, $B_{\text{av}} = 69\text{\AA}^2$, alle Reste: $B_{\text{av}} = 35\text{\AA}^2$; gebundener Zustand: Reste 48-56 in der pre-helix-Schleife, $B_{\text{av}} = 32\text{\AA}^2$, alle Reste: $B_{\text{av}} = 34\text{\AA}^2$; (Kirsch et al., 2000c)), sollten die beobachteten entropischen Effekte zu einem Grossteil auf Veränderungen in BMPR-IA zurückzuführen sein. Für GDF-5 und BMPR-IB kann von noch größeren konformationellen Änderungen in den Partnermolekülen bei Bindung ausgegangen werden (siehe IV. 7. 1. 2). Die stereochemisch begrenzte Flexibilität der „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB

lässt vermuten, dass diese auch in freiem BMPR-IB in den zwei beobachteten, offenen und geschlossenen, Konformationen, vorliegt. Der Verlauf der Hauptkette in der „Klappe“ von freiem BMPR-IA ähnelt für etwa die Hälfte der Moleküle in der NMR-Strukturschar derjenigen im geschlossenen Konformer von BMPR-IB (Abbildung V-4, S. 184). Bei Überlagerung von BMPR-IB in Komplex mit GDF-5 und den Strukturen von freiem BMPR-IA lassen sich keine sterischen Konflikte mit Arg57 von GDF-5 feststellen. Die Konformation der „Klappe“ in freiem BMPR-IA könnte deshalb eine der möglichen Konformationen in einem – bisher strukturell nicht charakterisierten – GDF-5•BMPR-IA-Komplex darstellen, wenn von einer möglichen Umlagerung von Arg57 (GDF-5) abgesehen wird (siehe auch Abbildung IV-55, S. 151).

Dennoch zeigt der Vergleich, dass sich die Rezeptoren der BMP-Familie in weitaus größerem Maße den Ligandenoberflächen anpassen als umgekehrt die Liganden den Rezeptoroberflächen. Eine hohe Flexibilität bzw. Anpassungsfähigkeit der Bindeepitope lässt sich nicht mit einer hohen sterischen und chemischen Oberflächenkomplementarität gleichsetzen, sondern stellt nur eine hinreichende Bedingung dar, um promiske Interaktionen zu erreichen, die abhängig von der Komplementarität – gekennzeichnet durch van-der-Waals-, polare und elektrostatische Wechselwirkungen sowie der Packungsdichte im Bindeepitop (Chothia and Janin, 1975; Janin and Chothia, 1990; Jones and Thornton, 1996) – zu mehr oder weniger stabilen Protein-Protein-Komplexen führen können.

V.4. Mechanismen natürlicher Mutationen in GDF-5

V. 4. 1. Kompletter Funktionsverlust infolge der DP-Mutation

Für GDF-5 wurden in den vergangenen Jahren einige im Menschen auftretende Mutationen in der signalaktiven, reifen Domäne beschrieben, welche zu veränderten Bindungseigenschaften und biologischen Funktionen von GDF-5 führen. Die Wirkung dieser Mutationen ist auf die Entwicklung der äußeren Extremitäten beschränkt. Ein DuPan-Phänotyp mit starken Deformationen der Gliedmaßen wurde kürzlich mit einem heterozygot auftretendem Mutationscluster in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 korreliert, der durch die Deletion von Leu56 und die Mutationen S58T und H59L charakterisiert ist (Szczałuba et al., 2005). Trotz der Heterozygotität führt diese DP-Mutation zu einem sonst eher durch homozygote Mutationen in *gdf5* repräsentierten, stark ausgeprägten Phänotyp mit einer gedrungenen Statur, akromesomeler Verkürzung der Extremitäten, deformierten Händen und Füßen sowie karpalen Knochenfusionen (Abbildung I-3, S. 18). Der DuPan-Phänotyp unterscheidet sich damit von mildereren Phänotypen, die durch heterozygote Mutationen in *gdf5* ausgelöst werden, beispielsweise Brachydactylie C (BDC) (Savarirayan et al., 2003), sodass ein dominant-negativer Effekt des DP-Defekts vermutet wird (Szczałuba et al., 2005). Das DP-Krankheitsbild ähnelt jedoch anderen Phänotypen, die durch eine homozygote L60P-Mutation in GDF-5 hervorgerufen werden (Faiyaz-Ul-Haque et al., 2002). Auffallend ist die Ähnlichkeit zu einem Phänotyp, der bei Mutation von BMPR-IB entsteht. Insbesondere hinsichtlich der Deformationen an Händen und Füßen führt eine homozygot auftretende, acht Basenpaare umfassende Deletion in *bmpr1b* zu einem ähnlichen Krankheitsbild (Demirhan et al., 2005). Punktmutationen in der Kinasedomäne von BMPR-IB haben hingegen geringere Auswirkungen auf die Entwicklung der Gliedmaßen und führen zu Brachydactylie A2 oder Brachydactylie C (Lehmann et al., 2006; Lehmann et al., 2003). Die Lokalisation der Defekte korreliert mit Experimenten zum Knockout von

GDF-5 in Mäusen, die eine Funktion von GDF-5 während der Knorpelentwicklung nahelegen (Storm et al., 1994; Storm and Kingsley, 1996).

Zur Analyse der molekularen Eigenschaften der DP-Mutation wurde eine GDF-5-DP-Variante rekombinant hergestellt, gereinigt und charakterisiert. GDF-5-DP weist keine Bindungsaffinität zu den Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB auf, wobei der Typ II Rezeptor BMPR-II gebunden wird. In ALP- und Reporterassays zeigt GDF-5-DP keine Aktivität. In ALP-Assays mit RobC26-Zellen kann jedoch ein geringer inhibitorischer Effekt festgestellt werden. Ein Strukturmodell der GDF-5-DP-Variante deutet an, dass überraschend wenig Veränderungen in der pre-Helix-Schleife bei Deletion von Leu56 zu erwarten sind und die Mutationen S58T und H59L nur vergleichsweise geringe Auswirkungen auf die Packung des potentiellen BMP Typ I Rezeptors im Bindeepitop haben (Abbildung V-7, S. 192). Trotz fehlender Leu56-Seitenkette, die sonst in das Innere des GDF-5-Dimers zeigt und vermutlich den Abstand der pre-Helix-Schleife zur zentralen α -Helix definiert, kann die GDF-5-DP-Variante renaturiert werden. Sowohl CD-spektroskopische Untersuchungen als auch Biacore-Bindungsanalysen weisen auf ein globuläres Protein mit einem nicht funktionellen „wrist“-, aber funktionellen „knuckle“-Epitop hin.

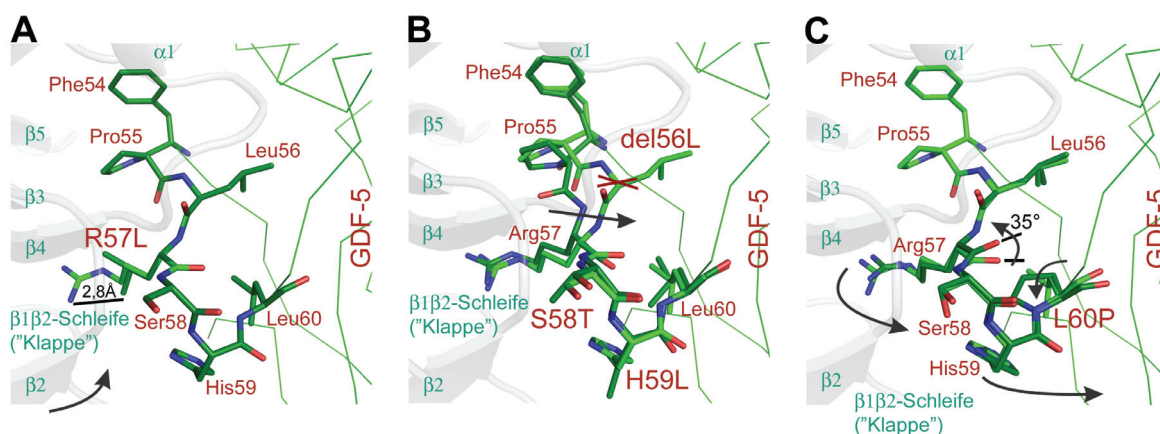


Abbildung V-7: Strukturelle Auswirkungen phänotypisch relevanter GDF-5-Mutationen.

Wildtypisches GDF-5 ist als hellgrünes α -Modell mit hellgrünen Stäbchen in der pre-Helix-Schleife, die jeweils mutierte pre-Helix-Schleife als dunkelgrüne Stäbchen und BMPR-IB als hellgraues Bändermodell dargestellt. **A:** Der Austausch von Arg57 gegen Leu führt zu einer höheren Bindungsaffinität zum BMP Typ I Rezeptor und zum Verlust der Bindungsspezifität zu BMPR-IB. Die Verkürzung der Seitenkette um die Guanidinium-Gruppe entspricht einem Abstand von $\sim 2,8\text{\AA}$. Durch den so entstandenen Freiraum kann die „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife des Rezeptors besser an die pre-Helix-Schleife von GDF-5 packen (Pfeil), was sich insbesondere hinsichtlich der flexiblen „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA günstig auswirkt. **B:** Bei der DP-Mutation fehlt Leu56; Ser58 ist zu Thr und His58 zu Leu mutiert. Durch die Deletion von Leu56 in GDF-5 fehlt der „Abstandshalter“ zur zentralen α -Helix und zum $\beta 6$ -Strang, wodurch die pre-Helix-Schleife konformationellen Änderungen unterworfen ist und dichter an den Kern von GDF-5 packt (Pfeil). Durch das veränderte „wrist“-Epitop können BMPR-IA und BMPR-IB nicht gebunden werden. **C:** Die L60P-Mutation führt zu einer Umlagerung einer kleinen vierzähligen Umdrehung aus Arg57, Ser58, His59 und Leu60 in der pre-Helix-Schleife. Eine energetische Minimierung vergrößert den Abstand zwischen Arg57 (O) und Pro60 (CD) auf $3,1\text{\AA}$, was einer Drehung der Arg57-Carbonyl-Gruppe um 35° entspricht. Diese „Abstoßung“ ähnlich einer Scherbewegung zwischen der Arg-Carbonylgruppe und der Prolinseitenkette destabilisiert diesen Teil der pre-Helix-Schleife und führt zu einer Drehung der Reste in Richtung des GDF-5-Kerns (Pfeile). Dadurch verringert sich die Passfähigkeit der GDF-5- und Typ I Rezeptor Bindeepitope und folglich die Bindungsaffinität.

Für die molekulare Funktion können bei Betrachtung des ausgeprägten Phänotyps, der Heterozygotität der Mutation und der fehlenden Bindungsaffinität gegenüber BMP Typ I Rezeptoren folgende Möglichkeiten diskutiert werden: (1) Die GDF-5-DP-Variante blockiert die stimulierende Aktivität potentieller Modulatorproteine oder Korezeptoren wie Dragon (Samad et al.,

2005) in einer dominant negativen Art und Weise, kompetitiert also diesbezüglich mit wildtypischem GDF-5. Von derartigen Effektoren sind bisher keine Struktur-Funktions-Analysen bekannt, sodass unklar ist, worauf die Konkurrenz beruhen könnte. (2) Die GDF-5-DP-Variante bildet *in vivo* Heterodimere mit wildtypischem GDF-5 oder anderen Liganden, die im Gegensatz zu Heterodimeren der GDF-5-C19Y-Mutation sekretiert werden (Thomas et al., 1997). Weil der DP-Mutationscluster nur die Bindung des Typ I Rezeptors im „wrist“-Epitop, nicht jedoch die Bindung des Typ II Rezeptors im „knuckle“-Epitop beeinträchtigt, resultieren Komplexe mit eingeschränkten Signaleigenschaften. (3) Obwohl die Bindungsaffinität zu BMPR-IA und BMPR-IB fehlt, kann GDF-5-DP noch in vorgebildete Rezeptorkomplexe rekrutiert werden (Nohe et al., 2002) und dadurch oder über andere Typ I Rezeptoren wie TSR-I (Brown et al., 2005; David et al., 2007; Nishitoh et al., 1996) die Expression von Antagonisten wie Noggin induzieren (Gazzerro et al., 1998). Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die Bindungsdeterminanten von BMPR-IA und BMPR-IB gegenüber BMP-2 bzw. GDF-5 in TSR-I nicht vollständig konserviert sind (Abbildung V-5, S. 186). Möglicherweise ist aus diesem Grund die Bindung von TSR-I weniger durch die DP-Mutation beeinträchtigt. Dem GDF-5 homologe Liganden wie BMP-9 und BMP-10 binden TSR-I (David et al., 2007; Scharpfenecker et al., 2007), für GDF-5 selbst ist dies bisher jedoch nicht gezeigt worden.

V. 4. 2. „Loss of function“ infolge der L60P-Mutation

Eine andere Mutation in GDF-5, die ebenfalls mit einem Verlust an Bindungsaffinität und *in vivo* Aktivität verbunden ist („loss of function“), aber unabhängig von der DP-Mutation auftritt, betrifft das zu Prolin geänderte Leu60 in der pre-Helix-Schleife (Faiyaz-Ul-Haque et al., 2002; Kjaer et al., 2006; Seemann et al., 2005). In Abhängigkeit von der Homozygotität oder Heterozygotität führt die L60P-Mutation zu einem milden Erscheinungsbild mit Fehlbildungen in den Fingern (fehlende oder verkürzte Fingerglieder im Zeigefinger und kleinen Finger; Brachydactylie A2) (Seemann et al., 2005) oder ausgeprägteren Erscheinungsbild mit starken Deformationen der Gliedmaßen und einer verkürzten Statur (DuPan-Syndrom) (Faiyaz-Ul-Haque et al., 2002; Kjaer et al., 2006). Gegenüber BMPR-IA kann mit einer rekombinant hergestellten GDF-5-L60P-Variante keine Bindungsaffinität gemessen werden, während BMPR-IB mit einer 33fach verringerten Bindungsaffinität ($K_D=42,3\text{nM}$) gebunden wird. Nimmt man einen derartigen Bindungsverlust für BMPR-IA an, so ergibt sich eine Bindungsaffinität von 535nM, die mit der 2:1-Interaktion wegen der begrenzten Löslichkeit von GDF-5 im Messpuffer nicht mehr korrekt zu bestimmen ist. Eine sehr geringe Bindung an den Sensorchip ist dementsprechend experimentell zu beobachten, aber nicht auswertbar (Abbildung IV-19, S. 88), sodass die L60P-Mutation als auch die im Folgenden diskutierten Mutationen prinzipiell in BMPR-IA und BMPR-IB denselben Funktionsmechanismen folgen sollten.

Eine stark erhöhte Dissoziationsgeschwindigkeit des GDF-5-L60P•BMPR-IB-Komplexes bedingt den starken Bindungsverlust. Nach allgemeiner Überzeugung spiegelt die Dissoziationsgeschwindigkeit von Protein-Protein-Komplexen eine partielle sterische Inkompatibilität der Oberflächen der Bindungspartner wider. Ersetzt man in der Struktur des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes Leu60 durch Prolin, so fällt auf, dass durch die räumliche Nähe zu Arg57 und Ser58 konformationelle Veränderungen in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 notwendig sind (Abbildung V-7, S. 192). Eine Energieminimierung verdeutlicht, dass Arg57 einer geringen Verschiebung unterliegt, die durch eine Drehung der Carbonylgruppe um etwa 35° verursacht wird. Diese Drehung hat Auswirkungen auf die Positionen von Ser58 und His59. Die Position von Pro60 bleibt wahrscheinlich aufgrund der dichten Molekülpackung unverändert. In dem energieminierten

Strukturmodell der GDF-5-L60P-Variante beträgt der Abstand zwischen Pro60 (CD) und Arg57 (O) allerdings nur 3,1Å, was eine weitergehende Destabilisierung der pre-Helix-Schleife vermuten lässt. Diese auf die pre-Helix-Schleife begrenzten strukturellen Umlagerungen und die Destabilisierung der pre-Helix-Schleife könnten zu der stark erhöhten Dissoziationsgeschwindigkeit der GDF-5•Typ I Rezeptor-Komplexe führen.

Die GDF-5-L60P-Variante zeigt weder in ALP- noch in Reporter-Gen-Assays mit endogenem Rezeptorbesatz biologische Aktivität, was mit den Ergebnissen der Bindungsstudien korreliert. Experimente von Seemann et al. deuten an, dass GDF-5-L60P mit ebenfalls exprimierten voll funktionsfähigem wildtypischen GDF-5, Heterodimeren oder anderen Liganden wie BMP-2 um Bindungsstellen der Rezeptoren konkurriert (Seemann et al., 2005). Die Bindungsstudien lassen vermuten, dass vor allem durch BMPR-IA vermittelte zelluläre Ereignisse von der L60P-Mutation betroffen sind, während trotz deutlich verringerter Bindungsaffinität zu BMPR-IB eine biologische Restaktivität der GDF-5-L60P-Variante in einem bestimmten zellulären Kontext zu erwarten ist, worauf Literaturangaben hinweisen (Seemann et al., 2005). Tritt die L60P-Mutation heterozygot auf, wird auch wildtypisches GDF-5 exprimiert. Heterodimere Liganden aus GDF-5 und GDF-5-L60P sollten eine verringerte, aber nicht vollständig reduzierte biologische Aktivität in den für die Segmentierung der Gliedmaßen verantwortlichen Knorpelzellen besitzen. Möglicherweise ist der milde Phänotyp auch auf eine niedrigere Expressionsrate von GDF-5-L60P im Vergleich zu GDF-5 zurückzuführen („gene dosage effect“); vielleicht hängt das Expressionsverhältnis beider Liganden vom zellulären Kontext ab. Bei Homozygotie für die L60P-Mutation fehlt hingegen signalaktives wildtypisches GDF-5, sieht man von der niedrigen Bindungsaffinität zu BMPR-IB ab. Entsprechend ist dann ein stärkerer Phänotyp zu beobachten. Obwohl die von GDF-5 rekrutierten Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB auch von anderen Liganden wie BMP-2 oder BMP-7 gebunden werden, können diese die Funktion von GDF-5 nicht oder nur unzureichend übernehmen.

V. 4. 3. „Gain of function“ infolge der R57L- (R57A-) Mutation

Eine weitere, durch Seemann et al. beschriebene Mutation in *gdf5* führt anders als die L60P-Mutation zu einem Funktionsgewinn („gain-of-function“) (Seemann et al., 2005). Diese „gain-of-function“-Mutation führt zu einem milden Phänotyp, bei dem die proximalen und mittleren Fingerglieder der Finger vier und fünf zusammengewachsen sind (Ankylose) (Seemann et al., 2005). Die Symptome der R57L-Mutation in GDF-5 ähneln denen heterozygoter Mutationen in *noggin*, einem Inhibitor von BMPs, die als proximaler Symphalangismus (SYM1) gedeutet wurden (Gong et al., 1999). Scheinbar hat die aktivierende Mutation R57L in GDF-5 den gleichen Effekt auf die Segmentierung der Finger wie inaktivierende Mutationen in *Noggin*, was auf komplementäre Mechanismen hinweist. Beide Funktionsstörungen bedingen eine Änderung des Verhältnisses zwischen BMP-Ligand und *Noggin*. Während die mutationsbedingt verringerte Sekretion von *Noggin* (Marcelino et al., 2001) zu einer Deregulierung der BMP-Signalgebung führt, kann die GDF-5-R57L-Variante möglicherweise – je nach zellulärem Kontext – Funktionen des ebenfalls bei der Gelenkentwicklung exprimierten BMP-2 übernehmen (Seemann et al., 2005).

Die Mutation in GDF-5 führt zum Austausch von Arg57 gegen Leucin, wodurch die Seitenkette um die Guanidiumgruppe verkürzt wird und mehr Raum im Ligand-Rezeptor-Bindeepitop zur Verfügung steht (Abbildung V-7, S. 192). In Bindungsstudien zeigt GDF-5-R57L eine 4fach höhere Bindungsaffinität zu BMPR-IA und eine geringfügig erhöhte Bindungsaffinität zu BMPR-IB. Somit ist die für wildtypisches GDF-5 charakteristische Diskriminierung zwischen BMPR-IA und BMPR-

IB in GDF-5-R57L fast vollständig aufgehoben. Die Einführung von Alanin für Arg57 verstärkt diesen Effekt (BMPR-IA: $K_D = 1,3nM$; BMPR-IB: $K_D = 0,6nM$) (Nickel et al., 2005), sodass räumliche bzw. sterische Gründe für den Verlust der Bindungsspezifität verantwortlich sein sollten. Die *in vitro* Ergebnisse spiegeln sich in ALP-Assays in einer signifikant höheren Aktivierbarkeit der Alkalischen Phosphatase und gleichzeitig niedrigeren effektiven Konzentrationen bei Stimulation von ATDC5- und RobC26-Zellen mit der GDF-5-R57L-Variante wider. Interessanterweise unterscheiden sich die EC_{50} -Werte in ATDC5-Zellen von denen in RobC26-Zellen um den Faktor zwei (GDF-5) bzw. neunzehn (GDF-5-R57L), was möglicherweise mit einem unterschiedlichen Rezeptorbesatz zusammenhängen könnte. Crosslink-Experimente in RobC26-Zellen deuten darauf hin, dass in diesen Zellen GDF-5-Signale durch BMPR-IB übermittelt werden (Erlacher et al., 1998; Nishitoh et al., 1996). In ATDC5-Zellen erfolgt die Signaltransduktion von GDF-5 durch Bindung an BMPR-IA (J. Nickel, persönliche Mitteilung). Die niedrigeren EC_{50} -Werte in RobC26-Zellen korrelieren mit der höheren Bindungsaffinität von GDF-5 zu BMPR-IB, die höheren EC_{50} -Werte in ATDC5-Zellen mit der niedrigeren Bindungsaffinität von GDF-5 zu BMPR-IA.

Ähnlich wie bei GDF-5-L60P resultieren die Änderungen in der Bindungsaffinität aus einer veränderten Dissoziationsgeschwindigkeit der Ligand-Rezeptor-Komplexe. Komplexe der GDF-5-R57L-Variante zeigen eine 2-3fach höhere Stabilität, was sich auf die verringerten sterischen Anforderungen in der Umgebung von Leu57 zurückführen lässt. Wie in V. 3. 2. diskutiert, spielt die Konformation der $\beta 1\beta 2$ -Schleife in BMPR-IA und BMPR-IB eine wichtige Rolle bei der Erkennung durch GDF-5. In einem GDF-5•BMPR-IA-Strukturmodell interferieren die Seitenketten von Arg57 (GDF-5) und His43 (BMPR-IA), sodass eine entsprechende Umlagerung in BMPR-IA oder GDF-5 bei Bildung des binären Komplexes notwendig ist. Im Modell „überlagern“ sich die Imidazolgruppe von His43 und die Guanidiniumgruppe von Arg57; die Einführung des weniger raumausfüllenden Restes Leucin an Position 57 von GDF-5 erfordert geringere strukturelle Anpassungen bei Komplexbildung (Abbildung V-8, S. 196). Für GDF-5-R57A gilt ähnliches, nur dass durch Alanin an Position 57 von GDF-5 nochmals Raum für His43 von BMPR-IA geschaffen wird und vermutlich kaum noch strukturelle Anpassungen in diesem Bereich des Bindeepitops notwendig sind. Dies macht sich in etwas höheren Bindungsaffinitäten gegenüber BMPR-IA und BMPR-IB bemerkbar (Nickel et al., 2005).

Die Interaktion zwischen GDF-5 und BMPR-IB profitiert weniger von den Leucin- und Alaninmutationen, weil infolge der vorgebildeten, offenen und geschlossenen Konformationen in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB die Komplementarität zur GDF-5-Oberfläche schon vorhanden ist (Abbildung V-8, S. 196). Die geringfügig höhere Bindungsaffinität bei Mutation von R57 zu Leucin bzw. Alanin (siehe Tabelle IX-3, S. 235 und Nickel et al. (Nickel et al., 2005)) ist interessant, weil die Seitenkette von Arg57 das GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitop vom Lösungsmittel abschirmt. Anders als in BMPR-IA kann bei Mutation von Arg57 der „frei“ werdende Raum im Bindeepitop nicht durch Reste in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife des Rezeptors besetzt werden, weshalb eine weniger dichten Packung zu erwarten ist.

Der Verlust der Bindungsspezifität von GDF-5 könnte die zusätzliche Verknöcherung in den putativen Fingergelenken erklären. In frühen Lebensjahren ist der Phänotyp kaum zu erkennen, die Fingersegmente sind unterscheidbar ausgebildet, obwohl eine anomale Verringerung des Gelenkraumes zu verzeichnen ist (Plett et al., 2008). Der Verlust der Fingergelenke resultiert demnach aus einer Fehlregulation der sekundären Ossifizierung, beispielsweise durch eine erhöhte, deregulierte Proliferation von Chondrozyten im Raum zwischen den Fingersegmenten, sodass nicht

wie im Normalfall ein Gelenk zwischen den artikulären Knorpelgeweben (Interzonen) der Fingersegmente entsteht. Expressionsstudien in Mäuse- oder Hühnerembryonen zeigen, dass während der Entwicklung der Gliedmaßen in einem zeitlichen und räumlichen Kontext neben GDF-5 (Chang et al., 1994; Storm and Kingsley, 1996; Storm and Kingsley, 1999) weitere Wachstumsfaktoren wie BMP-2 (Lyons et al., 1990; Macias et al., 1997), BMP-4 (Jones et al., 1991), BMP-6 (Lyons et al., 1989) und BMP-7 (Macias et al., 1997) exprimiert werden, denen BMPRIA und BMPRII für die Signalübermittlung zur Verfügung stehen (Zou et al., 1997). In ihrer Funktion bei der Differenzierung mesenchymaler Zellen in Chondrozyten und deren anschließender Proliferation kann die GDF-5-R57L-Variante anders als wildtypisches GDF-5 neben BMPRII zusätzlich BMPRI in signalaktive Komplexe rekrutieren, wodurch das Proliferationssignal potenziert und gleichzeitig die inhibierende Wirkung von Noggin reduziert werden. Alternativ kann vermutet werden, dass GDF-5-R57L mit anderen BMP-Liganden wie BMP-2, die potentiell apoptotische Prozesse auslösen, um Typ I Rezeptorbindestellen kompetitiert. In diesem Sinne würde GDF-5-R57L als Antagonist der BMP-vermittelten chondrogenen Apoptose fungieren.

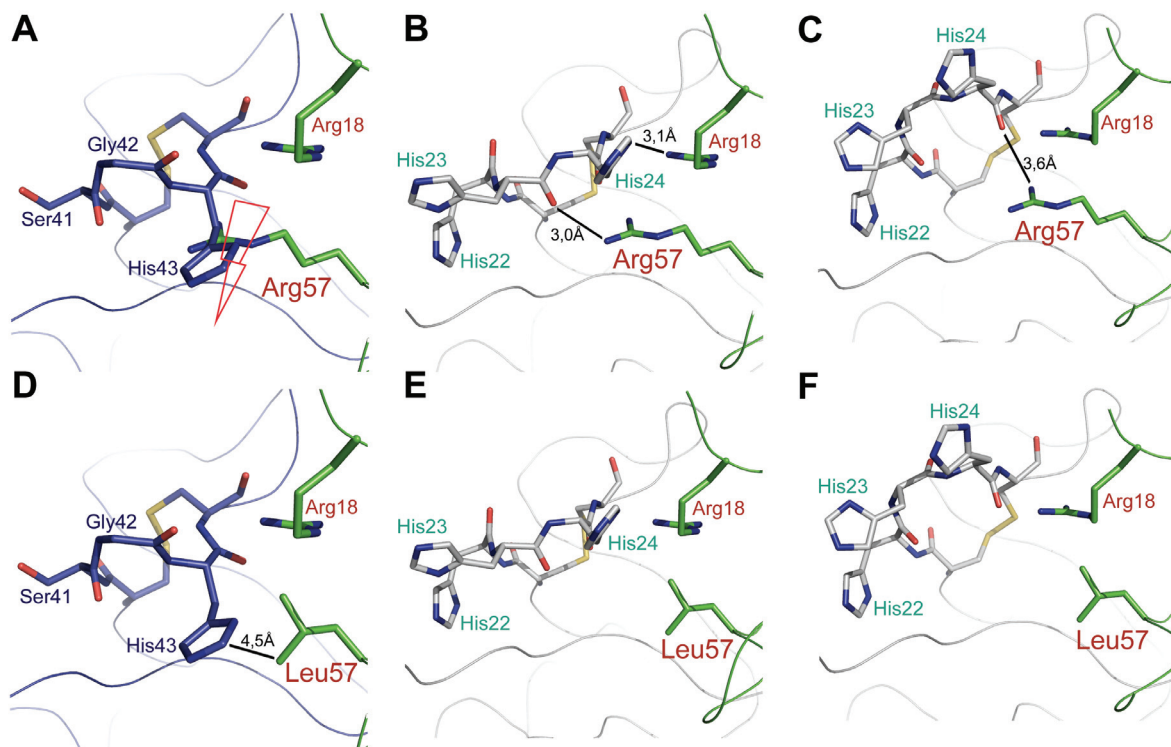


Abbildung V-8: Strukturelle Auswirkung der GDF-5-R57L-Mutation. GDF-5 ist als grüne, BMPRI-IA als blaue und BMPRI-IB als hellgraue α -Darstellung oder Stäbchen gezeichnet. Abstände sind als schwarze Linien angegeben. **A,D:** Vergleich der Situation mit Arg57 (**A**) oder Leu57 (**D**) für die „Klappe“ in der β 1 β 2-Schleife von BMPRI-IA in einem GDF-5•BMPRI-IA-Modell. **B,C,E,F:** Vergleich der Situation für die „Klappe“ in der β 1 β 2-Schleife von BMPRI-IB in der GDF-5•BMPRI-IB-Struktur mit BMPRI-IB in der geschlossenen (**B,E**) oder offenen Konformation (**C,F**). Deutlich ist der bei Mutation von Arg57 zu Leucin „frei“ werdende Raum im Ligand-Rezeptor-Epitop zu erkennen, der sich bei Mutation zu Alanin nochmals vergrößert. Die Bindungsaffinität von GDF-5 zu BMPRI-IA und BMPRI-IB steigt dementsprechend mit der Leucin- und Alaninmutation.

V. 4. 4. Mechanismen weiterer Mutationen in GDF-5

Um zu prüfen, inwieweit die Deletion von Leu56 und die Mutationen S58T und H59L in der DP-Mutation einzeln zum Verlust der Bindungsaffinität beitragen, wurden GDF-5-del56L-, GDF-5-S58T- und GDF-5-H59L-Varianten rekombinant hergestellt und charakterisiert. Die GDF-5-del56L-

Variante zeigt weder in ALP- noch in Reporterassays biologische Aktivität. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Bindungsstudien, in denen keine Bindung zu BMP Typ I als auch BMP Typ II Rezeptoren feststellbar ist, und weist darauf hin, dass die Deletion von Leu56 nicht nur das „wrist“- sondern auch das „knuckle“-Epitop strukturell verändert. Die anderen beiden Mutationen S58T und H59L weisen hingegen eine annähernd wildtypische Bindungsaffinität zu BMPR-IA und BMPR-IB auf. Auffallend ist der sukzessive Anstieg der Dissoziationsgeschwindigkeit bei den Mutationen S58T, H59L und L60P. Bei Messung der BMPR-IB-Interaktion führt dies bei ungefähr gleichbleibender Assoziationsgeschwindigkeit zu einer zunehmend niedrigeren Bindungsaffinität (Abbildung IV-19, S. 88). Eine Ausnahme bildet hierbei jedoch die Interaktion zwischen GDF-5-H59L und BMPR-IA. Während die Bindungsaffinität wildtypischem GDF-5 entspricht, ist eine äquivalente Erhöhung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten zu verzeichnen. Unerwarteterweise resultiert die schnelle Gleichgewichtsreaktion in einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität von GDF-5-H59L in ALP- und Reporterassays. Obwohl bei GDF-5-S58T vor allem die Dissoziationsgeschwindigkeit von Komplexen mit BMPR-IA bzw. BMPR-IB stark erhöht ist, kann auch für diese Variante keine Aktivität in RobC26-Zellen und nur eine Restaktivität in ATDC5-Zellen gemessen werden. In Anbetracht der ähnlichen Ergebnisse bei Untersuchungen zu GDF-5-L60P (V. 4. 2.) und GDF-5-R57L (V. 4. 3.) kann geschlossen werden, dass sich die Stabilität des GDF-5•BMPR-I-Komplexes, die von der Dissoziationsgeschwindigkeit abhängt, proportional zu der biologischen Aktivität verhält. Damit scheint es einen Zusammenhang zwischen der Kinetik der Ligand-Rezeptor-Komplexbildung und der Aktivierbarkeit des Smad1/5/8-Signalwegs zu geben. Möglicherweise ist eine bestimmte Halbwertszeit von GDF-5•BMPR-I-Komplexen notwendig, um die intrazelluläre Phosphorylierungskaskade zu initiieren. Für BMP-Rezeptoren sind keine Phosphorylierungsgeschwindigkeiten bekannt. Andere Serin/Threonin-Kinasen weisen Umsatzgeschwindigkeiten (k_{cat}) von $0,3s^{-1}$ (PDK1) (Gao and Harris, 2006) bis $0,01s^{-1}$ (p38 α) (Lukas et al., 2004) auf.

Für BMPs wird ein begrenzt kooperativer Bindungsmodus angenommen, weil Typ I und Typ II Rezeptoren unabhängig voneinander gebunden werden können. Der hochaffin bindende Typ I Rezeptor „immobilisiert“ den BMP-Liganden an der Zelloberfläche, wodurch dessen Freiheitsgrade auf die zwei Dimensionen der Zelloberfläche begrenzt und leichter ternäre Komplexe mit den niedrig affin bindenden Typ II Rezeptoren gebildet werden können (Schlessinger et al., 1995). Weil die konstitutiv aktive Serin/Threonin-Kinase des Typ II Rezeptors die intrazelluläre Phosphorylierungskaskade durch die Aktivierung der Typ I Rezeptorkinase auslöst, stellt die Rekrutierung des Typ II Rezeptors wahrscheinlich den limitierenden Schritt der Smad-Aktivierung dar. Vorstellbar ist, dass durch die deutlich niedrigere Halbwertszeit beispielsweise von GDF-5-H59L•BMPR-IA-Komplexen der Typ II Rezeptor nicht effizient in einen stabilen ternären Komplex rekrutiert werden und somit die intrazelluläre Phosphorylierung des Typ I Rezeptors schlecht oder gar nicht ablaufen kann.

Die Ergebnisse mit den hier vorgestellten GDF-5-Varianten erinnern an das EPO-System, in dem verschiedene mimetische Peptide (EMPs) trotz hoher Bindungsaffinität zum EPOR eine geringere Aktivität als der wildtypische Faktor aufweisen (Johnson et al., 1998). Die geringere biologische Aktivität ist möglicherweise nicht allein auf eine „falsche“ Orientierung von EPOR im Komplex mit EMP, sondern ebenso auf die hohen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten von EMP-EPOR-Komplexen zurückzuführen (Ballinger and Wells, 1998; Livnah et al., 1998). Interessanterweise finden sich auch Beispiele für eine erhöhte biologische Funktion infolge einer

schnelleren Gleichgewichtsreaktion. Im EGF-System konnten beispielsweise Ligand-Chimären aus EGF und TGF- α konstruiert werden, die in Biacore-Messungen mit immobilisierter EGFR- (ErbB-, Her1-) Ektodomäne zwar eine den wildtypischen Liganden EGF und TGF- α vergleichbare Bindungsaffinität (K_D), aber stark erhöhte kinetische Konstanten aufweisen (Lenferink et al., 2000). Diese EGF-TGF- α -Chimären zeigen überraschenderweise schon bei einer 10fach niedrigeren Konzentration eine den wildtypischen Liganden entsprechende zelluläre Antwort (Phosphorylierung vom MAPK), was vermutlich auf die Änderung der kinetischen Parameter der Komplexbildung zurückgeführt werden kann. Warum die schnellere Gleichgewichtsreaktion das intrazelluläre Signal verstärkte, konnte hingegen nicht geklärt werden.

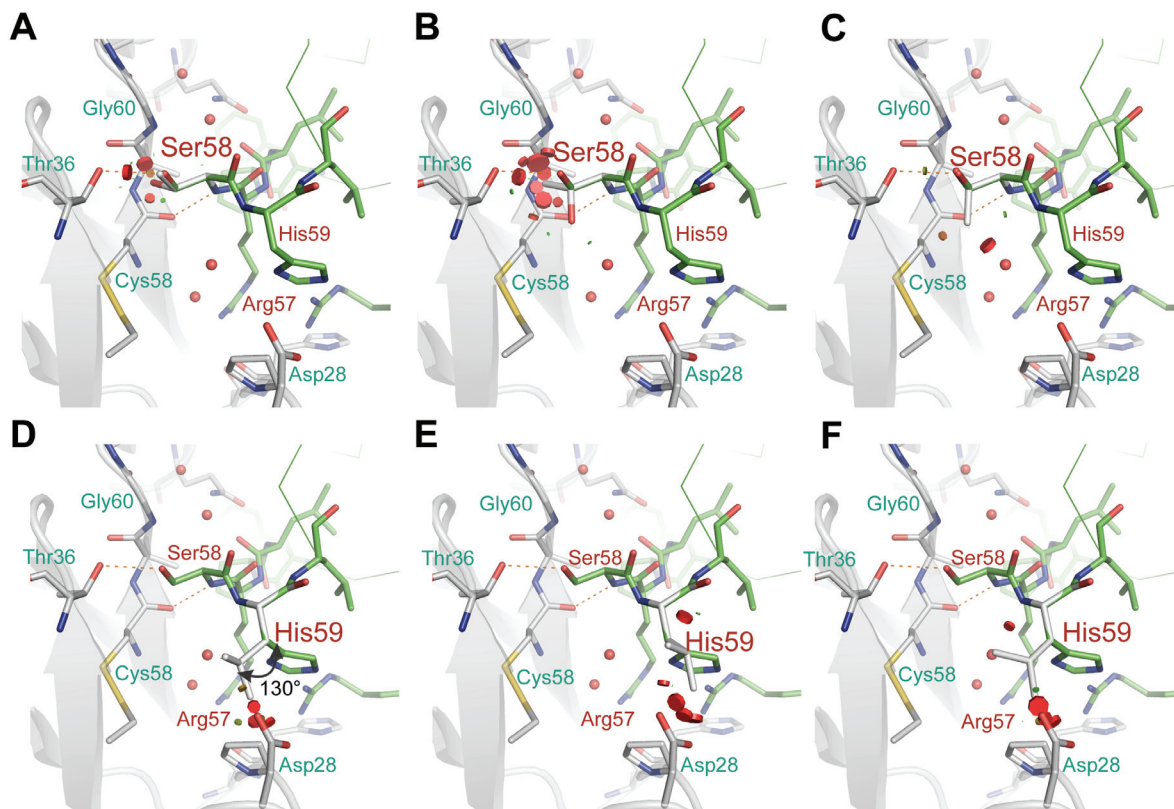


Abbildung V-9: Auswirkungen der Mutationen S58T und H59L auf die Stabilität des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes. Die Reste Ser58 und His59 wurden in PYMOL (DeLano, 2002) gegen die entsprechenden Aminosäuren Thr bzw. Leu ausgetauscht. Es sind jeweils drei Rotamere (in hellgrau) angegeben, wobei die Häufigkeit der Rotamere von links nach rechts abnimmt, also das linke Rotamer geometrisch am wahrscheinlichsten ist. Eventuelle sterische Hindernisse sind als rote Scheiben visualisiert. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. BMPR-IB ist in hellgrau, GDF-5 in grün wiedergegeben. Die jeweils mutierten Reste sind größer geschrieben. **A-C:** Die Mutation S58T führt zu sterischen Problemen im GDF-5•BMPR-IB-Bindeepitop. Grund hierfür ist die zusätzliche Methylgruppe am C β -Atom. Die Methylgruppe in Threonin könnte die einzige Hauptketten-Wasserstoffbrücke im Bindeepitop zwischen Cys58-O (BMPR-IB) und Ser58-N (GDF-5) beeinträchtigen. Die Wasserstoffbrücke zwischen Thr36-OG1 (BMPR-IB) und Ser58-OG (GDF-5) kann in den Rotameren eins (links) und zwei (Mitte) nicht mehr ausgebildet werden. Beim dritten Rotamer (rechts) wird ein Wassermolekül aus dem Raum zwischen Cys58 (BMPR-IB) und His59 (GDF-5) verdrängt. **D-F:** Durch Substitution von His59 mit Leucin ändert sich die Hydrophobizität; zudem ist die Interaktionsfläche gegenüber dem Solvens abgeschirmt, sodass möglicherweise zwei Wassermoleküle im Zwischenraum von Arg57, Arg18 und Ser58 (alle GDF-5), die an Wasserstoffbrücken beteiligt sind, nicht stabilisiert werden. Die entstehenden Freiräume im Bindeepitop könnten zu einer Destabilisierung des GDF-5-H59L•BMPR-IB-Komplexes führen.

Zusammengenommen sollten weniger die Bindungsaffinität einer Ligand-Rezeptor-Interaktion, sondern vielmehr die dieser zugrunde liegenden kinetischen Parameter Rückschlüsse auf die

biologische zelluläre Antwort erlauben. Wie mit den GDF-5-Varianten gezeigt, können schon einzelne, auf den ersten Blick strukturell und funktionell uninteressante Mutationen allein aufgrund ihrer Fähigkeit, die Dynamik des Ligand-Rezeptor-Komplexgleichgewichts zu modulieren, grundsätzlich veränderte biologische Funktionen herbeiführen.

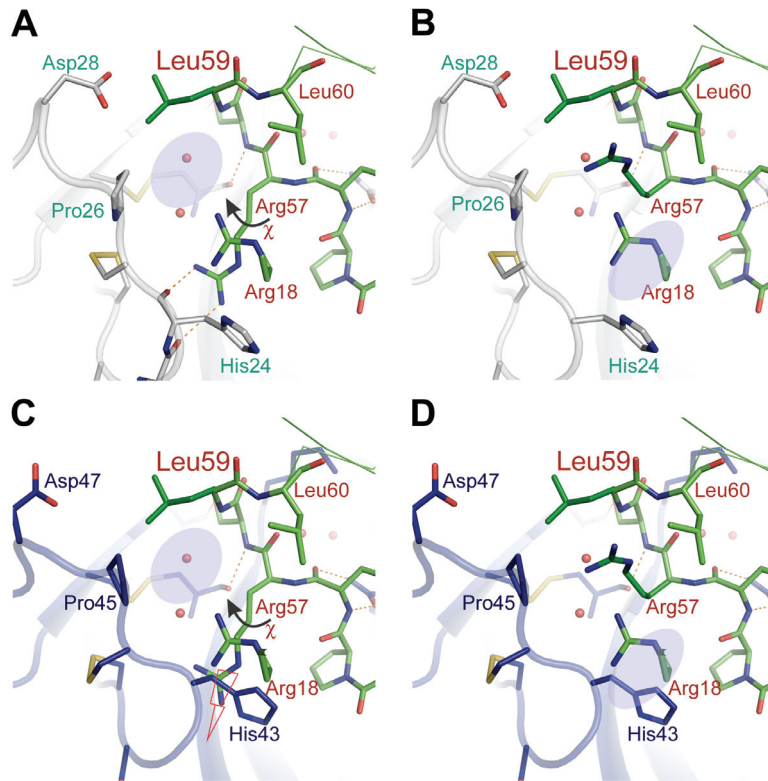


Abbildung V-10: Molekularer Mechanismus von GDF-5-H59L. Der bei Substitution von His59 mit Leucin „frei“ werdende Raum im Bindepitop des GDF-5-H59L•BMPR-I-Komplexes (energieminimiertes Modell) ist als hellblauer Kreis angegeben. Im Komplex unterliegt Arg57 von GDF-5-H59L geringeren sterischen Einschränkungen und kann möglicherweise eine veränderte Seitenkettenkonformation annehmen (siehe Pfeilrichtung). **A, B:** Bindepitop zu BMPR-IB (hellgrau). Die Solvenz Zugänglichkeit der Interaktionsfläche ist erhöht, was mit einer höheren Dissoziationsgeschwindigkeit korreliert. **C, D:** Bindepitop zu BMPR-IA (blau) nach Überlagerung auf BMPR-IB. Wie bereits beschrieben, passen die Konformation der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IA (His43) und die Position von Arg57 in der pre-Helix-Schleife von GDF-5 nicht zusammen, sodass eine Reorientierung stattfinden muss. Nimmt Arg57 die hier modellierte, veränderte Seitenkettenkonformation an, muss bei Bindung keine Umlagerung erfolgen, was die Assoziation erleichtert, aber auch das Bindepitop dem Solvens öffnet und so zu einer höheren Dissoziationsgeschwindigkeit führt.

Der molekulare Mechanismus hinter der veränderten Bindungskinetik der GDF-5-S58T-Variante ist offensichtlicher als der für die GDF-5-H59L-Variante. Durch die Einführung einer zusätzlichen Methylgruppe in das dicht gepackte Bindepitop wird sterische Spannung erzeugt, die sich in einer erhöhten Dissoziationsgeschwindigkeit äußert. Zudem wird vermutlich die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen Ser58 (dann Thr) und Cys58 bzw. Thr36 (beide BMPR-IB) beeinträchtigt (Abbildung V-9, S. 198). Bei der GDF-5-H59L-Variante sind bei Bindung an BMPR-IA die Assoziations- als auch Dissoziationsgeschwindigkeiten in gleichem Maße, bei BMPR-IB ist nur die Dissoziationsgeschwindigkeit verändert. GDF-5-H59L kann demnach einerseits BMPR-IA schneller und effizienter in den binären Komplex rekrutieren, andererseits ist dieser Komplex ähnlich wie der GDF-5-H59L•BMPR-IB-Komplex instabiler als der Komplex mit wildtypischen GDF-5. Wahrscheinlich resultiert die beschleunigte Assoziation von BMPR-IA aus dem Freiraum, der durch die unterschiedlichen Winkel des His-Rotamers ($\chi_1 \sim 69^\circ$) und des Leu-Rotamers ($\chi_1 \sim 66^\circ$)

entsteht, weil dadurch die konformationellen Freiheitsgrade von Arg57 (GDF-5) zunehmen (Abbildung V-9, S. 198). Andererseits könnten energetisch ungünstige Kontakte zwischen Leu59 von GDF-5 und Asp28 in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife von BMPR-IB (Asp47 in BMPR-IA) zu einer erhöhten Dissoziationsrate führen. In Komplexen von GDF-5-H59L mit BMPR-IA und BMPR-IB ist in der Kontaktfläche zwischen Leu59 in der pre-Helix-Schleife und der $\beta 1\beta 2$ -Schleife keine dichte Ligand-Rezeptor-Packung und nur eine unzureichende Abschirmung der Interaktionsfläche vom Solvens zu erwarten (Abbildung V-10, S. 199). Die erhöhte Diffusionsrate von Solvensmolekülen in die Interaktionsfläche wirkt sich entsprechend negativ auf die Komplexstabilität aus.

V.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammengenommen lässt sich für die Interaktion von GDF-5 und BMPR-IB schlussfolgern, dass zwei der drei, wie in Abbildung V-3 (S. 180) illustriert zur molekularen Erkennung des Liganden beitragenden Regionen in BMPR-IB bei Bindung von GDF-5 von sterischen Umlagerungen betroffen sind. Die vorgebildeten Konformationen der „Klappe“ in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife weisen eine hohe Komplementarität zur GDF-5-Oberfläche auf. Positiv auf die Komplexstabilität wirkt sich die vorgebildete Konformation der $\beta 1\beta 2$ -Schleife indessen nur im Zusammenspiel mit den $\beta 4\alpha 1$ - und $\alpha 1\beta 5$ -Schleifen aus. Deren Konformation bestimmt wesentlich die Spezifität der GDF-5•BMPR-IB-Interaktion und bewirkt vermutlich die Drehung von BMPR-IB im „wrist“-Epitop von GDF-5 im Vergleich zu BMPR-IA im „wrist“-Epitop von BMP-2. Obwohl die Interaktionsfläche gegenüber dem Lösungsmittel vergleichsweise schlecht abgeschirmt ist, wird mit der von Gln67 auf Phe66 „umgeschalteten“ Bindungsdeterminanten eine im Vergleich mit der GDF-5•BMPR-IA-Interaktion fast 15fach höhere Bindungsaffinität erreicht, auf der die preferentielle Bindung von BMPR-IB durch GDF-5 beruht. Die Komplementarität der Moleküloberflächen zwischen den Bindungspartnern ist jedoch nicht nur aus sterischer Sicht, sondern auch für die Ausbildung von nichtkovalenten, beispielsweise polaren oder elektrostatischen, Wechselwirkungen von Bedeutung. Eine mangelnde Oberflächenkomplementarität zwischen Ligand und Rezeptor kann dazu führen, dass sonst maßgeblich zur Bindungsaffinität beitragende hydrophobe Wechselwirkungen wegen der unzureichenden Verdrängung von Solvensmolekülen aus dem Bindepitop weniger zur Bindungsenergie beitragen (Chothia and Janin, 1975).

Für andere BMP-Ligand-Rezeptor-Kombinationen können völlig andere Erkennungsmechanismen gelten, wie die Abhängigkeit der BMP-6•ActR-I-Interaktion von der Glykosylierung des Liganden demonstriert. Beispielsweise ist fraglich, ob glykosyliertes BMP-2 oder GDF-5 den Rezeptor ActR-I binden können, oder weshalb deglykosyliertes BMP-6 trotz moderater Bindungsaffinität zu BMPR-IA und BMPR-IB keine Aktivität in ALP-Assays zeigt. Möglich wäre auch eine begrenzte Kooperativität von Typ I und Typ II Rezeptoren, wie sie bei der Identifizierung der Rezeptoren *in vivo* oft beschrieben wurde (Liu et al., 1995; Nohno et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995). Kürzlich publizierte Arbeiten demonstrieren dies beispielsweise für die Wechselwirkung von BMP-9 mit TSR-I und mehr noch ActR-I (Scharpfenecker et al., 2007). Auch für die Bindung von BMP-6 oder BMP-7 an ActR-I käme eine begrenzte Kooperativität in Betracht (Yamashita et al., 1995). TSR-I kann in Gegenwart von T β R-I und T β R-II von TGF- β s gebunden werden (Goumans et al., 2003), sodass TSR-I möglicherweise strukturelle Eigenschaften vereint, die sonst jeweils T β R-I und BMPR-IA/BMPR-IB zugeschrieben werden (siehe V. 3. 2. 2). TSR-I könnte deshalb die höchste Promiskuität unter den Typ I Rezeptoren aufweisen, die allerdings wegen der unterschiedlichen

Erkennungsmechanismen von TGF β - und BMP-Liganden eine niedrige Bindungsaffinität bedingt. Vermutlich kann jedoch gerade bei niedrigaffinen Interaktionen eine begrenzte Kooperativität dazu beitragen, die zur Signalgebung notwendige Komplexstabilität noch zu erreichen. BMP-10, ein Homolog von BMP-9 und ein naher Verwandter von GDF-5, rekrutiert sowohl BMPR-IA und BMPR-IB als auch TSR-I zur Signalübermittlung (David et al., 2007). Im Gegensatz dazu können BMP-2 oder GDF-5 nach derzeitigem Stand der Forschung zumindest *in vitro* weder ActR-I noch TSR-I binden – wobei nicht ausgeschlossen ist, dass *in vivo* beispielsweise Modulatorproteine wie RGMs oder Korezeptoren wie Endoglin aktivierend wirken. Strukturell betrachtet sollten noch unbekannte Merkmale auf den Liganden kodiert sein, die für diese hohe Bindungspromiskuität verantwortlich zeichnen, wobei die Bindungspromiskuität und -spezifität generell im zellulären Kontext gesehen werden müssen – also inwiefern auch intrazellulär in Abhängigkeit vom Liganden spezifische Signale ausgelöst werden. Diesbezüglich existieren noch viele Fragen zu den Erkennungsmechanismen von BMP-Liganden, beispielsweise welche strukturellen Eigenschaften den unterschiedlichen Signalmechanismen von GDF-9 – das T β R-I rekrutiert – und dessen nächsten Homolog GDF-9b (BMP-15) – das BMPR-IB rekrutiert – zugrundeliegen (Mazerbourg and Hsueh, 2006), weshalb die Liganden der GDF-5-Untergruppe einschließlich BMP-9 und BMP-10 drei Rezeptoren, BMPR-IA und/oder BMPR-IB sowie je nach Ligand zusätzlich TSR-I, binden oder wie sich die Bindungseigenschaften von TSR-I oder ActR-I gegenüber einzelnen Bindungspartnern erklären lassen.

Hinsichtlich der anfangs erwähnten Möglichkeit, Erkenntnisse aus der molekularen Erkennung von Liganden und Rezeptoren in weniger komplex aufgebauten, *de novo* konstruierten Molekülen („proteomimetics“ (Che et al., 2006; Fletcher and Hamilton, 2005; Fletcher and Hamilton, 2006)) zu kombinieren, um die Signaltransduktion von BMPs gezielt zu beeinflussen, geben die hier vorgestellten Ergebnisse neue Anregungen. Beispielsweise könnte die Bindung von BMPR-IB und BMP-Liganden selektiv durch Inhibitoren des „knob-into-hole“-Motivs erfolgen, wenn ein Antagonist aus einem zentralen Phenylalanin und umgebenden, stark hydrophoben Resten bestehen würde, die der Verankerung des Moleküls im Epitop dienen. Die Nachahmung von Bindungseigenschaften natürlicher Liganden ließe sich durch einen Nachbau des dreiteiligen Bindeepitops bewerkstelligen, indem um das zentrale, die Bindungsaffinität generierende Motiv in einer stereochemisch starren Form Kontakte zu den Erkennungsregionen auf dem Liganden hergestellt werden. Ähnlich wie für HGH unternommen, wäre es interessant, über gerichtete Mutagenesestrategien in Verbindung mit Phage Display oder anderen Methoden Liganden zu identifizieren, die trotz der Unterbrechung von Bindungsdeterminanten die Rezeptoren mit hoher Bindungsaffinität binden können, was zusätzliche Informationen über Mechanismen, wie Affinitäten im BMP-System generiert werden können, hervorbringen würde. Bisher ist es nicht gelungen, Bindungsaffinitäten und biologische Funktionen von extrazellulären Liganden durch *de novo* konstruierte, kleine Moleküle zu kopieren, sodass letztlich meist Antikörper mit ihren großen Interaktionsflächen als Inhibitoren molekularer Wechselwirkungen eingesetzt werden, wie beispielsweise aktuelle Entwicklungen von VEGF-Hemmstoffen (Avastin[®], Lucentis[®]) zeigen. Untersuchungen an krankheitsrelevanten GDF-5-Varianten zeigen, dass ähnlich wie für andere Proteinfamilien beschrieben schon vergleichsweise geringe Veränderungen in der Bindungskinetik von Ligand-Rezeptor-Komplexen drastische Auswirkungen auf die Signaltransduktion und damit die biologische Aktivität des entsprechenden Liganden haben, was neue Ansätze im Protein-Design eröffnet.

VI. Zusammenfassung

Knochenwachstumsfaktoren (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) sind ubiquitäre, sekretierte Proteine mit vielfältigen biologischen Funktionen. Die Vielfalt an zellulären Prozessen, die durch BMPs reguliert werden, von der Knochenentwicklung und Organhomöostase bis hin zur Neurogenese, erstaunt – und wirft angesichts von teils redundanten, teils spezifischen Funktionen der BMPs Fragen zu den Mechanismen ihrer Signalübermittlung auf. Die Signaltransduktion von BMPs erfolgt wie bei den strukturell verwandten TGF- β s und Activinen durch die ligandeninduzierte Oligomerisierung von transmembranen Serin/Threonin-Kinaserezeptoren, von denen zwei Typen – Typ I und Typ II – existieren. Einer Vielzahl von mehr als 18 BMP-Liganden stehen nach derzeitigem Erkenntnisstand nur vier Typ I und drei Typ II Rezeptorsubtypen für die Bildung von heteromeren Rezeptorkomplexen zur Verfügung. Ein BMP-Ligand kann hochspezifisch nur einen bestimmten Rezeptorsubtyp oder in einer promiskuen Art und Weise mehrere Rezeptorsubtypen binden. Trotz dieser Bindungspromiskuität üben BMPs ihre biologische Funktion überwiegend hochspezifisch aus, d.h. abhängig vom Liganden werden spezifische zelluläre Prozesse reguliert. Somit stellt sich die Frage, wie die Bildung von heteromeren Ligand-Rezeptor-Komplexen und die Aktivierung definierter intrazellulärer Signalkaskaden zusammenhängen und wie letztlich ein bestimmtes BMP-Signal durch einen „Flaschenhals“, repräsentiert durch die begrenzte Anzahl an Rezeptorsubtypen, in das Zellinnere übermittelt wird.

Die Interaktionen zwischen BMP-2 / GDF-5 und den Typ I Rezeptoren BMPR-IA / BMPR-IB sind ein Paradebeispiel für Bindungspromiskuität und -spezifität. Während BMP-2 beide Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB mit gleicher Bindungsaffinität bindet („promiske Interaktion“), zeigt GDF-5 eine 15-20fach höhere Bindungsaffinität zu BMPR-IB („spezifische“ Interaktion). Dieser Unterschied ist scheinbar gering, aber physiologisch überaus relevant. Um Einblick in die Mechanismen der molekularen Erkennung zwischen den Bindungspartnern zu gewinnen, wurden binäre und ternäre Komplexe aus den Liganden BMP-2 oder GDF-5, den extrazellulären Domänen der Typ I Rezeptoren BMPR-IA oder BMPR-IB sowie der extrazellulären Domäne des Typ II Rezeptors ActR-IIB untersucht. Die hier vorliegende Arbeit beschreibt die strukturelle und funktionelle Analyse dieser Ligand-Rezeptor-Komplexe. Um den Einfluss struktureller Flexibilität auf die BMP Typ I Rezeptor Erkennung näher zu analysieren, wurde zudem die Struktur von BMPR-IA in freiem Zustand mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt.

Aus Mutagenesedaten und der Kristallstruktur des GDF-5•BMPR-IB-Komplexes lassen sich im Vergleich zu bekannten Kristallstrukturen Merkmale ableiten, mit denen die Ligand-Rezeptor-Bindung und -Erkennung charakterisiert werden kann: (1) Die Hauptbindungs determinanten in Komplexen von BMPR-IA und BMPR-IB mit ihren Liganden sind unterschiedlich. Während in Komplexen mit BMPR-IB ein hydrophobes Motiv die Bindungsaffinität bestimmt, trägt in Komplexen mit BMPR-IA eine polare Interaktion signifikant zur Bindungsenergie bei. Ein Vergleich der Strukturen von freien und gebundenen Liganden und Typ I Rezeptoren zeigt, dass interessanterweise diese Hauptbindemotive erst bei der Ligand-Rezeptor-Interaktion entstehen, sodass ein „induced fit“ vorliegt und die Moleküle entsprechend „aufeinander falten“. (2) Die Bindungsspezifität wird durch periphere Schleifen in den Typ I Rezeptoren bestimmt. Wie Untersuchungen von Punktmutationen in BMPR-IA zeigen, die einer krebsartigen Darmerkrankung (Juvenile Polyposis) zugrunde liegen, führt erst die „richtige“ Kombination aus Flexibilität in den

Schleifen und Rigidität des Rezeptorgrundgerüsts zu signalaktiven Typ I Rezeptoren mit einer potentiell den Liganden komplementären Oberfläche. Die mangelnde sterische Komplementarität von Ligand- und Rezeptoroberflächen führt zu der niedrigeren Bindungsaffinität von GDF-5 zu BMPR-IA im Vergleich zu BMPR-IB.

Interessanterweise zeigen die hier vorgestellten, hochaufgelösten Strukturdaten, dass die Orientierungen/Positionen der Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB in den Bindepitopen der Liganden BMP-2 und GDF-5 variieren. Unter der Voraussetzung, dass die extrazelluläre Domäne, das Transmembransegment und die intrazelluläre Domäne der Typ I Rezeptoren ein starres Element bilden, sollte sich die unterschiedliche Orientierung der extrazellulären Domänen der Typ I Rezeptoren in der Anordnung der Kinasedomänen widerspiegeln und sich auf die Signaltransduktion auswirken. Möglicherweise ist eine bestimmte Anordnung der Kinasedomänen der Typ I und Typ II Rezeptoren für eine effiziente Phosphorylierung bzw. Signaltransduktion erforderlich. Der Vergleich mehrerer Ligand-Typ I Rezeptor-Komplexe zeigt, dass die unterschiedliche Orientierung dieser Rezeptoren möglicherweise vom Liganden abhängt. Angesichts der Bindungspromiskuität unter BMP-Liganden und -Rezeptoren könnten so spezifische Signale übermittelt und spezifische biologische Funktionen reguliert werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Erkenntnisse tragen wesentlich zur strukturellen Charakterisierung der Ligand-Rezeptor-Erkennung in der BMP-Familie bei. Die Frage, warum trotz strukturell hoch homologer Liganden und Rezeptoren und weitgehend konservierten Bindepitopen eine teils promiske und teils spezifische Interaktion möglich ist, kann nun für die Liganden BMP-2 und GDF-5 sowie den beiden Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB beantwortet werden.

VII. Summary

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are ubiquitous, secreted cytokines involved in a manifold of biological functions. The diversity of cellular processes regulated by BMPs, from bone development to tissue homeostasis and neuronal processes, is amazing – and raises questions about the mechanisms of signal transduction in the light of redundant functions on the one hand, and specific functions on the other hand. Similar to structurally related activins and TGF- β s, the signal transduction of BMPs is accomplished by ligand-induced oligomerization of transmembrane BMP type I and type II serine/threonine receptor kinases. According to current knowledge, only four type I and three type II receptor subtypes are available for BMP signal transduction, facing a multitude of more than 18 BMP ligands. Binding of BMP ligands to their receptors can be highly specific meaning that only one specific receptor of either subtype is used for signaling. In contrast, many BMP ligands can recruit more than one receptor subtype, which results in binding promiscuity. However, even though receptor subtypes are bound in a promiscuous manner, only certain biological functions are triggered. Dependent on the BMP ligand, specific cellular processes are activated and regulated. This discrepancy between unspecific binding and specific signaling events and the biological response raises the question how the formation of heteromeric ligand-receptor complexes is linked to the activation of defined intracellular signaling cascades, and finally, how a certain BMP signal is transduced into the interior of the cell through a „bottleneck“ represented by the limited number of receptor subtypes.

The interaction between BMP-2 / GDF-5 and the BMP type I receptors BMPR-IA / BMPR-IB is a prime example for binding promiscuity and binding specificity. BMP-2 binds BMPR-IA and BMPR-IB with almost equal binding affinity („promiscuous interaction“) while GDF-5 exhibits a 15-20fold higher binding affinity to BMPR-IB („specific interaction“). Although this difference is seemingly small, it is however of considerable relevance for the physiological role of these ligands. To gain insight into the mechanisms of molecular recognition between the binding partners, binary and ternary ligand-receptor complexes consisting of BMP-2 or GDF-5, the extracellular domains of the type I receptors BMPR-IA or BMPR-IB, and the extracellular domain of the type II receptor ActR-IIB were investigated. The thesis presented here describes the structural and functional analysis of these ligand-receptor complexes. To analyse the effect of structural flexibility on BMP type I receptor recognition in more detail, the structure of free BMPR-IA was determined using NMR spectroscopy.

Based on data from a limited mutagenesis and the crystal structure of the GDF-5•BMPR-IB complex several characteristics concerning ligand-receptor binding and recognition can be deduced: (1) The main binding determinants in complexes of BMPR-IA and BMPR-IB with their ligands BMP-2 and GDF-5 differ. A hydrophobic binding motif determines binding affinity in complexes of BMPR-IB, whereas a polar interaction significantly contributes to binding energy in complexes of BMPR-IA. These main binding motifs are only formed during complex formation as demonstrated by a comparison between structures of free and bound ligands as well as type I receptors. Both ligand and receptor fold „onto each other“ which suggests an induced fit mechanism. (2) Binding specificity is encoded on loops at the periphery of the binding epitope of the type I receptors. Only the „appropriate“ combination between structural flexibility in the receptor loops and structural rigidity of the receptor backbone results in signal active type I receptors, as shown by analysis of single

polymorphisms in BMPR-IA causing juvenile polyposis syndrome, a cancerous disease of the intestine. A lack of steric surface complementarity between GDF-5 and BMPR-IA, that cannot be overcome by structural flexibility, leads to the lower binding affinity in comparison to BMPR-IB.

Interestingly, the high resolution structure of the GDF-5•BMPR-IB complex shows that the orientations/positions of BMPR-IA in the binding epitope of BMP-2 and of BMPR-IB in the binding epitope of GDF-5 vary. Assuming that the extracellular domain, the transmembrane segment, and the intracellular domain of the type I receptors form a rigid element, the different orientations of the extracellular domains should also reflect the assembly of the kinase domains and therefore, affect signal transduction. One can assume that a defined arrangement of the kinase domains of type I and type II receptors is required to allow for efficient phosphorylation and signal transduction, respectively. The comparison of several BMP ligand-type I receptor complexes suggests that the different orientations of these receptors are likely dependent on the ligand. Considering the binding promiscuity among BMP ligands and receptors such a mechanism would represent a possible way for the transmission of specific signals and regulation of specific biological functions.

The insights into molecular structure and function of BMP ligands and receptors presented in this thesis contribute significantly to a more detailed understanding of their binding properties. The question why the interaction of BMP ligands and receptors is promiscuous on the one hand and specific on the other hand in spite of structurally highly homologous molecules can now be answered for BMP-2 and GDF-5 as well as BMPR-IA and BMPR-IB.

VIII. Literaturverzeichnis

(1984). IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* **138**, 9-37.

Akarsu, A. N., Rezaie, T., Demirtas, M., Farhud, D.D, Sarfarazi, M. (1999). Multiple synostosis type 2 (SYNS2) maps to 20q11.2 and caused by a missense mutation in the growth/differentiation factor 5 (GDF5). *ASHG Annual Meeting* **1569**.

Allendorph, G. P., Isaacs, M. J., Kawakami, Y., Belmonte, J. C. and Choe, S. (2007). BMP-3 and BMP-6 structures illuminate the nature of binding specificity with receptors. *Biochemistry* **46**, 12238-47.

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

Arakawa, T., Bhat, R. and Timasheff, S. N. (1990a). Preferential interactions determine protein solubility in three-component solutions: the MgCl₂ system. *Biochemistry* **29**, 1914-23.

Arakawa, T., Bhat, R. and Timasheff, S. N. (1990b). Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins. *Biochemistry* **29**, 1924-31.

Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K. and Ikawa, Y. (1990). A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev* **30**, 109-16.

Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M., Massague, J. and 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**, 671-80.

Attisano, L., Wrana, J. L., Cheifetz, S. and 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., Wrana, J. L., Montalvo, E. and Massague, J. (1996). Activation of signalling by the activin receptor complex. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 1066-1073.

Auclair, B. A., Benoit, Y. D., Rivard, N., Mishina, Y. and Perreault, N. (2007). Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology* **133**, 887-96.

Baarends, W. M., van Helmond, M. J., Post, M., van der Schoot, P. J., Hoogerbrugge, J. W., de Winter, J. P., Uilenbroek, J. T., Karels, 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**, 189-97.

Bai, Y., Auperin, T. C. and Tong, L. (2007). The use of in situ proteolysis in the crystallization of murine CstF-77. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **63**, 135-138.

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

Ballinger, M. D. and Wells, J. A. (1998). Will any dimer do? *Nat Struct Biol* **5**, 938-40.

Banfield, M. J., Naylor, R. L., Robertson, A. G., Allen, S. J., Dawbarn, D. and Brady, R. L. (2001). Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure* **9**, 1191-9.

- Bardwell, J. C. (1994). Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol Microbiol* **14**, 199-205.
- Baur, S. T., Mai, J. J. and Dymecki, S. M. (2000). Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development* **127**, 605-19.
- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J. and Georgiou, G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13703-8.
- Bhat, T. N., Bentley, G. A., Boulot, G., Greene, M. I., Tello, D., Dall'Acqua, W., Souchon, H., Schwarz, F. P., Mariuzza, R. A. and Poljak, R. J. (1994). Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1089-93.
- Binnie, C., Jenish, D., Cossar, D., Szabo, A., Trudeau, D., Krygsman, P., Malek, L. T. and Stewart, D. I. (1997). Expression and characterization of soluble human erythropoietin receptor made in Streptomyces lividans 66. *Protein Expr Purif* **11**, 271-8.
- Boesen, C. C., Radaev, S., Motyka, S. A., Patamawenu, A. and Sun, P. D. (2002). The 1.1 Å crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain. *Structure* **10**, 913-9.
- Bogan, A. A. and Thorn, K. S. (1998). Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* **280**, 1-9.
- Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M. and Leahy, D. J. (2005). The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15024-9.
- Braden, B. C., Dall'Acqua, W., Eisenstein, E., Fields, B. A., Goldbaum, F. A., Malchiodi, E. L., Mariuzza, R. A., Schwarz, F. P., Ysern, X. and Poljak, R. J. (1995). Protein motion and lock and key complementarity in antigen-antibody reactions. *Pharm Acta Helv* **69**, 225-30.
- Bricogne, G., Vonrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M. and Paciorek, W. (2003). Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **59**, 2023-2030.
- Brown, M. A., Zhao, Q., Baker, K. A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A. et al. (2005). Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem* **280**, 25111-8.
- Brummel, T. J., Twombly, V., Marques, G., Wrana, J. L., Newfeld, S. J., Attisano, L., Massague, J., O'Connor, M. B. and Gelbart, W. M. (1994). Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in Drosophila. *Cell* **78**, 251-61.
- Brunger, A. T. (1992). Free R-Value - a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal-Structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S. et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 905-21.
- Brunger, A. T., Kuriyan, J. and Karplus, M. (1987). Crystallographic R-Factor Refinement by Molecular-Dynamics. *Science* **235**, 458-460.
- Buck, M. (1998). Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q Rev Biophys* **31**, 297-355.

- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J. and Huber, R.** (1995). High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**, 788-96.
- CammersGoodwin, A., Allen, T. J., Oslick, S. L., McClure, K. F., Lee, J. H. and Kemp, D. S.** (1996). Mechanism of stabilization of helical conformations of polypeptides by water containing trifluoroethanol. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 3082-3090.
- Canalis, E., Economides, A. N. and Gazzerro, E.** (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Reviews* **24**, 218-235.
- Carcamo, J., Weis, F. M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J. L., Attisano, L. and Massague, J.** (1994). Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* **14**, 3810-21.
- CCP4.** (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-3.
- Chang, S. C., Hoang, B., Thomas, J. T., Vukicevic, S., Luyten, F. P., Ryba, N. J., Kozak, C. A., Reddi, A. H. and Moos, M., Jr.** (1994). Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem* **269**, 28227-34.
- Chantalat, L., Jones, N. D., Korber, F., Navaza, J. and Pavlovsky, A. G.** (1995). The Crystal-Structure of Wild-Type Growth-Hormone at 2.5 Angstrom Resolution. *Protein and Peptide Letters* **2**, 333-340.
- Che, Y., Brooks, B. R. and Marshall, G. R.** (2006). Development of small molecules designed to modulate protein-protein interactions. *J Comput Aided Mol Des* **20**, 109-30.
- Cho, H. S. and Leahy, D. J.** (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* **297**, 1330-3.
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr. and Leahy, D. J.** (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**, 756-60.
- Chothia, C. and Janin, J.** (1975). Principles of protein-protein recognition. *Nature* **256**, 705-8.
- Clackson, T., Ultsch, M. H., Wells, J. A. and de Vos, A. M.** (1998). Structural and functional analysis of the 1:1 growth hormone:receptor complex reveals the molecular basis for receptor affinity. *J Mol Biol* **277**, 1111-28.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. and Barton, G. J.** (2004). The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**, 426-7.
- Constam, D. B. and Robertson, E. J.** (1999). Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* **144**, 139-49.
- Cordingley, M. G., Callahan, P. L., Sardana, V. V., Garsky, V. M. and Colonno, R. J.** (1990). Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage in vitro. *J Biol Chem* **265**, 9062-5.
- Cowtan, K.** (1994). 'DM': An automated procedure for phase improvement by density modification. Joint CCP4 and ESF-EACBM. *Newsletter on Protein Crystallogr.* **31**, 34-38.
- Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K. and Newhouse, Y.** (1994). Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal-Growth. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**, 414-4123.

- Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y. and Davies, D. R.** (1992). Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* **257**, 369-73.
- Dasgupta, S., Iyer, G. H., Bryant, S. H., Lawrence, C. E. and Bell, J. A.** (1997). Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers. *Proteins* **28**, 494-514.
- Dauter, Z., Botos, I., LaRonde-Leblanc, N. and Wlodawer, A.** (2005). Pathological crystallography: case studies of several unusual macromolecular crystals. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **61**, 967-975.
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J. and Bailly, S.** (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**, 1953-1961.
- De Crescenzo, G., Grothe, S., Zwaagstra, J., Tsang, M. and O'Connor-McCourt, M. D.** (2001). Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *J Biol Chem* **276**, 29632-43.
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y. and O'Connor-McCourt, M. D.** (2003). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *J Mol Biol* **328**, 1173-83.
- DeLano, W. L.** (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. , (ed. Palo Alto, CA, USA. : DeLano Scientific.
- Demirhan, O., Turkmen, S., Schwabe, G. C., Soyupak, S., Akgul, E., Tastemir, D., Karahan, D., Mundlos, S. and Lehmann, K.** (2005). A homozygous BMPR1B mutation causes a new subtype of acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies. *J Med Genet* **42**, 314-7.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J. M.** (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J* **17**, 3091-100.
- Derewenda, U., Mateja, A., Devedjiev, Y., Routzahn, K. M., Evdokimov, A. G., Derewenda, Z. S. and Waugh, D. S.** (2004). The structure of Yersinia pestis V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure* **12**, 301-6.
- Derewenda, Z. S.** (2004). Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure* **12**, 529-35.
- Derman, A. I. and Beckwith, J.** (1995). Escherichia coli alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. *J Bacteriol* **177**, 3764-70.
- Devos, A. M., Ultsch, M. and Kossiakoff, A. A.** (1992). Human Growth-Hormone and Extracellular Domain of Its Receptor - Crystal-Structure of the Complex. *Science* **255**, 306-312.
- di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J. Y., Vigier, B., Josso, N. and Cate, R.** (1994). Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. *Mol Endocrinol* **8**, 1006-20.
- Douzgou, S., Lehmann, K., Mingarelli, R., Mundlos, S. and Dallapiccola, B.** (2008). Compound heterozygosity for GDF5 in Du Pan type chondrodysplasia. *Am J Med Genet A* **146A**, 2116-21.
- Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E. and Leduc, R.** (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **270**, 10618-24.

- Dyson, H. J., Rance, M., Houghten, R. A., Wright, P. E. and Lerner, R. A. (1988). Folding of immunogenic peptide fragments of proteins in water solution. II. The nascent helix. *J Mol Biol* **201**, 201-17.
- Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T. K., Kawabata, M., Miyazono, K. and Imamura, T. (1999). Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci* **112** (Pt 20), 3519-27.
- Eigenbrot, C. and Gerber, N. (1997). X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding. *Nat Struct Biol* **4**, 435-8.
- Erlacher, L., McCartney, J., Piek, E., ten Dijke, P., Yanagishita, M., Oppermann, H. and Luyten, F. P. (1998). Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *J Bone Miner Res* **13**, 383-92.
- Evans, G. and Pettifer, R. F. (2001). CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *Journal of Applied Crystallography* **34**, 82-86.
- Everman, D. B., Bartels, C. F., Yang, Y., Yanamandra, N., Goodman, F. R., Mendoza-Londono, J. R., Savarirayan, R., White, S. M., Graham, J. M., Jr., Gale, R. P. et al. (2002). The mutational spectrum of brachydactyly type C. *Am J Med Genet* **112**, 291-6.
- Faiyaz-Ul-Haque, M., Ahmad, W., Zaidi, S. H., Haque, S., Teebi, A. S., Ahmad, M., Cohn, D. H. and Tsui, L. C. (2002). Mutation in the cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP1) gene in a kindred affected with fibular hypoplasia and complex brachydactyly (DuPan syndrome). *Clin Genet* **61**, 454-8.
- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J. and Lemmon, M. A. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* **11**, 507-17.
- Fischer, L., Boland, G. and Tuan, R. S. (2002). Wnt-3A enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells. *J Biol Chem* **277**, 30870-8.
- Fletcher, S. and Hamilton, A. D. (2005). Protein surface recognition and proteomimetics: mimics of protein surface structure and function. *Curr Opin Chem Biol* **9**, 632-8.
- Fletcher, S. and Hamilton, A. D. (2006). Targeting protein-protein interactions by rational design: mimicry of protein surfaces. *J R Soc Interface* **3**, 215-33.
- Flocco, M. M. and Mowbray, S. L. (1994). Planar stacking interactions of arginine and aromatic side-chains in proteins. *J Mol Biol* **235**, 709-17.
- Franzen, P., Tendijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C. H. and Miyazono, K. (1993). Cloning of a Tgf-Beta Type-I Receptor That Forms a Heteromeric Complex with the Tgf-Beta Type-II Receptor. *Cell* **75**, 681-692.
- Gao, X. and Harris, T. K. (2006). Steady-state kinetic mechanism of PDK1. *J Biol Chem* **281**, 21670-81.
- Gaur, R. K., Kupper, M. B., Fischer, R. and Hoffmann, K. M. (2004). Preliminary X-ray analysis of a human V(H) fragment at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 965-7.
- Gazzerro, E., Gangji, V. and Canalis, E. (1998). Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *Journal of Clinical Investigation* **102**, 2106-2114.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y. I. and Knaus, P. (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* **11**, 1023-35.

- Gilboa, L., Wells, R. G., Lodish, H. F. and Henis, Y. I.** (1998). Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol* **140**, 767-77.
- Gilliland, G. L., Tung, M., Blakeslee, D. M. and Ladner, J. E.** (1994). Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0: new features, data and the NASA archive for protein crystal growth data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 408-13.
- Gong, Y., Krakow, D., Marcelino, J., Wilkin, D., Chitayat, D., Babul-Hirji, R., Hudgins, L., Cremers, C. W., Cremers, F. P., Brunner, H. G. et al.** (1999). Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet* **21**, 302-4.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S. and ten Dijke, P.** (2003). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**, 817-28.
- Gray, P. C., Harrison, C. A. and Vale, W.** (2003). Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5193-8.
- Greenwald, J., Fischer, W. H., Vale, W. W. and Choe, S.** (1999). Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nat Struct Biol* **6**, 18-22.
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W. and Choe, S.** (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* **11**, 605-17.
- Greenwald, J., Vega, M. E., Allendorph, G. P., Fischer, W. H., Vale, W. and Choe, S.** (2004). A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors. *Mol Cell* **15**, 485-9.
- Gregory, K. E., Ono, R. N., Charbonneau, N. L., Kuo, C. L., Keene, D. R., Bachinger, H. P. and Sakai, L. Y.** (2005). The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem* **280**, 27970-80.
- Griffith, D. L., Keck, P. C., Sampath, T. K., Rueger, D. C. and Carlson, W. D.** (1996a). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 878-883.
- Griffith, D. L., Keck, P. C., Sampath, T. K., Rueger, D. C. and Carlson, W. D.** (1996b). 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**, 878-83.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Belmonte, J. C. and Choe, S.** (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **420**, 636-42.
- Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., Schwarz, P. M., Wrana, J. L. and Hinck, A. P.** (2008). Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell* **29**, 157-68.
- Grueninger, D., Treiber, N., Ziegler, M. O., Koetter, J. W., Schulze, M. S. and Schulz, G. E.** (2008). Designed protein-protein association. *Science* **319**, 206-9.
- Gumienny, T. L. and Padgett, R. W.** (2002). The other side of TGF-beta superfamily signal regulation: thinking outside the cell. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 295-9.

- Halbrooks, P. J., Ding, R., Wozney, J. M. and Bain, G.** (2007). Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *J Mol Signal* **2**, 4.
- Han, S., Loulakis, P., Griffor, M. and Xie, Z.** (2007). Crystal structure of activin receptor type IIB kinase domain from human at 2.0 Angstrom resolution. *Protein Sci* **16**, 2272-7.
- Harp, J. M., Hanson, B. L., Timm, D. E. and Bunick, G. J.** (1999). Macromolecular crystal annealing: evaluation of techniques and variables. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 1329-34.
- Harrington, A. E., Morris-Triggs, S. A., Ruotolo, B. T., Robinson, C. V., Ohnuma, S. and Hyvonen, M.** (2006). Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. *Embo J* **25**, 1035-45.
- Harrison, C. A., Gray, P. C., Koerber, S. C., Fischer, W. and Vale, W.** (2003). Identification of a functional binding site for activin on the type I receptor ALK4. *J Biol Chem* **278**, 21129-35.
- Harrison, C. A., Wiater, E., Gray, P. C., Greenwald, J., Choe, S. and Vale, W.** (2004). Modulation of activin and BMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* **225**, 19-24.
- Hart, P. J., Deep, S., Taylor, A. B., Shu, Z., Hinck, C. S. and Hinck, A. P.** (2002). Crystal structure of the human TbetaR2 ectodomain--TGF-beta3 complex. *Nat Struct Biol* **9**, 203-8.
- Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M. M., Wenzel, V., Boergermann, J. H., Hassel, S., Henis, Y. I. and Knaus, P.** (2006). Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* **26**, 7791-805.
- Hatta, T., Konishi, H., Katoh, E., Natsume, T., Ueno, N., Kobayashi, Y. and Yamazaki, T.** (2000). Identification of the ligand-binding site of the BMP type IA receptor for BMP-4. *Biopolymers* **55**, 399-406.
- Heldin, C. H., Miyazono, K. and ten Dijke, P.** (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-71.
- Hendrickson, W. A. and Teeter, M. M.** (1981). Structure of the Hydrophobic Protein Crambin Determined Directly from the Anomalous Scattering of Sulfur. *Nature* **290**, 107-113.
- Heras, B. and Martin, J. L.** (2005). Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 1173-80.
- 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. et al.** (1996). Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* **35**, 8517-34.
- Hoedemaeker, F. J., Signorelli, T., Johns, K., Kuntz, D. A. and Rose, D. R.** (1997). A single chain Fv fragment of P-glycoprotein-specific monoclonal antibody C219. Design, expression, and crystal structure at 2.4 A resolution. *J Biol Chem* **272**, 29784-9.
- Hogan, B. L.** (1996a). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 432-8.
- Hogan, B. L. M.** (1996b). Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development* **10**, 1580-1594.
- Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C. and Abola, E. E.** (1996). Errors in protein structures. *Nature* **381**, 272.
- Hoppe, W.** (1957). Die Faltmolekulmethode - Eine Neue Methode Zur Bestimmung Der Kristallstruktur Bei Ganz Oder Teilweise Bekannter Molekulstruktur. *Acta Crystallographica* **10**, 750-751.
- Houry, W. A.** (2001). Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr Protein Pept Sci* **2**, 227-44.

- Howe, J. R., Bair, J. L., Sayed, M. G., Anderson, M. E., Mitros, F. A., Petersen, G. M., Velculescu, V. E., Traverso, G. and Vogelstein, B. (2001). Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nature Genetics* **28**, 184-187.
- Howe, J. R., Sayed, M. G., Ahmed, A. F., Ringold, J., Larsen-Haidle, J., Merg, A., Mitros, F. A., Vaccaro, C. A., Petersen, G. M., Giardiello, F. M. et al. (2004). The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *Journal of Medical Genetics* **41**, 484-491.
- Huse, M., Chen, Y. G., Massague, J. and Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* **96**, 425-36.
- Ilangovan, U., Deep, S., Hinck, C. S. and Hinck, A. P. (2004). Letter to the Editor: Sequential resonance assignments of the extracellular domain of the human TGF beta type II receptor in complex with monomeric TGF beta 3. *Journal of Biomolecular Nmr* **29**, 103-104.
- Jancarik, J. and Kim, S. H. (1991). Sparse-Matrix Sampling - a Screening Method for Crystallization of Proteins. *Journal of Applied Crystallography* **24**, 409-411.
- Janin, J. and Chothia, C. (1990). The structure of protein-protein recognition sites. *J Biol Chem* **265**, 16027-30.
- Johnson, D. L., Farrell, F. X., Barbone, F. P., McMahon, F. J., Tullai, J., Hoey, K., Livnah, O., Wrighton, N. C., Middleton, S. A., Loughney, D. A. et al. (1998). Identification of a 13 amino acid peptide mimetic of erythropoietin and description of amino acids critical for the mimetic activity of EMP1. *Biochemistry* **37**, 3699-710.
- Johnson, S., Roversi, P., Espina, M., Deane, J. E., Birket, S., Picking, W. D., Blocker, A., Picking, W. L. and Lea, S. M. (2006). Expression, limited proteolysis and preliminary crystallographic analysis of IpaD, a component of the Shigella flexneri type III secretion system. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **62**, 865-868.
- Johnson, T. C., Wada, K., Buchanan, B. B. and Holmgren, A. (1987). Reduction of Purothionin by the Wheat Seed Thioredoxin System. *Plant Physiol* **85**, 446-451.
- Jones, C. M., Lyons, K. M. and Hogan, B. L. (1991). Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* **111**, 531-42.
- Jones, S. and Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13-20.
- Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Jonsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., Ronnberg, I. et al. (1991). Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11**, 620-7.
- Kabsch, W. and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-637.
- Kamitani, S., Akiyama, Y. and Ito, K. (1992). Identification and characterization of an Escherichia coli gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *Embo J* **11**, 57-62.
- Kang, B. S., Devedjiev, Y., Derewenda, U. and Derewenda, Z. S. (2004). The PDZ2 domain of syntenin at ultra-high resolution: bridging the gap between macromolecular and small molecule crystallography. *J Mol Biol* **338**, 483-93.
- Kannan, K. and Givol, D. (2000). FGF receptor mutations: dimerization syndromes, cell growth suppression, and animal models. *IUBMB Life* **49**, 197-205.

- Kantardjieff, K. A. and Rupp, B.** (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* **12**, 1865-71.
- Karkera, J. D., Lee, J. S., Roessler, E., Banerjee-Basu, S., Ouspenskaia, M. V., Mez, J., Goldmuntz, E., Bowers, P., Towbin, J., Belmont, J. W. et al.** (2007). Loss-of-function mutations in growth differentiation factor-1 (GDF1) are associated with congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet* **81**, 987-94.
- Karlsson, R., Fagerstam, L., Nilshans, H. and Persson, B.** (1993). Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters. *J Immunol Methods* **166**, 75-84.
- Karplus, P. A. and Schulz, G. E.** (1985). Prediction of Chain Flexibility in Proteins - a Tool for the Selection of Peptide Antigens. *Naturwissenschaften* **72**, 212-213.
- Kawabata, M., Chytil, A. and 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**, 5625-30.
- Keeler, C., Jablonski, E. M., Albert, Y. B., Taylor, B. D., Myszka, D. G., Clevenger, C. V. and Hodsdon, M. E.** (2007). The kinetics of binding human prolactin, but not growth hormone, to the prolactin receptor vary over a physiologic pH range. *Biochemistry* **46**, 2398-410.
- Keller, S.** (2004). Struktur- und Funktionsanalysen an BMP Ligand-Rezeptor Komplexen. *Dissertation am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg*.
- Keller, S., Nickel, J., Zhang, J. L., Sebald, W. and Mueller, T. D.** (2004). Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 481-8.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. and Price, N. C.** (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1751**, 119-139.
- Kelly, S. M., Price, N. C.** (2000). The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein and Peptide Science* **1**, 349-384.
- Kern, R., Malki, A., Holmgren, A. and Richarme, G.** (2003). Chaperone properties of Escherichia coli thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochem J* **371**, 965-72.
- Kiefersauer, R., Than, M. E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J. M., Soulimane, T. and Huber, R.** (2000). A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *Journal of Applied Crystallography* **33**, 1223-1230.
- Kim, Y. G. and Maas, S.** (2000). Multiple site mutagenesis with high targeting efficiency in one cloning step. *Biotechniques* **28**, 196-8.
- Kingsley, D. M.** (1994). What Do Bmps Do in Mammals - Clues from the Mouse Short-Ear Mutation. *Trends in Genetics* **10**, 16-21.
- Kirsch, T., Nickel, J. and Sebald, W.** (2000a). BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *Embo J* **19**, 3314-24.
- Kirsch, T., Nickel, J. and Sebald, W.** (2000b). Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. *FEBS Lett* **468**, 215-9.
- Kirsch, T., Sebald, W. and Dreyer, M. K.** (2000c). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* **7**, 492-6.
- Kjaer, K. W., Eiberg, H., Hansen, L., van der Hagen, C. B., Rosendahl, K., Tommerup, N. and Mundlos, S.** (2006). A mutation in the receptor binding site of GDF5 causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. *J Med Genet* **43**, 225-31.

- Klages, J.** (2008a). Structure and Dynamics using NMR spectroscopy. *Dissertation am Institut für Organische Chemie II der TU München*.
- Klages, J., Kotsch, A., Murray, C., Nickel, J., Müller, T.D., Kessler, H.** (2008b). The solution structure of BMPR-IA reveals a local disorder-to-order transition upon BMP-2 binding. *Biochemistry Accepted*.
- Knockaert, M., Sapkota, G., Alarcon, C., Massague, J. and 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**, 11940-5.
- Kobayashi, M., Kubota, M. and Matsuura, Y.** (1999). Crystallization and improvement of crystal quality for x-ray diffraction of maltooligosyl trehalose synthase by reductive methylation of lysine residues. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 931-3.
- Koenig, B. B., Cook, J. S., Wolsing, D. H., Ting, J., Tiesman, J. P., Correa, P. E., Olson, C. A., Pecquet, A. L., Ventura, F., Grant, R. A. et al.** (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **14**, 5961-74.
- Koli, K., Saharinen, J., Hyytiainen, M., Penttinen, C. and Keski-Oja, J.** (2001). Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Tech* **52**, 354-62.
- Korchynskyi, O. and 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**, 4883-91.
- Kotsch, A., Nickel, J., Seher, A., Heinecke, K., van Geersdaele, L., Herrmann, T., Sebald, W. and Mueller, T. D.** (2008). Structure Analysis of Bone Morphogenetic Protein-2 Type I Receptor Complexes Reveals a Mechanism of Receptor Inactivation in Juvenile Polyposis Syndrome. *J Biol Chem* **283**, 5876-5887.
- Kurinov, I. V., Mao, C., Irvin, J. D. and Uckun, F. M.** (2000). X-ray crystallographic analysis of pokeweed antiviral protein-II after reductive methylation of lysine residues. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 549-52.
- La Fortelle, E. d. B., G.** (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. In *Methods in Enzymology*, vol. Volume 276 (ed. C. W. S. Carter, R.M.), pp. 472-494. San Diego: Academic Press.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lambert, N. and Freedman, R. B.** (1983). Structural-Properties of Homogeneous Protein Disulfide-Isomerase from Bovine Liver Purified by a Rapid High-Yielding Procedure. *Biochemical Journal* **213**, 225-234.
- Lamzin, V. S., Perrakis, A. & Wilson, K. S.** (1999). The ARP/wARP suite for automated construction and refinement of protein models. In *International Tables for Crystallography, Volume F: Crystallography of Biological Macromolecules.*, (ed. M. R. E. Arnold), pp. 720-722. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Laporte, S. L., Forsyth, C. M., Cunningham, B. C., Miercke, L. J., Akhavan, D. and Stroud, R. M.** (2005). De novo design of an IL-4 antagonist and its structure at 1.9 Å. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1889-94.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R. et al.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-8.

- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993). Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 283-291.
- Lavigne, P., Bagu, J. R., Boyko, R., Willard, L., Holmes, C. F. and Sykes, B. D. (2000). Structure-based thermodynamic analysis of the dissociation of protein phosphatase-1 catalytic subunit and microcystin-LR docked complexes. *Protein Sci* **9**, 252-64.
- Lehmann, K., Seemann, P., Boergemann, J., Morin, G., Reif, S., Knaus, P. and Mundlos, S. (2006). A novel R486Q mutation in BMPR1B resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *Eur J Hum Genet* **14**, 1248-54.
- Lehmann, K., Seemann, P., Stricker, S., Sammar, M., Meyer, B., Suring, K., Majewski, F., Tinschert, S., Grzeschik, K. H., Muller, D. et al. (2003). Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12277-82.
- Lenferink, A. E., van Zoelen, E. J., van Vugt, M. J., Grothe, S., van Rotterdam, W., van De Poll, M. L. and O'Connor-McCourt, M. D. (2000). Superagonistic activation of ErbB-1 by EGF-related growth factors with enhanced association and dissociation rate constants. *J Biol Chem* **275**, 26748-53.
- Leong, L. E. C., Walker, P. A. and Porter, A. G. (1992). Efficient Expression and Purification of a Protease from the Common Cold Virus, Human Rhinovirus Type-14. *Journal of Crystal Growth* **122**, 246-252.
- Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **No. 26**.
- Li, X., Keskin, O., Ma, B., Nussinov, R. and Liang, J. (2004). Protein-protein interactions: hot spots and structurally conserved residues often locate in complemented pockets that pre-organized in the unbound states: implications for docking. *J Mol Biol* **344**, 781-95.
- Lin, H. Y., Moustakas, A., Knaus, P., Wells, R. G., Henis, Y. I. and Lodish, H. F. (1995). The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. *J Biol Chem* **270**, 2747-54.
- Lin, H. Y., Wang, X. F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R. A. and Lodish, H. F. (1992). Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* **68**, 775-85.
- Lin, X., Duan, X., Liang, Y. Y., Su, Y., Wrighton, K. H., Long, J., Hu, M., Davis, C. M., Wang, J., Brunicardi, F. C. et al. (2006). PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* **125**, 915-28.
- Liu, F., Ventura, F., Doody, J. and Massague, J. (1995). Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* **15**, 3479-86.
- Liu, S., Liu, S., Zhu, X., Liang, H., Cao, A., Chang, Z. and Lai, L. (2007). Nonnatural protein-protein interaction-pair design by key residues grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5330-5.
- Livnah, O., Johnson, D. L., Stura, E. A., Farrell, F. X., Barbone, F. P., You, Y., Liu, K. D., Goldsmith, M. A., He, W., Krause, C. D. et al. (1998). An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation. *Nat Struct Biol* **5**, 993-1004.

- Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K. and Wilson, I. A. (1999). Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**, 987-90.
- Logeart-Avramoglou, D., Bourguignon, M., Oudina, K., Ten Dijke, P. and Petite, H. (2006). An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct. *Anal Biochem* **349**, 78-86.
- Longenecker, K. L., Garrard, S. M., Sheffield, P. J. and Derewenda, Z. S. (2001). Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 679-88.
- Lopez-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. and 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**, 557-68.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2003). Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins-Structure Function and Genetics* **50**, 437-450.
- Lukas, S. M., Kroe, R. R., Wildeson, J., Peet, G. W., Frego, L., Davidson, W., Ingraham, R. H., Pargellis, C. A., Labadia, M. E. and Werneburg, B. G. (2004). Catalysis and function of the p38 alpha.MK2a signaling complex. *Biochemistry* **43**, 9950-60.
- Luke, K., Apiyo, D. and Wittung-Stafshede, P. (2005). Dissecting homo-heptamer thermodynamics by isothermal titration calorimetry: entropy-driven assembly of co-chaperonin protein 10. *Biophysical Journal* **89**, 3332-6.
- Lyles, M. M. and Gilbert, H. F. (1991). Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry* **30**, 613-9.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W. and Hogan, B. L. (1989). Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev* **3**, 1657-68.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W. and Hogan, B. L. (1990). Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* **109**, 833-44.
- Mace, P. D., Cutfield, J. F. and 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**, 831-8.
- Macias, D., Ganam, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurie, J. M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109-1117.
- Mann, M. and Wilm, M. (1995). Electrospray Mass-Spectrometry for Protein Characterization. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 219-224.
- Marcelino, J., Sciortino, C. M., Romero, M. F., Ulatowski, L. M., Ballock, R. T., Economides, A. N., Eimon, P. M., Harland, R. M. and Warman, M. L. (2001). Human disease-causing NOG missense mutations: effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11353-8.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-91.

- Massague, J. and Chen, Y. G.** (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14**, 627-44.
- Mathews, L. S. and Vale, W. W.** (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* **65**, 973-82.
- Matthews, B. W.** (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**, 491-7.
- Mazerbourg, S. and Hsueh, A. J.** (2006). Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update* **12**, 373-83.
- Mccoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. and Read, R. J.** (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* **40**, 658-674.
- McDonald, N. Q. and Hendrickson, W. A.** (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**, 421-4.
- McRee, D.** (1999). Practical Protein Crystallography. San Diego: Academic Press.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S.** (1993). Identification and characterization of the Escherichia coli gene dsbB, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7084-8.
- Mittl, P. R., Priestle, J. P., Cox, D. A., McMaster, G., Cerletti, N. and Grutter, M. G.** (1996). The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding. *Protein Sci* **5**, 1261-71.
- Monnier, P. P., Sierra, A., Macchi, P., Deitinghoff, L., Andersen, J. S., Mann, M., Flad, M., Hornberger, M. R., Stahl, B., Bonhoeffer, F. et al.** (2002). RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature* **419**, 392-5.
- Moriki, T., Maruyama, H. and Maruyama, I. N.** (2001). Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* **311**, 1011-26.
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G. and Thornton, J. M.** (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **12**, 345-64.
- Moustakas, A. and Heldin, C. H.** (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**, 3573-84.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C. H.** (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* **114**, 4359-69.
- Mueller, T. D., Gottermeier, M., Sebald, W. and Nickel, J.** (2005). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human growth and differentiation factor 5 (GDF-5). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 134-6.
- Murphy, K. P., Bhakuni, V., Xie, D. and Freire, E.** (1992). Molecular basis of co-operativity in protein folding. III. Structural identification of cooperative folding units and folding intermediates. *J Mol Biol* **227**, 293-306.
- Murphy, K. P. and Freire, E.** (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem* **43**, 313-61.
- Murphy, K. P., Freire, E. and Paterson, Y.** (1995). Configurational effects in antibody-antigen interactions studied by microcalorimetry. *Proteins* **21**, 83-90.
- Murphy, K. P., Xie, D., Thompson, K. S., Amzel, L. M. and Freire, E.** (1994). Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss. *Proteins* **18**, 63-7.
- Murray-Rust, J., McDonald, N. Q., Blundell, T. L., Hosang, M., Oefner, C., Winkler, F. and Bradshaw, R. A.** (1993). Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure* **1**, 153-9.

- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J.** (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-55.
- Navaza, J.** (1994). Amore - an Automated Package for Molecular Replacement. *Acta Crystallographica Section A* **50**, 157-163.
- Nellen, D., Affolter, M. and Basler, K.** (1994). Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of Drosophila body pattern by decapentaplegic. *Cell* **78**, 225-37.
- Nickel, J., Dreyer, M. and Sebald, W.** (2002). Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction. In *Bone Morphogenetic Proteins From Laboratory to Clinical Practice.*, (ed. S. a. S. Vukicevic, K. T.), pp. 61-85. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- Nickel, J., Kotsch, A., Sebald, W. and Mueller, T. D.** (2005). A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB. *J Mol Biol* **349**, 933-47.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. and Yura, T.** (1998). Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1694-9.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H. and Yura, T.** (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **66**, 884-9.
- Nishitoh, H., Ichijo, H., Kimura, M., Matsumoto, T., Makishima, F., Yamaguchi, A., Yamashita, H., Enomoto, S. and Miyazono, K.** (1996). Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* **271**, 21345-52.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I. and Knaus, P.** (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* **277**, 5330-8.
- Nohno, T., Ishikawa, T., Saito, T., Hosokawa, K., Noji, S., Wolsing, D. H. and Rosenbaum, J. S.** (1995). Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* **270**, 22522-6.
- Noiva, R.** (1994). Enzymatic catalysis of disulfide formation. *Protein Expr Purif* **5**, 1-13.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M. et al.** (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775-87.
- Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S. et al.** (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2626-31.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. and Niehrs, C.** (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**, 480-5.
- Otwinowski, Z. a. M., W.** (1997). [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography Part A*, vol. Volume 276 (ed. Charles W. Carter, Jr.), pp. 307-326: Academic Press.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T.** (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-23.
- Pape, T. S., TR.** (2003). HKL2MAP, (ed.
- Penton, A., Chen, Y., Staehling-Hampton, K., Wrana, J. L., Attisano, L., Szidonya, J., Cassill, J. A., Massague, J. and Hoffmann, F. M.** (1994). Identification of two bone morphogenetic protein

- type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor. *Cell* **78**, 239-50.
- Perrakis, A., Harkiolaki, M., Wilson, K. S. and Lamzin, V. S.** (2001). ARP/wARP and molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1445-50.
- Perrakis, A., Morris, R. and Lamzin, V. S.** (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol* **6**, 458-63.
- Pittz, E. P. and Timasheff, S. N.** (1978). Interaction of ribonuclease A with aqueous 2-methyl-2,4-pentanediol at pH 5.8. *Biochemistry* **17**, 615-23.
- Plett, S. K., Berdon, W. E., Cowles, R. A., Oklu, R. and Campbell, J. B.** (2008). Cushing proximal symphalangism and the NOG and GDF5 genes. *Pediatr Radiol* **38**, 209-15.
- Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J.** (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* **272**, 15661-7.
- Proba, K., Ge, L. and Pluckthun, A.** (1995). Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene* **159**, 203-7.
- Quiocho, F. A. and Richards, F. M.** (1964). Intermolecular Cross Linking of a Protein in the Crystalline State: Carboxypeptidase-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**, 833-9.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V.** (1963). Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *Journal of Molecular Biology* **7**, 95-&.
- Ramakris.C and Ramachan.Gn.** (1965). Stereochemical Criteria for Polypeptide and Protein Chain Conformations .2. Allowed Conformations for a Pair of Peptide Units. *Biophysical Journal* **5**, 909-&.
- Rawadi, G., Vayssiere, B., Dunn, F., Baron, R. and Roman-Roman, S.** (2003). BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* **18**, 1842-53.
- Rayment, I.** (1997). Reductive alkylation of lysine residues to alter crystallization properties of proteins. *Methods Enzymol* **276**, 171-9.
- Read, R. J.** (1986). Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from Partial Structures with Errors. *Acta Crystallographica Section A* **42**, 140-149.
- Rees, B. and Bilwes, A.** (1993). Three-dimensional structures of neurotoxins and cardiotoxins. *Chem Res Toxicol* **6**, 385-406.
- Reznikoff, C. A., Brankow, D. W. and Heidelberger, C.** (1973). Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res* **33**, 3231-8.
- Riley, B. M., Mansilla, M. A., Ma, J., Daack-Hirsch, S., Maher, B. S., Raffensperger, L. M., Russo, E. T., Vieira, A. R., Dode, C., Mohammadi, M. et al.** (2007). Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4512-7.
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H. and Miyazono, K.** (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7632-6.
- Rossmann, M. G. and Blow, D. M.** (1962). Detection of Sub-Units within Crystallographic Asymmetric Unit. *Acta Crystallographica* **15**, 24-&.
- Ruppert, R., Hoffmann, E. and Sebald, W.** (1996). Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* **237**, 295-302.

- Rypniewski, W. R., Holden, H. M. and Rayment, I. (1993). Structural consequences of reductive methylation of lysine residues in hen egg white lysozyme: an X-ray analysis at 1.8-Å resolution. *Biochemistry* **32**, 9851-8.
- Samad, T. A., Rebbapragada, A., Bell, E., Zhang, Y., Sidis, Y., Jeong, S. J., Campagna, J. A., Perusini, S., Fabrizio, D. A., Schneyer, A. L. et al. (2005). DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* **280**, 14122-9.
- Samad, T. A., Srinivasan, A., Karchewski, L. A., Jeong, S. J., Campagna, J. A., Ji, R. R., Fabrizio, D. A., Zhang, Y., Lin, H. Y., Bell, E. et al. (2004). DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties. *J Neurosci* **24**, 2027-36.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saremba, S., Nickel, J., Seher, A., Kotsch, A., Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J* **275**, 172-83.
- Savarirayan, R., White, S. M., Goodman, F. R., Graham, J. M., Jr., Delatycki, M. B., Lachman, R. S., Rimoin, D. L., Everman, D. B. and Warman, M. L. (2003). Broad phenotypic spectrum caused by an identical heterozygous CDMP-1 mutation in three unrelated families. *Am J Med Genet A* **117**, 136-42.
- Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q. H., Pukac, L., Lowik, C. W. G. M. and ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *Journal of Cell Science* **120**, 964-972.
- Scherner, O., Meurer, S. K., Tihaa, L., Gressner, A. M. and Weiskirchen, R. (2007). Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J Biol Chem* **282**, 13934-43.
- Scheufler, C., Sebald, W. and Hulsmeier, M. (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* **287**, 103-15.
- Schlessinger, J. (2002). All signaling is local? *Mol Cell* **10**, 218-9.
- Schlessinger, J., Lax, I. and Lemmon, M. (1995). Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* **83**, 357-60.
- Schneider, T. R. and Sheldrick, G. M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **58**, 1772-1779.
- Scholtz, J. M., Marqusee, S., Baldwin, R. L., York, E. J., Stewart, J. M., Santoro, M. and Bolen, D. W. (1991). Calorimetric determination of the enthalpy change for the alpha-helix to coil transition of an alanine peptide in water. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2854-8.
- Schomake, V. and Trueblood, K. N. (1968). On Rigid-Body Motion of Molecules in Crystals. *Acta Crystallographica Section B-Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **24**, 63-8.
- Schreiber, G. and Fersht, A. R. (1993). Interaction of barnase with its polypeptide inhibitor barstar studied by protein engineering. *Biochemistry* **32**, 5145-50.
- Schubot, F. D. and Waugh, D. S. (2004). A pivotal role for reductive methylation in the de novo crystallization of a ternary complex composed of Yersinia pestis virulence factors YopN, SycN and YscB. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1981-6.

- Sebald, W. and Mueller, T. D.** (2003). The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 518-21.
- Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J. L. and Mueller, T. D.** (2004). Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem* **385**, 697-710.
- Seemann, P., Schwappacher, R., Kjaer, K. W., Krakow, D., Lehmann, K., Dawson, K., Stricker, S., Pohl, J., Ploger, F., Staub, E. et al.** (2005). Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* **115**, 2373-81.
- Sheldrick, G. M.** (2008). A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A* **64**, 112-122.
- Shen, B. J., Hage, T. and Sebald, W.** (1996). Global and local determinants for the kinetics of interleukin-4/interleukin-4 receptor alpha chain interaction. A biosensor study employing recombinant interleukin-4-binding protein. *Eur J Biochem* **240**, 252-61.
- Shi, Y. and Massague, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.
- Shukunami, C., Ishizeki, K., Atsumi, T., Ohta, Y., Suzuki, F. and Hiraki, Y.** (1997). Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J Bone Miner Res* **12**, 1174-88.
- Singhatanadgit, W., Salih, V. and Olsen, I.** (2006). Shedding of a soluble form of BMP receptor-IB controls bone cell responses to BMP. *Bone* **39**, 1008-17.
- Smith, J. L., Corfield, P. W., Hendrickson, W. A. and Low, B. W.** (1988). Refinement at 1.4 Å resolution of a model of erabutoxin b: treatment of ordered solvent and discrete disorder. *Acta Crystallogr A* **44** (Pt 3), 357-68.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Storm, E. E., Huynh, T. V., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kingsley, D. M. and Lee, S. J.** (1994). Limb Alterations in Brachypodism Mice Due to Mutations in a New Member of the Tgf-Beta-Superfamily. *Nature* **368**, 639-643.
- Storm, E. E. and Kingsley, D. M.** (1996). Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* **122**, 3969-3979.
- Storm, E. E. and Kingsley, D. M.** (1999). GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Developmental Biology* **209**, 11-27.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Stueber, D., Ibrahim, I., Cutler, D., Dobberstein, B. and Bujard, H.** (1984). A novel in vitro transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences. *Embo J* **3**, 3143-8.
- Stura, E. A., Matsumura, M., Fremont, D. H., Saito, Y., Peterson, P. A. and Wilson, I. A.** (1992). Crystallization of murine major histocompatibility complex class I H-2Kb with single peptides. *J Mol Biol* **228**, 975-82.
- Stura, E. A., Stanfield, R. L., Fieser, T. M., Balderas, R. S., Smith, L. R., Lerner, R. A. and Wilson, I. A.** (1989). Preliminary crystallographic data and primary sequence for anti-peptide Fab' B13I2 and its complex with the C-helix peptide from myohemerythrin. *J Biol Chem* **264**, 15721-5.

- Sun, P. D. and Davies, D. R. (1995). The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**, 269-91.
- Syed, R. S., Reid, S. W., Li, C., Cheetham, J. C., Aoki, K. H., Liu, B., Zhan, H., Osslund, T. D., Chirino, A. J., Zhang, J. et al. (1998). Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* **395**, 511-6.
- Szczaluba, K., Hilbert, K., Obersztyn, E., Zabel, B., Mazurczak, T. and Kozlowski, K. (2005). Du Pan syndrome phenotype caused by heterozygous pathogenic mutations in CDMP1 gene. *Am J Med Genet A* **138**, 379-83.
- Tamaki, K., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Nakao, A., Sampath, K., Heldin, C. H. and ten Dijke, P. (1998). Intracellular signaling of osteogenic protein-1 through Smad5 activation. *J Cell Physiol* **177**, 355-63.
- ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C. H. and Miyazono, K. (1993). Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* **8**, 2879-87.
- ten Dijke, P., Korchynski, O., Valdimarsdottir, G. and Goumans, M. J. (2003). Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol* **211**, 105-13.
- ten Dijke, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Franzen, P., Laiho, M., Miyazono, K. and Heldin, C. H. (1994a). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* **264**, 101-4.
- ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T. K., Reddi, A. H., Estevez, M., Riddle, D. L., Ichijo, H., Heldin, C. H. and Miyazono, K. (1994b). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* **269**, 16985-8.
- Ten, L. (1973). Crystallographic fast Fourier transforms. *Acta Crystallographica Section A* **29**, 183-191.
- Terwilliger, T. C. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 965-72.
- Terwilliger, T. C. (2003). Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 38-44.
- Terwilliger, T. C. and Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 849-61.
- Thomas, J. T., Kilpatrick, M. W., Lin, K., Erlacher, L., Lembessis, P., Costa, T., Tsipouras, P. and Luyten, F. P. (1997). Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1. *Nat Genet* **17**, 58-64.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-80.
- Thompson, T. B., Lerch, T. F., Cook, R. W., Woodruff, T. K. and Jardetzky, T. S. (2005). The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell* **9**, 535-43.
- Thompson, T. B., Woodruff, T. K. and Jardetzky, T. S. (2003). Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions. *Embo J* **22**, 1555-66.
- Tsuchida, K., Mathews, L. S. and Vale, W. W. (1993). Cloning and characterization of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11242-6.

- Tsuchida, K., Sawchenko, P. E., Nishikawa, S. and Vale, W. W.** (1996). Molecular cloning of a novel type I receptor serine/threonine kinase for the TGF beta superfamily from rat brain. *Mol Cell Neurosci* **7**, 467-78.
- Ultsch, M. and de Vos, A. M.** (1993). Crystals of human growth hormone-receptor complexes. Extracellular domains of the growth hormone and prolactin receptors and a hormone mutant designed to prevent receptor dimerization. *J Mol Biol* **231**, 1133-6.
- Upton, P. D., Long, L., Trembath, R. C. and Morrell, N. W.** (2008). Functional characterization of bone morphogenetic protein binding sites and Smad1/5 activation in human vascular cells. *Mol Pharmacol* **73**, 539-52.
- Urist, M. R.** (1965). Bone: Formation by Autoinduction. *Science* **150**, 893-899.
- Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. and Clardy, J.** (1993). Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol* **229**, 105-24.
- Vihinen, M., Torkkila, E. and Riikonen, P.** (1994). Accuracy of protein flexibility predictions. *Proteins* **19**, 141-9.
- von Tiedemann, B. and Bilitewski, U.** (2002). Characterization of the vascular endothelial growth factor-receptor interaction and determination of the recombinant protein by an optical receptor sensor. *Biosens Bioelectron* **17**, 983-91.
- Wada, K. and Buchanan, B. B.** (1981). Purothionin - a Seed Protein with Thioredoxin Activity. *Febs Letters* **124**, 237-240.
- Walker, P. A., Leong, L. E. C., Ng, P. W. P., Tan, S. H., Waller, S., Murphy, D. and Porter, A. G.** (1994). Efficient and Rapid Affinity Purification of Proteins Using Recombinant Fusion Proteases. *Bio-Technology* **12**, 601-605.
- Wan, Y., McDevitt, A., Shen, B., Smythe, M. L. and Waters, M. J.** (2004). Increased site 1 affinity improves biopotency of porcine growth hormone. Evidence against diffusion dependent receptor dimerization. *J Biol Chem* **279**, 44775-84.
- Wang, X., Xiao, F., Yang, Q., Liang, B., Tang, Z., Jiang, L., Zhu, Q., Chang, W., Jiang, J., Jiang, C. et al.** (2006). A novel mutation in GDF5 causes autosomal dominant symphalangism in two Chinese families. *Am J Med Genet A* **140**, 1846-53.
- Watowich, S. S., Hilton, D. J. and Lodish, H. F.** (1994). Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization. *Mol Cell Biol* **14**, 3535-49.
- Weber, D.** (2006). Aufklärung der Struktur und Charakterisierung des ternären Komplexes aus BMP-2, BMPR-IA und ActR-IIB. *Dissertation am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg*.
- Weber, D., Kotzsch, A., Nickel, J., Harth, S., Seher, A., Mueller, U., Sebald, W. and Mueller, T. D.** (2007). A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and Activin type IIB receptor. *BMC Struct Biol* **7**, 6.
- Whitman, M.** (2001). Nodal signaling in early vertebrate embryos: themes and variations. *Dev Cell* **1**, 605-17.
- Wieser, R., Wrana, J. L. and 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**, 2199-208.

- Wiesmann, C. and de Vos, A. M. (2000). Variations on ligand-receptor complexes. *Nat Struct Biol* **7**, 440-2.
- Wilson, M. A. and Brunger, A. T. (2000). The 1.0 Å crystal structure of Ca(2+)-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. *J Mol Biol* **301**, 1237-56.
- Winn, M. D., Isupov, M. N. and Murshudov, G. N. (2001). Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **57**, 122-133.
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**, 1528-34.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massague, J. (1994a). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341-7.
- Wrana, J. L., Tran, H., Attisano, L., Arora, K., Childs, S. R., Massague, J. and O'Connor, M. B. (1994b). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol* **14**, 944-50.
- Wrighton, N. C., Balasubramanian, P., Barbone, F. P., Kashyap, A. K., Farrell, F. X., Jolliffe, L. K., Barrett, R. W. and Dower, W. J. (1997). Increased potency of an erythropoietin peptide mimetic through covalent dimerization. *Nat Biotechnol* **15**, 1261-5.
- Wuytens, G., Verschuere, K., de Winter, J. P., Gajendran, N., Beek, L., Devos, K., Bosman, F., de Waele, P., Andries, M., van den Eijnden-van Raaij, A. J. et al. (1999). Identification of two amino acids in activin A that are important for biological activity and binding to the activin type II receptors. *J Biol Chem* **274**, 9821-7.
- Xia, Y., Yu, P. B., Sidis, Y., Beppu, H., Bloch, K. D., Schneyer, A. L. and Lin, H. Y. (2007). Repulsive guidance molecule RGMA alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4. *J Biol Chem* **282**, 18129-40.
- Xiao, T., Gardner, K. H. and Sprang, S. R. (2002). Cosolvent-induced transformation of a death domain tertiary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11151-6.
- Xu, D., Tsai, C. J. and Nussinov, R. (1997). Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein Eng* **10**, 999-1012.
- Yamaguchi, A. and Kahn, A. J. (1991). Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential. *Calcif Tissue Int* **49**, 221-5.
- Yamashita, H., ten Dijke, P., Huylebroeck, D., Sampath, T. K., Andries, M., Smith, J. C., Heldin, C. H. and Miyazono, K. (1995). Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* **130**, 217-26.
- Yi, S. E., Daluiski, A., Pederson, R., Rosen, V. and Lyons, K. M. (2000). The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development* **127**, 621-30.
- Yin, H., Yeh, L. C., Hinck, A. P. and Lee, J. C. (2008). Characterization of ligand-binding properties of the human BMP type II receptor extracellular domain. *J Mol Biol* **378**, 191-203.
- Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I. and Schlessinger, J. (2007). Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* **130**, 323-34.
- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. and Creighton, T. E. (1995). Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 5075-89.

- Zhang, J. L., Qiu, L. Y., Kotzsch, A., Weidauer, S., Patterson, L., Hammerschmidt, M., Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). Crystal structure analysis reveals how the Chordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding. *Dev Cell* **14**, 739-50.
- Zhou, M., Felder, S., Rubinstein, M., Hurwitz, D. R., Ullrich, A., Lax, I. and Schlessinger, J. (1993). Real-time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model for receptor activation. *Biochemistry* **32**, 8193-8.
- Zou, H., Wieser, R., Massague, J. and Niswander, L. (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* **11**, 2191-203.
- Zuniga, J. E., Groppe, J. C., Cui, Y., Hinck, C. S., Contreras-Shannon, V., Pakhomova, O. N., Yang, J., Tang, Y., Mendoza, V., Lopez-Casillas, F. et al. (2005). Assembly of TbetaRI:TbetaRII:TGFbeta ternary complex in vitro with receptor extracellular domains is cooperative and isoform-dependent. *J Mol Biol* **354**, 1052-68.
- Zwart, P. H., Grosse-Kunstleve, R. W., Lebedev, A. A., Murshudov, G. N. and Adams, P. D. (2008). Surprises and pitfalls arising from (pseudo)symmetry. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **64**, 99-107.

IX. Anhang und Ergänzungen

IX.1. Expressionsvektorkarten

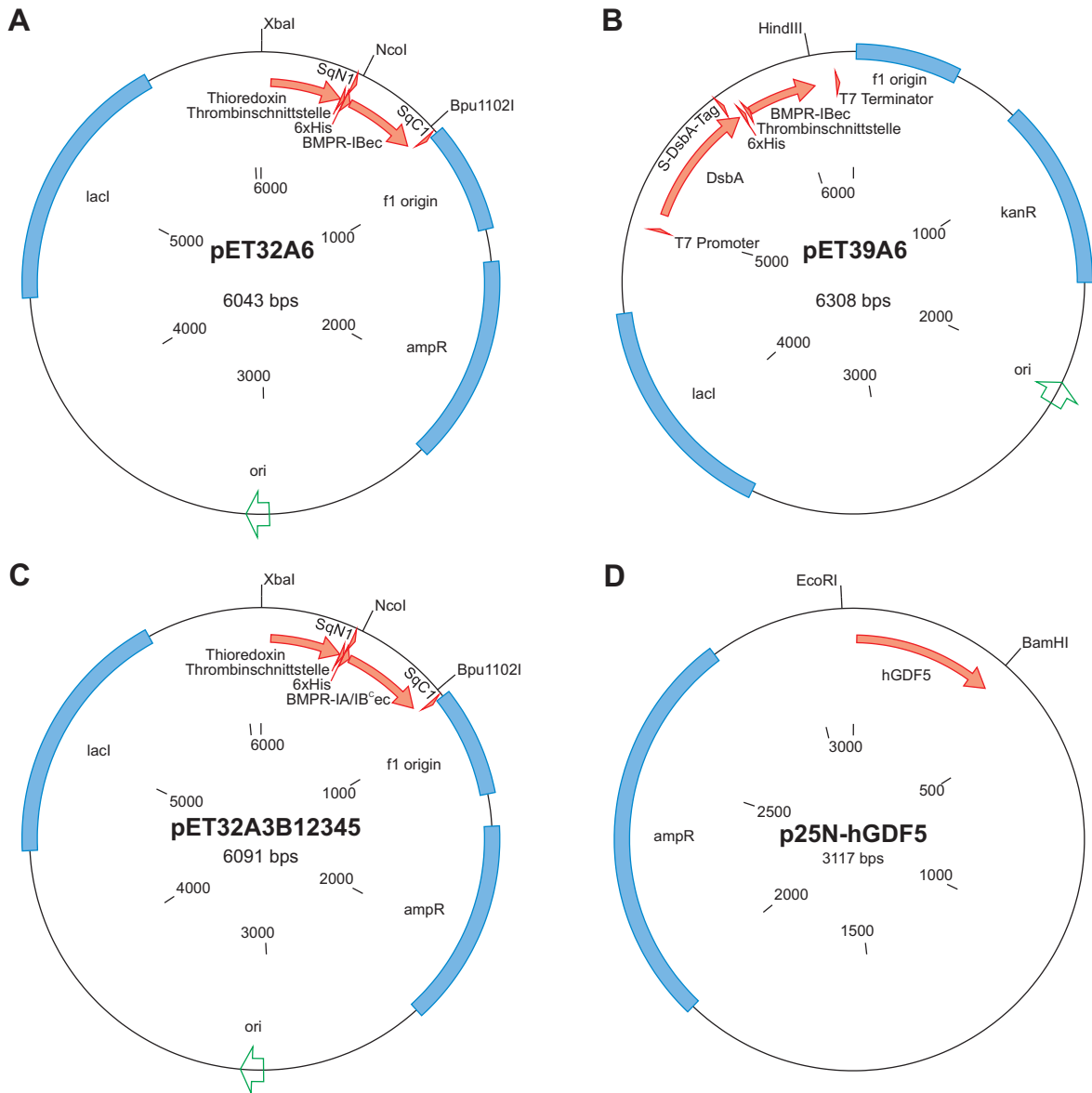


Abbildung IX-1: Expressionsvektoren zur Herstellung von BMP Rezeptoren und GDF-5. **A:** Expressionsvektor von BMPR-IB als Thioredoxin-Fusion, der auf modifiziertem pET32a (Novagen) basiert (Kirsch et al., 2000b). **B:** Expressionsvektor von BMPR-IBec als DsbA-Fusion, der auf pET39b (Novagen) basiert. **C:** Expressionsvektor von BMPR-IA/IB^{ec}, anderen BMPR-IAec-Varianten (BMPR-IA^{sf} usw.) sowie ActR-II^{Bec}, der auf modifiziertem pET32a (Novagen) basiert. **D:** Expressionsvektor von hGDF-5, der auf RBSII_{N25}^{x/0} basiert (Stueber et al., 1984).

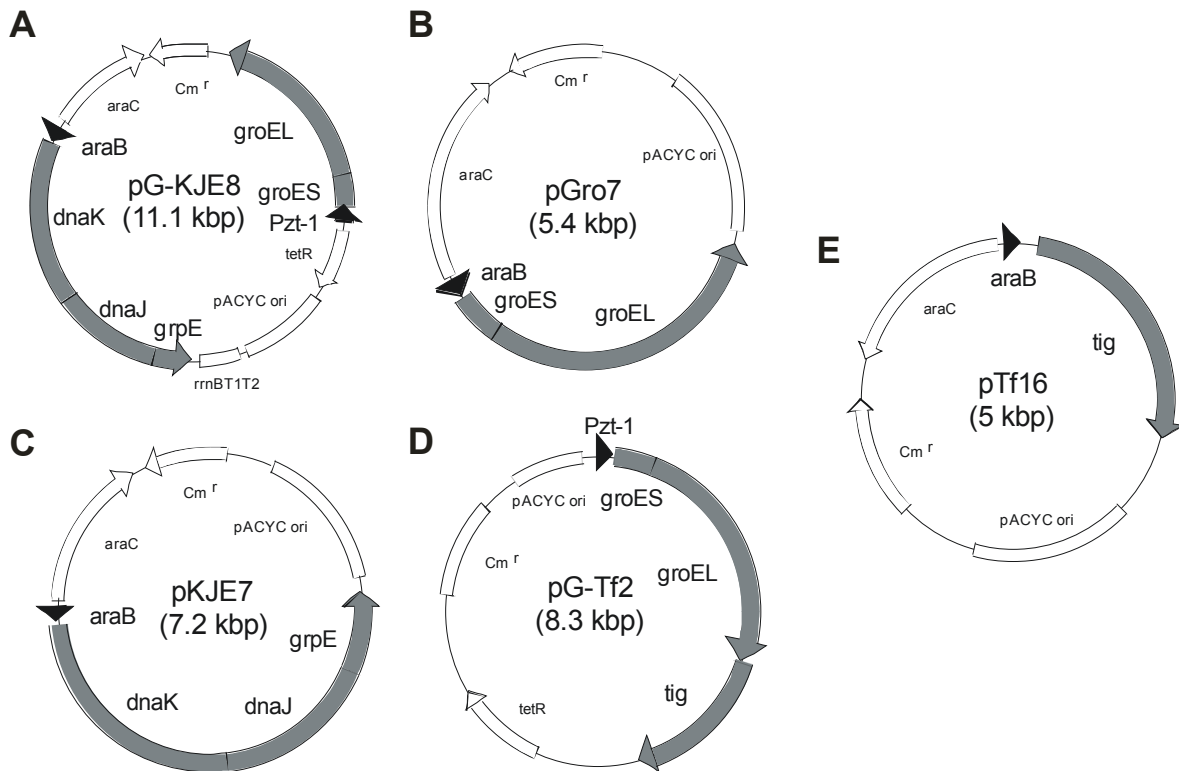


Abbildung IX-2: Vektoren zur Ko-Expression von Chaperonen. Die Abbildung wurde dem Anwendungsprotokoll von Takara Bioscience entnommen (Internet-Adresse: http://catalog.takara-bio.co.jp/en/product/manual_info.asp?catcd=B1000559&subcatcd=B1000561&unitid=U100005840). **A:** Hsp60 und Hsp70, **B:** Hsp60, **C:** Hsp70, **D:** Hsp60 und Trigger Faktor, **E:** Trigger Faktor.

IX.2. Kalibrierung der Superdex 75 HR10/30-Säule

Die Superdex 75 HR10/30 Gelfiltrationssäule wird mit den in III. 12. 5. beschriebenen Proteinen kalibriert. Das Volumen des Gelbetts (V_B) beträgt laut Hersteller 24ml. Das Lösungsmittelvolumen in der Säule (V_0) wird mit Hilfe von Dextranblau 2000 bestimmt und beträgt 7,895ml. Das für jedes Protein charakteristische Retentionsvolumen (V_R) ergibt sich durch Multiplikation von Retentionszeit (t_R) und Flussrate (0,5ml/min). Der Verteilungskoeffizient K_D wird wie in Abbildung IX-3 angegeben berechnet. Die Kalibrierung erfolgte in HBS₅₀₀-Puffer.

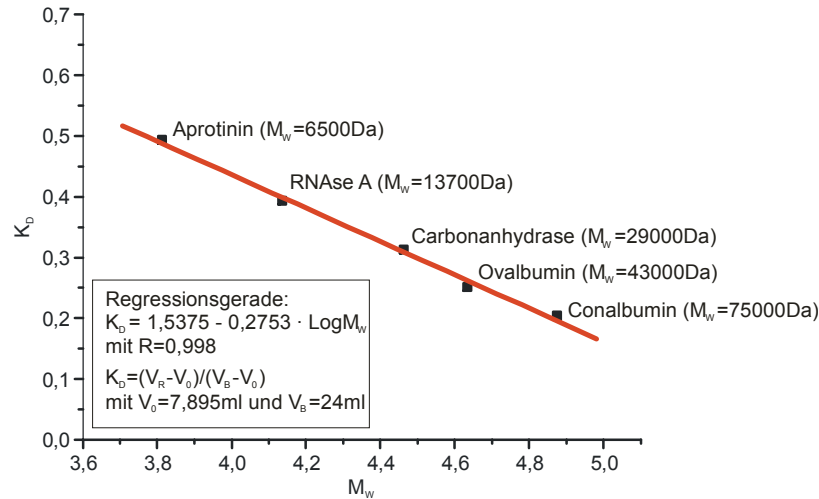


Abbildung IX-3: Kalibriergerade der Superdex 75 HR10/30 Gelfiltrationssäule.

IX.3. Massenspektrometrie

Protein	$M_{W, \text{berechnet}}$ (Da)	$M_{W, \text{experimentell}}$ (amu)	Differenz (amu)
BMPR-IAec	14650,744	14651,080	0,336
BMPR-IAec_Y39G42	14745,840	14745,323	-0,517
¹⁵ N-BMPR-IAsf	11389,707	11389,059	-0,648
¹⁵ N, ¹³ C-BMPR-IAsf	11838,272	11837,632	-0,640
BMPR-IA/IB ^c ec	14746,674	14746,906	0,232
BMPR-IBec (DsbA)	13055,939	13056,225	0,286
BMPR-IBec (Trx)	13182,978	13183,997	1,019
Se-BMPR-IBec (Trx)	13324,833	13325,107	0,274
BMPR-IBec_KKM	13310,070	13310,632	0,562
BMPR-IBec_NTerm	15258,025	15258,475	0,450
BMPR-IBec_H22SH23G	12925,874	12926,188	0,314
BMPR-IBec_E62A	12997,933	12998,185	0,252
BMPR-IBec_F66A	12979,907	12980,280	0,373
BMPR-IBec_Q67A	12998,917	12998,288	-0,629
BMPR-IBec_D70A	13011,949	13012,306	0,357
BMPR-IBec_P74A	13029,923	13030,290	0,367
ActR-IIBec	13072,665	13073,830	1,165
GDF-5del56L (Dimer)	26534,754	26535,178	0,424
GDF-5del56L (Monomer) ^a	13268,377	13573,670	305,293
GDF-5R57L	26674,888	26675,464	0,576
GDF-5S58T	26788,954	26789,141	0,187
GDF-5H59L	26712,973	26713,147	0,174
GDF-5L60P	26728,860	26730,160	1,300
GDF-5DP	26514,836	26516,142	1,306
Se-GDF-5	27230,462	mehrere Spezies (10 Se: 27231,008)	0,546

amu...Atomare Masseneinheiten (engl. atomic mass units)
^a Die Massendifferenz entspricht einem Glutathion-Molekül ($M_{W}=307,330\text{amu}$), wenn dieses über eine Disulfidbrücke kovalent mit dem GDF-5-Monomer verknüpft ist:
 $M_{W, \text{berechnet}}$ (1 Glutathion kovalent gebunden) = 13573,456; $M_{W, \text{experimentell}}$ = 13573,670

Tabelle IX-1: Massenspektrometrisch bestimmte Molekulargewichte.

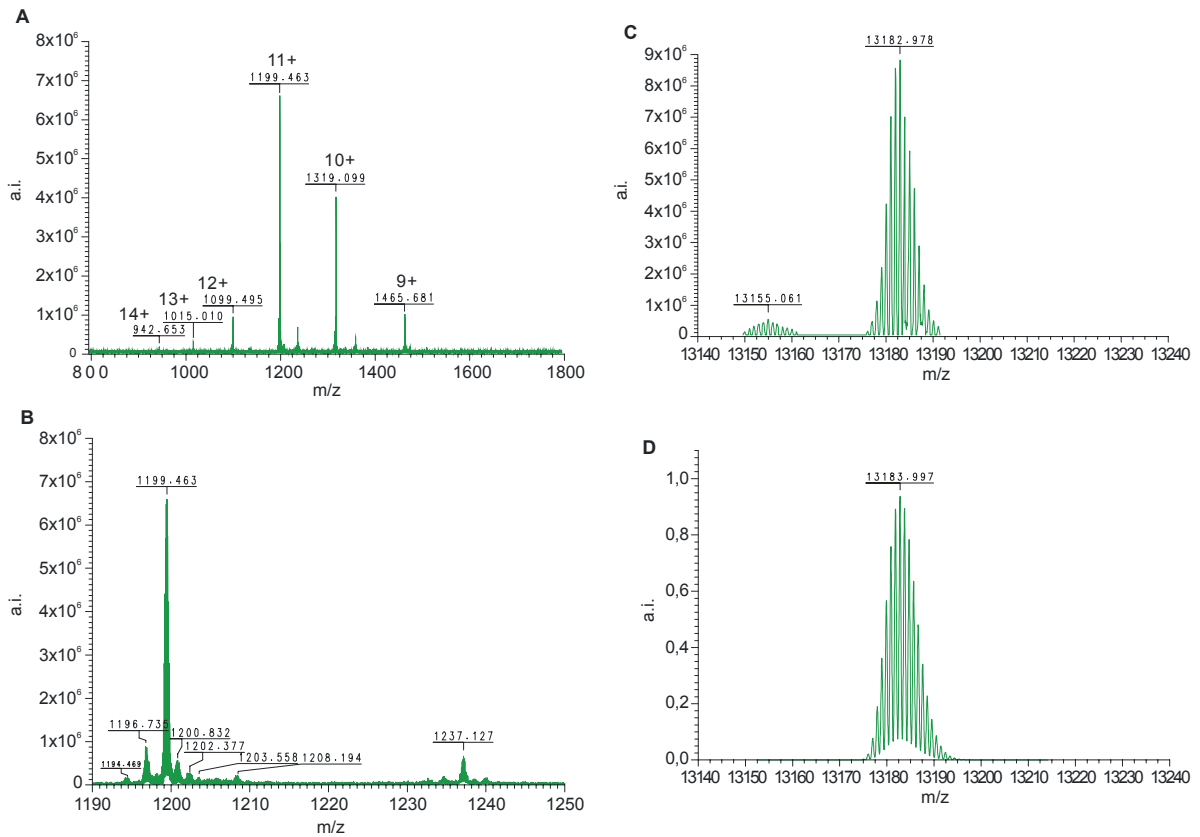


Abbildung IX-4: Massenspektrum von Bmpr-IBec aus der Trx-Fusion. **A:** Experimentelles Massenspektrum für Bmpr-IBec. Verschieden stark geladene Spezies sind angegeben. **B:** Vergrößerung des Peaks der 11fach positiv geladenen Bmpr-IBec-Spezies. Es waren nur geringe Verunreinigungen, z.B. durch einfach oxidierte Moleküle ($m/z=1200,832$) oder Molekülen mit Phosphatgruppen ($m/z=1203,558$) zu detektieren. **C:** Massenspektrum nach Deconvolution. **D:** Die theoretische Isotopenverteilung unter Berücksichtigung von fünf Cystinbrücken stimmt mit der experimentell bestimmten (C) überein.

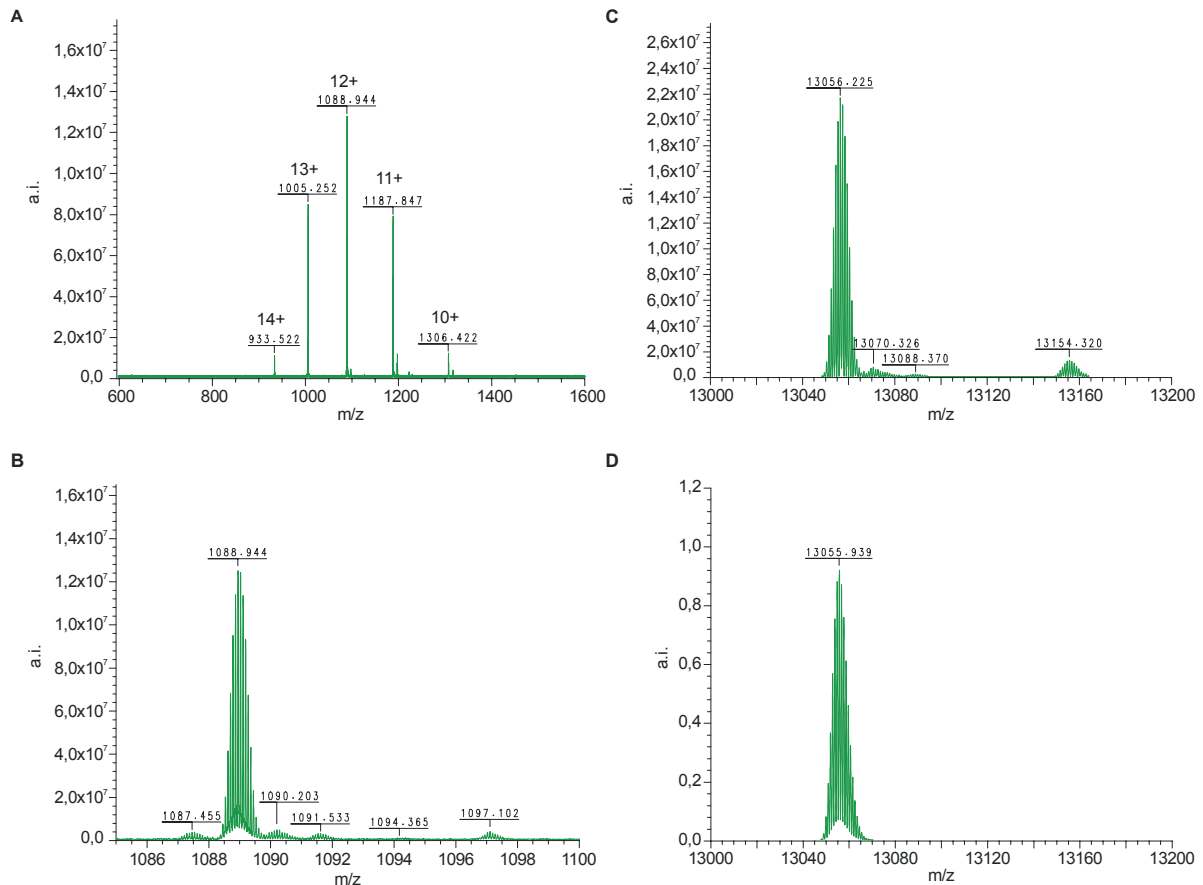


Abbildung IX-5: Massenspektrum von Bmpr-IBec aus der DsbA-Fusion. A: Experimentelles Massenspektrum für Bmpr-IBec. Verschieden stark geladene Spezies sind angegeben. **B:** Vergrößerung des Peaks der 12fach positiv geladenen Bmpr-IBec-Spezies. **C:** Massenspektrum nach Deconvolution. **D:** Die theoretische Isotopenverteilung unter Berücksichtigung von fünf Cystinbrücken stimmt mit der experimentell bestimmten (C) überein.

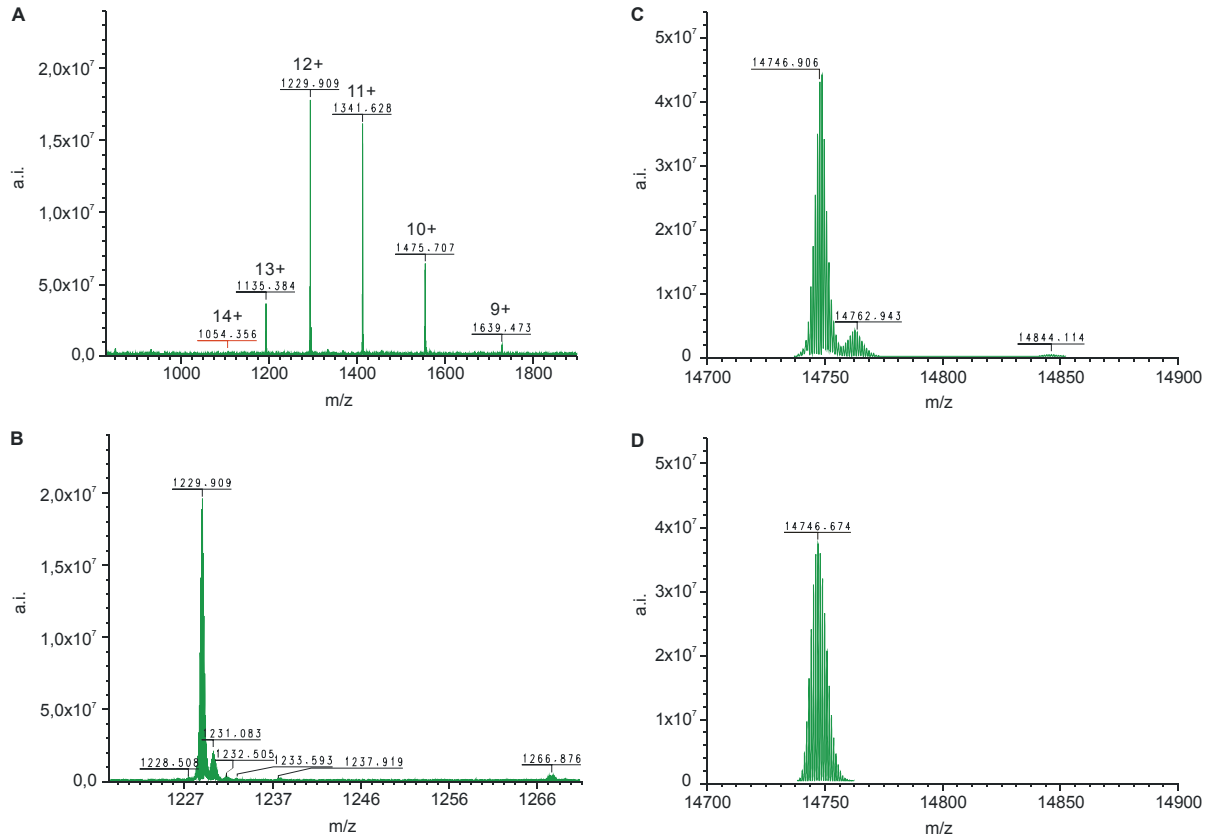


Abbildung IX-6: Massenspektrum von Bmpr-IA/IB^{cEc}. **A:** Experimentelles Massenspektrum für Bmpr-IA/IB^{cEc}. Verschieden stark geladene Spezies sind angegeben. **B:** Vergrößerung des Peaks der 12fach positiv geladenen Bmpr-IB^{cEc}-Spezies. Es waren nur geringe Verunreinigungen, z.B. durch einfach oxidierte Moleküle ($m/z=1231,083$) zu detektieren. **C:** Massenspektrum nach Deconvolution. **D:** Die theoretische Isotopenverteilung unter Berücksichtigung von fünf Cystinbrücken stimmt mit der experimentell bestimmten (C) überein.

IX.4. Biacore-Bindungsdaten von Proteinen

Rezeptor-ECD	BMP-2			GDF-5		
	k_{on} [10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{off} [10 ⁻⁴ s ⁻¹]	K_D [nM] ^a	k_{on} [10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{off} [10 ⁻⁴ s ⁻¹]	K_D [nM] ^a
<i>BMPR-IAec</i>						
Wildtyp	3,3	4,7	1,5	1,5	19,2	17
B1	4,0	9,7	2,4	1,6	22,6	19
B12	3,0	3,4	1,1	2,0	4,0	2,2
B123	1,8	3,3	1,8	1,1	2,4	2,2
B1234	1,5	4,0	2,7	1,1	2,2	2,0
BMPR-IA/IB ^{cec}	2,8	11,1	4,9	2,4	5,1	2,3
Y39G42	2,7 (2,7)	3,0 (3,3)	1,1 (1,2)	1,9 (1,6)	53 (106)	28 (68)
BMPR-IA ^{sf}	1,4	2,0	1,5	1,4	18	13
¹⁵ N-BMPR-IA ^{sf}		wildtypisch			wildtypisch	
¹³ C, ¹⁵ N-BMPR-IA ^{sf}		wildtypisch			wildtypisch	
<i>BMPR-IBec (Trx)</i>						
Wildtyp	2,3	11,4	4,9	3,3	3,7	1,1
KKM	3,9	10,0	2,6	1,5	2,1	1,2
NTerm	2,8	1,2	4,4	3,3	3,7	1,1
<i>BMPR-IBec (DsbA)</i>						
Wildtyp	3,3	20,1	6,0	3,6	10,1	2,8
H22SH23G	2,2	15,7	7,2	3,0	12,6	4,1
E62A	5,1	25,7	5,0	4,5	13,7	3,1
F66A	k.b.	k.b.	k.b.	-	-	~4740 ^b
Q67A	8,9	194	21,7	4,5	36,6	8,2
D70A	4,2	9,9	2,4	4,1	32,9	8,1
P74A	2,9	8,3	2,9	3,5	33,3	9,6
<i>ActR-II^{Bec}</i>						
Wildtyp	28	180	6,4	11	45	4,0

Die Abkürzungen bzw. Beschreibungen der einzelnen Proteinvarianten finden sich in Tabelle III-16.

Rezeptor-ECDs sind auf dem Sensorchip immobilisiert.

Abkürzungen: n.a. = nicht auswertbar; k.b. = keine Bindung.

Werte in Klammern geben Messungen an, bei denen in zwei unabhängigen Messungen verschiedene Werte erhalten wurden, die jedoch nichts an der Aussage ändern.

^a Die Dissoziationskonstante wurde berechnet durch $K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$.

^b Dieser Wert wurde aus der Dosisabhängigkeit des Bindungsgleichgewichts ($k_{\text{on}} \sim k_{\text{off}}$) abgeleitet.

^c Persönliche Mitteilung von W. Sebald.

Tabelle IX-2: Experimentelle Bindungsdaten von BMP Rezeptoren.

Ligand	BMPR-IAec			BMPR-IBec			BMPR-IIec
	k_{on} [10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{off} [10 ⁻⁴ s ⁻¹]	K_D [nM] ^a	k_{on} [10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{off} [10 ⁻⁴ s ⁻¹]	K_D [nM] ^a	$K_{D,eq}$ [nM] ^b
<i>GDF-5</i>							
Wildtyp	2,4	33,8	16,2	2,7	3,4	1,3	65,8
del56L	k.b.	k.b.	k.b.	k.b.	k.b.	k.b.	k.b.
R57L	2,6	11,0	4,2	2,5	1,7	0,7	55,9
S58T	4,9	179	36,4	4,6	11,5	2,5	37,5
H59L	16,3	274	16,8	4,6	32,8	7,2	28,6
L60P	n.a.	n.a.	n.a.	6,0	256	42,3	31,9
DP	k.b.	k.b.	k.b.	k.b.	k.b.	k.b.	73,0
<i>BMP-2</i>							
Wildtyp	3,3	4,7	1,5	2,3	11,4	4,8	48,0
S13R	3,6	6,0	1,8	-	-	-	-

Die Abkürzungen bzw. Beschreibungen der einzelnen Proteinvarianten finden sich in Tabelle III-16. BMPR-IAec, BMPR-IBec (Trx) bzw. BMPR-IIec sind auf dem Sensorchip immobilisiert.

n.a. = nicht auswertbar

k.b. = keine Bindung

^a Die Dissoziationskonstante wurde berechnet durch $K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$.

^b Dieser Wert wurde aus der Dosisabhängigkeit des Bindungsgleichgewichts ($k_{on} \sim k_{off}$) abgeleitet.

Tabelle IX-3: Experimentelle Bindungsdaten von BMP-2, GDF-5 und dessen Varianten.

Analyt	Immobilisierte Komponente	k_{on} [$10^4 M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [$10^{-3} s^{-1}$]	K_D [nM]
BMPR-IAec	BMP-2	9,3	4,4	47
BMPR-IBec	BMP-2	5,9	7,0	119
BMPR-IAec-Y39G42	BMP-2	1,1	1,7	162
BMPR-IAec	GDF-5	5,9	22	367
BMPR-IBec	GDF-5	16	1,9	12
BMPR-IAec-Y39G42	GDF-5	49	9,6	1970
BMPR-IAec	GDF-5-R57A	6,5	2,3	35
BMPR-IBec	GDF-5-R57A	12	1,3	11
BMPR-IAec-Y39G42	GDF-5-R57A	24	2,8	114
BMP-2-A52R	BMPR-IAec	-	-	21 ^a
GDF-5-R57A	BMPR-IAec	-	-	1,3 ^a
BMP-2-A52R	BMPR-IAec-Y39G42	7,7	19	244
GDF-5-R57A	BMPR-IAec-Y39G42	7,5	0,1	1,1

^aWerte entnommen aus Nickel et al. (Nickel et al., 2005)

Tabelle IX-4: Experimentelle und publizierte Bindungsdaten zwischen Ligand- und Rezeptorvarianten.

BMPR-IA-Variante	k_{on} [$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	k_{off} [10^{-3} s^{-1}]	K_D [nM]	$K_{D, [2:1]}$ [nM] ^c
<i>Hatta et al.</i> (Hatta et al., 2000) ^a				
Wildtyp	2,8	1,3	47	1,5
I62A	0,4	3,4	820	26
E64A	0,7	0,95	130	4,1
T72A	0,7	1,2	170	5,4
T74A	0,6	1,1	180	5,7
Y80A	2,2	1,5	67	2,1
F85A	0,5	3,6	720	23
<i>Keller et al.</i> (Keller et al., 2004) ^b				
Q86A	-	-	80	-
S90A	-	-	2,2	-
Q94P	-	-	2,8	-

^a Rezeptoren als Analyt perfundiert über immobilisiertes BMP-4; Die Bindungsaffinität für die BMP-4:BMPR-IAec Interaktion stimmt mit der Bindungsaffinität der BMP-2:BMPR-IAec Interaktion (Tabelle IX-4) überein.

^b BMP-2 als Analyt perfundiert über immobilisierte Rezeptor-Ektodomänen

^c $K_{D, [2:1]}$ bedeutet, dass die Bindungsaffinität für die 1:1-Interaktion (Ligand immobilisiert, Rezeptor perfundiert) zu Vergleichszwecken auf die 2:1-Interaktion (Rezeptor immobilisiert, Ligand perfundiert) „umgerechnet“ wurde. Dies erfolgt durch Division mit einem aus der BMP-2•BMPR-IAec-Interaktion

(Tabelle IX-2 und Tabelle IX-4) berechneten Faktor $f = \frac{47 \text{ nM} [2:1]}{1,5 \text{ nM} [1:1]} = 31,3$.

Tabelle IX-5: Publierte Bindungsdaten einiger BMPR-IAec-Varianten.

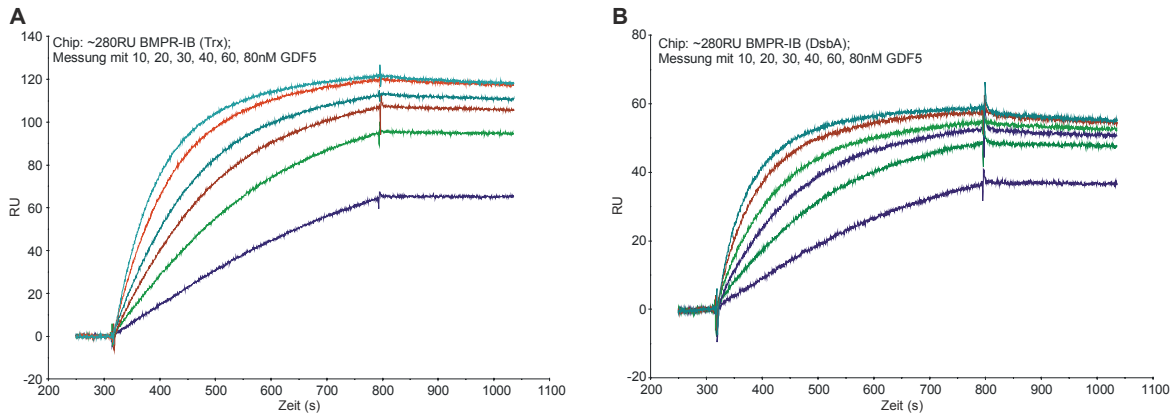


Abbildung IX-7: Konzentrationsabhängigkeit der Biacore-Kurven bei Interaktionen von immobilisiertem BMPR-IB mit GDF-5. Messung der Bindung von BMPR-IB (aus Trx-Fusion) (**A**) und BMPR-IB (aus DsbA-Fusion) (**B**) gegenüber 10, 20, 30, 40, 60 und 80nM GDF-5.

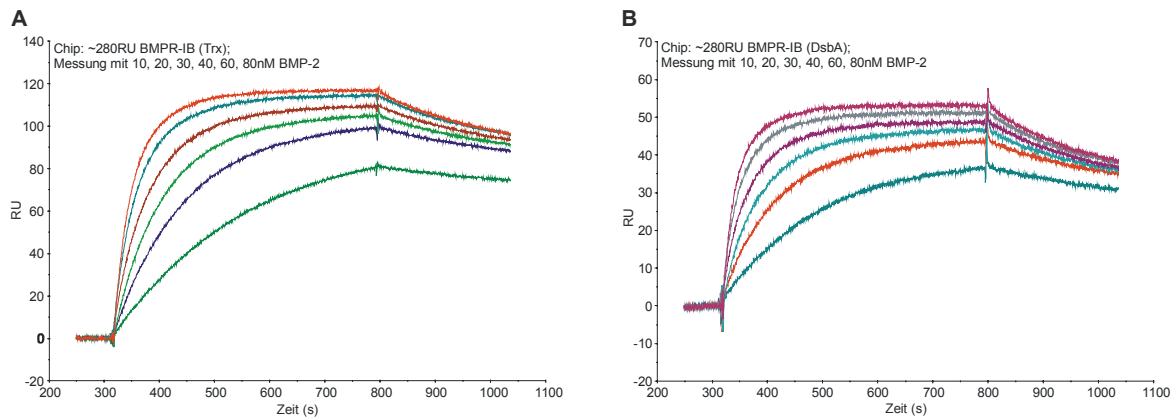


Abbildung IX-8: Konzentrationsabhängigkeit der Biacore-Kurven bei Interaktionen von immobilisiertem BMPR-IB mit BMP-2. Messung der Bindung von (**A**) BMPR-IB (Trx) und (**B**) BMPR-IB (DsbA) gegenüber 10, 20, 30, 40, 60 und 80nM BMP-2.

IX.5. Erster Kristallisationscreen für den GDF-5•BMPR- IBec•ActR-IIBec-Komplex

Nr	Screen und Nummer	Puffer	Fällungsmittel	Additive	Beobachtung ^b
<i>Initialer Kristallisationsscreen (Eigene Bedingungen und HR Screens)</i>					
1	PEG/Ion #20	-	20% PEG3350	0,2M Mg-Formiat pH5,9	Einzelkristalle nach 6d
2	CS Cryo #14	0,095M Hepes pH7,5	26,6% PEG400	0,19M CaCl ₂ , 5% Glycerol	C
3	CS Cryo #17	0,085M Tris pH8,5	25,5% PEG4000	0,17M Li ₂ SO ₄ , 15% Glycerol	Einzelkristalle nach 4 Monaten
4	CS Cryo #28	0,085M Na- Cacodylat pH6,5	25,5% PEG8000	0,17M NaOAc, 15% Glycerol	Einzelkristalle nach 11d
5	CS Cryo #41	0,085M Hepes pH7,5	17% PEG4000	8,5% Isopropanol, 15% Glycerol	PS
6	CS Cryo #44	-	0,1M Mg-Formiat	50% Glycerol	C
7	CS Cryo #45	0,085M Na- Cacodylat pH6,5	14,4% PEG8000	0,16M ZnOAc, 20% Glycerol	MC
8	CS Cryo #46	0,085M Na- Cacodylat pH6,5	14,4% PEG8000	0,16M CaOAc ₂ , 20% Glycerol	PS
9	INDEX #13	0,1M Bis-Tris pH5,5	0,3M Mg-Formiat	-	C
10	INDEX #29	Tacsimate ^a pH7	60% Tacsimate ^a	-	MC
11	CS LITE #6	0,1M Tris pH8,5	15% PEG4000	0,2M MgCl ₂	Einzelkristalle nach 40d
12	CS LITE #11	0,1M Na ₃ -Citrat pH5,6	0,5M (NH ₄) ₃ PO ₄	-	PS
13	CS LITE #14	0,1M Hepes pH7,5	14% PEG400	0,2M CaCl ₂	C
14	CS LITE #20	0,1M NaOAc pH4,6	12,5% PEG4000	(0,2M NH ₄) ₂ SO ₄	P
15	CS I #36	0,1M Tris pH8,5	8% PEG8000	-	C
16	CS II #37	0,1M Hepes pH7,5	10% PEG8000	8% Ethylenglycol	kleiner Cluster oder Spherulit
17	CS II #46	0,1M Bicin pH9	20% PEG MME 550	0,1M NaCl	C
18	SaltRx #7	0,1M Bis-Tris- Propan pH7	3,5M NH ₄ Cl	-	C
19	Salt Rx #38	0,1M Bis-Tris- Propan pH7	2,5M NH ₄ NO ₃	-	C
20	-	0,8M K-Na- Phosphat pH8,2	-	25% Ethylenglycol	C

Fortsetzung auf der nächsten Seite.

Nr	Screen und Nummer	Puffer	Fällungsmittel	Additive	Beobachtung ^b
21	-	0,1M Tris pH9	0,4M K-Na-Tartrat	0,5% PEG MME 5000	C
22	-	0,8M K-Na-Phosphat pH8,5	-	-	C
23	-	0,1M Tris pH8,6	11% PEG4000	0,25M MgCl ₂ , 15% Glucose	C
24	-	0,1M Bis-Tris pH6,7	0,6M Mg-Formiat	10% Glucose	kleiner Cluster
25	-	0,1M Tris pH8,2	0,7M K-Na-Tartrat	0,5% PEG MME 5000, 35% Glucose	C
26	-	0,1M Tris pH8,4	2M NH ₄ Cl	20% Glucose	C
27	-	0,1M Tris pH7,8	2M NH ₄ Cl	30% Sucrose	C
28	-	0,1M Bis-Tris pH6	35% PPG400	-	Einzelkristalle nach 6d
29	-	0,1M Bis-Tris pH6	40% PPG400	-	MC
30	-	0,1M Bis-Tris pH6,25	35% PPG400	-	PS-MC
31	-	0,1M Bis-Tris pH6,25	40% PPG400	-	MC
32	-	0,1M Hepes pH7,5	25% PEG3350	0,2M NaCl	kleiner Cluster
<i>PACT-Premier (Molecular Dimensions)</i>					
33	P1-5	0,1M SPG-Puffer pH8	25% PEG1500	-	Einzelkristall nach 4d
34	P1-28	0,1M PCB-Puffer pH7	25% PEG1500	-	Einzelkristalle nach 4d
35	P1-32	0,1M Hepes pH7	20% PEG6000	0,2M NH ₄ Cl	Einzelkristall nach 17d
36	P2-22	0,1M Bis-Tris-Propan pH6,5	20% PEG3350	0,2M K-Na-Phosphat	Stäbchenkristal 1 nach 17d
37	P2-35	0,1M Bis-Tris-Propan pH7,5	20% PEG3350	0,2M Na ₃ -Citrat	Cluster nach 4d

^a Tacsimate setzt sich zusammen aus 1,36M Malonsäure, 0,25M (NH₄)₃-Citrate, 0,12M Succinsäure, 0,3M D,L-Maleinsäure, 0,4M NaOAc, 0,5M Na-Formiat, 0,16M (NH₄)₃-Tartrat

^b C...Klarer Tropfen, PS...Phasentrennung, P...Präzipitat, MC...Mikrokristalle

Tabelle IX-6: Zusammenstellung der Kristallisationsbedingungen des ersten Screens für den GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex.

IX.6. Optimierung der Kristalle des GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplexes

In einem letzten Fine-Screen wurde die Konzentrationsabhängigkeit der ausgewählten Additive ermittelt (Abbildung IX-9).

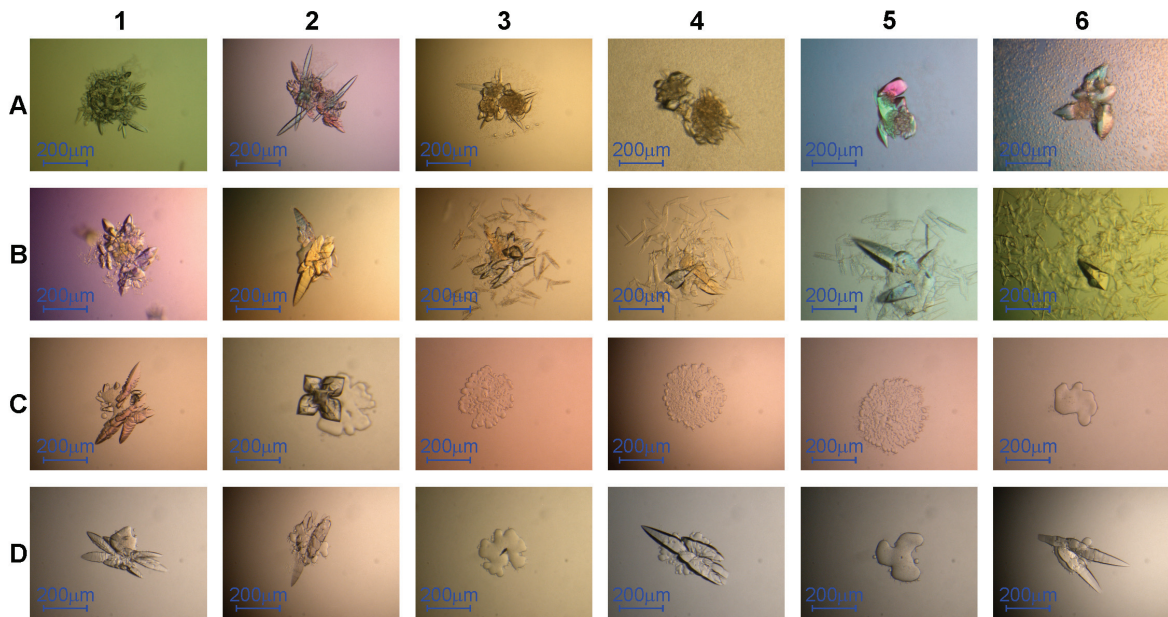


Abbildung IX-9: Zusammenstellung des finalen Additiv-Fine-Screens für den GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIBec-Komplex. *Reihe A:* 0,1M NaOAc pH5,25, 50% PPG400 plus 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5% DMSO. *Reihe B:* 0,1M NaOAc pH5,25, 50% PPG400 plus 12,5, 15, 17,5, 27,5, 30, 32,5mM MgSO₄. *Reihe C:* 0,1M NaOAc pH5,25, 50% PPG400 plus 30, 35, 40, 45, 50, 55mM CaOAc₂. *Reihe D:* 0,1M NaOAc pH5,25, 50% PPG400 plus 30, 35, 40, 45, 50, 55mM Mg-Formiat.

IX.7. Statistiken der Datenprozessierung

IX. 7. 1. GDF-5•BMPr-IBec•ActR-IIBec-Kristalle (PPG400-Form)

	MAD-Datensätze			Nativer Datensatz
<i>A. Datenprozessierung</i>				
Strahlenquelle	BESSY, BL14.1			SLS, X06SA
Detektor	MAR225-MOSAIC			MAR225-MOSAIC
Temperatur	100K			100K
Belichtungsdauer	3,2s pro Bild			2s pro Bild
Drehung	90°			125°
Abstand Kristall-Detektor	190mm			180mm
Meßdatum	07.03.2007			05.05.2006
Bezeichnung	r2a4			r2y4
Raumgruppe	P4 ₂ 2 ₁ 2			P4 ₂ 2 ₁ 2
Einheitszelle	a=b=76,62Å, c=82,12Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$			a=b=76,46Å, c=82,78Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Wellenlänge (Å)	0,97979 (inflection)	0,97962 (peak)	0,90789 (remote)	1,10485 (nativ)
Auflösungsbereich (Å) ^a	36,32-2,90 (3,00-2,90)	38,31-2,60 (2,69-2,60)	36,26-2,90 (3,00-2,90)	34,19-2,10 (2,18-2,10)
Anzahl gemessener Reflexe ^b	39424 (3897)	54117 (5303)	35898 (3576)	144233 (14428)
Anzahl einzigartiger Reflexe ^b	5862 (560)	7962 (760)	5839 (559)	14815 (1455)
Vollständigkeit (%)	99,8 (100,0)	99,9 (100,0)	99,9 (100,0)	99,5 (100)
Multiplizität	6,69 (6,93)	6,75 (6,85)	6,1 (6,3)	9,7 (9,9)
R _{merge} für alle Reflexe ^c	15,7 (49,2)	10,0 (40,8)	12,0 (39,0)	7,1 (35,4)
<Intensität / σ (Intensität)>	6,2 (2,5)	9,1 (3,5)	8,6 (3,7)	14,7 (5,3)
<i>B: Bestimmung der Phasen</i>				
	3 von 5 Se-Positionen identifiziert			-
	Auflösungsbereich: 38,3-4,6Å [§]			-
R _{Cullis} ^d	0,85	0,66	0,89	-
r.m.s. lack-of-closure ^e	0,87	1,12	0,89	-
Phasing power ^f	0,71	1,82	0,53	-
Figure of merit nach DM		0,83 ^h		-
Die Angaben zur Datenprozessierung wurden der CrystalClear-Log-Datei entnommen. Die Positionen der Selen-Atome wurden mit dem Programm SHELXC bestimmt. Die Berechnung und Verfeinerung der Phasen erfolgte mit Sharp, indem je eine „Kristallkomponente“ für die drei MAD-Datensätze und eine „Kristallkomponente“ für den nativen Datensatz definiert wurde („MAD+native“). ^a Angaben in Klammern kennzeichnen die höchste Auflösungsschale. ^b Ausschlussgrenze für Reflexe: $F > 0\sigma$. ^c $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle }{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle}$ worin $\langle I_{hkl} \rangle$ der mittleren Intensität von symmetrieverwandten, einzigartigen Reflexen entspricht. ^d $R_{Cullis} = \frac{\sum F_{PH} + F_P - F_{H,calc} }{\sum F_{PH} - F_P }$. Soll: $R_{Cullis} = 0,4$ bis $0,6$. ^e Quadratischer Mittelwert (engl. r.m.s.) des normalisierten lack-of-closure $\sqrt{\epsilon^2} = \frac{\sum (F_{PH,obs} - F_{PH,calc})^2}{\sum F_{PH,calc} }$. ^f Phasing Power = $\frac{\sum F_{H,calc} }{\sum F_{PH,obs} - F_{PH,calc} }$. Soll: Phasing Power > 1 . [§] Der Grenzwert für anomale Differenzen azentrischer Reflexe wurde der SHARP-Log-Datei entnommen, kann aber auch aus den SHELXC-Diagrammen abgeschätzt werden. Dementsprechend bezieht sich die Phasenstatistik auf diesen Auflösungsbereich. ^h Auflösungsbereich: 6,7-2,0Å.				

Tabelle IX-7: Statistik für die Aufnahme und Prozessierung der Datensätze von GDF-5•BMPr-IBec•ActR-IIBec-Kristallen mit klingenförmigem Aussehen (PPG400-Bedingung).

IX. 7. 2. GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIbec-Kristalle (PEG-Form)

	Nativer Datensatz
Strahlenquelle	ESRF, ID23-2 (Mikrofokus)
Detektor	MAR225-MOSAIC
Raumgruppe	P4 ₁
Temperatur	100K
Belichtungsdauer	20s pro Bild
Drehung	146°
Abstand Kristall-Detektor	324,42mm
Meßdatum	18.11.2007
Bezeichnung	Box97B1
Einheitszelle	a=b=125,77Å, c=201,40Å α=β=γ=90°
Wellenlänge (Å)	0,9340 (nativ)
Auflösungsbereich (Å) ^a	44,47-6,80 (7,04-6,80)
Anzahl gemessener Reflexe ^b	30743 (3223)
Anzahl einzigartiger Reflexe ^b	5420 (554)
Vollständigkeit (%)	99,9 (100)
Multiplizität	5,6 (5,7)
R _{merge} für alle Reflexe ^c	12,9 (60,8)
<Intensität / σ>	6,6 (2,1)
<p>Der analysierte, etwa 100µm x 50µm x 50µm große und ein bis zwei Jahre alte Kristall wurde der Bedingung 0,1M Tris pH8,2, 15% PEG4000, 0,1M MgCl₂ entnommen. Die Daten wurden mit CrystalClear prozessiert und anschließend für das Verfahren des Molekularen Ersatzes mit Hilfe des Programms Phaser (CCP4-Software-Suite) eingesetzt. Eine bessere Auflösung konnte trotz Analyse mehrerer Kristalle nicht erreicht werden. Andere Kristalle aus der gleichen Box beugten an der Drehanodenanlage bis etwa 8Å. ^a Angaben in Klammern kennzeichnen die höchste Auflösungsschale. ^b Ausschlussgrenze für Reflexe: $F > 0\sigma$. ^c $R_{\text{sym}} = \sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle / \sum_{\text{hkl}} \langle I_{\text{hkl}} \rangle$ worin $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ der mittleren Intensität von symmetrieverwandten, einzigartigen Reflexen entspricht.</p>	

Tabelle IX-8: Statistik für die Aufnahme und Prozessierung der Datensätze von GDF-5•BMPR-IBec•ActR-IIbec-Kristallen mit oktaedrischem Aussehen (PEG-Bedingung).

IX. 7. 3. GDF-5•BMPr-IA/IB^cec-Kristalle

	MAD-Datensätze			Nativer Datensatz
<i>A. Datenprozessierung</i>				
Strahlenquelle	BESSY, BL14.1			Drehanode
Detektor	MAR225-MOSAIC			X-AXIS IV
Temperatur	100K			100K
Belichtungsdauer	3,2s pro Bild			min pro Bild
Drehung	90°			125°
Abstand Kristall-Detektor	190mm			180mm
Meßdatum	07.03.2007			05.05.2006
Bezeichnung	r2b4			box153a4
Raumgruppe	P6 ₂ 22			P6 ₂ 22
Einheitszelle	a=b=109,13, c=194,64 $\alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$			a=b=109,46, c=194,91 $\alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$
Wellenlänge (Å)	0,97987 (inflection)	0,97965 (peak)	0,90791 (remote)	1,5418 (nativ)
Auflösungsbereich (Å) ^a	35,70-2,80 (2,90-2,80)	35,72-2,80 (2,90-2,80)	35,75-2,80 (2,90-2,80)	19,86-2,80 (2,90-2,80)
Anzahl gemessener Reflexe ^b	39424 (5920)	61031 (6049)	60968 (6061)	169983 (16970)
Anzahl einzigartiger Reflexe ^b	17330 (1682)	17365 (1684)	17405 (1695)	17610 (1710)
Vollständigkeit (%)	98,8 (98,5)	98,9 (98,8)	98,9 (99,2)	99,9 (100)
Multiplizität	3,5 (3,5)	3,5 (3,6)	3,5 (3,4)	9,6 (9, 9)
R _{merge} für alle Reflexe ^c	8,0 (48,7)	8,9 (47,7)	8,3 (49,7)	11,6 (58,3)
<Intensität / σ (Intensität)>	7,2 (1,5)	6,4 (1,6)	6,8 (1,6)	10,6 (3,9)
<i>B: Bestimmung der Phasen</i>				
	8 von 10 Se-Positionen identifiziert			-
	Auflösungsbereich: 33,5-4,7Å ^g			-
R _{Cullis} ^d	0,76	0,77	0,82	-
r.m.s. lack-of-closure ^e	0,77	0,79	0,76	-
Phasing power ^f	1,23	1,20	1,21	-
Figure of merit nach DM		0,78 ^h		-
Die Angaben zur Datenprozessierung wurden der CrystalClear-Log-Datei entnommen. Die Positionen der Selen-Atome wurden mit dem Programm SHELXC bestimmt. Die Berechnung und Verfeinerung der Phasen erfolgte mit Sharp, indem eine „Kristallkomponente“ für die drei MAD-Datensätze definiert wurde („MAD“). ^a Angaben in Klammern kennzeichnen die höchste Auflösungsschale. ^b Ausschlussgrenze für Reflexe: $F > 0\sigma$. ^c $R_{merge} = \sum_{hkl} I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle / \sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle$ worin $\langle I_{hkl} \rangle$ der mittleren Intensität von symmetrieverwandten, einzigartigen Reflexen entspricht. ^d $R_{Cullis} = \sum F_{PH} + F_P - F_{H,calc} / \sum F_{PH} - F_P $. Soll: $R_{Cullis} = 0,4$ bis $0,6$. ^e Quadratischer Mittelwert (engl. r.m.s.) des normalisierten lack-of-closure $\sqrt{\epsilon^2} = \sum (F_{PH,obs} - F_{PH,calc})^2$. ^f Phasing Power = $\sum F_{H,calc} / \sum F_{PH,obs} - F_{PH,calc} $. Soll: Phasing Power > 1. ^g Der Grenzwert für anomale Differenzen azentrischer Reflexe wurde der SHARP-Log-Datei entnommen. Dementsprechend bezieht sich die Phasenstatistik auf diesen Auflösungsbereich. ^h Auflösungsbereich: 9,1 - 2,8Å.				

Tabelle IX-9: Statistik für die Aufnahme und Prozessierung der Datensätze von GDF-5•BMPr-IA/IB^cec-Kristallen aus der MPD-Bedingung.

IX.9. Konsensus-Diagramm von BMPR-IAsf

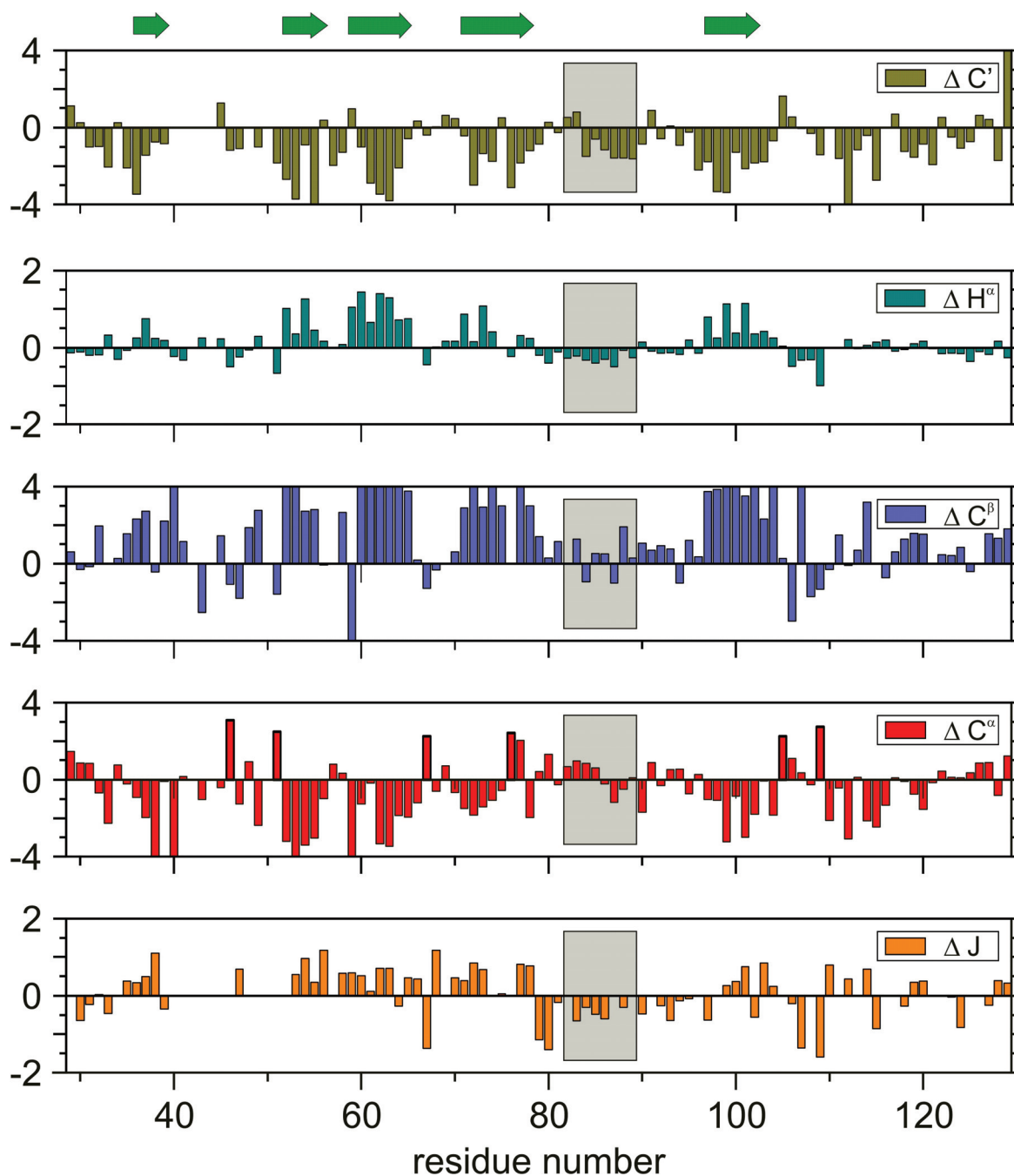


Abbildung IX-11: Konsensus-Diagramm von BMPR-IAsf. Dargestellt sind die Unterschiede zwischen experimentell gemessenen chemischen Verschiebungen und chemischen Verschiebungen von ungefaltetem Protein („random coil“) für C' , H^α -, C^β - und C^α -Atome. Zusätzlich ist die Abweichung der $^3J_{\text{HNHA}}$ -Kopplungen (ΔJ) vom Wert des ungefalteten Proteins gezeigt. Negative Werte für ΔH^α und ΔJ deuten auf helikale Sekundärstrukturen, Verschiebungen für die C' -, C^α - und C^β -Atome hingegen auf *random coil*-Strukturen (C^α , C^β) bzw. Faltblattstrukturen (C'). Der Bereich der „werdenden“ α -Helix in BMPR-IAsf ist grau hinterlegt. Die Abbildung wurde dem Artikel von Klages et al. (Klages, 2008b) entnommen.

IX.10. Deposition von Strukturen in der RCSB-Datenbank

Die Atomkoordinaten und Strukturdaten der in dieser Arbeit vorgestellten und veröffentlichten Proteinstrukturen wurden in der Proteindatenbank (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ; <http://www.rcsb.org>) hinterlegt. Tabelle IX-10 fasst die Einträge zusammen.

Proteinstruktur	Art	Eintrag in der Proteindatenbank
<i>Eigene Beiträge</i>		
BMP-2•BMPR-IA-B1	Kristallstruktur	2QJ9
BMP-2•BMPR-IA-B12	Kristallstruktur	2QJA
BMP-2•BMPR-IA/IB ^C	Kristallstruktur	2QJB
GDF-5•BMPR-IB	Kristallstruktur	in Arbeit
BMPR-IA ^f	NMR-Struktur	2K3G
<i>Mitarbeit</i>		
GDF-5	Kristallstruktur	1WAQ
BMP-6	Kristallstruktur	2R52 und 2R53
BMP-2•BMPR-IA•ActR-IIB	Kristallstruktur	2H62 und 2H64
BMP-2•VWC1 CV-2	Kristallstruktur	3BK3

Tabelle IX-10: Proteinstrukturen in der Proteindatenbank.

X. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. T. Müller, der eine im besten Sinne einzigartige Forschungsatmosphäre ermöglichte. Seine stetige Bereitschaft, Forschungsergebnisse zu diskutieren, mit neuen Impulsen und Ideen die tägliche Forschungsarbeit zu bereichern und zu neuen Ufern zu führen, als auch zunächst vielleicht weniger aussichtsreichen oder eigenen Vorhaben den nötigen Raum zu geben, hat mich sehr beeindruckt und motiviert. Ein Grossteil meiner Fertigkeiten und Fähigkeiten auf proteinkristallographischem Gebiet sind ihm zu verdanken; die vielen Fahrten an Synchrotron-Einrichtungen in Deutschland und der Schweiz boten eine willkommene Abwechslung vom wissenschaftlichen Alltag. Der Möglichkeit, an den unterschiedlichsten Projekten innerhalb und außerhalb der Arbeitsgruppe mitzuwirken, verdanke ich einige Publikationen. Wünsche, an Konferenzen und sonstigen Veranstaltungen zur beruflichen Weiterbildung teilzunehmen, wurden ausnahmslos unterstützt und gefördert. Ich hätte meine Promotionsstelle nicht besser wählen können – ganz herzlichen Dank.

Mein Dank gilt Prof. W. Sebald für die Überlassung des Forschungsthemas und für die fortwährende Unterstützung der Forschungsarbeiten an BMP-Ligand-Rezeptorkomplexen. Sehr dankbar bin ich, dass er Anstrengungen zur wissenschaftlichen Weiterbildung stets offen gegenüberstand, diese selbst anregte oder finanziell unterstützte.

Prof. U. Fischer danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie.

Bei Dr. J. Nickel möchte ich mich sehr bedanken, weil er notwendige Biacore-Messungen exzellent erledigt und im „Notfall“ mit kostbarem Protein ausgeholfen hat. Seine Bereitschaft, mich an seinem Forschungsthema teilhaben zu lassen und zur Zusammenarbeit, seine Offenheit gegenüber Diskussionen aller Art und seine Hilfsbereitschaft bedeuten mir sehr viel. Nicht zuletzt danke ich ihm für das Korrektur-Lesen dieser Arbeit.

Die Zusammenarbeit mit Dr. A. Seher war vorbildlich, exzellent und motivierend; an ihn vielen Dank für die Einführung in das zellbiologische Arbeiten und die umstandslose, sehr hilfreiche Unterstützung bei den Zellassays. Ein großes Dankeschön geht auch an Kai Heinecke für seine Hilfsbereitschaft in ebensolchen Fragen.

Der ganzen Arbeitsgruppe von Prof. T. Müller, insbesondere den längeren Weggefährten Michael Kraich, Edwin Patino, Stella Weidauer, Stefan Sarembea und Maike Gottermeier, aber auch den kürzlich neu hinzugekommenen Kollegen möchte ich ein herzliches Dankeschön für die sehr hilfreiche Unterstützung im Laboralltag, die angenehme, unkomplizierte Arbeitsatmosphäre und die Organisation des einen oder anderen lustigen und stets erinnerungswerten Betriebsausflugs oder Grillabends aussprechen. Allen anderen Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe W. Sebald und der Physiologischen Chemie II, insbesondere Werner Schmitz, Birgit Midloch und Christian Söder, aber auch den Kollegen in der Botanik I danke ich für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit. Heide-Marie Roth am Virchow-Zentrum danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft bei der CD-Spektroskopie und Ashwin Chari am Lehrstuhl für Biochemie für die vielen Tips und Diskussionen. Ganz besonders und herzlich danke ich meinen Eltern Matthias und Evelin Kotzsch, deren stete Hilfe das Unternehmen Studium und Promotion sehr erleichterte und die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und stehen. Meine Brüder Vincent und Hans-Christoph Kotzsch sind ebenfalls unersetzlich und haben mir mit ihrem Wissen, Kreativität, Einfallsreichtum und Lebenslust geholfen, den eigenen Lebenshorizont zu erweitern und so schnell nicht aufzugeben.

XI. Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen (umgekehrt chronologisch sortiert)

a) Bereits erschienene, zur Veröffentlichung akzeptierte oder in Druck befindliche Manuskripte

- [1] Klages, J.*, **Kotzsch, A.***, Murray, C., Sebald, W., Nickel, J., Müller, T. D.[§] and Kessler, H.[§] (2008). The solution structure of BMPR-IA reveals a local disorder-to-order transition upon BMP-2 binding. *Biochemistry, Akzeptiert*. (* Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen)
- [2] **Kotzsch, A.**, Nickel, J., Seher, A., Heinecke, K., van Geersdaele, L., Herrmann, T., Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). Structure Analysis of Bone Morphogenetic Protein-2 Type I Receptor Complexes Reveals a Mechanism of Receptor Inactivation in Juvenile Polyposis Syndrome. *J Biol Chem* **283**, 5876-5887.
- [3] Zhang, J. L., Qiu, L. Y., **Kotzsch, A.**, Weidauer, S., Patterson, L., Hammerschmidt, M., Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). Crystal structure analysis reveals how the Chordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding. *Dev Cell* **14**, 739-50.
- [4] Qiu, L. Y., Zhang, J. L., **Kotzsch, A.**, Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the complex of the first von Willebrand type C domain bound to bone morphogenetic protein 2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**, 307-12.
- [5] Saremba, S., Nickel, J., Seher, A., **Kotzsch, A.**, Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *Febs J* **275**, 172-83.
- [6] Weber, D., **Kotzsch, A.**, Nickel, J., Harth, S., Seher, A., Mueller, U., Sebald, W. and Mueller, T. D. (2007). A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and Activin type IIB receptor. *BMC Struct Biol* **7**, 6.
- [7] Nickel, J., **Kotzsch, A.**, Sebald, W. and Mueller, T. D. (2005). A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB. *J Mol Biol* **349**, 933-47.

b) Eingereichte Manuskripte

- [1] **Kotzsch, A.***, Nickel, J.*, Seher, A., Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). Crystal structure analysis reveals a spring-loaded latch as molecular mechanism for GDF-5 - type I receptor specificity. *Eingereicht*. (* Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen)
- [2] Volk C., Gorboulev V., **Kotzsch A.**, Mueller T. D., Koepsell H. (2008). Identification of Two Amino Acids in Organic Cation Transporter 1 in the Center of the Outward- and Inward-facing Substrate Binding Cleft. *Mol Pharmacol, In Revision*.
- [3] Patino, E., Kraich, M., Saremba, S., **Kotzsch, A.**, Sebald, W. and Müller, T. D. (2008). Crystal structure analysis of murine IL-5. *In Revision*.

c) Manuskripte in Vorbereitung

- [1] **Kotzsch, A.**, Nickel, J., Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). Purification, crystallization and preliminary data analysis of the binary complex of growth and differentiation factor 5 (GDF-5) and BMP receptor IB (BMPR-IB). *In Vorbereitung*.

- [2] Patino E., **Kotzsch A.**, Sarembe S., Kraich M., Nickel J., Sebald W., Mueller T. D. (2008). The crystal structure of the IL-5 ligand-receptor complex reveals a wrench-like architecture for the IL-5 receptor. *In Vorbereitung*.
- [3] Heinecke, K., **Kotzsch, A.**, Seher, A., Mueller, T. D., Sebald, W., Nickel, J. (2008). The main BMP receptor assembly on the cell surface consists of the ligand, two type II receptors, and only one type I receptor. *In Vorbereitung*.
- [4] Klammert, U., Wuerzler, K., Kübler, A., **Kotzsch, A.**, Mueller, T. D., Sebald, W., Nickel, J. (2008). Ambiguous GDF-5: Agonistic and antagonistic properties of GDF-5 depend on the cellular context. *In Vorbereitung*.

d) Manuskripte aus vorherigen Arbeiten (Diplomarbeit)

- [1] Zehner, S., **Kotzsch, A.**, Bister, B., Sussmuth, R. D., Mendez, C., Salas, J. A. and van Pee, K. H. (2005). A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005. *Chem Biol* **12**, 445-52.
- [2] Dong, C., **Kotzsch, A.**, Dorward, M., van Pee, K. H. and Naismith, J. H. (2004). Crystallization and X-ray diffraction of a halogenating enzyme, tryptophan 7-halogenase, from *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1438-40.

Posterbeiträge

- [1] **A. Kotzsch**, A. Seher, J. Nickel, K. Heinecke, W. Sebald and T. Müller, Murnau Conference on Structural Biology of Disease Mechanisms **2007**, Murnau, Deutschland, Postertitel: „The effect of single missense mutations in BMP receptor IA found in juvenile polyposis syndrome may be attributed to a loss of function.“
- [2] J. Nickel, D. Weber, **A. Kotzsch**, K. Heinecke, T. Müller, W. Sebald, International Symposium of the SFB487: Membrane Proteins and Diseases **2007**, Würzburg, Deutschland, Postertitel: „Molecular recognition in Bone Morphogenetic Protein (BMP) / Receptor interaction.“
- [3] **A. Kotzsch**, J. Nickel, T. Müller, W. Sebald, FEBS Special Meeting "Molecular Signaling" **2006**, Dubrovnik, Kroatien, Postertitel: „Specificity in BMP ligand-receptor interaction.“
- [4] **A. Kotzsch**, J. Nickel, D. Weber, W. Sebald, T. Müller, Strategies in Tissue Engineering **2004**, Würzburg, Deutschland, Postertitel: „Molecular Logic of BMP/TGF- β Receptor interaction.“

XII. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation
„BMP Ligand-Rezeptor-Komplexe: Molekulare Erkennung am Beispiel der spezifischen Interaktion
zwischen GDF-5 und BMPRII.“
selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel
benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem
anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Würzburg, den

Unterschrift
(Vor- und Zuname)