



No. 10-067268-A-00005-0000

Fecha: 2013-06-26 16:33:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 21

Señor Superintendente
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COME
E. S. D.

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 412

Referencia : Expediente No. 10.067.268 A
Asunto : Solicitud de patente para: **CONJUGADOS DE NEUTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACÉUTICO**
Solicitante : DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT
Fecha de solicitud : 03 de junio de 2010

I. RECURSO VÍA GUBERNATIVA

Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad **DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT** solicitante de la patente de la referencia, por el presente escrito atentamente manifiesto a usted que debidamente notificada de la Resolución No. **27435** del 10 de mayo de 2013, interpongo en su contra el recurso de **REPOSICIÓN**, para que sea revocada y en consecuencia se conceda el privilegio de patente de invención para **“CONJUGADOS DE NEUTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACÉUTICO”** a favor de **DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT**.

II. OPORTUNIDAD DE LA IMPUGNACIÓN

La Resolución No. **27435** del 10 de mayo de 2013, con fecha de publicación listado el 21 de mayo de 2013, fecha de vencimiento el 21 de junio de 2013, y fecha del término legal el 28 de junio de 2013.

III. LA DECISIÓN RECURRIDA

3.1 Mediante la Resolución objeto de la presente impugnación, el Superintendente de Industria y Comercio decidió:

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax In U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

3.1.1 Denegar la patente de invención a la creación titulada: **“CONJUGADOS DE NEUTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACÉUTICO”**

3.2 En la parte motiva de la providencia, se mencionaron los siguientes fundamentos:

3.2.1 “Las características esenciales de la invención de la reivindicación 1 habían sido derivadas de manera evidente previamente en los documentos D1 (Resumen, página 8, líneas 26-34 y página 16, líneas 3-10) y D3 (página 3414, Fig. 1), los cuales dan a conocer una variante de una proteína de neurturina humana, que comprende:

Una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o un fragmento biológicamente activo que puede homodimerizarse con la neurturina humana con una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

3.2.2 “Como se dijo anteriormente, el documento D1 es considerado el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1, porque divulga un conjugado de neurturina que comprende una porción de poliol unida covalentemente a la proteína neurturina humana o una variante de la misma para mejorar el tiempo de circulación de la proteína (Resumen, Pág. 8, líneas 26-34 y Pág. 16, líneas 3-10). El documento D1 también enseña una composición farmacéutica que comprende el conjugado, la cual es útil para el tratamiento de la diabetes (Pág. 6, líneas 7-12).

3.2.3 “La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el conjugado del documento D1 consiste en que el cambio de aminoácido es la sustitución de un residuo de arginina en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, o 65 de SEQ ID No. 6 con un ácido glutámico o la sustitución de un residuo de arginina en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63 o 65 de SEQ ID No. 6 con lisina.

3.2.4 “El efecto que logra el incluir este cambio de aminoácido en la región talón de la proteína neurturina, que comprende los residuos 47-69, es que no afecta el funcionamiento normal de la variante de la proteína neurturina.

- 3.2.5 “Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: cómo modificar la variante de proteína neurturina conocida en D1 de manera que no se afecte el funcionamiento normal de la variante de la proteína neurturina.
- 3.2.6 “Sin embargo, el documento D3 enseña que los residuos ubicados en los dominios finger F1 y F2 son necesarios para la unión con el componente alfa del receptor GDNF y que los residuos 47-69 están en la región talón, fuera de los dominios F1 y F2 (Pág. 3414, Fig. 1) y que es bien conocido en el estado del arte que las reacciones de PEGilación sobre residuos de arginina es lenta, mientras que residuos como lisina son sitios usuales para la reacción con polietilenglicol.
- 3.2.7 “En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, habría inferido sin mucho esfuerzo de su parte, utilizar técnicas conocidas en el estado del arte como mutagénesis dirigida (documento D1, Pág. 15, líneas 8-11) para modificar residuos de arginina dentro de la región talón de la neurturina humana madura, pero fuera de las regiones finger F1 y F2, de acuerdo a las enseñanzas del documento D3, para obtener más conjugados con un mejorado tiempo de circulación, manteniendo la actividad de la proteína.
- 3.2.8 “De manera que la solución propuesta por esta solicitud en la reivindicación 1 y en las reivindicaciones 2 — 29 es obvia y no tiene nivel inventivo.
- 3.2.9 “Con relación al argumento de la solicitante según el cual la presente solicitud está dirigida a variantes de neurturina que comprenden alteraciones específicas en la región talón y que están asociadas a efectos inesperados, por ejemplo, las alteraciones en la región talón de la proteína de neurturina no afecta el funcionamiento normal de la variante de la proteína neurturina, este Despacho considera que efectivamente, con base en las enseñanzas del documento D1 y el conocimiento general que hasta ese momento se tenía acerca de la proteína neurturina revelada en el documento D3, la persona del oficio normalmente versada en la materia se vería motivada a incluir alteraciones de aminoácidos en la región talón de la proteína neurturina con alta probabilidad de éxito para no afectar el funcionamiento normal de la variante de esta proteína.

3.2.10 “La solicitante igualmente argumenta que el documento D3 instruye que la región talón de la neuriturina es crucial por su unión con GFR α 2 y por esta razón, una persona versada no esperaría que esta región pudiera tolerar alteraciones de aminoácidos, así como que no todas las alteraciones de aminoácidos de la región talón están asociadas con un único efecto uniforme, ejemplificado en la reducción de la expresión de la proteína en la sustitución R63E. Al respecto, esta Superintendencia se permite aclarar que, contrario a lo afirmado por la solicitante, el documento D3 enseña que es el segmento Ha de la región talón, la cual se encuentra adyacente a los segmentos F2a y F2c de la región dedo 2 del monómero opuesto, la que está involucrada en la unión con GFR α 2 (Pág. 3419, Col. izquierda, Párr. 4). De esta forma, debido a que el segmento Ha no comprende los residuos 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63 o 65 reclamados en la reivindicación 1 de la presente solicitud, los cuales se encuentran en los segmentos Hb, Hc y Hd (documento D3, Fig. 1), constituye una enseñanza que motiva a la persona del oficio normalmente versada en la materia, para incluir sustituciones en los segmentos Hb, Hc y Hd de la región talón. De otra parte, el argumento de la solicitante según el cual la sustitución R63E reduce la expresión de la proteína, no parece tener relación con la actividad mejorada de la neuriturina humana. Por demás, la misma solicitud reclama la sustitución sobre este residuo por lisina.

IV. OBJETO DEL RECURSO

De acuerdo con los argumentos que expongo a continuación, solicito atentamente a su Despacho lo siguiente:

1. Revocar la Resolución No. **27435** del 10 de mayo de 2013.
2. Conceder el privilegio de patente de invención para “**CONJUGADOS DE NEUTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACÉUTICO**” a favor de **DEVELOGEN AKTIENGESSELLSCHAFT**.

V. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Respetuosamente me permito disentir de lo expuesto por ese Despacho en la Resolución objeto del presente recurso, toda vez que la presente solicitud sí cumple con los requerimientos de novedad y nivel inventivo exigidos en la Decisión 486, como se demostrará a continuación:

5.1 La presente solicitud sí tiene nivel inventivo

El artículo 18 de la Decisión 486 señala lo siguiente:

Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.

Consecuentemente, una invención se considerará inventiva si la misma no hubiese resultado obvia a partir del arte previo, para una persona del oficio normalmente versada en la materia. Esto a su vez implica que el Examinador a cargo de esta evaluación debe colocarse en el momento exacto en el que el inventor buscaba resolver el problema técnico contemplado en la solicitud y para el cual poseía la literatura y el conocimiento disponibles en dicho momento.

Siguiendo entonces los lineamientos de la Jurisprudencia aplicable al análisis del nivel inventivo de una solicitud de patente, se considera que una anterioridad o una combinación de dos anterioridades puede afectar dicho requerimiento de patentabilidad, si una persona medianamente versada en la materia encuentra enseñanzas o sugerencias claras que, a partir de un conocimiento medio en dicho campo, le permitan llegar de manera obvia a la invención reivindicada. Adicionalmente se considera que una mejora sustancial, un efecto inesperado o una ventaja con respecto al arte previo es un indicio de nivel inventivo, por cuanto aporta un salto tecnológico en la regla técnica.

Respecto a lo anterior, el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina ha expuesto en la Interpretación Prejudicial del proceso 13-IP-2010:

“En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la

materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no es consecuencia clara y directa de dicho estado”.

[Señalado fuera del texto]

Por lo anterior, se entiende que para que una persona medianamente versada en la materia pudiera derivar de manera obvia una invención, requeriría simplemente aplicar sus conocimientos técnicos. En contraste, todo aquello que va más allá de la simple aplicación de los conocimientos técnicos y que no ha sido revelado en el estado de la técnica, debe ser considerado inventivo.

A este respecto, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo por el Examinador y con las conclusiones del mismo y solicitamos atentamente la reconsideración de las razones por las cuales se decidió negar la patente, con base en la siguiente información:

En primer lugar, con respecto a las objeciones realizadas por el señor Examinador, amablemente señalamos que como ha reconocido él mismo, el documento D1 no enseña o sugiere la realización de una variante en la que un cambio es introducido específicamente en el estrecho rango de las posiciones de aminoácidos 47-69 (la región "talón" de la neurturina) con el fin de obtener las moléculas de neurturina reivindicadas que tienen alteraciones específicas de aminoácidos dentro de la región del talón. La presente solicitud enseña que las alteraciones específicas en la región del talón de la neurturina que se enuncian en las reivindicaciones sustitutas están asociadas con un efecto inesperado, es decir, las alteraciones en la región del talón de la proteína neurturina no afectan la función normal de la variante de la proteína neurturina. Mientras se preserva la función de la proteína neurturina, los aminoácidos alterados en las variantes de neurturina reivindicadas son entonces también susceptibles de modificación post-traducciona con compuestos tales como una fracción de poliol, lo que aumenta la biodisponibilidad de la variante de neurturina en un paciente. Por lo tanto, estas variantes no solo proporcionan proteínas que retienen la función nativa de la neurturina, sino que también tienen mayor biodisponibilidad. No hay enseñanza o sugerencia en D1 en la que se debe seleccionar específicamente la región del talón, y mucho menos los aminoácidos específicos expuestos en las reivindicaciones, como un sitio para una mutación, y ciertamente no hay enseñanza o sugerencia en D1 del hallazgo sorprendente en el que las alteraciones específicas de aminoácidos en la región del talón de neurturina se asocian con una preservación de la función de la proteína modificada.

D3 no corrige las deficiencias en D1. Como se indica en la respuesta a la Acción Oficial No. 23650 presentada a su Despacho el 19 de marzo de 2013, en ninguna parte el documento D3 enseña o sugiere que las mutaciones de aminoácidos específicos pueden ser hechas sin consecuencia en la región del talón de GDNF, y mucho menos en la región del talón de neurturina. Por el contrario, el documento D3 señala en la página 3418 que "[P]or lo tanto, similar a la interacción [neurturina]-GFR α 2, la interacción ARTN-GFR α 3 requiere determinantes moleculares *tanto del talón y las regiones finger 2 de la molécula [énfasis en el original]*" Como sólo los comentarios de D3, con respecto a la zona del talón, son los que juegan un papel importante en la función de ARTN y la neurturina, la persona del oficio normalmente versada en la materia no habría tenido ninguna razón para ver el documento D3 como enseñanza o sugerencia con respecto a que ciertas porciones de la región del talón serían susceptibles de mutación. De hecho, la persona versada en la materia habría llegado a la conclusión de todo lo contrario.

Adicionalmente, el Examinador argumenta que el documento D3 indica que la porción Ha rodea las porciones F2a y F2c, y, como resultado, la persona del oficio normalmente versada en la materia habría llegado a la conclusión de que sólo la porción Ha de la región del talón fue esencial para la función de la neurturina. Respetuosamente indicamos que el Examinador ha caracterizado erradamente las enseñanzas de D3. Contrariamente a las afirmaciones del Examinador, señalamos que el documento D3 enseña sustituciones de los bloques cortos de aminoácidos (aproximadamente 8 tramos de aminoácidos) en cualquiera de las cuatro porciones de la región del talón (es decir, Ha, Hb, Hc y Hd), lo cual dio lugar a la disminución de la proteína mutante de la familia GDNF probada. En efecto, las proteínas de la familia de GDNF que tienen estos bloques cortos de mutaciones en cualquiera de las porciones de la región del talón se asociaron con una reducción del 20-60% en bioactividad (Figura 4 de D3). Además, la leyenda de la Figura 4 del documento D3 expone con respecto a las porciones Hb y Hc lo siguiente: "[T]res mutantes adicionales fueron mucho más atenuadas en su capacidad para activar GFR α 2-RET que GFR α 1-RET (F1b, Hb, Hc). [Énfasis añadido]" Esta evidencia habría conducido a la persona del oficio normalmente versada en la materia, en la fecha de presentación efectiva antes de la solicitud, a entender que todas las porciones de la región del talón de la neurturina juega un papel en su función, y que la región del talón, como un todo, probablemente no sería susceptible a sustituciones de aminoácidos individuales.

En contraste, la presente solicitud en trámite enseña el sorprendente hallazgo en el que, no sólo las variantes de la proteína neurturina reivindicadas que tienen



sustituciones específicas en la región del talón, conservan su función biológica, pero la mayoría de las variantes de neurturina que tienen las alteraciones de aminoácidos enunciadas se han asociado con una modesta *mejora* en la actividad biológica en comparación con una proteína de neurturina de control tipo salvaje (por ejemplo, Figura 5B de la presente solicitud). Tal como el documento D3 enseña, la actividad biológica se reduciría si cualquiera de las partes de la región del talón fueran mutadas, de esta forma D3 no enseña los resultados sorprendentes que se dan a conocer en la solicitud en trámite. En consecuencia, amablemente señalamos que por lo menos, el documento D3 no proporciona ninguna motivación para modificar la región del talón, como el Examinador afirma.

Como una prueba adicional de la comprensión de una persona del oficio normalmente versada en el tema de la región del talón, a la fecha de presentación efectiva antes de la solicitud, la solicitante presenta el artículo de Wang *et al.*, 2006, Structure, 14:1083-92 (de ahora en adelante nombrado como "Wang"). Al igual que el documento D3, Wang señala la relación entre neurturina y otras proteínas de la familia de GDNF, y explora la relación estructura/función de una proteína de la familia GDNF representativa (es decir, artemina). Así, y de manera similar a D3, Wang enseña la importancia de la región del talón en la función de las proteínas que son miembros de la familia de las proteínas GDNF (por ejemplo, página 1085 de Wang), que se refiere a la importancia de la porción de la hélice alfa de la región del talón en la interacción entre dos monómeros de artemina en la formación de un dímero de artemina. En el contexto de la neurturina, la hélice alfa de la región del talón se extiende desde la porción Ha de la región del talón hasta la porción Hc (figura 1 en D3). De forma similar a la artemina, la neurturina forma un homodímero. Como tal, la persona del oficio normalmente versada en la materia habría leído Wang como enseñanza de que, *al menos*, las porciones Ha-Hc de la región del talón de un monómero de neurturina realizó una función importante, y, como resultado, no se habría esperado que estas porciones de la región del talón toleraran mutaciones sin afectar negativamente la función.

Al contrario de las enseñanzas de los documentos D3 y Wang, la presente solicitud enseña el sorprendente hallazgo de que varias posiciones de aminoácidos (es decir, 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60) en las porciones de la región del talón Hb y Hc son susceptibles de alteración (por ejemplo, los Ejemplos 4 y 5 de la presente solicitud). Como se señaló anteriormente, la solicitud enseña el sorprendente hallazgo de que no sólo las proteínas de neurturina reivindicadas conservan su función biológica, sino que la mayoría de las variantes de neurturina que tienen las alteraciones de aminoácidos

citados fueron asociadas con una modesta *mejora* en la actividad biológica en comparación con un control de tipo salvaje de la proteína neurturina (por ejemplo, la Figura 5B de la presente solicitud).

Por otra parte, y como se señaló en nuestra anterior respuesta a la Acción Oficial No. 23650, la solicitud también enseña que la alteración particular de aminoácidos en la región del talón de neurturina, es decir, R63E (un aminoácido presente en la porción Hd de la región del talón), fue asociada con una expresión reducida de la proteína (por ejemplo, el Ejemplo 4 de la presente solicitud). Como tal, la solicitud enseña que no todas las alteraciones de aminoácidos en la región del talón de la neurturina se encuentran asociadas con un solo efecto uniforme y predecible. El Examinador rechaza esta evidencia, con el argumento aparente que la solicitud en trámite reivindica variantes de neurturina que tienen alteraciones R63K, y como resultado, las presentes reivindicaciones se encuentran dirigidas las proteínas no funcionales. Sin embargo, respetuosamente manifestamos que el argumento del examinador no tiene fundamento. En este sentido, las variantes de neurturina R63K no fueron asociadas con los mismos niveles de expresión reducidos asociados a las variantes de neurturina R63E. Más bien, la solicitud enseña el sorprendente hallazgo en el que las variantes de neurturina R63K pueden expresarse, y eran más susceptibles a la conjugación en el sitio R63K con una fracción de poliol (Ejemplo 5 de la presente solicitud).

En contraste con las enseñanzas de la solicitud en trámite, el documento D3 no ofrece ninguna orientación en cuanto a si la región del talón de la proteína neurturina sería tolerante de las alteraciones específicas de aminoácidos, y mucho menos que las mutaciones específicas de aminoácidos en la región del talón se asocian con alta o baja expresión de la proteína neurturina modificada.

En vista de lo anterior, las reivindicaciones 1 a 22 de la presente invención son inventivas sobre los documentos del arte previo D1 y D3, ya sea visto solo o en combinación. En consecuencia, solicitamos respetuosamente que al Examinador que reconsidere y retire la objeción con respecto a la falta de nivel inventivo.

Por último, cordialmente deseamos aclarar que la respuesta a la Acción Oficial No. 23650 presentada anteriormente (19 de marzo de 2013) a su Despacho, contiene un pliego reivindicatorio modificado que comprende únicamente 22 reivindicaciones en total. Por lo tanto, de acuerdo a la presente Resolución No. 27435, el Examinador cometió un error de digitación, por cuanto el fragmento "*De manera que la solución propuesta por*

9

esta solicitud en la reivindicación 1 y en las **reivindicaciones 2-29** es obvia y no tiene nivel inventivo” de la página 5, se refiere a 29 reivindicaciones, cuando corresponde realmente a 22.

Conclusión

El documento D1, el documento D3, o su combinación no resultan anterioridades válidas capaces de afectar el nivel inventivo de la variante de una proteína de neuriturina humana de la presente solicitud.

Por todo lo anterior, consideramos que la presente solicitud cumple a cabalidad con los requerimientos de patentabilidad exigidos por la legislación actual, por lo que atentamente solicitamos en consideración lo siguiente:

VI. PETICIÓN

Por todo lo anterior, solicito a ese Despacho lo siguiente:

6.1 Que al considerar las razones precedentes se revoque la decisión contenida en la Resolución No. **27435** del 10 de mayo de 2013., en cuanto resuelve negar el privilegio de patente de invención.

6.2. Que se otorgue el privilegio de patente de invención para **“CONJUGADOS DE NEUTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACÉUTICO”** a favor de **DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT.**

VII. NOMBRE Y DIRECCIÓN

El nombre y la dirección del solicitante recurrente son los siguientes:

DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT
Marie-Curie-Strasse 7,
37079 Göttingen,
Alemania

VIII. ANEXOS

- Artículo: Wang, X., Baloh, R. H., Milbrandt, J. & Garcia, C. (2006). Structure of Artemin Complexed with Its Receptor GFR α 3: Convergent Recognition of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factors. *Structure*. Vol. 14: 1083-1092.

IX. NOTIFICACIONES

Atentamente manifiesto a usted que recibiré notificaciones en la Secretaria de su Despacho o en mi oficina de abogada situada en la Carrera 4ª. No. 72-35, piso 4º, de esta ciudad de Bogotá, D.C.

Señor Superintendente,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

✓ COLO-16793-0841-004-7
SGD\SGD\ID-245042\WPC16793
No. M-2013-245042\SGD

Structure of Artemin Complexed with Its Receptor GFR α 3: Convergent Recognition of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factors

Xinquan Wang,¹ Robert H. Baloh,² Jeffrey Milbrandt,³ and K. Christopher Garcia^{1,*}

¹Howard Hughes Medical Institute
Stanford University School of Medicine
Departments of Microbiology and Immunology,
and Structural Biology

Stanford, California, 94305-5124

²Department of Neurobiology
Washington University School of Medicine
St. Louis, Missouri 63110

³HOPE Center for Neurological Disorders
Departments of Pathology and Neurology
Washington University School of Medicine
St. Louis, Missouri 63110

Summary

Artemin (ARTN) is a member of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands (GFLs) which regulate the development and maintenance of many neuronal populations in the mammalian nervous system. Here we report the 1.92 Å crystal structure of the complex formed between ARTN and its receptor GFR α 3, which is the initiating step in the formation of a ternary signaling complex containing the shared RET receptor. It represents a new receptor-ligand interaction mode for the TGF- β superfamily that reveals both conserved and specificity-determining anchor points for all GFL–GFR α pairs. In tandem with the complex structure, cellular studies using receptor chimeras implicate dyad-symmetric composite interfaces for recruitment and dimerization of RET, leading to intracellular signaling. These studies should facilitate the functional dissection of the specific versus pleiotropic roles of this system in neurobiology, as well as its exploitation for therapeutic applications.

Introduction

The glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands (GFLs) include GDNF (Lin et al., 1993), neurturin (NRTN) (Kotzbauer et al., 1996), persephin (PSPN) (Milbrandt et al., 1998), and artemin (ARTN) (Baloh et al., 1998). GFLs play critical roles in supporting the development and survival of distinct sets of central and peripheral neurons (Airaksinen and Saarma, 2002; Baloh et al., 2000a). The potent neurotrophic activities of GFLs have stimulated interest in their use as therapeutic agents for the treatment of neurodegenerative diseases such as Parkinson's. GDNF, the founding member in the family, has shown antiparkinsonian actions in various animal models and pilot studies with human patients (Gill et al., 2003; Grondin and Gash, 1998; Slevin et al., 2005). ARTN has been shown in recent studies to be effective as a systemic treatment for neuropathic pain

(Gardell et al., 2003). Given the importance of GFLs in basic neurobiology and their potential therapeutic value, it has become a compelling goal to understand the molecular basis of the interactions between GFLs and their receptors.

GFLs belong to the transforming growth factor β (TGF- β) family because of the conserved seven cysteine residues and structural similarities, but they are different from other members in the signaling pathway (Saarma, 2000). Unlike other members in the TGF- β family (TGF- β s, BMPs, Activins, etc.) which signal through direct engagement of two different types of serine/threonine receptor kinases (Massague and Chen, 2000), GFLs exert their activities through the nucleation of a ternary complex containing a nonsignaling, ligand-specific GFR α receptor and a signaling and shared tyrosine kinase receptor RET (Durbec et al., 1996; Treanor et al., 1996; Trupp et al., 1996; Worby et al., 1996). One widely accepted model is that GFL first binds its preferential GFR α receptor. This binary complex, then, recruits RET through the formation of a composite GFL/GFR α interface, which triggers the activation of the intracellular tyrosine kinase domain (Airaksinen et al., 1999). The GFR α receptors contain three cysteine-rich repeats that appear to mark distinct extracellular domains (D1, D2, and D3). Four different GFR α receptors (GFR α 1–4) have been identified (Baloh et al., 1998; Buj-Bello et al., 1997; Enokido et al., 1998; Jing et al., 1996), and it is now established that GFR α 1 binds preferentially to GDNF, GFR α 2 to NRTN, GFR α 3 to ARTN, and GFR α 4 to PSPN (Airaksinen et al., 1999).

The protein fold of GDNF is a canonical “cystine-knot” motif, formed by a hallmark pattern of seven cysteine residues within the primary sequence, and one inter-chain disulfide bond linking two GDNF monomers to form a homodimer (Eigenbrot and Gerber, 1997; Sun and Davies, 1995). The structure of a single unliganded domain corresponding to the third cysteine-rich repeat (D3) of GFR α 1 has been reported, which did not possess ligand binding activity, but from which the GDNF interactions were modeled (Leppanen et al., 2004). In order to begin to elucidate the molecular basis of GFL receptor recognition and activation, we report here the crystal structure of ARTN bound to the ligand binding domains of GFR α 3, together with cellular studies that collectively point to a convergent binding and activation mode between GFL and their receptors across this important neurotrophic factor family.

Results

Biochemical Studies and Structure Determination

A soluble ectodomain of human GFR α 3 (D1D2D3) (residues 32–363) with a C-terminal hexa-histidine tag, and human ARTN (residues 139–237) without His-tag were coexpressed in insect cells. Gel filtration chromatography of the Nickel-agarose captured material resolved a major peak consisting of the ARTN–GFR α 3 complex, followed by excess GFR α 3 (Figure 1A). The molecular weight of the ARTN–GFR α 3 complex determined by

*Correspondence: kcgarcia@stanford.edu

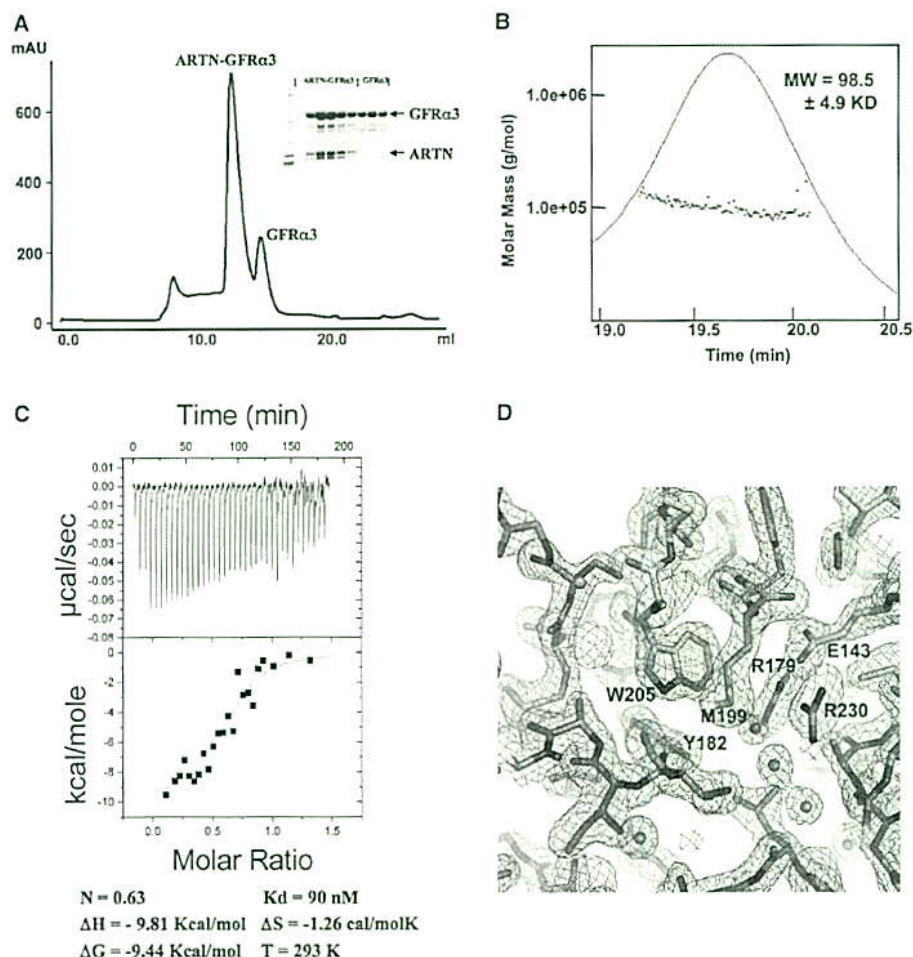


Figure 1. Biochemical and Structural Characterization of the ARTN-GFR α 3 Complex

(A) Gel filtration analysis of the ARTN-GFR α 3 (D1D2D3) complex. ARTN without hexa-histidine tag copurifies with GFR α 3 molecules containing hexa-histidine tag.
(B) Measurement of the molecular weight of the ARTN-GFR α 3 (D1D2D3) complex by multiangle laser light scattering (MALS). The measured 98.5 kDa molecular weight is consistent with the 1:2 stoichiometry in the ARTN-GFR α 3 complex (calculated MW = 97.2 kDa).
(C) Isothermal titration calorimetry (ITC) of GFR α 3 receptor with ARTN. The N value of 0.63 indicates a 1:2 stoichiometry of one ARTN dimer binding to two GFR α 3 monomers. The theoretically correct value of N = 0.5 is in practice difficult to obtain due to the slight imprecision in protein concentration measurements using different methods. The affinity value of K_d = 90 nM compares to the affinity of ARTN for GFR α 3 measured on cells giving a K_d = 1–10 nM. The lower affinity is what is commonly observed when receptor affinities are measured with soluble molecules in a free solution state compared to the receptors being constrained to the cell surface. In the solution state, there is a rigid body entropy penalty (rotation and translation) that results in a reduction in the observed binding free energy.
(D) A representative electron density map (SIGMAA 2Fo-Fc, 1.2 σ) around residues Trp 205 and Met 199 in the ARTN/GFR α 3 binding interface. Several water molecules mediate hydrogen bonds at the perimeter of the interface, but there are no buried waters within the tightly packed core.

multiangle laser light scattering (MALS) is 98.5 kDa (Figure 1B), indicating the complex consists of two receptor molecules and one ARTN homodimer. The 1:2 stoichiometry was further validated by isothermal titration calorimetry (Figure 1C), which indicated that the complex is composed of one ARTN homodimer and two GFR α 3 (D1D2D3) receptors.

During crystallization, the GFR α 3 N-terminal domain (D1) was spontaneously proteolyzed by remaining trace quantities of proteases after purification. This digestion resulted in the formation of crystals containing a complex consisting of the GFR α 3 D2D3 domains (residues 146–363) and one ARTN homodimer, which was confirmed by N-terminal sequencing of washed crystals.

That D1 is dispensable for ARTN-GFR α 3 complex formation is consistent with previous findings that GFR α 4 as well as some isoforms of GFR α 2 do not contain a D1, indicating it is not required for GFL binding or recruitment of RET (Airaksinen et al., 1999; Scott and Ibanez, 2001). A combination of heavy atom phasing and molecular replacement methods were used to determine the complex structure at 1.92 Å resolution, as well as two different unbound ARTN structures at resolutions of 1.76 Å and 2.6 Å, respectively (Figure 1D and Table 1).

Overall Structure of the ARTN-GFR α 3 Complex

The complex consists of a single ARTN homodimer together with two GFR α 3 D2D3 molecules in a 1:2

Table 1. Crystallographic Statistics

	GFR α 3-ARTN complex	ARTN (form 1)	ARTN (form 2)	ARTN derivative (Hg)
Data collection^a				
Space group	P2 ₁	P6 ₅ 22	P6 ₅	P6 ₅
Cell dimensions				
a, b, c (Å)	73.7, 41.5, 119.9	47.9, 47.9, 190.1	94.2, 94.2, 219.2	94.4, 94.4, 219.5
α , β , γ (°)	90, 103.6, 90	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120
Resolution (Å)	40.0-1.92	40.0-1.76	40.0-2.60	40.0-2.80
R _{merge}	8.1 (51.5)	7.4 (54.8)	8.8 (59.4)	6.6 (33.3)
I / σ I	21.0 (3.0)	42.5 (2.4)	24.2 (2.9)	20.7 (3.0)
Completeness (%)	98.9 (98.5)	89.4 (96.4)	99.8 (100)	99.3 (97.1)
Redundancy	11.8	21.2	18.0	9.2
Refinement				
Resolution (Å)	50.0-1.92	50-1.76	50-2.6	
No. reflections	54357	13670	33810	
R _{work} / R _{free}	21.9/26.6	23.9/25.5	30.8/35.3	
No. atoms				
Protein	4574	736	4416	
Water	236	113		
Carbohydrate	61			
B-factors				
Protein	37.3	38.1	43.9	
Water	39.2	41.3		
Carbohydrate	42.4			
Rms deviations				
Bond lengths (Å)	0.021	0.016	0.04	
Bond angles (°)	1.82	1.78	3.24	

^a Number in the parentheses are statistics for the highest resolution shell.

stoichiometry (Figures 2A and 2B). One symmetric ARTN dimer binds two GFR α 3 molecules at each of its two distal tips, resulting in the complex spanning ~130 Å in the dimension parallel to the cell membrane (Figure 2A). The noncrystallographic 2-fold related halves of the complex are highly similar to each other (Figure 2B), being related by a rotation of ~179° and with a root-mean-square difference (rmsd) of ~0.6 Å for 298 C α positions.

ARTN Homodimer

ARTN is a homodimer in which the two monomers are assembled in a “tail-to-head” fashion, linked by an inter-chain disulfide bond (Figures 2A and 2B). The ARTN monomer structure is composed of two β sheet fingers, a cystine-knot core motif, and an α -helical heel region. The finger 1 is composed of two long continuous anti-parallel β strands, and finger 2 has interruptions in the middle, resulting in five relatively short β strands in the β sheet. In the dimer, the helix in the heel region of one ARTN monomer contacts the finger region of another monomer with its helical axis nearly perpendicular to the β strands (Figures 2A and 2B). The structure of ARTN bound to GFR α 3 is very similar to the two unbound structures, as reflected in the rmsd of ~1 Å for C α superimposition in both monomer and dimer levels. Structural comparison of ARTN with GDNF shows an approximate 20° difference in the angle between the finger and heel regions, which results in poor monomer superimposition (~7 Å rmsd) and different homodimer orientations (Figures S1B and S1C; see the Supplemental Data available with this article online).

GFR α 3 “D2D3” Module

The compact globular structure of the GFR α 3 D2D3 fragment was unexpected based on speculation that the GFR α fold into three independent domains (Leppanen et al., 2004). Instead, the “D2D3” modules are closely packed together, with each cysteine-rich repeat domain contributing five α helices (α 1– α 5 for D2, α 6– α 10 for D3) that then stack in two roughly triangular spirals (Figure 2C). The interface between the two domains forms a large hydrophobic core between the outermost helices (α 3 and α 4) of the D2 domain with the innermost helices (α 8, α 10 and α 8– α 9 linker) of the D3 domain, respectively. The residues involved in the hydrophobic interactions include Leu200, Phe204, Leu216, Leu217, Leu289, Tyr292, Leu293, Ile296, Phe304, and Ile345, which are highly conserved in all GFR α receptors. The disulfide-bond pattern is very similar in both D2 and D3, which has five disulfide bonds distributed at the three corners of the triangular spiral to fix the scaffold (Figure 2C). There are no disulfide bonds in the interface between D2 and D3. Considering that all cysteine residues in the disulfide-bonds are conserved across the GFR α family and the correspondence of GFR α 3 D3 to the isolated GFR α 1 D3 domain previously solved (rmsd of ~0.6 Å for 62 C α atoms in the helical region) (Leppanen et al., 2004) (Figure S1A; see the Supplemental Data available with this article online), we believe that other GFR α receptors will have similar architectures.

Overview of the ARTN/GFR α 3 Binding Interface

The interaction of ARTN with GFR α 3 occurs through the protruding tips of fingers 1 and 2 in ARTN inserting into a pocket in the center of a triangle of α helices in the D2 domain of GFR α 3 (Figure 3A). The D3 domain has no

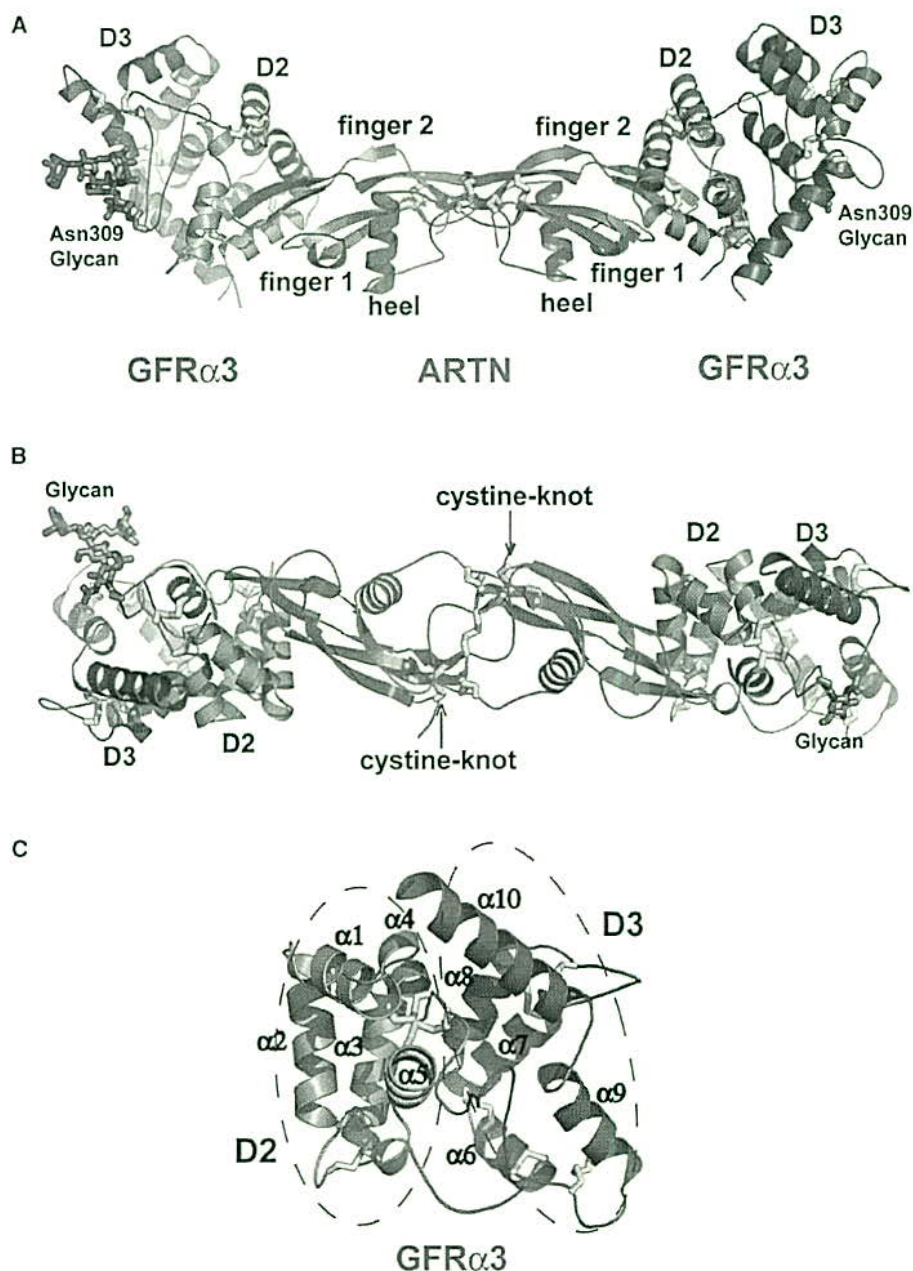


Figure 2. Overall Structure of Artemin Complexed with GFR α 3

In (A), the view is approximately parallel to where a cell membrane would lie underneath the complex, in (B) the view is from above, looking down on the complex with membrane underneath (approximately a 90° rotation of the complex in (A) toward the reader. One ARTN dimer (monomers in cyan and green) binds two GFR α 3 receptors. The observed N-linked carbohydrates at Asn309 position of GFR α 3 are shown as sticks in dark blue.

(C) The stacked D2 and D3 subdomains in the GFR α 3 receptor "D2D3" module. The D2 is shown in deep salmon color, while the D3 is shown in red. Disulfide bonds are shown in yellow. The program PyMol (DeLano, 2002) was used to make all the following figures.

interaction with ARTN. The role of the D3 domain appears to be to stabilize the D2 domain, in contrast to speculation that it forms direct ligand contacts (Leppanen et al., 2004). As a result of complex formation, 16 residues from ARTN and 19 residues from GFR α 3 bury a total of ~1500 Å² surface (Figures 3C and 3D; also see Table S1 in the Supplemental Data available with

this article online). The interface between ARTN and GFR α 3 can be described as a small hydrophobic core surrounded by a much larger halo of charged and hydrophilic interactions (Figures 3C and 3D), consistent with our thermodynamic measurements indicating that binding is enthalpy driven, which is usually a signature for polar and charged interactions (Figure 1C) (Carneiro

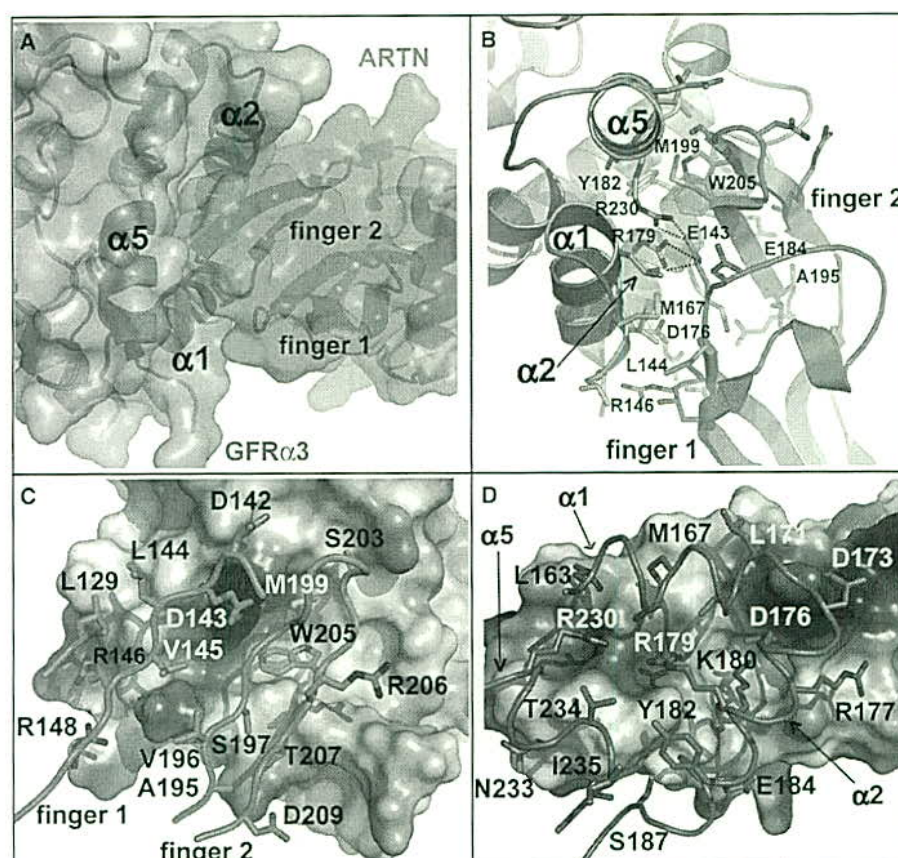


Figure 3. Ligand-Receptor Contacts between Artemin and GFR α 3
(A) Molecular surfaces highlight the knob-in-hole complementarity between the protruding ARTN finger region (cyan) and the recessed center of a triangular spiral of α helices in GFR α 3 D2 (deep salmon) formed by helices α 1, α 2, and α 5.
(B) Interatomic contacts between ARTN and GFR α 3, with the hydrophobic core of ARTN surrounded by a halo of polar interactions.
(C) Electrostatic footprints and complementarity of buried residues of ARTN on top of the GFR α 3 surface.
(D) Electrostatic footprints and complementarity of buried residues of GFR α 3 on top of the ARTN surface.

et al., 2002; He et al., 2001). Both apolar and polar segments in ARTN/GFR α 3 contact interface contain conserved residues in GFLs and GFR α receptors. These conserved residues clearly serve as the common anchor points in all GFL–GFR α pairs, which are then surrounded by specificity determinants unique to each GFL–GFR α pair.

Conserved Hydrophobic and Hydrophilic Interactions

The protruding hydrophobic core at the ARTN fingertips, composed of Trp205 and Met199 (Figure 3B), is highly conserved in other GFLs (Figures 4A and 4B). It is structurally and chemically matched on the complementary GFR α 3 surface formed by a recessed ring of exposing residues including Arg179, Tyr182, Gly183, Arg230, and Ala236 (Figure 4B). The main contact hydrophobic residue Tyr182 in GFR α 3 is strictly conserved, and hydrophobic positions Gly183 and Ala236 are also replaced by hydrophobic residues in other GFR α receptors (Figure 4C). Upon complex formation, Trp205 and Met199 from ARTN undergo large sidechain movements and bury ~28% of the total surface area in the interface

(Figure 3C; also see Figure S1D in the Supplemental Data available with this article online). Underscoring the importance of Trp205 and Met199 positions, their mutations in GDNF result in a complete loss of binding activity for GFR α 1 (Eketjall et al., 1999).

The majority of the ARTN/GFR α 3 interface is formed by several patches of matching complementary charge (Figures 3C and 3D). The conserved hydrophilic patch involves salt bridges between residue Glu143 from ARTN and residues Arg179 and Arg230 in GFR α 3 (Figure 3B), which are strictly conserved in all GFR α receptors (Figure 4C). Glu143 is also strictly conserved in all GFLs (Figure 4A) and is one of the most important binding determinants for the interactions between GDNF and GFR α 1 (Eketjall et al., 1999). We therefore speculate that these two binding epitopes, one hydrophobic and one charged, constitute “anchor” points for GFLs interactions with their GFR α receptors.

GFL-GFR α Specificity Determinants

We also find three epitopes in the ARTN-GFR α 3 complex that are potential determinants of specificity between GFLs and their preferential GFR α receptors. The

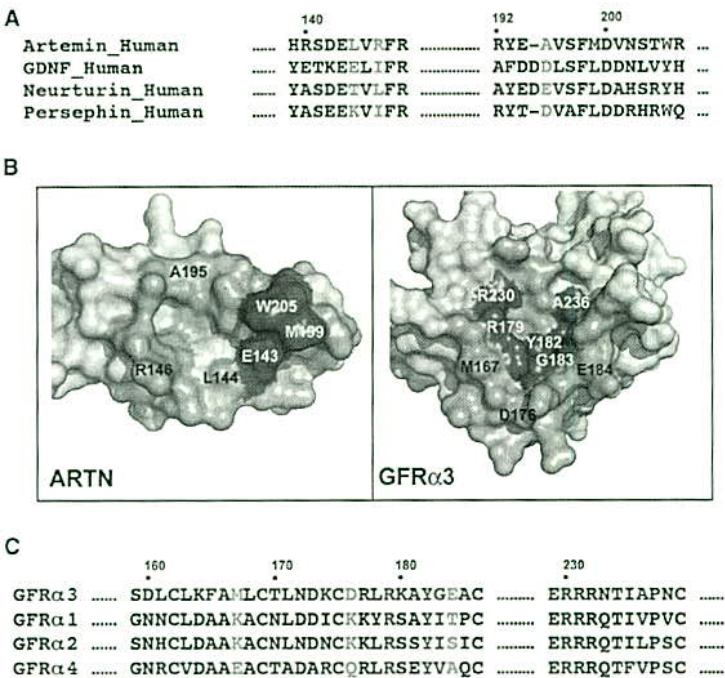


Figure 4. Conservation of Shared and Specific Ligand-Receptor Anchor Points across the GDNF Family Ligands and Receptors

(A) Sequence alignment of GFL around the region of receptor contact. The more conserved positions are colored in blue, while the more variable ligand-specific residues are colored in green to correspond with the coloring of the "open-book" surface representation, shown in panel (B) of the ARTN/GFRα3 interface.

(B) Common binding residues are colored in blue, and ligand-receptor specific residues are colored green on a background of the total buried surface (gray). ARTN is in the left panel and GFRα3 in the right panel.

(C) Sequence alignment of GDNF α receptors (GFRα) around the region of ligand contact. As for (A), the conserved positions are colored in blue, while the variable ligand-specific residues are colored in green.

first is a van der Waals interaction between positions Ala195 (ARTN) and Glu184 (GFRα3) (Figure 3B). The other three GFLs, GDNF, NRTN, and PSPN, have negatively charged residues (Asp or Glu) at position 195 (Figure 4A), and we expect that the repulsion from Asp-Glu or Glu-Glu would not favor the binding of GDNF, NRTN, and PSPN with GFRα3. Their preferential receptors GFRα1, GFRα2, and GFRα4 have small neutral residues at position 184 instead of a negatively charged residue (Figure 4C). A patch of complementary charge between Arg146 of ARTN and Asp176 of GFRα3 is another potential specificity determinant (Figure 3B). Receptors GFRα1 and GFRα2 both have Lys instead of Asp at position 176 (Figure 4C), which would result in repulsion by an Arg-Lys interaction in a mismatched ligand-receptor pair. The last potential determinant is a hydrophobic contact between Leu144 of ARTN and

Met167 in GFRα3 (Figure 3B). The corresponding residues found at position 144 in GDNF, NRTN, and PSPN are Glu, Thr, and Lys, respectively, that match with Lys, Lys, and Glu, respectively, at position 167 in GFRα1, GFRα2, and GFRα4 (Figures 4A and 4C). These charge reversals would then be repulsive in mismatched complexes (GDNF-GFRα4, PSPN-GFRα1, and PSPN-GFRα2).

To probe the importance of the D2D3 region of GFRα3 for interaction with artemin as well as RET, we generated mutant chimeric receptors between GFRα2 and GFRα3 and directly test their ability to form functional ternary receptor signaling complexes in response to NRTN and ARTN, respectively (Figure 5). The experiment was done by transiently transfecting the chimeric receptor together with Gal4-Elk1/Gal4-luciferase reporter system into fibroblasts that stably express RET. This system,

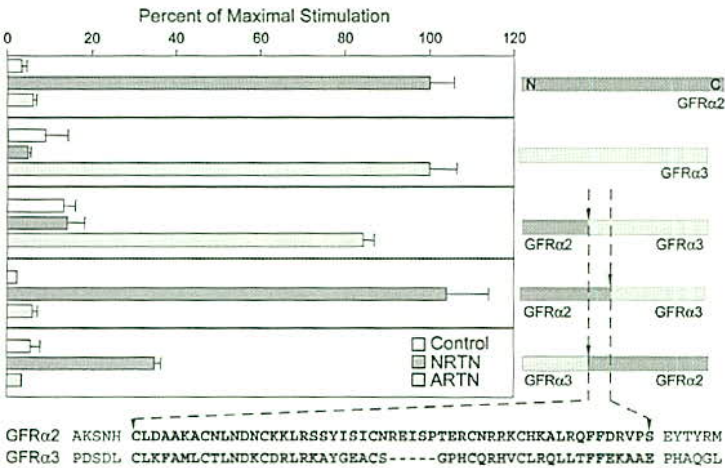


Figure 5. Functional Demonstration that Receptor Specificity for GFL Is Dictated by the D2 Domain

Substitution of GFRα3 D2 domain with that of GFRα2 results in conversion to NRTN specificity, while substitution of GFRα2 D2 domain with that of GFRα3 results in conversion to ARTN specificity. NIH-3T3 fibroblasts stably expressing human RET were transfected with the indicated construct, together with the Gal4-Elk1 fusion and a Gal4-luciferase reporter. Cells were deprived of serum, and stimulated with 50 ng/mL of the indicated ligand for 6 hr. Experiments were done in triplicate, and normalized to the response to the preferred ligand (ARTN for GFRα3, and NRTN for GFRα2). The residues in bold below correspond to the region conferring ligand specificity.

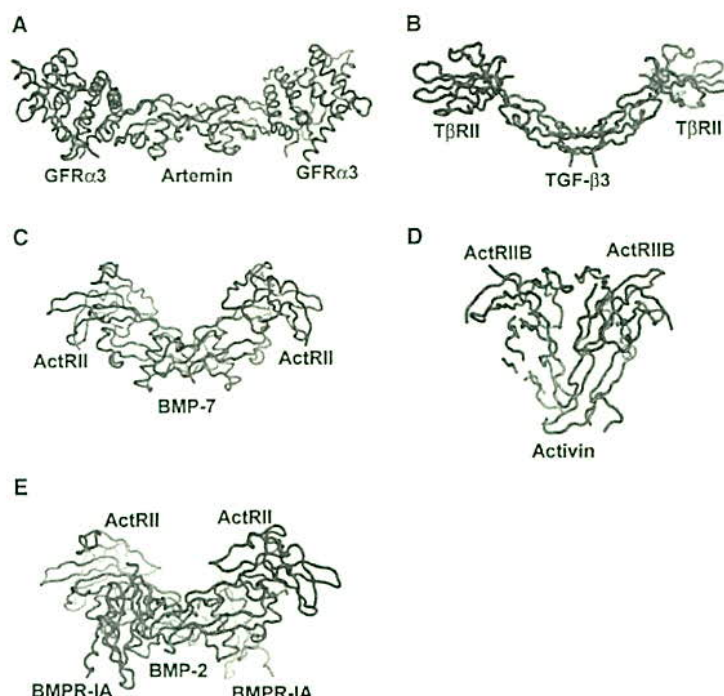


Figure 6. Diversity of Receptor-Ligand Docking Modes in the TGF- β Superfamily

Each of the complexes are shown in approximately similar orientations with respect to the ligand, and the cell membrane would lie underneath the complexes. (A) Artemin bound to GFR α 3; (B) TGF- β 3 bound to T β RII; (C) BMP-7 bound to ActRII; (D) Activin bound to ActRIIB; (E) BMP-2 bound to ActRII and BMPRII.

which utilizes the ability of the Gal4-Elk1 fusion protein to respond to MAP kinase activity and activate transcription of the Gal4-luciferase reporter, has been used previously to monitor NGF-TrkA activation of MAP kinase in PC12 cells and GDNF-RET activation of MAP kinase in neuroblastoma cell lines (Worby et al., 1996; York et al., 1998). As expected, wild-type GFR α 2 responded only to NRTN, and GFR α 3 only to ARTN. A chimeric GFR α containing N-terminal GFR α 2 (Ser22 to His160) together with C-terminal GFR α 3 (Cys162 to Asn374) responded only to ARTN. In contrast, a chimera containing N-terminal GFR α 2 (Ser22 to Ser213) with C-terminal GFR α 3 (Pro210 to Asn374) responded only to NRTN, indicating that residues involved in ligand specificity lie between Cys162 and Glu209, in the D2 region of GFR α 3. Confirming this, an additional chimera with N-terminal GFR α 3 (Gly31 to Pro157) fused with C-terminal GFR α 2 (Glu214 to Gln374), in which the D2 region was derived from GFR α 2, maintained responsiveness only to NRTN. Therefore, these functional receptor studies indicate that the ligand specificity is dictated by the stretch of residues from Cys162 to Glu209, which is the major region of GFR α 3 contacting ARTN in our structure.

Discussion

The activated receptor complexes of GFLs consist of the shared signaling tyrosine kinase receptor RET and ligand-specific nonsignaling GFR α coreceptors (Airaksinen and Saarma, 2002). This receptor composition is unique in the TGF- β superfamily, because other members, such as BMPs, Activins, and TGF- β s, have two different types of serine/threonine receptor kinases (Massague and Chen, 2000). Previous studies have revealed the complex structures of BMPs, Activins, and

TGF- β s with their receptors, which all have one single β sheet fold in the receptor ectodomain (Figures 6B–6E) (Allendorph et al., 2006; Greenwald et al., 2003; Greenwald et al., 2004; Hart et al., 2002; Kirsch et al., 2000; Thompson et al., 2003). Our ARTN–GFR α 3 complex structure adds a new ligand-receptor binding mode in the TGF- β superfamily because the GFR α 3 ectodomain has multiple domains mainly composed of α helices. Although still substantially different, the overall docking mode of ARTN with GFR α 3 is most similar to that seen in the TGF- β 3–T β RII complex (Figures 6A and 6B) (Hart et al., 2002), which also uses the ligand fingertips to engage receptor. Structural comparison of the ligand-receptor complexes in the TGF- β superfamily also shows different intermonomer angles in the homodimeric ligands (Figures 6A–6E). Such homodimeric structural flexibility has been proposed to be a potential mechanism of receptor signaling modulation (Greenwald et al., 2004; Thompson et al., 2003). Variable homodimer orientations have also been observed between ARTN and GDNF (Figure S1C; see the Supplemental Data available with this article online), and we propose that it would result in different relative orientations of two RET molecules in the ternary signaling complex, potentially influencing the activation of its intracellular kinase domains.

GFL must engage GFR α in order to recruit the shared tyrosine kinase receptor RET (Airaksinen and Saarma, 2002), suggesting that RET recognizes a composite surface formed by the conjunction of GFL and GFR α receptor (Scott and Ibanez, 2001; Trupp et al., 1998). Alternatively, ligand capture by GFR α on the membrane may increase the effective concentration of GFL at the cell surface for presentation to RET through a noncomposite RET binding surface on GFL, or the GFL binding will induce the conformational changes of the noncomposite

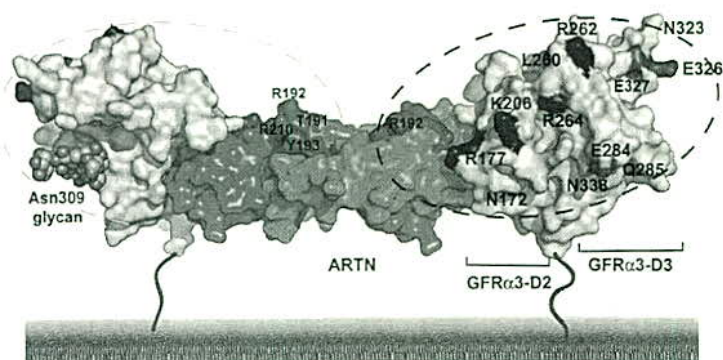


Figure 7. Putative RET Binding Surface on the Artemin-GFR α 3 Complex

The 2-fold related potential RET binding sites are circled in dotted lines. Colored and labeled residues are conserved in GFR α receptors and surface-exposed in the GFR α 3 structure. The magenta patch in ARTN are the corresponding regions found in GDNF to be important for RET activation.

RET binding surface on GFR α . The RET binding region of GFR α 1 has been delimited to a region analogous to the GFR α 3 "D2D3" module described here (Scott and Ibanez, 2001). Given the shared usage of RET by all GFL-GFR α complexes, the RET binding surface on GFR α may be conserved. We found 12 conserved GFR α residues that map onto an exposed face, involving both D2 and D3, on one side of GFR α 3 in the complex, thereby defining a potential RET binding site (Figure 7). Most of these conserved residues are charged, which is consistent with homolog-scanning mutagenesis of RET, indicating that charged residues in the first cadherin-like domain of RET are important for formation of GDNF-GFR α 1-RET complex (Kjaer and Ibanez, 2003). We propose that this face of GFR α 3 forms part of the RET binding surface and includes residues from helices α 2, α 3, α 7, α 8, α 9, and α 10. This RET binding surface would be located adjacent to the two bottom fingers in ARTN (magenta highlighted in Figure 7), which could form part of the composite RET interaction surface. These ARTN residues do not interact with GFR α 3; however, they are located within a region previously shown using GFL homolog scanning mutagenesis to be essential for RET activation (Baloh et al., 2000b). Although there are several conserved residues on the opposite face of GFR α 3, it is less likely to serve as the RET binding surface due to the presence of a bulky Asparagine (309)-linked glycan prominently in the middle of the region of possible interaction (Figure 7). The two potential RET binding surfaces we proposed here are related by the intrinsic 2-fold symmetry and also angled toward one another in roughly a V-shape, such that two RET molecules, if bound along the approximate long axis of the GFR α , would be steered into closer apposition as it enters the cell membrane, resulting in reduced proximity of their intracellular kinase domains.

Experimental Procedures

Protein Preparation

Proteins used in this study were expressed using the Baculovirus system (Pharmingen) in insect cells. Briefly, insect *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells were used for generating high titer recombinant virus and were cultured at 28°C using SF900 II SFM medium (Invitrogen). *Trichopulsia ni* (High-Five) cells (Invitrogen) were used to express the recombinant protein and were grown in Insect Xpress medium (Cambrex) at 28°C. Human GFR α 3 ectodomain (residues Asp32-Pro363) with C-terminal hexa-histidine and the N-terminal truncated human ARTN (Gly139-Gly237) were cloned into the pAcgp67A vector (Pharmingen). The ARTN-GFR α 3 complexes

were obtained by coexpression in High-Five cells and purified by Ni-NTA, FPLC Superdex 200 size exclusion, and Mono S ion-exchange columns (Pharmacia). Unbound ARTN was also expressed in High-Five cells and purified by Ni-NTA and Superdex 200 size exclusion column.

Crystallization and Data Collection

Crystals of ARTN-GFR α 3 complex were grown by hanging-drop vapor diffusion at 20°C. The well solution contained 0.1 M Imidazole (pH 8.0), 20% (v/v) ethanol, and 0.1 M MgCl₂. The crystals grew to a maximum size of 0.2 × 0.1 × 0.05 mm³ over the course of 15–20 days. The crystals belong to the P2₁ space group and contain one full complex per asymmetric unit. Two different forms of ARTN crystals (spacegroup P6₅22 and P6₅, respectively) were obtained at 20°C with hanging-drop vapor diffusion method. One was grown with the well solution of 0.1 M Hepes (pH 7.5), 12%–16% (w/v) PEG3350, and 0.1 M MgCl₂, the other one with the well solution of 0.1 M Bis-Tris propane (pH 7.0) and 3 M NaNO₃. All data were collected at Advanced Light Source (UC Berkeley) and Stanford Synchrotron Radiation Laboratory. The data sets were collected at 100 K and processed using HKL2000 software suite (Otwinowski and Minor, 1997). More statistics of crystal and data collection are in Table 1.

Structure Determination and Refinement

The structure of unbound ARTN was first determined by single isomorphous replacement with anomalous scattering (SIRAS) method with a mercury derivative in P6₅ form, which has three dimers in the asymmetric unit. The derivative was prepared by soaking a single crystal in the mother liquor containing 100 mM Thimerosal for 1 hr. The heavy atom binding sites were determined with SHELXD (Schneider and Sheldrick, 2002). The initial phases were calculated in SHARP (de la Fortelle and Bricogne, 1997) and improved with SOLOMON (Abrahams and Leslie, 1996). The ARTN model from P6₅ form was used to determine its structure in P6₅22 form (one monomer per asymmetric unit) with PHASER (Read, 2001). The structure of the ARTN-GFR α 3 complex was determined by the molecular replacement method with our ARTN and GFR α 1 D3 domain structures (PDB ID: 1Q8D) as the search models. Program PHASER (Read, 2001) was used to locate the positions of one ARTN dimer and two GFR α 3 D3 domains in the complex. After density improvement with ARP/wARP (Perrakis et al., 1999), the residues in the D2 domain were built into the map by using COOT (Emsley and Cowtan, 2004). All structures were refined with CNS (Brunger et al., 1998) and REFMAC (CCP4 package) (Murshudov et al., 1997). Structure determination and refinement statistics are listed in Table 1.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and Multiangle Light Scattering (MALS)

Calorimetry titrations were carried out on the VP-ITC calorimeter (MicroCal) at 20°C, with 15 μ M GFR α 3 titrated against 2.5 μ M ARTN dimer. Both GFR α 3 and ARTN were prepared in a buffer containing 0.01 M Hepes (pH 7.2) and 0.5 M NaCl. The data were processed with the MicroCal Origin 7.0 software. A DAWN EOS (Wyatt Technology) equipped with a K5 flow cell and a 30 mW linearly polarized GaAs laser of wavelength 690 nm was used in MALS experiment. Data analysis was carried out real time using ASTRA (Wyatt

Technologies) and molecular weight was calculated using the Debye fit method.

Receptor Activation Assays

They were performed as described previously (Baloh et al., 2000b). Briefly, 3T3 fibroblasts stably expressing human RET were plated at 85,000 cells/well in 12-well plates and transfected using Superfect (Qiagen) with the reporter plasmids (250 ng/well Gal4-Luc, 50 ng/well Gal4-Elk), CMV-lacZ (50 ng/well) for transfection normalization, a CMV-GFR α (500 ng/well) expression plasmid, and 650 ng/well pBluescript as a carrier for a total of 1.5 μ g of DNA/well. Cells were switched to 0.5% serum-containing medium the morning after transfection, stimulated for 6 hr with 50 ng ml⁻¹ of recombinant artemin or neurturin, and harvested 36 hr after transfection. The average luciferase activity of triplicate samples was normalized to β -galactosidase activity of the cotransfected lacZ reporter to control for transfection efficiency.

Supplemental Data

Supplemental data including a supplemental figure and table are available at <http://www.structure.org/cgi/content/full/14/6/1083/DC1/>.

Acknowledgments

We thank N. Goriatcheva and D. Waghay for expert technical assistance, S. Juo and S. Laporte for assistance with data collection, F. Bazan for critical reading of the manuscript, S. Jain for the image of RET-GFP neurons, C. Ibanez for the gift of GFR α 3 DNA, A. Bankovich for help in biophysical experiments, and M. Rickert for help in making figures. This work was supported by NIH grants AG13730 and NS39358 (J.M.), The Keck Foundation (KCG), NIH RO1 HL077325 (KCG), The Christopher Reeve Paralysis Foundation (KCG), and The Howard Hughes Medical Institute (KCG).

Received: May 11, 2006

Revised: May 17, 2006

Accepted: May 17, 2006

Published: June 13, 2006

References

- Abrahams, J.P., and Leslie, A.G. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 52, 30–42.
- Airaksinen, M.S., and Saarma, M. (2002). The GDNF family: signaling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–394.
- Airaksinen, M.S., Titievsky, A., and Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 313–325.
- Allendorph, G.P., Vale, W.W., and Choe, S. (2006). Structure of the ternary signaling complex of a TGF- β superfamily member. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7643–7648.
- Baloh, R.H., Tansey, M.G., Lampe, P.A., Fahrner, T.J., Enomoto, H., Simburger, K.S., Leitner, M.L., Araki, T., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (1998). Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFR α 3-RET receptor complex. *Neuron* 21, 1291–1302.
- Baloh, R.H., Enomoto, H., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (2000a). The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 103–110.
- Baloh, R.H., Tansey, M.G., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (2000b). Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands and production of GFR α 1 RET-specific agonists. *J. Biol. Chem.* 275, 3412–3420.
- 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, 905–921.

Buj-Bello, A., Adu, J., Pinon, L.G., Horton, A., Thompson, J., Rosenthal, A., Chinchetru, M., Buchman, V.L., and Davies, A.M. (1997). Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 387, 721–724.

Carneiro, F.A., Bianconi, M.L., Weissmuller, G., Stauffer, F., and Da Poian, A.T. (2002). Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions. *J. Virol.* 76, 3756–3764.

de la Fortelle, E., and Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.* 276, 472–494.

DeLano, W.L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System (San Carlos, CA: DeLano Scientific).

Durbec, P., Marcos-Gutierrez, C.V., Kilkenny, C., Grigoriou, M., Wartiovaara, K., Suvanto, P., Smith, D., Ponder, B., Costantini, F., Saarma, M., et al. (1996). GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381, 789–793.

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, 435–438.

Eketjall, S., Fainzilber, M., Murray-Rust, J., and Ibanez, C.F. (1999). Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFR α 1 and activation of the GFR α 1-c-Ret receptor complex. *EMBO J.* 18, 5901–5910.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.

Enokido, Y., de Sauvage, F., Hongo, J.A., Ninkina, N., Rosenthal, A., Buchman, V.L., and Davies, A.M. (1998). GFR α -4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin. *Curr. Biol.* 8, 1019–1022.

Gardell, L.R., Wang, R., Ehrenfels, C., Ossipov, M.H., Rossomando, A.J., Miller, S., Buckley, C., Cai, A.K., Tse, A., Foley, S.F., et al. (2003). Multiple actions of systemic artemin in experimental neuropathy. *Nat. Med.* 9, 1383–1389.

Gill, S.S., Patel, N.K., Hotton, G.R., O'Sullivan, K., McCarter, R., Bunage, M., Brooks, D.J., Svendsen, C.N., and Heywood, P. (2003). Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat. Med.* 9, 589–595.

Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., and Choe, S. (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol. Cell* 11, 605–617.

Greenwald, J., Vega, M.E., Allendorph, G.P., Fischer, W.H., Vale, W., and Choe, S. (2004). A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF- β family receptors. *Mol. Cell* 15, 485–489.

Grondin, R., and Gash, D.M. (1998). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 245, 35–42.

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- β 3 complex. *Nat. Struct. Biol.* 9, 203–208.

He, X., Chow, D., Martick, M.M., and Garcia, K.C. (2001). Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. *Science* 293, 1657–1662.

Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P.L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., et al. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 85, 1113–1124.

Kirsch, T., Sebald, W., and Dreyer, M.K. (2000). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat. Struct. Biol.* 7, 492–496.

Kjaer, S., and Ibanez, C.F. (2003). Identification of a surface for binding to the GDNF-GFR α 1 complex in the first cadherin-like domain of RET. *J. Biol. Chem.* 278, 47898–47904.

Kotzbauer, P.T., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Golden, J.P., Creedon, D.J., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384, 467–470.

- Leppanen, V.M., Bespalov, M.M., Runeberg-Roos, P., Puurand, U., Merits, A., Saarma, M., and Goldman, A. (2004). The structure of GFRalpha1 domain 3 reveals new insights into GDNF binding and RET activation. *EMBO J.* 23, 1452–1462.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130–1132.
- Massague, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14, 627–644.
- Milbrandt, J., de Sauvage, F.J., Fahmer, T.J., Baloh, R.H., Leitner, M.L., Tansey, M.G., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Kotzbauer, P.T., Simburger, K.S., et al. (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20, 245–253.
- 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, 240–255.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307–326.
- Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V.S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* 6, 458–463.
- Read, R.J. (2001). Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 1373–1382.
- Saarma, M. (2000). GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur. J. Biochem.* 267, 6968–6971.
- Schneider, T.R., and Sheldrick, G.M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1772–1779.
- Scott, R.P., and Ibanez, C.F. (2001). Determinants of ligand binding specificity in the glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 5. *J. Biol. Chem.* 276, 1450–1458.
- Slevin, J.T., Gerhardt, G.A., Smith, C.D., Gash, D.M., Kryscio, R., and Young, B. (2005). Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosurg.* 102, 216–222.
- Sun, P.D., and Davies, D.R. (1995). The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 269–291.
- 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, 1555–1566.
- Treanor, J.J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D.M., Poulsen, K.T., Beck, C.D., Gray, C., Armanini, M.P., Pollock, R.A., Hefti, F., et al. (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382, 80–83.
- Trupp, M., Arenas, E., Fainzilber, M., Nilsson, A.S., Sieber, B.A., Grioriou, M., Kilkeny, C., Salazar-Gruoso, E., Pachnis, V., and Aru-mae, U. (1996). Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381, 785–789.
- Trupp, M., Raynoschek, C., Belluardo, N., and Ibanez, C.F. (1998). Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Neurosci.* 11, 47–63.
- Worby, C.A., Vega, Q.C., Zhao, Y., Chao, H.H., Seasholtz, A.F., and Dixon, J.E. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 23619–23622.
- York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., and Stork, P.J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622–626.

Accession Numbers

The coordinates have been deposited in the RCSB Protein Data Bank with the accession codes: 2GH0 (ARTN–GFR α 3 complex), 2GYR (ARTN) and 2GYZ (ARTN).