

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion  
der Prodomäne von BMP-2**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

- Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt

von

Silke Kuhfahl

geboren am 14. November 1984 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elisabeth Schwarz
2. Prof. Dr. Andrea Sinz
3. Prof. Dr. Petra Seemann

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.12.2013

Tag der öffentlichen Verteidigung: 11.06.2014

# Inhalt

1. Einleitung .....	1
1.1 <i>Bone morphogenetic proteins</i> (BMPs) .....	1
1.1.1. Strukturmerkmale .....	2
1.1.2. Biogenese der Wachstumsfaktoren .....	4
1.1.3. Biologische Funktionen der BMPs .....	5
1.1.4. Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren .....	6
1.1.5. Proformen und Prodomänen .....	7
1.2 <i>Bone morphogenetic protein</i> (BMP)-2 .....	10
1.2.1. Therapeutisches Potential von BMP-2 .....	12
1.2.2. Die Prodomäne von BMP-2 .....	13
1.3 Zielstellung .....	14
2. Materialien und Methoden .....	16
2.1 Materialien .....	16
2.1.1 Chemikalien .....	16
2.1.2 Standards .....	16
2.1.3 Antibiotika und Enzyme .....	16
2.1.4 Säulen und Säulenmaterialien .....	17
2.1.5 <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )-Stämme .....	17
2.1.6 Plasmide .....	18
2.1.7 Antikörper .....	18
2.1.8 Reagenzien für die Zellkultur .....	18
2.1.9 Zelllinien .....	19
2.1.10 Weitere Materialien .....	19
2.1.11 Geräte .....	20
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	21
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	21
2.2.1.2 Extraktion von Ribonukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen und reverse Transkription .....	21

2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	22
2.2.1.4	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	23
2.2.1.5	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren .....	23
2.2.1.6	Gelextraktion von DNA-Fragmenten .....	26
2.2.1.7	<i>Ligation</i> .....	26
2.2.1.8	Agarose-Gelelektrophorese .....	26
2.2.1.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	27
2.2.1.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	27
2.2.2	Mikrobiologische Methoden und Proteinreinigung .....	27
2.2.2.1	Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.2.2.2	Rekombinante Genexpression .....	28
2.2.3	Proteinchemische Methoden .....	30
2.2.3.1	<i>Inclusion Body</i> (IB)-Präparation .....	30
2.2.3.2	Renaturierung .....	31
2.2.3.3	Proteinreinigung .....	31
2.2.3.4	Fällung von Proteinen .....	32
2.2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	32
2.2.3.6	<i>Western Blot</i> .....	33
2.2.3.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	34
2.2.4	Biophysikalische Methoden .....	35
2.2.4.1	Fluoreszenzspektroskopie .....	35
2.2.4.2	Circulardichroismus .....	35
2.2.4.3	Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge .....	36
2.2.4.4	Analytische Ultrazentrifugation .....	38
2.2.4.5	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) .....	39
2.2.4.6	Oberflächenplasmonresonanz .....	40
2.2.4.7	<i>Microarray</i> .....	41
2.2.4.8	Chemisches <i>cross-linking</i> und Massenspektrometrie .....	41
2.2.5	Zellkultur .....	43
2.2.5.1	Kultivierung mammalischer Zellen .....	43

2.2.5.2	Passagieren von adherenten Zellen.....	43
2.2.5.3	Anlegen von Kryokulturen .....	43
2.2.5.4	Transiente Transfektion mammalischer Zellen.....	44
2.2.5.5	Konzentrationsbestimmung von BMP-2 im Kulturüberstand .....	45
2.2.5.6	Alkalische Phosphatase (AP)-Assay .....	45
3.	Ergebnisse .....	47
3.1	Analyse des 15 kDa-Kernfragmentes .....	47
3.1.1	Rekombinante Genexpression und Reinigung .....	47
3.1.2	Biophysikalische Charakterisierung des 15 kDa-Kernfragmentes.....	49
3.1.2.1	CD-Spektroskopie .....	49
3.1.2.2	Intrinsische Fluoreszenz.....	50
3.1.2.3	Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge.....	51
3.1.3	Interaktionsstudien des Kernfragmentes mit BMP-2 .....	52
3.1.3.1	Untersuchung der Bindung des 15 kDa-Kernfragmentes an reifes BMP-2 mittels Oberflächenplasmonresonanz .....	52
3.1.3.2	Identifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren .....	54
3.1.4	Strukturuntersuchung des Kernfragmentes .....	55
3.1.4.1	Strukturanalyse mittels NMR .....	55
3.1.4.2	Strukturaufklärung mit Hilfe von chemischen <i>cross-linking</i> und Massenspektrometrie .....	58
3.1.5	Analyse der Dimerisierung/Oligomerisierung des 15 kDa-Fragmentes.....	63
3.2	Untersuchung des 20 kDa-Fragmentes .....	66
3.2.1	Rekombinante Genexpression .....	66
3.2.2	Biophysikalische Charakterisierung des 20 kDa-Kernfragmentes.....	68
3.2.2.1	CD-Spektroskopie .....	68
3.2.2.2	Intrinsische Fluoreszenz.....	69
3.2.2.3	Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge.....	70
3.2.3	Strukturuntersuchung .....	71
3.2.3.1	Strukturanalyse mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) .....	71
3.2.3.2	Chemisches <i>cross-linking</i> .....	72

3.3	Untersuchung der biologischen Funktion der BMP-2-Prodomäne in Zellkultur .....	74
3.3.1	Einfluss der Prodomäne auf die Biogenese von BMP-2.....	74
3.3.1.1	Sekretionsanalyse von Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert wurden .	74
3.3.1.2	Die Sekretion des reifen Wachstumsfaktors ist abhängig von der Prodomäne .....	77
3.3.2	Einfluss des 20 kDa-Kernfragmentes auf die Biogenese von BMP-2.....	80
3.3.2.1	Das 20 kDa-Fragment ist für die Biogenese von BMP-2 ausreichend .....	80
3.3.2.2	Unterschiedliche Prozessierung des Vorläuferproteins führt zu verschiedenen BMP-2-Spezies .....	81
3.3.3	Quantifizierung des sezernierten BMP-2.....	83
3.3.4	Überprüfung der Funktionalität des sezernierten BMP-2.....	84
4.	Diskussion.....	86
4.1	Die Kernfragmente der Prodomäne von BMP-2 .....	86
4.2	Rolle der Prodomäne bei der Biogenese von reifem BMP-2 .....	92
4.3.1	Die Prodomäne von BMP-2 ist essentiell für die Biogenese des reifen Wachstumsfaktors.....	92
4.3.2	Das 20 kDa-Kernfragment kann teilweise die Funktionen der Prodomäne übernehmen.....	94
5.	Zusammenfassung und Ausblick .....	97
6.	Literaturverzeichnis .....	98
7.	Abkürzungsverzeichnis .....	110
8.	Anhang.....	I

# 1. Einleitung

## 1.1 *Bone morphogenetic proteins* (BMPs)

Knochenwachstumsfaktoren gehören zur Gruppe multifunktionaler Zytokine, die eine Reihe unterschiedlicher Funktionen während der Entwicklung und Differenzierung von Organen erfüllen. Die Fähigkeit demineralisierter Knochenmatrix, die Bildung von Knochen *in vivo* zu induzieren, wurde erstmals im Jahre 1965 durch Urist beschrieben [1]. Diese Eigenschaft konnte später auf einen Glykoproteinkomplex zurückgeführt werden, der entsprechend als *bone morphogenetic protein* (BMP) bezeichnet wurde [2]. Ein erster Versuch den Komplex zu isolieren und näher zu charakterisieren erfolgte durch Sampath und Reddi im Jahre 1981 [3]. In den späten 1980er Jahren wurden schließlich erste Vertreter dieser Proteinfamilie, wie beispielsweise bovines BMP-3 sowie humanes BMP-2 und BMP-4 isoliert und charakterisiert [4–7]. Bis heute wurden 20 Proteine identifiziert, die, mit Ausnahme von BMP-1, aufgrund ihrer Sequenzhomologie der TGF- $\beta$ -Superfamilie zugeordnet werden [6,8].

Zu der Unterklasse der BMPs gehören auch die *growth and differentiation factors* (GDFs). Basierend auf der Primärstruktur lassen sich die Mitglieder weiterhin in Untergruppen einteilen [5,9] (Tabelle 1). So bilden BMP-2 und BMP-4 eine Untergruppe, die wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung übernimmt. BMP-5, 6 und 7 sowie GDF-5, 6 und 7 gehören eigenen Gruppen an, die an der Entwicklung von Organen und Extremitäten beteiligt sind. Die Ausnahme bildet BMP-1, bei welchem es sich um eine sezernierte Metalloprotease handelt, die strukturell keine Ähnlichkeit zu der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie aufweist [6,10].

Tabelle 1: Übersicht über die Untergruppen der BMPs (nach Reddi *et al.* [9]). BMPs bilden eine Unterklasse der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie. Die einzelnen Mitglieder der BMPs gehören aufgrund von Sequenzhomologien zusätzlich Untergruppen an.

<b>BMP-Untergruppe</b>	<b>Mitglieder</b>
BMP-2/4	BMP-2, BMP-4
BMP-3	BMP-3, BMP-3B
BMP-5	BMP-5, -6, -7, -8, -8B, -9, -10, -11
BMP-12	BMP-12 (GDF-7), BMP-13 (GDF-6), BMP-14 (GDF-5), BMP-15

Die Mitglieder BMP-2, 3, 4, 5, 6 und 7 induzieren die Knorpel- und Knochenbildung, wenn sie subkutan implantiert werden [11]. Dennoch können nicht alle Mitglieder der BMPs die Knochenneubildung *de novo* induzieren [12], wodurch die funktionelle Heterogenität dieser Unterklasse hervorgehoben wird. Vielmehr werden zahlreiche Funktionen übernommen, die nicht nur die Skelettentwicklung, sondern auch Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose, Morphogenese und Organogenese umfassen [13].

Besonders aufgrund ihrer Fähigkeit die ektope Knochenbildung zu induzieren, stehen BMPs im Fokus der medizinischen Forschung. So sind BMP-2 und BMP-7 kommerziell erhältlich und für den Einsatz bei der Behandlung von schweren Knochenbrüchen und Wirbelfusionen zugelassen. Die Beeinflussung der BMP-Signalwirkung kann zu Krankheitsbildern, wie beispielsweise FOP (*fibrodysplasia ossificans progressiva*) oder PAH (*pulmonary arterial hypertension*), führen, welche auf Gendefekte in den BMP-Rezeptoren zurückzuführen sind [14,15].

### 1.1.1. Strukturmerkmale

Alle BMPs werden als Vorläuferproteine synthetisiert. Auf eine kurze Signalsequenz folgt die Prodomäne, an die sich der reife Wachstumsfaktor anschließt. Das Signalpeptid vermittelt die Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER). Die Funktionen der Prodomänen, die den reifen Wachstumsfaktor bezüglich der Anzahl an Aminosäuren um das Zwei- bis Dreifache übertreffen, sind innerhalb der TGF- $\beta$ -Superfamilie verschieden (1.1.5).

Die strukturelle Besonderheit in dem reifen Wachstumsfaktor stellt der Cystinknoten dar, den alle Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie aufweisen. Dadurch gehören die Wachstumsfaktoren zu der Familie der Cystinknoten-Proteine, zu der auch die Neurotrophine, *platelet-derived growth factors* (PDGFs) und Glykoprotein-Hormone zugeordnet werden [16,17]. Daneben gibt es weiterhin eine Gruppe inhibitorischer Cystinknoten-Proteine, denen unter anderem die Conotoxine angehören [18]. An dem Aufbau des Cystinknotens sind sechs Cysteine beteiligt, die intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Zwei der Cystine verbinden das Peptidrückgrat zu einem Ring, durch den eine dritte Disulfidbrücke hindurch tritt (Abbildung 1). Die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie bilden alle einen aus 10 Aminosäuren bestehenden Cystinknoten [16]. Dabei führen immer die Disulfidbrücken zwischen Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>5</sup> und Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup> zu der Bildung des Rings, der von dem Cystin Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>4</sup> durchdrungen wird (Abbildung 1A). Das Hindurchtreten der dritten Disulfidbrücke erlaubt aus sterischen Gründen nur die Anwesenheit eines Glycins zwischen dem zweiten und dritten Cystein [18], wodurch sich eine typische Konsensussequenz für den 10-gliedrigen Cystinknoten ergibt (Abbildung 1A, unten).

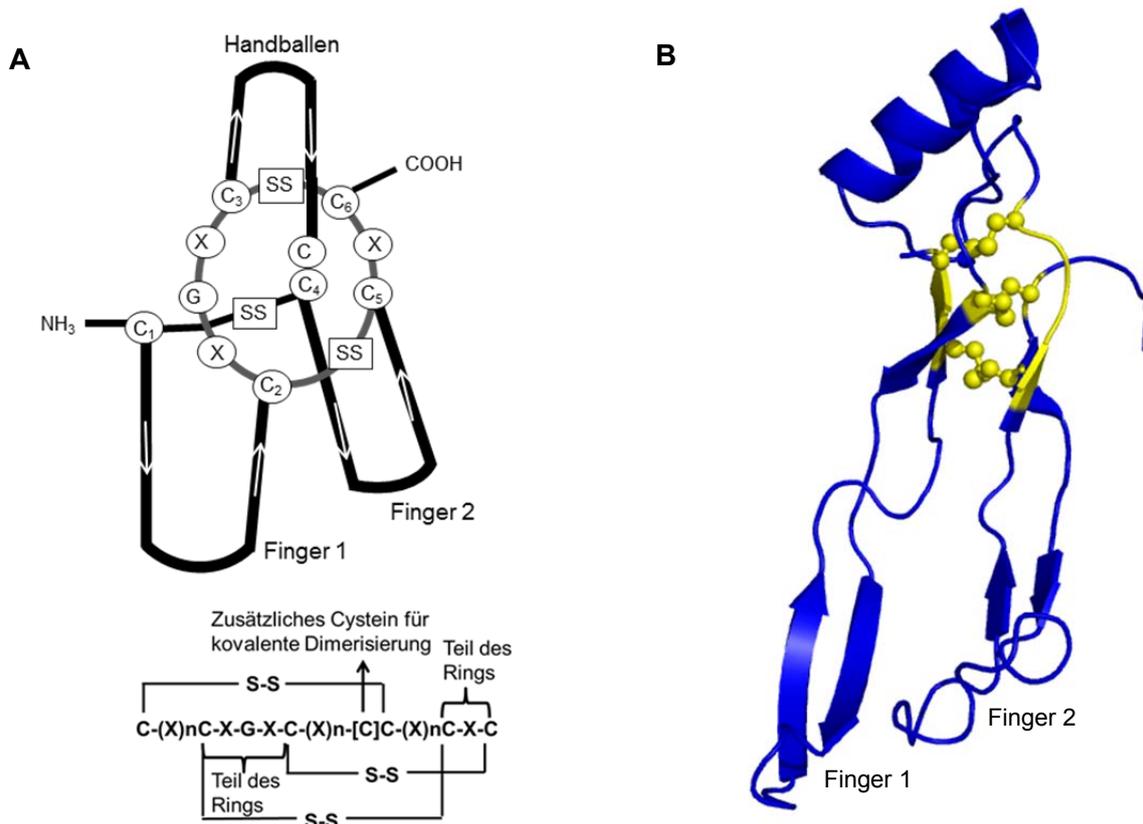


Abbildung 1: Aufbau des Cystinknotens. A) Schematische Darstellung der Struktur von 10-gliedrigen Cystinknoten-Proteinen. Pfeile zeigen die Richtung vom N- zum C-Terminus an. Die den Knoten bildenden Cysteine sind nummeriert, SS verweist auf eine Disulfidbrücke (nach Vitt *et al.*, 2001 [19]). B) Cystinknoten-Motiv von BMP-2. Dargestellt ist ein BMP-2-Monomer (pdb: 2BMP [20]) in blau. Der Cystinknoten ist in gelb gezeigt, wobei die Atome der Cysteine als Sphären hervorgehoben sind.

Obwohl die Mitglieder der Cystinknoten-Proteinfamilie nur geringe Sequenzhomologien aufweisen, besitzen die Proteine mit einem 10-gliedrigen Cystinknoten konservierte Strukturmerkmale. Die Ausbildung des Cystinknotens führt zu der Entstehung von drei ausgeprägten Bereichen. So bestehen die Abschnitte zwischen Cys<sup>1</sup> und Cys<sup>2</sup> sowie Cys<sup>4</sup> und Cys<sup>5</sup> aus antiparallelen  $\beta$ -Strängen, die Strukturen bilden, welche aufgrund ihrer Anordnung als "Finger" bezeichnet werden (Abbildung 1A) [20,21]. Dagegen umfasst das dritte Segment zwischen Cys<sup>3</sup> und Cys<sup>4</sup> eine  $\alpha$ -Helix. Die dreidimensionale Struktur wird oft als Hand bezeichnet, die aus zwei Fingern und dem Handballen besteht.

Der Cystinknoten bewirkt die Exposition hydrophober Reste, die durch Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren maskiert werden. Eine Dimerisierung ist für alle Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie beschrieben [17,20]. Einige BMPs besitzen N-terminal des Cys<sup>4</sup> ein weiteres Cystein, welches zwei Monomere durch Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke kovalent miteinander verbindet. Mit Ausnahme von GDF-3, GDF-9 und BMP-15 ist dieses zusätzliche Cystein innerhalb der TGF- $\beta$ -Superfamilie konserviert [22]. Die Dimere der reifen Wachstumsfaktoren stellen die biologisch aktive Einheit dar [17].

Alle Cystinknoten-Proteine, deren Knoten aus 10 Aminosäuren besteht, sind extrazelluläre Proteine. Durch die Ausbildung des Cystinknotens wird eine globuläre Proteinstruktur, wie sie für andere extrazelluläre Peptide charakteristisch ist, unterdrückt [19]. Neben strukturellen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die Proteine der TGF- $\beta$ -Superfamilie von den anderen Mitgliedern durch das Vorhandensein eines Stopp-Codons nach dem Cys<sup>6</sup> des Cystinknotens. Andere Unterklassen, wie die PDGFs, weisen eine ähnliche Cystinknoten-Struktur auf, besitzen allerdings einen längeren Aminosäureabschnitt nach dem sechsten Cystein [23].

### 1.1.2. Biogenese der Wachstumsfaktoren

BMPs werden, wie bereits erwähnt, als Präproteine synthetisiert. Vermutlich erfolgt als erstes die Ausbildung des hochkonservierten Cystinknotens in der C-terminalen Domäne nach der signalsequenzvermittelten Translokation in das ER. In den meisten Fällen besitzen BMPs ein weiteres konserviertes Cystein in der C-terminalen Region, welches die kovalente Dimerisierung des Vorläuferproteins vermittelt. Dabei können entsprechend Homo- oder Heterodimere gebildet werden. Heterodimere der reifen Wachstumsfaktoren (zum Beispiel BMP2/6 und BMP2/7) weisen im Vergleich zu Homodimeren veränderte funktionelle Eigenschaften auf, wie zum Beispiel eine gesteigerte Induktion der Alkalischen Phosphatase (AP) und der Knochensynthese [24].

Schließlich wird in einem Prozessierungsschritt die Prodomäne abgespalten und der reife, biologisch aktive Wachstumsfaktors sezerniert. Die proteolytische Spaltung erfolgt an einer dibasischen Konsensussequenz R-X-X-R (X entspricht einer beliebigen Aminosäure) durch Serin-Endoproteasen der Familie der *subtilisin-like proprotein convertases* (SPCs) [25]. Für BMP-4 konnte bereits gezeigt werden, dass die Prozessierung von proBMP-4 während der Embryonalentwicklung von Furin (SPC1) bzw. SPC6 katalysiert wird [26]. Dieser Reifungsprozess wird von der die Spaltsequenz umgebenden Aminosäuren reguliert, die Einfluss auf die Spalteffizienz haben [25].

Einige BMPs werden im Zuge der post-translationalen Modifikationen in dem Golgi-Netzwerk glykosyliert. So besitzen die Untergruppen BMP-2/4 und BMP-5,6,7 eine konservierte Glykosylierungssequenz der Form NXS/T in dem zu der  $\alpha$ -Helix hinführenden *loop* [22]. Für BMP-6 konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung an dieser Stelle (Asn<sup>73</sup>) essentiell für die Bindung des Activin Rezeptors-Typ I ist [27].

Nach Dimerisierung, Abspaltung der Prodomäne und Glykosylierung wird der reife Wachstumsfaktor von den Zellen sezerniert und erfüllt seine biologische Funktion. Erfolgt die Prozessierung nicht oder nur unvollständig, werden die Proformen sezerniert. Dies konnte für BMP-2 und BMP-6 gezeigt werden. In der Synovialflüssigkeit von Patienten, die unter

rheumatoider Arthritis leiden, wurden die unprozessierten Vorläuferproteine nachgewiesen [28]. Zudem wiesen Beck *et al.* 2002 nach, dass die BMP- Vorläuferproteine auch extrazellulär von SPCs prozessiert werden können [29].

### 1.1.3. Biologische Funktionen der BMPs

BMPs erfüllen während der Entwicklung als auto- und parakrin wirkende Zytokine eine Vielzahl von Funktionen. Charakteristisch für diese Proteine ist ihre Fähigkeit die Knochenneubildung *in vivo* durch die Differenzierung von undifferenzierten mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten zu induzieren. Diese Eigenschaft kann auch in Zellkultur über die Transdifferenzierung von myoblastischen Zelllinien, wie der murinen Myoblasten-Vorläuferzelllinie C2C12, zu Osteoblasten verfolgt werden [30]. Dabei wird die Expression muskelspezifischer Proteine unterdrückt, während knochenspezifische Markerproteine, wie die Alkalische Phosphatase, induziert werden. Entsprechend führt ein *knockout* verschiedener BMPs zu Skelettanomalitäten. Mäuse mit homozygoter *bmp-2*-Null-Mutation sind nicht überlebensfähig und sterben während der Embryonalentwicklung aufgrund einer abnormalen Entwicklung des Herzens [31]. *Bmp-4* defiziente Mutanten sterben infolge einer fehlenden Mesodermentwicklung [32]. BMP-3 andererseits inhibiert die von BMP-2 ausgelöste osteogene Differenzierung [33]. Daher weisen *bmp-3-knockout*-Mäuse eine erhöhte Knochendichte auf. Dies deutet darauf hin, dass BMP-3 ein Antagonist der BMP-Signalwirkung ist. Neben Funktionen bei der Skelettentwicklung, haben BMPs auch Einfluss auf andere Gewebe. Eine homozygote Null-Mutante für *bmp-7* führt zu perinataler Letalität aufgrund einer gestörten Nierenentwicklung [34,35]. BMP-9 spielt eine Rolle bei der Glucosehomöostase in der Leber [36], BMP-10 hat Einfluss auf die embryonale Herzentwicklung [37]. Proteine der BMP-Familie erfüllen demnach ein breites Spektrum an biologischen Funktionen bei der Entwicklung und Morphogenese verschiedener Organe.

Der knocheninduzierenden Wirkung durch BMPs steht der knochenabbauende Effekt gegenüber. So konnte gezeigt werden, dass BMPs auch die osteoklastische Differenzierung stimulieren und somit für die Knochenhomöostase verantwortlich sind [38,39]. Abgesehen von den Funktionen bei der Embryonalentwicklung besitzen BMPs auch Aufgaben im adulten Organismus. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung und Regeneration von Knorpel. Eine Überexpression von BMPs bewirkt eine vermehrte Bildung von Knorpelgewebe in den Extremitäten [40,41]. Des Weiteren führt eine Stimulierung mit BMPs zu einer erhöhten Proliferationsgeschwindigkeit der Chondrocyten in Zellkultur [42].

Weiterhin haben BMPs Einfluss auf die Regulation von Stammzeleigenschaften [43]. BMP-4 stimuliert die Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESC) zu Trophoblasten [44]. Das BMP-2/4-Homolog *decapentaplegic* (DPP) aus *Drosophila melanogaster* ist essentiell

für die Aufrechterhaltung und Teilung der Stammzellen [45]. BMPs kontrollieren zudem viele Schritte bei der Ausbildung des Gehirns von Vertebraten, wobei sie bei verschiedenen Stadien der neuronalen Entwicklung und in unterschiedlichen Regionen des Zentralnervensystems bei der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung agieren [46]. Während der Embryonalentwicklung können BMPs auch Apoptose vermitteln. So wurden für BMP-2, BMP-4 und BMP-7 apoptoseinduzierende Effekte beschrieben [47–50].

#### 1.1.4. Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren

Die oben beschriebenen biologischen Funktionen erfüllen die BMPs über zelluläre Signalwirkungen, die über Oberflächenrezeptoren vermittelt werden. Durch spezifische Bindung der Liganden werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, bei denen über die Regulation von Transkriptionsfaktoren letztlich spezifische Zielgene gesteuert werden [51]. Wie für andere Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie erfolgt die Signalwirkung von BMPs über membranständige Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. Dabei wird zwischen Typ I- und Typ II-Rezeptoren unterschieden. Bisher wurden drei Typ I-Rezeptoren identifiziert, die BMP-Liganden binden: BMP-Rezeptor (BMPR)-IA (auch ALK-3) und BMPR-IB (ALK-6) sowie der Activin-Rezeptor (ActR)-IA [52–54]. Zudem erfolgt die Signalweiterleitung über die drei Typ II-Rezeptoren BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB [55–57], die spezifisch BMPs binden. Für die Signalvermittlung ist die Heterooligomerisierung dieser Rezeptoren notwendig [58]. Welche Signalkaskade ausgelöst wird, ist abhängig von dem Mechanismus der Rezeptoroligomerisierung. Die Bindung des Liganden an einen bereits gebildeten Typ-I-II-Rezeptorkomplex (*pre-formed complex*, PFC) aktiviert intrazellulär den Smad-Signalweg (Abbildung 2). Dagegen löst die BMP-induzierte Dimerisierung von zwei Typ I-Rezeptoren und die folgende Rekrutierung von zwei Typ II-Rezeptormolekülen in den Komplex (*BMP-induced signaling complex*, BISC) den p38/MAPK-Signalweg aus [59,60] (Abbildung 2). Der p38-Signalweg bewirkt die Induktion der Alkalischen Phosphatase und damit die Differenzierung zu Osteoblasten. Die Bindung des Liganden bewirkt, dass die Serin/Threonin-Kinase-Domäne des Typ II-Rezeptors, welche konstitutiv aktiv ist, das Glycin-Serin (GS)-Segment des Typ I-Rezeptors phosphoryliert. Der aktivierte Typ I-Rezeptor phosphoryliert anschließend die nachfolgenden Elemente der entsprechenden Signalwege [60].

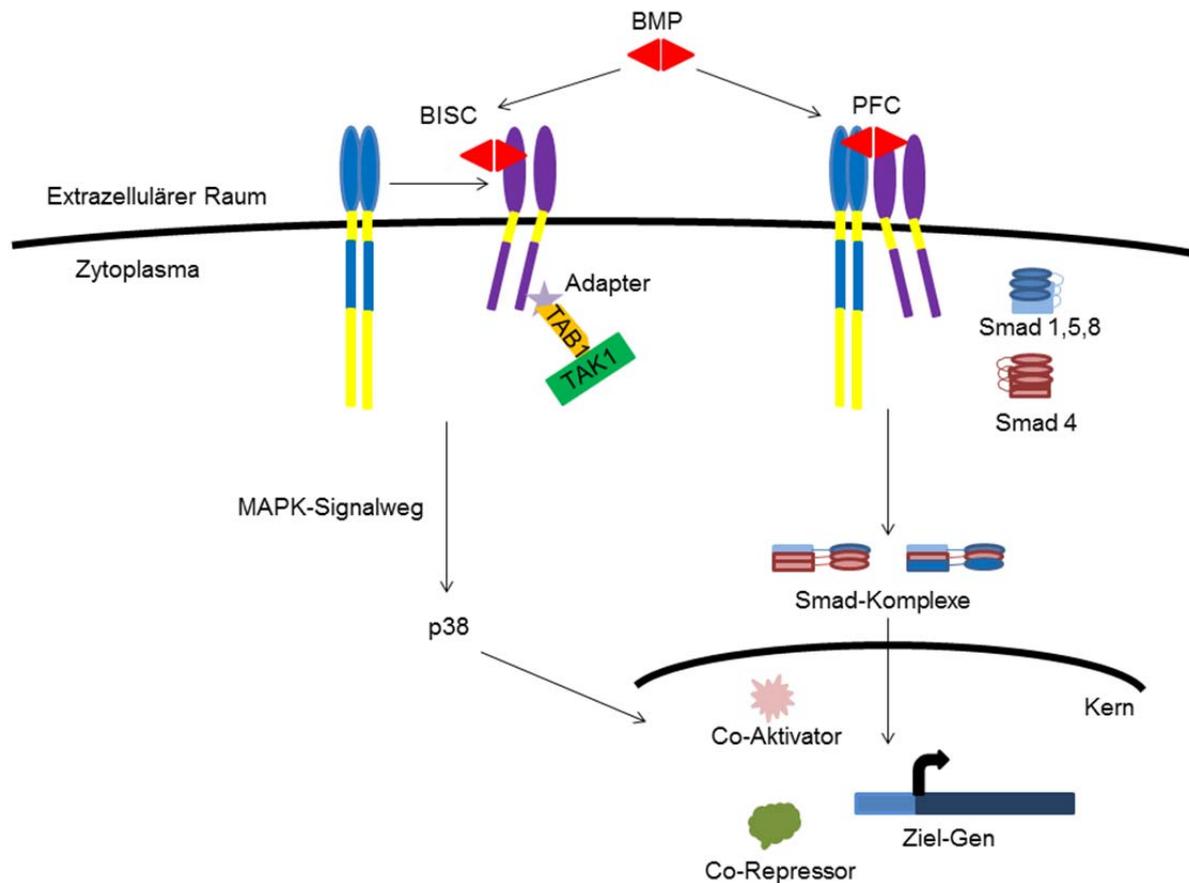


Abbildung 2: Schematische Darstellung des BMP-Signalweges. Gezeigt sind die beiden möglichen Signalkaskaden, die sich nach dem jeweiligen Bindungsmodus richten. Typ I-Rezeptoren sind in lila dargestellt, Typ II-Rezeptoren in blau (nach Nohe *et al.*, 2004 [59]).

### 1.1.5. Proformen und Prodomänen

Die Funktionen der Prodomänen sind zwischen den Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie zum Teil sehr verschieden. Die Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 ist am besten charakterisiert. Sie ist sowohl an der Faltung als auch an der Regulation der Funktion des reifen TGF- $\beta$ 1 beteiligt. Nach proteolytischer Spaltung des proTGF- $\beta$ 1 durch Furin [61] bleibt die Prodomäne nicht-kovalent mit dem reifen Wachstumsfaktor assoziiert [62,63]. Dieser Komplex ist biologisch inaktiv und wird als *small latent complex* (SLC) bezeichnet. Entsprechend wird die Prodomäne *latency associated peptide* (LAP) genannt. Die Dimerisierung der Prodomäne und die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zu dem reifen TGF- $\beta$ 1 scheinen eine entscheidende Rolle bei der Latenzvermittlung einzunehmen [62]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die latente Form des TGF- $\beta$ 1 als hochmolekularer Komplex, bestehend aus dem SLC und zusätzlich gebundenen Proteinen, sezerniert wird [64,65]. Über die Prodomäne wird der Kontakt zu Proteinen vermittelt, die als *latent TGF- $\beta$  binding proteins* (LTBPs) bezeichnet werden und die die Sekretion des inaktiven Komplexes über den Golgi-Apparat bewirken sowie die Bindung an die extrazelluläre Matrix fördern [66–68]. Dieser

Komplex wird *large latent complex* (LLC) genannt. Die Latenz beruht vermutlich auf der Maskierung eines Epitops, welches für die Bindung an den Typ II-Rezeptor erforderlich ist [69]. Für den Mechanismus der Aktivierung des latenten Komplexes wurden mehrere Möglichkeiten postuliert. Zum einen aktiviert Plasmin, eine Serinprotease, das reife TGF- $\beta$  durch Spaltung des Komplexes [70]. Schon früh konnte gezeigt werden, dass die Verringerung des pH-Wertes ebenfalls zu der Freisetzung des biologisch aktiven Wachstumsfaktors führt [69,71]. Ein anderer postulierter Mechanismus basiert auf dem Aufbau einer "Spannung" innerhalb des Moleküls durch Bindung an Proteine auf beiden Seiten des SLC. Dieses Modell wurde von Shi *et al.*, 2011 basierend auf der Kristallstruktur des latenten TGF- $\beta$ 1 vorgeschlagen [72]. Entsprechend dem Modell, umgeben die beiden Prodomänen-Moleküle das reife TGF- $\beta$ 1-Dimer in einer Art "Zwangsjacke" (Abbildung 3A).

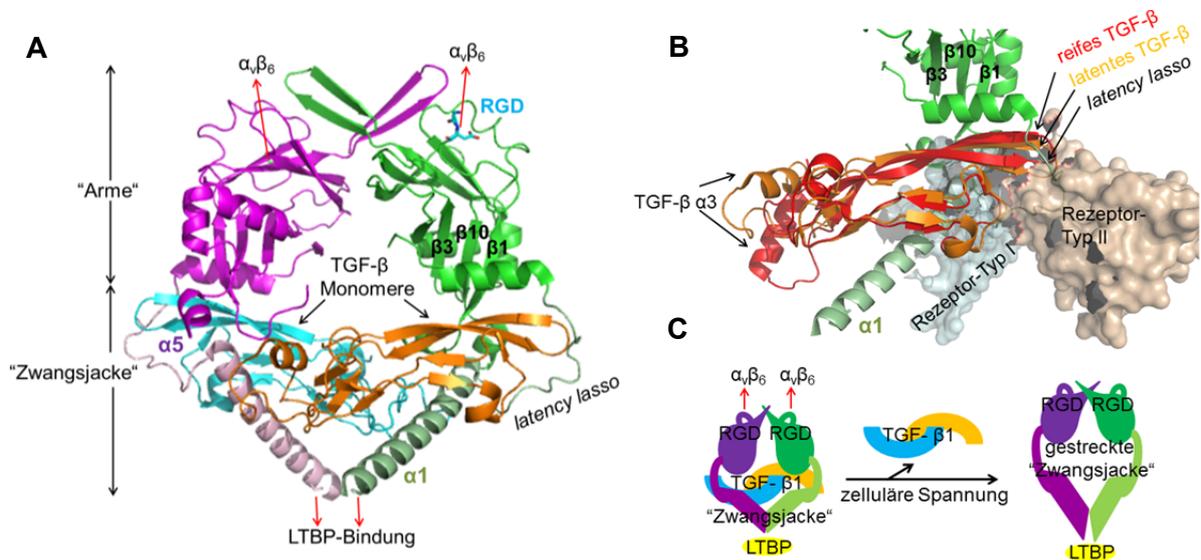


Abbildung 3: Kristallstruktur von proTGF- $\beta$ 1 in der *cartoon*-Darstellung (pdb: 3RJR [72]). A) Die TGF- $\beta$ 1-Monomere sind in hellblau und orange gezeigt. Bei den beiden Prodomänen-Molekülen ist der "Armbereich" in lila und grün hervorgehoben und die "Zwangsjacke", die von der  $\alpha$ -Helix 1 und dem *latency lasso* gebildet wird, in hellgrün und -lila. Das RGD-Motiv ist in hellblau dargestellt. B) TGF- $\beta$ 1 bzw. proTGF- $\beta$ 1 im Komplex mit den Rezeptor-Typ I und II (pdb: 3KFD [73]). Es ist jeweils nur ein TGF- $\beta$ 1-Monomer in rot (freies TGF- $\beta$ 1) bzw. orange (TGF- $\beta$ 1 im Komplex mit der Prodomäne) zu sehen. Die Rezeptor-Moleküle sind als transparente Oberflächen gezeigt. C) Modell der Aktivierung des LLC (nach Shi *et al.*, 2011 [72]).

Durch diese Anordnung wird die Rezeptorbindung des reifen TGF- $\beta$ 1 verhindert (Abbildung 3B). An der Abschirmung des Rezeptors-Typ II ist vor allem ein Segment, welches als "*latency lasso*" bezeichnet wird, beteiligt (Abbildung 3B). Die Bindung an den Typ I-Rezeptor wird durch die  $\alpha$ -Helix 1 aber auch die  $\alpha$ -Helix 5 und den  $\beta$ -Strängen 1,3 und 10 verhindert. Die Autoren vermuten, dass die gleichzeitige Bindung an LTBP's und Integrine sowie zelluläre Kontraktionen erforderlich sind um den reifen Wachstumsfaktor aus dem latenten Komplex zu entlassen. Die Bindung an Integrine erfolgt über das RGD-Motiv an den

“Schultern“ der Prodomänen (Abbildung 3A). An der Bindung der LTBP's ist die  $\alpha$ -Helix 1 der Prodomänen über die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken beteiligt. Die Hypothese der Autoren beruht darauf, dass der Aufbau einer “Spannung“ durch die entgegengesetzt gerichtete Zugkraft, bedingt durch Bindung der LTBP's auf der einen Seite und von Integrinen auf der anderen Seite, zu der Öffnung der “Zwangsjacke“ und damit zu der Freisetzung des TGF- $\beta$ 1-Dimers führt (Abbildung 3C).

Für GDF-8 (Myostatin), einem negativen Regulator für das Muskelwachstum, wurde eine ähnliche Funktion der Prodomäne beobachtet. Die Prodomäne bildet ebenfalls einen nicht-kovalenten Komplex mit dem reifen Myostatin. In diesem Komplex inhibiert die Prodomäne die biologische Aktivität von GDF-8 und die Bindung an Rezeptoren auf Myoblasten [74–76]. Durch diesen inhibitorischen Effekt kommt es zu einem Anstieg von Muskelmasse. Die Anwendung der GDF-8-Prodomäne wird in der Therapie von Muskeldystrophien diskutiert [77].

Es wird vermutet, dass die Latenzvermittlung der Prodomänen auf einer entsprechend hohen Affinität zu dem reifen Wachstumsfaktor basiert. Bisher wurde aber nur für wenige andere Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie gezeigt, dass die Prodomänen Latenz vermitteln. Dazu gehören die Isoformen des TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und 3, und GDF-11 [78]. Bei einigen BMPs konnte dennoch eine Interaktion zwischen der Prodomäne und dem reifen Dimer nachgewiesen werden. So bleibt auch die Prodomäne von BMP-7 nach proteolytischer Spaltung mit der reifen Domäne assoziiert und wird in diesem Komplex sezerniert [79]. Die Prodomäne vermittelt in dem stabilen Komplex die Bindung an Fibrillin-1, einem LTBP homologen Protein, wodurch die Positionierung und Konzentration des Wachstumsfaktors in der extrazellulären Matrix gewährleistet wird [80]. Im Gegensatz zu dem latenten TGF- $\beta$ 1 zeigt der BMP-7-Prodomänen-Komplex eine ähnliche Bioaktivität wie reifes BMP-7 *in vitro* [81]. Auch BMP-9 wird im Komplex mit der Prodomäne sezerniert. Wie bei BMP-7 beeinflusst die Prodomäne von BMP-9 die Rezeptorbindung nicht, der Prodomänen-Wachstumsfaktor-Komplex ist biologisch aktiv [82]. Die Besonderheit bei der Prodomäne von BMP-4 stellt die zweite hoch-konservierte Spaltstelle für Prohormonkonvertasen dar [26]. Neben der optimalen Erkennungssequenz “RSKR“ (S1), die von Furin und SPC6 gespalten wird, existiert eine weitere minimale Konsensussequenz “RISR“ (S2) [83]. Nach der Prozessierung an der S1-Stelle bleibt die Prodomäne mit der reifen Domäne assoziiert und erst die Spaltung an der S2-Stelle führt zu der Dissoziation von dem reifen BMP-4 Dimer. Erfolgt keine Proteolyse an der zweiten Schnittstelle, wird der Komplex im Lysosom abgebaut. Somit können Sequenz-elemente innerhalb der Prodomäne einen Regulationsmechanismus vermitteln [84].

Neben der Regulation der Aktivität können Prodomänen auch an der Faltung und Sekretion der reifen Proteine beteiligt sein. Diese Prodomänen werden als *intramolecular chaperones*

(IMCs) bezeichnet [85]. Erstmals wurde solch eine Prodomänen-abhängige Proteinfaltung für Subtilisin E gezeigt und später auch für andere Proteasen beobachtet [86–88]. Für die Familie der Cystinknoten-Proteine wurde bereits eine ähnliche Funktion der Prodomäne nachgewiesen. Die reife Domäne des *nerve growth factors* (NGF) faltet *in vitro* wesentlich langsamer und mit geringerer Ausbeute im Vergleich zu dem Proprotein [89,90]. Zusätzlich vermittelt die Prodomäne eine andere biologische Aktivität. So wurde für proNGF ein apoptosevermittelnder Effekt nachgewiesen, wogegen die reife Form das Überleben von Nervenzellen bewirkt [91,92]. Die Prodomäne eines Mitglieds der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie, des *macrophage-inhibitory cytokine* (MIC)-1, übernimmt die Funktion der Qualitätskontrolle für die korrekte Faltung des reifen Zytokins [93]. Aminosäuren am N-Terminus der Prodomäne sind verantwortlich für den proteasomalen Abbau von falsch gefalteten Formen.

Auch für das bekannteste Mitglied dieser Proteinfamilie, TGF- $\beta$ 1, wurde für die Prodomäne neben der regulatorischen Funktion eine Rolle als IMC nachgewiesen. Obwohl sich TGF- $\beta$ 1 *in vitro* mit hohen Ausbeuten renaturieren lässt [94], konnten Gray und Mason 1990 zeigen, dass die Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 essentiell für die Dimerisierung und Sekretion des reifen Wachstumsfaktors *in vivo* ist [95]. Fehlt die Prodomäne bei der Expression, kommt es nicht zu der Sekretion des aktiven Homodimers. Allerdings kann die Funktion durch Expression der Prodomäne *in trans* wieder hergestellt werden. Analoge Ergebnisse wurden für die Prodomäne von Activin A erhalten. Einem Modell zufolge spielen bei der korrekten Assemblierung der dimeren Wachstumsfaktoren hydrophobe Interaktionsbereiche zwischen reifer Domäne und der Prodomäne eine Rolle [96]. Zudem wurden Reste identifiziert, die wichtig für die kovalente Dimerisierung der Prodomäne des TGF- $\beta$ 1 und damit die Stabilität des Komplexes sind [97]. Bereits früher wurden funktionelle Abschnitte innerhalb der Prodomäne identifiziert, die die Maturierung und Sekretion von reifem TGF- $\beta$ 1 beeinflussen [98].

Für die Prodomäne von BMP-4 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie Einfluss auf die korrekte Faltung des reifen Dimers hat. Ein Konstrukt, in welchem die S2-Schnittstelle und die folgenden Reste bis zu der S1-Stelle (31 AS) deletiert waren, führte nicht zu funktionellem BMP-4 [84]. Dabei war vor allem die korrekte Faltung, aber nicht die Dimerisierung, von proBMP-4 betroffen.

## 1.2 *Bone morphogenetic protein* (BMP)-2

Die essentielle Funktion von BMP-2 während der Embryonalentwicklung wird dadurch deutlich, dass der systemische Verlust zu Letalität führt [31]. Durch induzierbares Abschalten des *bmp-2*-Gens wurde diese Letalität zwar umgangen, doch es wurde deutlich, dass eine signifikant verzögerte sekundäre Ossifikation stattfindet [99]. Im weiteren

Entwicklungsverlauf traten progressive Frakturen ohne spontane Heilung auf. Dies beweist die Rolle von BMP-2 bei der Aufrechterhaltung der Knochenintegrität und -regeneration. Zellulär wird BMP-2, wie alle Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie, als Vorläuferprotein synthetisiert. Auf die aus 23 Aminosäuren (AS) bestehende Prä-Sequenz (Signalsequenz) folgt die 259 AS umfassende Prodomäne. Die Struktur und die Funktionen dieser Prodomäne sind noch weitgehend unbekannt. Der reife Wachstumsfaktor umfasst 114 AS und wird durch die Spaltung an der Konsensussequenz "REKR" durch Prohormonkonvertasen, wie beispielsweise Furin, freigesetzt (Abbildung 4A). Die Kristallstruktur der reifen Domäne wurde im Jahr 1999 von Scheufler *et al.* gelöst [20]. Jedes Monomer besteht aus einer  $\alpha$ -Helix und zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (Abbildung 4B). Durch Ausbildung des Cystinknotens wird jedes Monomer trotz des fehlenden hydrophoben Kerns intramolekular stabilisiert. Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente wurde, wie für alle Proteine der TGF- $\beta$ -Superfamilie, mit einer Hand verglichen, wobei die  $\alpha$ -Helix das Handgelenk, der Cystinknoten die Handfläche und die  $\beta$ -Stränge die Finger darstellen [100]. Dennoch existieren strukturelle Unterschiede zu den TGFs. Zum Beispiel ist der *N*-Terminus von BMP-2 flexibel und weist daher in der Kristallstruktur keine definierte Elektronendichte auf [20]. TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 besitzen im Gegensatz dazu eine kurze *N*-terminale  $\alpha$ -Helix. Außerdem ist die in den TGFs enthaltene  $\alpha$ -Helix 2 in BMP-2 nicht vorhanden [20]. Zudem ist nur bei BMP-2 ein kurzer  $\beta$ -Strang in dem *loop*, der *N*-terminal der  $\alpha$ -Helix liegt, zu finden.

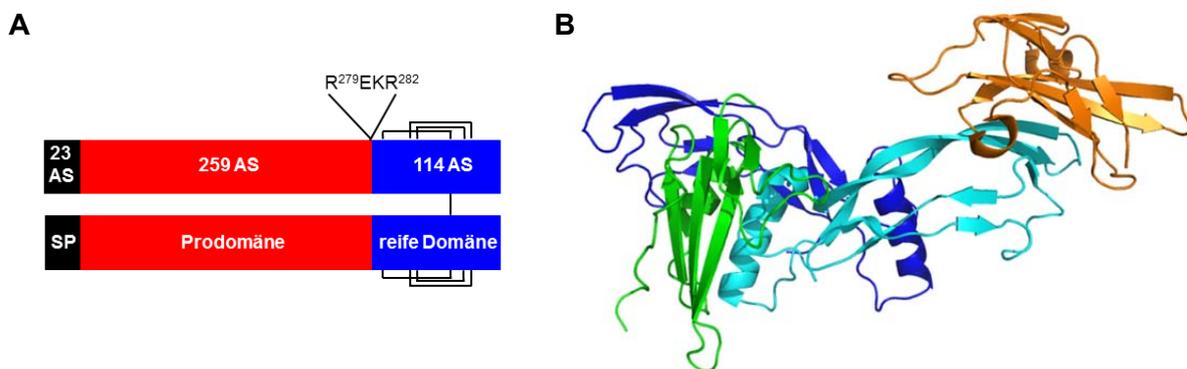


Abbildung 4: Struktur von BMP-2. A) Schematische Darstellung von prä-proBMP-2. Das Signalpeptid (SP) ist in schwarz gezeigt, die Prodomäne in rot und das reife BMP-2 in blau. Die Konsensussequenz für die Prohormonkonvertase Furin ist hervorgehoben B) Kristallstruktur von BMP-2 im ternären Komplex mit der BMPR-IA-ECD und Act-IIA-ECD (pdb: 2GOO [103]). Gezeigt ist das BMP-2-Dimer in blau (Monomere in hell- und dunkelblau), die BMPR-IA-ECD in grün und die Act-IIA-ECD in orange. Es ist jeweils nur ein Molekül jeder ECD zu sehen.

Wie bereits für die Proteinfamilie erwähnt, führt die Dimerisierung zu einer weiteren Stabilisierung. Dabei bildet das siebte Cystein jedes Monomers eine intermolekulare Disulfidbrücke aus, die zu der Bildung des Homodimers führt. Die beiden Monomere befinden sich in antiparalleler Anordnung zueinander [20]. Ein Jahr nach Aufklärung der

Kristallstruktur des reifen BMP-2 wurde die Struktur im Komplex mit der extrazellulären Domäne (ECD) des BMPR-IA gelöst [101], wodurch nicht nur die Epitope für die Rezeptorbindung identifiziert werden konnten, sondern auch nachgewiesen wurde, dass jede ECD des Rezeptor-Dimers mit beiden BMP-2-Monomer-Untereinheiten interagiert [102]. In Abbildung 4B ist der Komplex aus BMP-2 mit den ECDs der beiden BMP-Rezeptoren gezeigt. Die ECD des BMPR-IA bindet mit hoher Affinität an das "Handgelenk" des einen Monomers und die Innenseite der "Handfläche" des anderen Monomers. Die ECD des ActR-IIA, die mit geringerer Affinität bindet, interagiert mit der konvexen Seite der "Finger".

Eine strukturelle Besonderheit stellt die Heparin-Bindestelle am N-Terminus von BMP-2 dar, die außerdem nur für BMP-4 und BMP-7 gefunden wurde. Interessanterweise konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass Polysaccharide mit Sulfatresten die biologische Aktivität von BMP-2 erhöhen [104]. Dieser Effekt wurde auf eine gesteigerte Stabilität zurückgeführt [105].

### 1.2.1. Therapeutisches Potential von BMP-2

BMP-2 besitzt ein hohes Potential die osteoblastische Differenzierung zu induzieren [106]. Bereits im Jahre 1998 wurde in Tierversuchen beobachtet, dass BMP-2 den Heilungsprozess von Frakturen erheblich beschleunigt [107]. Die Bestätigung dieser Effekte in klinischen Studien [108] führte dazu, dass rekombinant hergestelltes BMP-2 seit 2002 in Europa für die Behandlung von Schienbeinfrakturen eingesetzt wird [109]. Von der *American Food and Drug Association* (FDA) ist neben BMP-2 nur noch BMP-7 für den Einsatz im Menschen zugelassen. BMP-2 ist unter dem Markennamen *InductOs*<sup>®</sup> (Pfizer, früher Wyeth Pharmaceuticals) bzw. *Infuse Bone Graft*<sup>®</sup> (Medtronic Sofamor Danek) kommerziell erhältlich. Seit 2005 wird es auch für die Fusion von Lendenwirbeln bei degenerativen Bandscheibenschäden [110] sowie seit 2007 für den Einsatz in der Gesichts- und Kieferchirurgie verwendet.

Daneben werden für BMP-2 auch Indikationen für andere Erkrankungen diskutiert. In der kraniofazialen Chirurgie könnten angeborene Schädelfehlbildungen korrigiert werden [111]. Der Einsatz in der Zahnmedizin für eine Stabilisierung von Implantaten im Kieferknochen befindet sich im Stadium der klinischen Studien [112]. Zudem ist eine systemische Applikation für die Behandlung von beispielsweise Osteoporose durch Erhöhung der Knochenmasse denkbar.

Der Einsatz von rekombinantem BMP-2 in der Therapie ist allerdings mit teils schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. So wurden besonders bei Verabreichung höherer Konzentrationen Komplikationen, wie z. B. Hämatome, Ödeme, Schwellungen Schluck- und Atembeschwerden und sogar Knochenabbau beobachtet [113,114]. Aber gerade bei großflächigen Knochendefekten muss eine entsprechend hohe BMP-2-

Konzentration eingesetzt werden. Tatsächlich entspricht die Dosis in der BMP-2 klinisch angewandt wird 2-30 mg Protein. Diese Menge stellt in etwa die doppelte Menge an BMP-2 dar, die in dem gesamten menschlichen Skelett vorhanden ist [115]. Der Grund könnte in der kurzen biologischen Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren liegen [116]. Um lokale Überdosierungen zu vermeiden, ist die Anwendung eines Trägermaterials, welches die kontrollierte Freisetzung von BMP-2 an dem Wirkort ermöglicht, denkbar. Das erste Trägermaterial basierte auf einem adsorbierenden porösen Collagen-Material. Die Entwicklung und Optimierung neuer Trägermaterialien steht weiterhin im Fokus der Forschung, wobei anorganische Materialien, synthetische und natürliche Polymere in Frage kommen [117]. Eine weitere Möglichkeit, Wachstumsfaktoren gezielt in das Gewebe einzubringen, ist der Einsatz von Gentransfer-Technologien, wie z. B. adenovirale Vektoren [118]. Auch die Anwendung von proBMPs als Retardform könnte zu einer Verbesserung der Nebenwirkungen führen.

## 1.2.2. Die Prodomäne von BMP-2

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Prodomäne für die Faltung des reifen BMP-2 *in vitro* nicht essentiell ist. So konnte reifes Dimer auch in Abwesenheit der Prodomäne aus *Inclusion Bodies* (IBs) renaturiert und die biologische Aktivität in Zellkultur nachgewiesen werden [119]. Auch die Prodomäne selbst konnte rekombinant aus IBs erhalten und *in vitro* gefaltet werden. In Studien zu der thermodynamischen Stabilität wurde belegt, dass die Prodomäne, wie die Prodomäne des Neurotrophins NGF [120], durch kovalente Bindung an reifes BMP-2 stabilisiert wird [119]. Untersuchungen zur biologischen Funktion von proBMP-2 erfolgten in Ratten, wobei die Proteine auf Keramikträger aufgetragen und subkutan implantiert wurden. Nach 30 Tagen wurden die Implantate entnommen und histologisch sowie durch Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase analysiert. ProBMP-2 induzierte, wie BMP-2, die ektopische Knochenneubildung. Diese Aktivität von proBMP-2 ist vermutlich auf die Prozessierung der Proform durch extrazelluläre Proteasen zurückzuführen. Die Abspaltung von BMP-Prodomänen durch extrazelluläres Furin wurde bereits früher beschrieben [29]. Neben Untersuchungen zu der Aktivität von proBMP-2 wurde zudem die Signalweiterleitung analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass proBMP-2 mit vergleichbarer Affinität wie BMP-2 an die BMPR-IA-ECD bindet, allerdings nicht an BMPR-II [121]. Des Weiteren unterschied sich die Proform von dem reifen Wachstumsfaktor in ihrer Fähigkeit die verschiedenen intrazellulären Signalwege auszulösen. ProBMP-2 war zwar in der Lage die Smad-Signalkaskade auszulösen, nicht aber den p38-Weg, welcher zur Induktion des Knochenmarkerenzym Alkalische Phosphatase (AP) führt. In Zellkulturexperimenten wurde

nachgewiesen, dass die Aktivierung der AP bei verlängerter Inkubation auch von proBMP-2 erreicht wird [122]. Zudem konnte beobachtet werden, dass proBMP-2 die Transkription verschiedener knochenspezifischer Enzyme bewirkt, wenn auch mit geringerer Effizienz als reifes BMP-2. Die verzögerte Wirkung der Proform ist vermutlich auf die Internalisierung, intrazelluläre Prozessierung von proBMP-2 und anschließende Sekretion des reifen Wachstumsfaktors zurückzuführen. Eine Interaktion zwischen der Prodomäne und BMP-2 wurde *in vitro* nachgewiesen [121]. Falls die Prodomäne auch im Organismus Latenz vermittelt, könnte die Proform von BMP-2 als Retardform eingesetzt werden.

### 1.3 Zielstellung

ProBMP-2 induziert im Tiermodell die ektope Knochenneubildung [119] und löst eine osteogene Aktivität in Zellkultur aus, auch wenn erst nach längeren Inkubationszeiten und zu einem geringeren Ausmaß als BMP-2 [122]. Es wurde daher vermutet, dass die Proform des Knochenwachstumsfaktors eine Retardform darstellt, die für therapeutische Anwendungen von großem Interesse sein könnte [123]. Über die Struktur der Prodomäne von BMP-2 ist bisher noch nichts bekannt. Biophysikalische Untersuchungen wiesen lediglich auf durch  $\beta$ -Faltblätter geprägte Sekundärstrukturanteile hin, die vergleichbar mit dem LAP von TGF- $\beta$ 1 sind [119,124].

Um einen Einblick in die Funktionen der Prodomäne und die Effekte auf den reifen Liganden zu erhalten, waren zu Beginn der Arbeit weitere Untersuchungen notwendig. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Prodomäne von BMP-2 könnte weiterführende Informationen, beispielsweise über die Interaktion zu dem reifen BMP-2 und die Auswirkung auf die Rezeptorbindung, liefern. Bisher sind lediglich zwei Strukturen von Prodomänen der Cystinknoten-Proteinfamilie verfügbar: die Prodomäne des *platelet-derived growth factors* [125] und aus der TGF- $\beta$ -Superfamilie die Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 [72].

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit Daten zu erhalten, die Aufschluss über die Struktur der Prodomäne geben. In einer vorangegangenen Arbeit wurde durch limitierte Proteolyse mit Trypsin ein proteoylseresistentes Fragment identifiziert, welches vermutlich den strukturellen Kern der Prodomäne repräsentiert [126]. Die biophysikalische Charakterisierung dieses 15 kDa-großen Fragmentes sollte Hinweise über die Struktur der gesamten Prodomäne liefern. Dazu sollte das Fragment rekombinant in *E. coli* hergestellt und gereinigt werden. Eine biochemische und biophysikalische Charakterisierung sollte zunächst Hinweise auf Sekundärstrukturelemente, Tertiärkontakte und die Stabilität des Fragmentes liefern. Zudem wurde vermutet, dass das Fragment aufgrund seiner geringeren Molekülmasse für Strukturanalysen mittels Kernspinresonanz geeignet ist. Aus den erhaltenen

biophysikalischen Daten sollten Rückschlüsse auf die gesamte Prodomäne getroffen werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in einer Analyse der biologischen Funktion der Prodomäne bei der Biogenese des reifen Wachstumsfaktors in Zellkultur. Anhand von Expressionsanalysen verschiedener Konstrukte in Zellkultur sollte getestet werden, ob in Abwesenheit der Prodomäne dimeres BMP-2 sezerniert wird. Weiterhin sollten Komplementationsexperimente, in denen die Prodomäne *in trans* zu dem reifen Wachstumsfaktor exprimiert wird, zeigen, ob eine kovalente Bindung zwischen reifer Domäne und Prodomäne essentiell für die Biogenese von BMP-2 ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten also sowohl weitere Informationen über die Struktur der Prodomäne von BMP-2 mittels biophysikalischer Techniken als auch über die biologische Rolle mittels zellbiologischer Methoden erhalten werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

In diesem Abschnitt sind alle Materialien aufgelistet, die nicht separat in dem Methodenteil ausgewiesen werden.

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen. Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet (Pure Lab Plus, USF Seral).

#### 2.1.2 Standards

Tabelle 2: Protein- und DNA-Standards

<b>Standards</b>	<b>Hersteller</b>
<i>pegGOLD</i> Protein-Marker II	peqlab (Erlangen)
<i>pegGOLD</i> Protein-Marker IV	peqlab (Erlangen)
<i>GeneRuler</i> 1 kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)

#### 2.1.3 Antibiotika und Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika und Enzyme

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Fluka (Buchs, Schweiz)
Lysozym	AppliChem (Darmstadt)
DNase I	AppliChem (Darmstadt)
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase	peqlab (Erlangen)

Produkt	Hersteller
N-Glykosidase F	Roche

## 2.1.4 Säulen und Säulenmaterialien

Tabelle 4: Säulen und Materialien für die Proteinreinigung

Säulen und Materialien	Hersteller
<i>HiTrap Heparin HP</i> (5 ml)	GE Healthcare (München)
<i>Macro-Prep High Q Support</i> <sup>1</sup>	Bio-Rad (München)
<i>CHT Ceramic Hydroxyapatite Type I</i> <sup>2</sup>	Bio-Rad (München)
<sup>1</sup> 20 ml gepackt in XK 16/20 Leersäule	GE Healthcare (München)
<sup>2</sup> 20 ml gepackt in XK 16/20 Leersäule	GE Healthcare (München)

## 2.1.5 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der Stamm XL-1 *Blue* (Agilent Technologies, La Jolla, USA) verwendet. Für die rekombinante Genexpression wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (Novagen, Bad Soden) eingesetzt, der zusätzlich mit dem Plasmid pUBS520 transformiert war. Dieses Plasmid trägt das *dnaY*-Gen, welches für in *E. coli* selten vorkommende tRNAs kodiert. Dadurch können Probleme bei der Expression aufgrund des *codon usage* vermindert werden. Die genotypischen Merkmale sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten *E. coli*-Stämme

Stamm	Antibiotika-Resistenz	Zusätzliche tRNA-Gene
<i>E. coli</i> XL-1 <i>Blue</i>	Tetrazyklin	
<i>E. coli</i> BL21(DE3), pUBS520	Kanamycin	<i>dnaY</i> (AGA, AGG)

## 2.1.6 Plasmide

Tabelle 6: Liste der bereits vorhandenen Vektoren

Protein	Plasmid	Herkunft
15 kDa-Fragment	pET11a	Forschungsgruppenpraktikum von Dorit Bennmann
proBMP-2	pSecTag2A	Dr. Elfie Rödel
Prodomäne <i>N</i> -term. FLAG- tag	pET11a	GENEART
F20BMP	pET11a	Forschungsgruppenpraktikum von Felix Neumann

## 2.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Übersicht über verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller	Verwendete Konzentration
Anti-rhBMP-2	Kaninchen	dianova (Hamburg)	0,1 µg/ ml
Anti-IgG Kaninchen, POD konjugiert	Ziege	dianova (Hamburg)	0,08 µg/ ml
Anti-IgG Kaninchen, DyLight 649	Maus	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, England)	0,3 µg/ml
Anti-FLAG-tag	Kaninchen	dianova (Hamburg)	0,4 µg/ml

## 2.1.8 Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 8: Medien und Lösungen für die Zellkultur

Produkt	Beschreibung	Hersteller
DMEM, <i>high Glucose</i> (4,5 g/l)	Dulbecco's modified Eagle's medium, mit Phenolrot	PAA (Pasching, Österreich)
RPMI 1640	Medium, mit Phenolrot	PAA (Pasching, Österreich)
DMSO	Dimethylsulfoxid, Zellkultur-geeignet	AppliChem (Darmstadt)

Produkt	Beschreibung	Hersteller
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , hitzeinaktiviert	GIBCO (Karlsruhe)
ITS 100 x	Insulin, Transferrin, Selenium	Invitrogen (Darmstadt)
Zeocin	Selektionsmarker für pSECTag2A, 100 mg/ml	Invitrogen (Darmstadt)
AB/AM 100 x (antibiotic/antimycotic solution)	Penicillin (10.000 units/ml), Streptomycin (10 mg/ml), Amphotericin B (0,25 mg/ml)	PAA (Pasching, Österreich)
TE-Lösung 1 x	Trypsin (0,5 mg/ml), EDTA (Titriplex III; 0,22 mg/ml) in PBS	PAA (Pasching, Österreich)
Glutamin	200 mM	PAA (Pasching, Österreich)

## 2.1.9 Zelllinien

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien

Name	Zelltyp, Organismus	Händler
C2C12	Myoblasten-Vorläuferzellen, Maus	DSMZ (Braunschweig)
HEK293	embryonale Nierenzellen, Mensch	DSMZ (Braunschweig)

## 2.1.10 Weitere Materialien

Tabelle 10: Einmal-Materialien

Produkt	Hersteller
Rundfilter für Pufferfiltration (Porengröße 0,45 µm)	Millipore (Bedford, MA, USA)
Dialyseschläuche (MWCO 6-8 kDa)	SpectraPor (Rancho Dominguez, USA)
Nitrocellulose Membran für Western Blots	GE Healthcare (München)
Lumi-Film <i>Chemoluminescent Detection Film</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
Elektroporationsküvette	peqlab (Erlangen)
Sterilfilter (Porengrößen 0,22 µm; 0,45 µm)	TPP AG (Trasadingen, Schweiz)

## 2.1.11 Geräte

Tabelle 11: Auflistung verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti J-20 und J-25 Zentrifuge	Beckmann (Krefeld)
<i>Elektroporator 1520</i>	Eppendorf (Hamburg)
<i>PCR Mastercycler gradient</i>	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter <i>pH 526</i>	WTW (Weilheim)
Elektrophoreseeinheit EPS	PharmaciaBiotech (Freiburg)
Elektrophoreselaufkammern	Hofer (San Francisco, USA)
<i>96-well microplate reader Multiskan GO 3.2</i>	Thermo Scientific (Bonn)
Abkühlgefäß 5100 <i>Cryo 1 °C</i>	Nalgene (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , mit Filterkappe	PAA (Pasching, Österreich)
Serologische Einmalpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	TPP AG (Trasadingen, Schweiz)
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Roth (Karlsruhe)
Autoklaven <i>Varioklav 500E</i>	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
<i>Äkta Explorer und Purifier</i> mit Fraktionskollektor Frac-900	GE Healthcare (München)
UV- und Leitfähigkeits-Monitor, " <i>Unicorn</i> "-Software	
Tischzentrifuge Biofuge <i>fresco</i> und <i>pico</i>	Heraeus (Hanau)
Western Blot Apparatur <i>Semi Phor</i>	Hofer Scientific Instruments
<i>Vivaflow 200</i> (MWCO 10 kDa, PES)	Sartorius Biotech (Göttingen)
<i>Nano</i> -Photometer	Implen (München)
Mikroskop <i>Telaval 3</i>	Carl Zeiss (Jena)
Sterilbank <i>Hera Safe</i>	Heraeus (Hanau)
UV-Transilluminator	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
Membran-Vakuumpumpe <i>Laboport</i>	Roth (Karlsruhe)
Brutschrank <i>Hera Cell</i>	Heraeus (Hanau)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde das *peqGold Plasmid Miniprep Kit I* (peqlab, Erlangen) verwendet. Zunächst wurden *E. coli* XL-1 *Blue*-Zellen, die das entsprechende Plasmid enthielten, in 6 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte in 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

Um größere Mengen an Plasmid-DNA für die Anwendung in Zellkultur zu gewinnen, wurde das *NucleoBond Xtra Midi Kit* (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Dabei wurde die DNA aus einer 200 ml-Übernachtskultur, wie in dem Protokoll beschrieben, isoliert.

#### 2.2.1.2 Extraktion von Ribonukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen und reverse Transkription

Um die Transkription spezifischer Gene in HEK293-Zellen nachzuweisen wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen präpariert und anschließend cDNA erzeugt. Für die Isolierung von RNA aus einer *monolayer*-Zellschicht wurde das *peqGOLD Total RNA Kit* (peqlab, Erlangen) verwendet. Die Methode beruht auf der Lyse der Zellen unter denaturierenden Bedingungen und der anschließenden reversiblen Bindung der RNA an eine Silikamembran. Die Elution der RNA erfolgte in 50 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O.

Für die Überprüfung der Transkription der gewünschten DNA in den HEK293-Zellen wurde cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA mit Hilfe des *peqGOLD cDNA Synthesis Kit H Plus* (peqlab, Erlangen) synthetisiert. Dies erfolgte mit für mRNA spezifischen Oligo(dT)<sub>18</sub> Primern des Kits nach Herstellerangaben. Die cDNA wurde anschließend mit Hilfe spezifischer Primer (Tabelle 12) mittels PCR amplifiziert und analysiert.

Tabelle 12: Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR der cDNA.  $T_{An}$  - *annealing*-Temperatur.

Name	Sequenz	$T_{An}$
Vektor for	5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGG-3'	65 °C
Vektor rev	5'-GATATCTGCAGAATTCCACCACACTGGAGTGGATCCTTACTA-3'	65 °C
PP for	5'-GCGCGCCGTACGAAGCTTGGGCGCGGCTGGCCTCG-3'	65 °C
PP rev	5'-GTGGAGAGGATGCCCTTTCCATCATGGCCAAAAGTT-3'	65° C

### 2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für die Herstellung der DNA für das 15 kDa-Fragment mit *N*-terminalem FLAG-*tag* verwendet sowie für die Amplifizierung eines gesamten Plasmids nach ortsspezifischer Mutagenese. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg) bezogen.

Die Einführung des FLAG-*tags* an die kodierende Sequenz des 15 kDa-Fragmentes in dem pET11a-Vektor erfolgte in zwei separaten Reaktionen, wobei je nur ein Teil des *tags* angefügt wurde. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 13 aufgelistet. Zur Optimierung der Amplifikation wurde die *annealing*-Temperatur in den ersten fünf Zyklen an die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der tatsächlich hybridisierenden Primer-Basen angepasst. In den folgenden 25 Zyklen wurde für die *annealing*-Temperatur die  $T_m$  des gesamten Primers berücksichtigt.

Für die PCR wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase verwendet und die Komponenten in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu$ l entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten Primer für die Einführung des FLAG-*tags*. Hervorgehoben ist die Sequenz des FLAG-*tags* (fett), die zu dem *template* komplementäre Sequenz (unterstrichen) und die eingeführte *Nde*I- (rot) und *Bam*HI- (blau) Schnittstelle.  $T_{An}$  - *annealing*-Temperatur.

template	Name/ Sequenz	$T_{An}$
pET11a:: 15 kDa- Fragment	<b>FFN1 for</b> (1. PCR) 5'- <b>GATGACGACGACAAG</b> <u>AGCTTCCACCATGAAGAATC</u> -3'	1. PCR 45 °C
	<b>FFN2 for</b> (2. PCR) 5'-GATATACATAT <b>GACTACAAGGATGACGACGACAAG</b> <u>AGCTTCCACC</u> -3'	2. PCR
	<b>Frag rev</b> 5'-CTTATCCTAACATGTCT <b>GGATCC</b> TACTTGGAGACACCTTG-3'	55 °C

### *Ortsspezifische Mutagenese*

Diese Methode diente der Herstellung der Expressionskonstrukte für die Zellkultur sowie der kodierenden DNA für das 20 kDa-Kernfragment mit einem *N*-terminalen FLAG-*tag* in dem pET11a-Vektor. Für die Durchführung wurde das *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, La Jolla, USA) verwendet. Die Einführung der gewünschten DNA-Sequenz erfolgte durch spezifische Mutagenese-Primer, die in Tabelle 14 gezeigt sind.

Wenn mehrere Sequenzabschnitte deletiert werden sollten, wurde die Mutagenese in zwei separaten Reaktionen durchgeführt. Zur Optimierung der Amplifikation wurde die *annealing*-Temperatur in den ersten drei Zyklen geringer gewählt. In den folgenden 15 Zyklen wurde dann eine höhere *annealing*-Temperatur verwendet (Tabelle 14).

Durch Verwendung der hochprozessiven *Pfu-Ultra* DNA-Polymerase (2,5 U/μl) in der PCR wurde die Amplifizierung der gesamten Plasmid-DNA gewährleistet. Die Reaktionsansätze wurden nach Angaben des Herstellers pipettiert.

#### 2.2.1.4 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Um die in der PCR erhaltene Sequenz für das 15 kDa-Fragment mit *N*-terminalem FLAG-*tag* auf die *Ligation* in den Vektor pET11a vorzubereiten, wurde die DNA hydrolytisch gespalten. Dazu wurden die *FastDigest* Restriktionsenzyme (Fermentas, St. Leon-Rot) *NdeI* und *BamHI* verwendet. Je 1 U Enzym wurde gemäß den Herstellerangaben zu dem PCR-Produkt gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde auch der pET11a-Vektor mit den gleichen Enzymen und unter den gleichen Bedingungen gespalten.

#### 2.2.1.5 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Um eine intramolekulare *Ligation* des Vektors zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen hydrolysiert. Die dafür verwendete Alkalische Phosphatase (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (1 U/μl), Fermentas, St. Leon-Rot)) wurde direkt zu dem Restriktionsansatz (2.2.1.4) zugegeben und entsprechend inkubiert.

Tabelle 14: Sequenzen der Mutagenese-Primer. Hervorgehoben ist die Sequenz des FLAG-tags (fett) und das eingeführte Stoppcodon (grün). Die Sequenz, die dem 20 kDa-Fragment entspricht, ist schwarz unterstrichen, die die dem reifen BMP-2 entspricht, ist rot hervorgehoben. Die Sequenz, die für die Furin-Schnittstelle kodiert ist blau.

<i>template</i>	Name/ Sequenz	<i>annealing-Temperatur</i>	Ziel-Konstrukt
pET11a::Prodomäne N-FLAG	<b>F20 for</b> (1. Mutagenese) 5'-GGATTATAAAGATGATGATGATAAA <u>GAACGTGCAGCAAGCCGTGC</u> -3' <b>F20 rev</b> 5'-GCACGGCTTGCTGCACGTTCTTTATCATCATCATCTTTATAATCC-3' <b>F20C for</b> (2. Mutagenese) 5'-CCGCTGCTGGTTACCTTTGGTCATGATTAAGGATCCGGCTGCTAAC-3' <b>F20C rev</b> 5'-GTTAGCAGCCGGATCCTTAATCATGACCAAAGGTAACCAGCAGCGG-3'	erst 50 °C, dann 65 °C	20 kDa-Fragment mit N-terminalem FLAG-tag
pSECTag2A::proBMP-2	<b>preBMP for</b> 5'-GCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTGCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACG-3' <b>preBMP rev</b> 5'-CGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGCAAGCTTCGTACGGCGCGCCTGGC-3'	erst 64 °C, dann 74 °C	BMP-2
pSECTag2A::proBMP-2	<b>Stopp for</b> 5'-GCCATGATGGAAAAGGGCATCCTCTCCACTAA <sup>grün</sup> AAAAGAGAAAACGTCAA-3' <b>Stopp rev</b> 5'-TTGACGTTTTTCTCTTTT <sup>grün</sup> TAGTGGAGAGGATGCCCTTTTCCATCATGGC-3'	67 °C	Prodomäne (PD)

<i>template</i>	Name/ Sequenz	<i>annealing- Temperatur</i>	Ziel-Konstrukt
pSECTag2A::proBMP-2	<b>F20BMP for</b> (1. Mutagenese) 5'-GCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTT <u>GTTGGAGAGGGCAGCCAGCCGAGCC</u> -3' <b>F20BMP rev</b> 5'- <u>GGCTCGGCTGGCTGCCCTCTCCAACAAGCTTCGTACGGCGCGCCTGGC</u> -3' <b>F20BMPCL for</b> (2. Mutagenese) 5'-GGCCATTGCTAGTAACTTTTGGCCATGATAGAGAAAACGTCAAGCC-3' <b>F20BMPCL rev</b> 5'-GGCTTGACGTTTTTCTCTATCATGGCCAAAAGTTACTAGCAATGGCC-3'	erst 67 °C, dann 74 °C  erst 55 °C, dann 65 °C	F20BMP
pSECTag2A::proBMP-2	<b>F20BMPNCL for</b> (2. Mutagenese) 5'-GGCCATTGCTAGTAACTTTTGGCCATGATCAAGCCAAACACAAACAGCGG-3' <b>F20BMPNCL rev</b> 5'-CCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGATCATGGCCAAAAGTTACTAGCAATGGCC-3'	erst 55 °C, dann 65 °C	F20BMP <sup>ΔS1</sup>
pSECTag2A::proBMP-2	<b>F20BMP mut for</b> 5'-GGTGTCTCCAAGAGACATGTTGGGATAAGCGGGTCTTTGCACCAAGATG-3' <b>F20BMP mut rev</b> 5'-CATCTTGGTGCAAAGACCCGCTTATCCCAACATGTCTCTTGGAGACACC-3'	67 °C	F20BMP <sup>D</sup>

### 2.2.1.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Um die geschnittene DNA nach Restriktionsspaltung von ungeschnittener zu separieren, wurden sowohl die *insert*-DNA als auch der linearisierte, dephosphorylierte Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.1.8) und die entsprechenden Banden isoliert. Die Rückgewinnung der DNA erfolgte mit dem *NucleoSpin Extract II Kit* (Macherey-Nagel, Düren).

### 2.2.1.7 Ligation

Die T4-DNA-Ligase (5 U/μl, Fermentas, St. Leon-Rot) katalysiert die ATP-abhängige Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der freien 3'-Hydroxylgruppe der Vektor-DNA und dem 5'-Phosphatrest der *insert*-DNA. Dadurch erfolgt die Insertion der DNA in den Vektor. Der Ansatz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers pipettiert, wobei das *insert* in einem fünffachen molaren Überschuss eingesetzt wurde. Die *Ligation* erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

### 2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele durch Erhitzen von 1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer hergestellt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 90 V für 60-90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 15 min lang in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 μg/ml) inkubiert und die DNA unter UV-Licht detektiert.

Tabelle 15: Zusammensetzung des TAE- und DNA-Probenpuffers

TAE-Puffer (50 x)	DNA-Probenpuffer (5 x)
2 M Tris/HCl pH 8,5	10 mM Tris/HCl
1 M Essigsäure	5 mM Na-EDTA
100 mM Na-EDTA	50% (w/v) Saccharose
	5% (v/v) Glycerin
	0,25% (w/v) Bromphenolblau

### 2.2.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte durch die Firma *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg). Jeweils 1,5 µg der DNA wurden verschickt und mit den Primern *T7* und *T7 Term* im Falle der pET-Konstrukte bzw. *T7* und *BGH* Primer für die pSecTag2A-Konstrukte sequenziert. Für die Auswertung wurde das Programm *Vector NTI Advance 11* (Invitrogen, Darmstadt) genutzt.

### 2.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen kann mittels UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Eine Absorption von 1 entspricht für doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Aus dem Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  können Hinweise auf das Vorliegen von Proteinkontaminationen erhalten werden. Bei reiner DNA beträgt das Verhältnis 1,8-2.

## 2.2.2 Mikrobiologische Methoden und Proteinreinigung

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden autoklaviert (20 min, 121 °C) oder steril filtriert (Porengröße 0,22 µm). Als Selektionsmarker wurden die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) eingesetzt. Die *E. coli*-Zellen wurden in LB-Medium in Schüttelinkubatoren bei 37 °C kultiviert.

Tabelle 16: Zusammensetzung des LB-Mediums

<b>LB-Medium</b>
10 g/L Trypton
5 g/L NaCl
5 g/L Hefeextrakt

### 2.2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Das Einbringen von DNA in kompetente Bakterienzellen erfolgte entweder durch Elektroporation oder Hitzeschock. Für molekularbiologische Arbeiten wurden XL-1 *Blue* Zellen (Agilent Technologie, La Jolla, USA) verwendet. Für die rekombinante Genexpression wurden BL21(DE3)-Stämme (Novagen, Bad Soden) genutzt. Es wurden jeweils maximal

100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Positive Klone wurden mit entsprechenden Antibiotika auf 1% (w/v) Agarplatten selektiert.

#### *Transformation durch Elektroporation*

Hierfür wurden 40 µl elektrokompente Zellen mit Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (peqlab, Erlangen) überführt. Die Transformation wurde durch Anlegen einer Spannung von 2,5 kV erreicht. Anschließend wurden die Zellen für 30-60 min bei 37 °C in 1 ml SOC-Medium kultiviert.

#### *Transformation durch Hitzeschock*

Für die Selektion positiver Klone nach ortsgerichteter Mutagenese der Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente XL-1 *Blue*-Zellen verwendet. 40 µl wurden mit maximal 5 µl des PCR-Ansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 s bei 42 °C. Nach anschließender zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 37 °C für 30-60 min in 1 ml SOC-Medium kultiviert. Zum Ausplattieren wurden die Zellen drei Minuten lang bei 8400 x g pelletiert. Das Pellet wurde anschließend wieder in 50 µl SOC-Medium resuspendiert und das gesamte Volumen auf eine Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika aufgetragen.

Tabelle 17: Bestandteile des SOB- und SOC-Mediums

<b>SOB-Medium</b>	<b>SOC-Medium</b>
2% (w/v) Trypton	SOB Medium
0,5% (w/v) Hefeextrakt	1/100 Vol. 1 M MgSO <sub>4</sub>
10 mM NaCl	1/100 Vol. 40% (w/v) D-Glucose
	2,5 mM KCl

#### 2.2.2.2 Rekombinante Genexpression

Die rekombinante Genexpression wurde bei 37 °C im Schüttelkolben in LB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, durchgeführt. Für alle verwendeten Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pUBS520 verwendet [127]. Das pUBS520-Plasmid enthält das *dnaY*-Gen, welches für zwei in *E. coli* selten vorkommende tRNAs (Arginin-Codons AGA, AGG) codiert. Eine 200 ml-Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 14-16 h kultiviert. Für die Hauptkultur wurden 1,5 L LB-Medium in einem 5 L-Kolben 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und bei 120 rpm geschüttelt. Hatte die Kultur eine optische Dichte

(OD<sub>600nm</sub>) von 0,8 erreicht, wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 4 h nach Induktion durch 20-minütige Zentrifugation bei 5053 x g geerntet.

### *Expression in Minimalmedium*

Die Expression von <sup>15</sup>N- bzw. <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-markiertem 15 kDa-Fragment erfolgte wie oben beschrieben in Minimalmedium (Tabelle 18). Die Mineralsalzlösung und Wasser wurden im Schüttelkolben autoklaviert, die restlichen Komponenten wurden steril filtriert. Für die Spurenelementlösung wurde zunächst das EDTA gelöst und der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Dann erst wurden die Spurenelemente zugegeben.

Tabelle 18: Komponenten und verwendete Verdünnungen des Minimalmediums

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
Mineralsalzlösung 10 x	1 x
500 mM MgSO <sub>4</sub>	1 mM
1 M CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Spurenelement-Lösung 100 x	1 x
D-Glucose 20% (w/v) ( <sup>13</sup> C)	0,3% (w/v)
Thiamin-Hydrochlorid 50 mg/ml	50 µg/ml
<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl 0,25 g/ml	1 mg/ml
Ampicillin 100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin 50 mg/ml	50 µg/ml
<b>Mineralsalzlösung 10 x</b>	<b>Spurenelement-Lösung 100 x</b>
421,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	17,1 mM EDTA
220,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O
85,5 mM NaCl	366,9 µM ZnCl <sub>2</sub>
pH 7,2 - 7,4	62,7 µM CuSO <sub>4</sub>
	77,02 µM CoCl <sub>2</sub>
	161,7 µM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	12,6 mM MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
	33,2 µM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

Für die Expression wurde zunächst eine 20 ml-Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Eine 200 ml-Übernachtskultur wurde 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und über Nacht bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2-4 kultiviert. Die Hauptkultur (1L) wurde dann mit 20 ml der Übernachtskultur angeimpft und die Expression bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 mit 1 mM IPTG induziert. Bei Induktion wurden nochmals 2 g/L Glucose zugegeben. Nach 15-18 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

## 2.2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1 *Inclusion Body* (IB)-Präparation

Alle in dieser Arbeit rekombinant gewonnenen Proteine wurden in *E. coli* als IBs produziert und nach dem Protokoll von Rudolph *et al.*, 1997 präpariert [128]. Dazu wurde das Zellpellet in 5 ml Zellaufschlusspuffer pro Gramm Zellfeuchtmasse resuspendiert und mit 1,5 mg/g Lysozym (AppliChem, Darmstadt) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mittels Hochdruckdispersion (*Gaulin Micron 40*, APV, Lübeck) bei einem Druck von 500-900 bar in drei Durchgängen aufgeschlossen. Um Nukleinsäuren zu hydrolysieren wurde das Zelllysate mit DNase I (Endkonzentration 10 µg/ml) und 3 mM MgCl<sub>2</sub> 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 0,5 Vol. Tritonpuffer versetzt und nochmals 30 min auf Eis inkubiert. Die IBs wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 75600 x g pelletiert. Das Detergenz wurde folgend durch viermaliges Waschen mit IB-Waschpuffer entfernt.

Die Solubilisierung der IBs des 15 kDa- und 20 kDa-Kernfragmentes erfolgte, wie für die Vollängen-Prodome, in 0,1 M Tris/HCl pH 5,9, 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff [119]. Die IBs des Konstruktes F20BMP wurden wie für proBMP-2 beschrieben solubilisiert [128].

Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 75600 x g abgetrennt.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Puffer für die IB-Präparation

Zellaufschlußpuffer	Tritonlösung	IB-Waschpuffer
100 mM Tris/HCl pH 7	60 mM Na-EDTA	100 mM Tris/HCl pH 7
1 mM Na-EDTA	6% (v/v) Triton X-100	20 mM Na-EDTA
	1,5 M NaCl	

### 2.2.3.2 Renaturierung

Für die Renaturierung der Proteine aus den IBs wurde L-Arginin als Rückfaltungsadditiv eingesetzt, welches die Aggregation der denaturierten Spezies unterdrückt [129,130]. Alle Proteine wurden in 1 L Renaturierungspuffer auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt und vier Tage bei 4 °C inkubiert. Die Kernfragmente wurden in 0,1 M Tris/HCl pH 8,3, 1 M L-Arginin und 5 mM Na-EDTA renaturiert. Der Zusatz von Redoxsystemen war nicht notwendig. Die Variante F20BMP wurde wie für proBMP-2 beschrieben renaturiert [119].

Renaturierungsansätze wurden durch Ultrafiltration im *cross-flow*-Verfahren (Vivaflow 200, Millipore, Schwalbach) 10-fach aufkonzentriert.

### 2.2.3.3 Proteinreinigung

Die Reinigung des 15 kDa- sowie des 20 kDa-Kernfragmentes und der Varianten mit FLAG-tag erfolgte durch Anionenaustausch-Chromatographie. Aufgrund der berechneten pI-Werte (<http://web.expasy.org/protparam>) von 5,95 und 6,48 liegen die Proteine bei einem pH-Wert von 8,0 theoretisch negativ geladen vor und können durch diese Chromatographie-Methode gereinigt werden. Die verwendete Matrix (*Macro-Prep High Q*, Bio-Rad, München) trägt ein quartäres Ammonium-Ion als funktionelle Gruppe. Nach Equilibrierung der Säule (Volumen: 20 ml) mit Puffer A (Tabelle 20), wurden 150-200 ml der nach Renaturierung aufkonzentrierten Proteinlösung mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min aufgetragen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte durch einen linearen Gradienten bis 70% Puffer B (Tabelle 20) über vier Säulenvolumen. Aufgezeichnet wurden die Absorption bei 280 nm sowie die Leitfähigkeit. Die relevanten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und gegen 0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 400 mM NaCl, dialysiert.

Tabelle 20: Verwendete Puffer für die Anionenaustauschchromatographie

<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>
20 mM Tris/HCl pH 8,0	20 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 M NaCl

Die Reinigung der proBMP-2 Variante ,F20BMP, erfolgte, wie für proBMP-2, mittels Heparin-Affinitätschromatographie [119].

### 2.2.3.4 Fällung von Proteinen

Um Proteine für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu konzentrieren wurde eine NaDOC/TCA-Fällung durchgeführt [131]. Dazu wurde 1 ml Proteinlösung mit 1/10 Vol. 1%-iger (w/v) Desoxycholsäure-Natriumsalz (NaDOC) und 1/5 Vol. 50%-iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt und gründlich gemischt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei  $14196 \times g$  wurde das Präzipitat mit 500  $\mu$ l eiskaltem Aceton gewaschen. Das trockene Pellet wurde anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### 2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch Bindung von SDS erhalten Proteine ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis und können daher mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE entsprechend ihrer Ladung und Größe aufgetrennt werden [132]. Verwendet wurden 14%-ige SDS-PA-Gele.

Tabelle 21: Zusammensetzung der SDS-PA-Gele. Die Acrylamidlösung bestand aus 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid, Natriumdodecylsulfat (SDS), N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED), Ammoniumperoxodisulfat (APS).

<b>Trenngel 14% (v/v)</b>		<b>Sammelgel 6% (v/v)</b>	
7 ml Acrylamid-Lösung		1,2 ml Acrylamid-Lösung	
4 ml dd H <sub>2</sub> O		3,3 ml ddH <sub>2</sub> O	
4 ml Trenngelpuffer (4 x)		1,5 ml Sammelgelpuffer (4 x)	
100 $\mu$ l APS		60 $\mu$ l APS	
50 $\mu$ l TEMED		30 $\mu$ l TEMED	

<b>Trenngelpuffer (4 x)</b>	<b>Sammelgelpuffer (4 x)</b>	<b>Laufpuffer (10 x)</b>
3 M Tris/HCl pH 8,85	500 mM Tris/HCl pH 6,8	250 mM Tris/HCl pH 8,3
0,4% (w/v) SDS	0,4% (w/v) SDS	1% (w/v) SDS
		1,87 M Glycin

Die Proteinlösungen wurden mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen überführt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei Minigelen (8,5 cm x 10 cm) für 1 h bei einer Spannung von 175 V und einer Stromstärke von 150 mA und für große Gele (14 cm x 16,5) für 2 h 20 min bei einer Spannung von 200 V. Anschließend wurden die Proteine mit einer nicht-kolloidalen *Coomassie Brilliant Blau*-Lösung angefärbt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Probenpuffers und der Färbelösung bzw. Entfärbelösung

<b>SDS-Probenpuffer (5 x)</b>	<b>Coomassie-Färbelösung</b>	<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>
100 mM Tris/HCl pH 8	10% (v/v) Essigsäure	10% (v/v) Essigsäure
4,8% (w/v) SDS	1 g/L <i>Brilliant Blau G250</i>	10% (v/v) Ethanol
16% (v/v) Glycerin		
2% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol		
0,1% (w/v) Bromphenolblau		

### 2.2.3.6 *Western Blot*

In den Zellkulturexperimenten wurde die Genexpression mittels *Western Blot* analysiert. Für den Nachweis von exprimiertem BMP-2 wurden vier *Whatman*-Papierblätter (Dicke 2 mm) und die Nitrocellulose-Transfermembran auf die Größe des SDS-PA-Gels zugeschnitten und 10 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Proteine nach der *semi-dry* Methode bei 1 mA/cm<sup>2</sup> 1,5 h lang auf die Membran übertragen. Nach dem Transfer erfolgte die Überprüfung der Transfereffizienz mittels Poinceau-Färbung. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit Blockierungspuffer inkubiert. An dem darauf folgenden Tag wurde die Membran mit den spezifischen primären Antikörpern, verdünnt in Blockierungspuffer, 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde dreimal mit TBST und zweimal mit TBS gewaschen und die Membran mit den sekundären Antikörpern für 1 h inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran wurden die Detektionslösungen I und II zu gleichen Teilen gemischt und auf die Membran gegeben. Die Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen ist Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für Western Blot

<b>Transferpuffer</b>	<b>Blockierungspuffer</b>	<b>TBS/ TBST</b>
20 mM Tris/HCl pH 8,5	TBS	20 mM Tris/HCl pH 7,5
150 mM Glycin	0,1% (v/v) Tween-20	150 mM NaCl
20% (v/v) Methanol	5% Milchpulver	
0,05% (w/v) SDS	5% BSA	0,1% (v/v) Tween-20

Detektionslösung I	Detektionslösung II	Poinceau-Rot-Lösung
100 mM Tris/HCl pH 8,5	100 mM Tris/HCl pH 8,5	2% (w/v) Poinceau S
396 µM Cumarin	0,02% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3% (w/v) TCA
2,5 mM Luminol		

### 2.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine erfolgte durch die Messung der Extinktion ultravioletten Lichts einer Wellenlänge von 280 nm an einem "Nanophotometer". Der Berechnung der Konzentration lag das Lambert-Beer-Gesetz zugrunde (Gleichung 1).

$$E_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad \text{Gleichung 1}$$

$E_{280}$	Extinktion bei 280 nm
$\epsilon_{280}$	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
c	Proteinkonzentration in M
d	Schichtdicke in cm

Die Extinktionskoeffizienten wurden nach Gill und Von Hippel über die Plattform *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam>) berechnet (Tabelle 24). Bei jeder Messung wurde ein Spektrum von 240-400 nm aufgenommen um die Proteinlösung zusätzlich auf Kontaminationen mit DNA und Proteinaggregaten (Streulicht bei 320 nm) zu überprüfen.

Tabelle 24: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine

Protein	Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280}$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
15 kDa-Fragment	12480
15 kDa-Fragment mit FLAG-tag	13980
20 kDa-Fragment mit FLAG-tag	19480
F20BMP	36815

## 2.2.4 Biophysikalische Methoden

### 2.2.4.1 Fluoreszenzspektroskopie

Die Lösungsmittelexposition der aromatischen Aminosäuren in einem gefalteten Protein lässt sich über die Fluoreszenz der intrinsischen Fluorophore (Tyr, Phe und Trp) ermitteln. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte nach Anregung bei einer Wellenlänge von 280 nm. Für die spezifische Anregung von Tryptophan-Resten wurde Licht mit einer Wellenlänge von 295 nm verwendet. Das emittierte Licht wurde in einem Bereich von 300-400 nm detektiert. Die Signalstärke wurde je 1 nm über 0,2 s gemessen, fünfmal akkumuliert und gemittelt. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert. Die Messungen wurden an einem *FluoroMax-2 Spektrofluorimeter* bei 20 °C unter Verwendung einer Fluoreszenzküvette aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 1 cm (*Suprasil*, Hellma, Müllheim) durchgeführt.

### 2.2.4.2 Circular dichroismus

Alle CD-Spektren wurden an einem *J-810 Spektropolarimeter* (Jasco, Groß-Umstadt) bei 20 °C aufgenommen.

#### *Fern-UV-CD-Spektroskopie*

Um Informationen über die Sekundärstrukturanteile eines Proteins zu erlangen, wurden Spektren in dem Bereich von 195-250 nm aufgenommen. Dazu wurde eine Quarzglasküvette (*Suprasil*, Hellma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 0,01 cm verwendet. Datenpunkte wurden bei einer Spaltbreite von 1 nm und einer Geschwindigkeit von 50 nm/min alle 0,2 nm gemessen. Die Spektren wurden 80-fach akkumuliert und pufferkorrigiert. Die Proteinkonzentrationen lagen zwischen 0,5 und 1 mg/ml. Die Spektren wurden anschließend mit Hilfe von Gleichung 2 normiert.

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot d \cdot c \cdot N} \quad \text{Gleichung 2}$$

$[\theta]_{\text{MRW}}$	mittlere residuelle Elliptizität ( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ )
$\theta$	gemessene Elliptizität (mdeg)
M	molare Masse (g/mol)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
N	Anzahl der Aminosäuren
d	Schichtdicke (cm)

### Nah-UV-CD-Spektroskopie

Tertiärkontakte ergeben charakteristische CD-Spektren im Nah-UV Bereich. Es wurden Datenpunkte im Bereich von 250-300 nm mit 10 nm/min alle 0,1 nm aufgenommen und 10-fach akkumuliert. Die Schichtdicke betrug 1 cm. Der Vergleich der Spektren erfolgte durch Normierung auf die molare Elliptizität ( $[\theta]$ ) mit Gleichung 3.

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot d \cdot c} \quad \text{Gleichung 3}$$

$[\theta]$	molare Elliptizität ( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ )
$\theta$	gemessene Elliptizität (mdeg)
M	Molekulargewicht (g/mol)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
d	Schichtdicke (cm)

### 2.2.4.3 Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge

Um Hinweise auf die thermodynamische Stabilität der gefalteten Proteine zu erhalten wurde die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  zwischen nativem und denaturiertem Zustand bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass während der Faltung keine Intermediate auftreten und daher nur der native und denaturierte Zustand des Proteins im Gleichgewicht miteinander stehen. Die Gleichgewichtskonstante kann dann entsprechend eines Zweizustandsmodells aus den experimentellen Daten berechnet werden.

$$K = \frac{(y_N - y)}{(y - y_U)} \quad \text{Gleichung 4}$$

$y_N$	Signal für den nativen Zustand
$y_U$	Signal für den denaturierten Zustand
$y$	gemessenes Signal

Die freie Enthalpie wird im Gleichgewicht wiederum wie folgt beschrieben:

$$\Delta G = - R \cdot T \cdot \ln K \quad \text{Gleichung 5}$$

$\Delta G$	freie Enthalpie in J/mol
R	universelle Gaskonstante = $8,314472 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$
T	absolute Temperatur in K
K	Gleichgewichtskonstante

Wird  $\Delta G$  der Denaturierung ( $\Delta G_D$ ) als Funktion der Konzentration an Denaturierungsmittel [DM] beschrieben, ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von  $\Delta G_D$  und [DM] [133].

$$\Delta G_D = \Delta G (H_2O) - m \cdot [DM] \quad \text{Gleichung 6}$$

$\Delta G_D$	freie Enthalpie in J/mol
$\Delta G(H_2O)$	thermodynamische Stabilität bei [DM] = 0 M, in J/mol
[DM]	Konzentration an Denaturierungsmittel in M
$m$	Kooperativität in J/mol · K

Für die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität des 15 kDa- und des 20 kDa-Kernfragmentes wurden chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge mit Harnstoff als Denaturierungsmittel gemessen.

Für die Analysen mittels Fluoreszenzspektroskopie wurden 2  $\mu$ M Protein in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 400 mM NaCl und variierenden Harnstoffkonzentrationen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Bestimmung des Anteils an nativer und denaturierter Spezies erfolgte durch Aufzeichnen der Emission bei 330 nm über 60 s nach Anregung bei 295 nm. Die Spaltbreiten betragen 5 nm für die Anregung und 8 nm für die Emission. Durch die Messung einer Pufferreihe konnten alle Werte pufferkorrigiert werden.

Für die Messung der Entfaltung mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurden je 0,5 mg/ml Protein in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 400 mM NaCl und verschiedenen Harnstoffkonzentrationen dialysiert. Es wurde eine Quarzglasküvette (*Suprasil*, Hellma) mit einer Schichtdicke von 0,05 cm verwendet. Das CD-Signal wurde bei einer Wellenlänge von 218 nm über 60 s gemessen. 30 Messungen wurden akkumuliert, gemittelt und pufferkorrigiert. Referenzsignale ohne Protein wurden 15-mal akkumuliert und von den Protein-Werten subtrahiert. Die molare residuelle Elliptizität wurde nach Gleichung 2 berechnet.

Die genaue Konzentration an Denaturierungsmittel wurde refraktrometrisch bestimmt und mittels Gleichung 7 berechnet [134].

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot \Delta n^2 + 185,56 \cdot \Delta n^3 \quad \text{Gleichung 7}$$

[Harnstoff]	Harnstoffkonzentration in M
$\Delta n$	Änderung des Brechungsindex

Die Auswertung der Übergangskurven erfolgte durch Anpassung der Messdaten mit Gleichung 8, die sich aus der Kombination von Gleichung 4 und 6 ergibt, über nicht-lineare Regression [135]:

$$y = \frac{\{(y_N + m_N \cdot [\text{Harnstoff}]) + (y_U + m_U \cdot [\text{Harnstoff}]) \times e^{-\left(\frac{\Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m \cdot [\text{Harnstoff}]}{RT}\right)\}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m \cdot [\text{Harnstoff}]}{RT}\right)}} \quad \text{Gleichung 8}$$

$y_N$	Signal für den nativen Zustand
$y_U$	Signal für den denaturierten Zustand
$m_N$	Anstieg des "pre-Übergangsplateaus"
$m_U$	Anstieg des "post-Übergangsplateaus"
[Harnstoff]	Harnstoffkonzentration in M
$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$	thermodynamische Stabilität bei [Harnstoff] = 0 M, in J/mol
$m$	Kooperativität in J/mol · K
$R$	universelle Gaskonstante = 8,314472 J/mol · K
$T$	Temperatur in K

Die Harnstoffkonzentration, bei der der Anteil an nativen und denaturierten Spezies gleich ist, wird als Übergangsmittelpunkt bezeichnet ( $\Delta G_D = 0$ ) und entsprechend Gleichung 6 berechnet.

Zum Vergleich mehrerer Übergangskurven wurden diese entsprechend dem Anteil an nativem Protein normiert und über eine modifizierte Gleichung 8 angepasst.

#### 2.2.4.4 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation ermöglicht die Bestimmung hydrodynamischer Eigenschaften von Makromolekülen. Bei Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten wird die Geschwindigkeit  $u$  bestimmt, mit der sich Makromoleküle einer Spezies unter dem Einfluss von Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegen. Der Sedimentationskoeffizient ist dabei wie folgt definiert:

$$S_{\text{app}} = \frac{u}{\omega^2 \cdot r} = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{N_A \cdot f} \quad \text{Gleichung 9}$$

$S_{\text{app}}$	apparenter Sedimentationskoeffizient
$u$	Sedimentationsgeschwindigkeit
$\omega$	Winkelgeschwindigkeit des Rotors
$r$	Radius
$M$	Molekülmasse
$N_A$	Avogadro-Konstante
$\rho$	Dichte der Lösung
$f$	Reibungskoeffizient des Makromoleküls
$\bar{v}$	partielles spezifisches Volumen des Makromoleküls

Bei Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten stellt sich im Schwerfeld eine zeitlich stabile exponentielle Konzentrationsverteilung innerhalb der Probenzelle ein, bei welcher der Sedimentationsfluss durch die Diffusion ausbalanciert wird [136]. Dabei geht in das Konzentrationsprofil nur noch das effektive Molekulargewicht als Strukturparameter ein. Für ideale Lösungen einheitlicher Makromoleküle gilt [137]:

$$c(r) = c(a) \cdot e^{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho) \cdot \omega^2 \cdot \frac{(r^2 - a^2)}{2RT}} \quad \text{Gleichung 10}$$

$c(r, a)$	Proteinkonzentration an einer beliebigen (r) bzw. festen (a) Position
$R$	universelle Gaskonstante = 8,314472 J/mol · K
$T$	Temperatur in K

Um zu überprüfen, ob das 15 kDa-Kernfragment *in vitro* Dimere bildet, wurde zunächst das apparente Molekulargewicht in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bestimmt. Dazu wurde das Sedimentationsgleichgewicht bei drei verschiedenen Proteinkonzentrationen (3  $\mu$ M, 13  $\mu$ M, 40  $\mu$ M) in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 400 mM NaCl bei 16000 rpm und 20 °C über 22 h eingestellt. Des Weiteren wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente bei 20 °C und 40000 rpm über 4 h durchgeführt und die apparenten Sedimentationskoeffizienten bestimmt.

Die Ultrazentrifugationsexperimente wurden an einer Optima XL-A Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld) und einem 50Ti-Rotor in Doppelsektorzellen durchgeführt. Die Datenaufnahme und Auswertung wurden freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Technische Biochemie) übernommen.

#### 2.2.4.5 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) sollten Strukturdaten für die Proteine erhalten werden. Zunächst wurde durch die Aufnahme von 1D-Protonenspektren auf geeignete Lösungsmittel getestet, die die Stabilität der Proteine unterstützen und NMR-tauglich sind. Für diese Messungen wurden das 15 kDa-Fragment sowie das 20 kDa-Fragment mit *N*-terminalem FLAG tag in nativem Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl) eingesetzt. Nach der Auswahl der Messbedingungen und Produktion von <sup>15</sup>N- und <sup>13</sup>C-markiertem 15 kDa-Fragment (2.2.2.2), wurden heteronukleare Korrelationsspektren aufgenommen, um unter Ausnutzung der chemischen Verschiebungen erste Hinweise auf Sekundärstruktureinheiten des Proteins zu erhalten.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biochem. Rica Patzschke (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Physik, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jochen Balbach) an einem Bruker-Spektrometer des Typs Avance III 800 (800 MHz Resonanzfrequenz der Protonen, Magnetfeldstärke 18,8 T) in entsprechendem Puffer mit 10% D<sub>2</sub>O bei 25 °C gemessen. Das Gerät war mit einem Triple-Resonanz-Kryoprobenkopf ausgestattet. Die Prozessierung und Analyse der 1D-Protonenspektren erfolgte mit Hilfe des Programms TopSpin (Bruker, Karlsruhe). Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden 1024 *scans* gemittelt. Die "Wasserunterdrückung" wurde über die Kombination aus Vorsättigung und WATERGATE-Sequenz (*water suppression by gradient taylorred excitation*) [138] erreicht. Zusätzliche Puffersignale wie Tris wurden selektiv über einen Vorsättigungspuls minimiert.

Die <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N- bzw. <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-heteronuklearen Korrelationsexperimente (HSQC-Spektren: *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) wurden mit 1024(<sup>1</sup>H) x 256 (<sup>15</sup>N) komplexen Punkten aufgenommen. Die Spektren wurden mit NMRPipe [139] mit einfachem *zero filling*, woraus Datenmatrizen mit 2048 · 256 komplexen Punkten resultierten, prozessiert. Die Analyse der Spektren erfolgte mit Hilfe des Programms NMRView [140].

#### 2.2.4.6 Oberflächenplasmonresonanz

Proteinwechselwirkungen zwischen dem 15 kDa-Kernfragment und reifem BMP-2 wurden mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz an einem BIAcore T100 gemessen. Dazu sollte zunächst biotinyliertes BMP-2 an einen Streptavidin-beschichteten Sensorchip (GE healthcare, München, Series S Sensor Chip SA) gekoppelt werden. Für die Biotinylierung wurden 0,1 mg BMP-2 in 50 mM Na-Acetat pH 4,7 mit 20-fachem Überschuss an *EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin* (Thermo Scientific, Bonn) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um einen basischen pH-Wert zu erhalten wurden 1/10 Vol. 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0 zugegeben. Überschüssiges Biotin wurde durch anschließende mehrfache Dialyse gegen 50 mM Na-Acetat pH 4,7 entfernt. Für die Immobilisierung wurden 10 ng biotinyliertes BMP-2 mit einer Geschwindigkeit von 5 µl/min auf den SA Chip bis zu einer *Response Unit* (RU) von 213 immobilisiert. Als Laufpuffer wurde HBS-EP (10 mM HEPES/KOH pH 7, 500 mM NaCl, 3,4 mM Na-EDTA, 0,005% (v/v) Tween-20) mit einer Flussrate von 30 µl/min bei 25 °C eingesetzt. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten im Gleichgewicht wurden Sättigungsmessungen durchgeführt. Dazu wurden die Analyten in unterschiedlichen Konzentrationen in dem jeweiligen nativen Puffer für je 2 min injiziert und die Sensogramme aufgenommen. Nach einer 5-minütigen Dissoziationsphase erfolgte die Regeneration mit 40 µl 10 mM Glycin pH 2,0.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch Anpassung der Daten an die Gleichung für die Langmuir-Bindungsisotherme:

$$R = \frac{R_{\max} \cdot c}{K_D \cdot c} \quad \text{Gleichung 11}$$

R	Signal bei bestimmter Analytkonzentration
$R_{\max}$	maximales Signal
$K_D$	Dissoziationskonstante
c	Analytkonzentration ( $\mu\text{M}$ )

#### 2.2.4.7 *Microarray*

Für die Bestimmung der Aminosäuren, die an der Bindung von der Prodomäne an reifes BMP-2 beteiligt sind, wurde ein Peptid-*microarray* durchgeführt. Dazu wurde die gesamte Sequenz von prä-proBMP-2 in überlappende 15er Peptide segmentiert, die um je drei Aminosäuren versetzt waren. Die Synthese und Immobilisierung der Peptide auf eine *PolyAn 3D Epoxy* Oberfläche wurde von JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) durchgeführt. Alle Peptide wurden in drei identischen *subarrays* aufgetragen, wobei jedes Peptid in Dreifachbestimmung immobilisiert wurde. Das *microarray* wurde mit 15  $\mu\text{M}$  BMP-2 in 50 mM Na-Acetat pH 4,7 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen und Trocknen des Chips wurde das *microarray* in einer Hybridisierungskammer (HS400, TECAN) behandelt. Der Chip wurde dreimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper (Anti-BMP-2 aus Kaninchen, dianova, Hamburg) für 1 h inkubiert. Durch wiederholtes Waschen wurde ungebundener Antikörper entfernt. Der Chip wurde weiter für 30 min mit einem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper (Anti-IgG Kaninchen aus Maus, Dylight 649, Jackson ImmunoResearch, Newmarket, England) inkubiert. Abschließend wurde das *microarray* gewaschen und getrocknet. Das Ergebnis wurde mit Hilfe des Axon Genepix 4200AL Scanners (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) analysiert. Für die Auswertung wurde die GenepixPro 6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) Software verwendet (JPT Peptide Technologies GmbH). Alle *microarray*-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Mike Schutkowski (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Enzymologie) durchgeführt.

#### 2.2.4.8 Chemisches *cross-linking* und Massenspektrometrie

Eine spezifische Vernetzung von Aminosäuren innerhalb eines Proteins ermöglicht es, Aussagen über den Abstand von Aminosäuren zu treffen und damit Daten über die

dreidimensionale Struktur des Proteins zu erhalten. Die anschließende Analyse der *cross-links* mittels hochauflösender Massenspektrometrie (MS) erlaubt eine schnelle und spezifische Auswertung. Alle Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biochem. Sabine Herbst (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andrea Sinz) durchgeführt. Als vernetzendes Agens wurde das aminreaktive Reagenz BS<sup>3</sup> (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat) verwendet. Der *cross-linker* wurde in 50-fachem molaren Überschuss zu der Proteinlösung (15 kDa-Fragment, 20 kDa-Fragment und Vollängen-Prodome, je 10 µM in 0,1 M HEPES/KOH pH 7) gegeben. Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von Ammoniumbicarbonat (Endkonzentration 20 mM) abgestoppt. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer wurde der Reaktionsansatz auf ein 14%-iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine, wie in 2.2.3.5 beschrieben, aufgetrennt. Anschließend wurden die entsprechenden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und *Coomassie* durch mehrmaliges Waschen entfernt. Dazu wurden die Banden zunächst zweimal für 10 min in 500 µl Acetonitril unter Schütteln inkubiert. Nach Entfernen des Acetonitrils wurden 100 mM Ammoniumbicarbonat/Acetonitril im Verhältnis 1:1 (v/v) zugegeben und 10-30 min geschüttelt. Abschließend wurde nochmals mit 500 µl Acetonitril gewaschen. Die Proteine wurden im Gel mit den Proteasen GluC und LysN (je 120 ng pro Gelbande) über Nacht bei 37 °C hydrolytisch gespalten. Nach der Extraktion der Proteolysefragmente mit 5% (v/v) TFA/Acetonitril im Verhältnis 1:2 (v/v) wurden das Volumen der Proben im Vakuumkonzentrator auf 20 µl verringert. Die Fragmente wurden mittels nano-HPLC/nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS analysiert. Die Fraktionierung der Peptidgemische erfolgte über *nano-RP-HPLC* (*Ultimate Nano-HPLC*-System, Dionex). Zunächst wurden die Peptide auf der Vorsäule (Acclaim PepMap, C18, 100 µm x 20 mm, 5 µm, 100 Å, Dionex) entsalzt (15 min, 0,1% (v/v) TFA). Anschließend wurden die Peptide auf der Trennsäule (Acclaim PepMap, C18, 75 µm x 200 mm, 3 µm, 100 Å, Dionex) über einen 90-min Gradient von 0-50% B (A: 5% (v/v) ACN mit 0,1% (v/v) FA; B: 80% (v/v) ACN mit 0,08% (v/v) FA) getrennt. Das HPLC-System war direkt mit der nano-ESI-Quelle (Proxeon, Odense, Dänemark) eines LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometers (Thermo Fisher Scientific, Bremen) gekoppelt. Die Peptide wurden dort im positiven Ionisierungsmodus analysiert. Daten-abhängige Fragmentierungsexperimente (*collision-induced dissociation*, CID) wurden in der linearen Ionenfalle (LTQ) von fünf Signalen mit der höchsten Intensität im Übersichtsspektrum durchgeführt. Durch sogenannte *dynamic exclusion* (für 120 s nach 3 aufgenommenen Fragment-Ionen-Spektren) konnte sichergestellt werden, dass auch unterrepräsentierte Signale fragmentiert und damit identifiziert wurden. Für die Auswertung der Daten wurden die Programme StavroX 2.0.6 und Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific, Bremen) verwendet.

## 2.2.5 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank in einem separaten Zellkultur-Labor durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden entweder von dem Hersteller steril geliefert oder autoklaviert. FBS, Antibiotikallösungen und Trypsin/EDTA wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Kulturmedien wurden frisch mit den entsprechenden Zusätzen supplementiert und bei 4 °C gelagert. Alle Puffer und Medien wurden vor Benutzung auf 37 °C temperiert.

### 2.2.5.1 Kultivierung mammalischer Zellen

Sowohl die verwendeten C2C12- als auch die HEK293-Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung inkubiert. Zunächst wurden die Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit 5 ml Medium kultiviert. Die Myoblasten-Zelllinie C2C12 wurde in RPMI 1640-Medium, die HEK-Zellen in DMEM kultiviert. Beide Medien wurden mit 10% (v/v) FBS und 1% (v/v) einer Antibiotika-Lösung (AB/AM) supplementiert. Für die Kultivierung größerer Zellmengen wurden 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 20 ml Medium verwendet. In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturen unter Verwendung des *PCR-Mycoplasmen-Testkits* (AppliChem, Darmstadt) auf Mykoplasmen getestet.

### 2.2.5.2 Passagieren von adherenten Zellen

Die Zellen wurden bei ca. 80% Konfluenz gesplittet. Dazu wurde der Kulturüberstand entfernt und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (1 ml für 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche, 3 ml für 75 cm<sup>2</sup>) vom Boden abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und 1:5 in frischem Medium in einer neuen Kulturflasche verdünnt. Die C2C12-Zellen wurden bis maximal zur 15. Passage verwendet, die HEK293-Zellen bis maximal zur 40. Passage.

### 2.2.5.3 Anlegen von Kryokulturen

Für die langfristige Lagerung wurden Kryokulturen der Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dafür wurden die Zellen in einem möglichst frühen Kultivierungsstadium verwendet. Zunächst wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben trypsinisiert, und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die HEK293-Zellen wurde die Zelldichte mit Lagermedium (70% DMEM, 20% FBS und 10% DMSO) auf  $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  eingestellt und zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die C2C12-Zellen wurden in reinem

FBS auf eine Zelldichte von  $1-2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  verdünnt und aliquotiert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte bei einer Abkühlrate von ca. 1 K/min über Nacht in einem Abkühlgefäß, welches mit Isopropanol gefüllt war.

Um die Kryokulturen zu verwenden wurde dem Stickstofftank ein Röhrchen entnommen und schnell bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden sofort in eine mit frischem Medium gefüllte 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt. Nach 4 h wurde das Anheften der Zellen an den Gefäßboden mikroskopisch überprüft und das Medium gewechselt um das zytotoxische DMSO vollständig zu entfernen.

#### 2.2.5.4 Transiente Transfektion mammalischer Zellen

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Diese Methode beruht auf der Bildung von Lipidvesikeln (Liposomen) aus kationischen Lipidmolekülen, die auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen Komplexe mit der DNA bilden und durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Als Vektor wurde das pSecTag2A-Expressionssystem verwendet. Zunächst wurden HEK293-Zellen in 6 well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank zu einer Zelldichte von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  kultiviert. An dem folgenden Tag wurden je 4 µg Plasmid-DNA, laut Herstellerangaben, in die Zellen transfiziert. Nach 24 h Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde das Kultivierungsmedium gegen Expressionsmedium ausgetauscht (Tabelle 25). Dieses wurde nach 24 h entfernt, die Proteine mit NaDOC/TCA (2.2.3.5) gefällt und mittels Western Blot (2.2.3.6) analysiert.

Für die Untersuchung der Glykosylierung von sezerniertem BMP-2 wurde N-Glykosidase F verwendet. Die gefällten Proteine wurden in 20 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,5, 0,1% (w/v) SDS, 0,5% (v/v) Nonidet P40, 10 mM EDTA, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol aufgenommen und mit 2 U Enzym über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Bestimmung der korrekten Faltung und Funktionalität des rekombinant gewonnenen BMP-2 mit Hilfe des AP-Assays (2.2.5.6) wurden HEK293-Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät und mit je 20 µg Plasmid-DNA transfiziert. Das konditionierte Medium wurde ebenfalls nach 48 h gesammelt und mit *Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices* (Millipore, Schwalbach) (Ausschlußgröße: 10 kDa) von 20 ml auf 60 µl konzentriert.

Tabelle 25: Medien für HEK293-Zellen.

Kultivierungsmedium	Expressionsmedium
DMEM high Glucose (4,5 g/L)	DMEM high Glucose (4,5 g/L)
10% (v/v) FBS	1 x ITS
1% (v/v) AB/AM	1% (v/v) AB/AM
1% (v/v) L-Glutamin	1% (v/v) L-Glutamin
	250 µg/ml Zeocin

### 2.2.5.5 Konzentrationsbestimmung von BMP-2 im Kulturüberstand

Die Konzentrationsbestimmung von BMP-2 im konditionierten Medium 48 h nach Transfektion erfolgte mit dem *BMP-2 ELISA Kit* von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen). Dazu wurden je 200 µl Medium von den transfizierten Zellen in den 6 *well*-Platten nach Herstellerangaben weiter behandelt. Das konzentrierte Medium (60 µl) aus den 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen wurde in Puffer B des Kits auf 200 µl verdünnt.

### 2.2.5.6 Alkalische Phosphatase (AP)-Assay

Für die Überprüfung der Funktionalität des in HEK293-Zellen exprimierten BMP-2 wurde der AP-Assay durchgeführt [141]. Die Grundlage bildet die Transdifferenzierung der C2C12-Myoblasten-Vorläuferzellen aus Maus zu Osteoblasten nach Stimulation mit BMP-2 [30]. Die Differenzierung kann quantitativ anhand der Aktivität des Knochenmarkerenzym Alkalische Phosphatase verfolgt werden. Der Nachweis des Enzyms erfolgt über die Umsetzung des chromogenen Substrates zu dem Chromophor *para*-Nitrophenol, dargestellt in der folgenden Reaktionsgleichung:

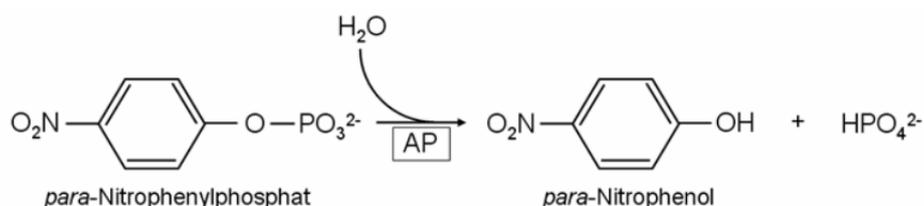


Abbildung 5: Nachweisreaktion für die Aktivität der AP. Die Hydrolyse des chromogenen Substrates *p*-Nitrophenylphosphat durch die AP führt zu der Bildung des Chromophors *p*-Nitrophenol, welches photometrisch bei 405 nm detektiert werden kann.

Für den AP-Assay wurden C2C12-Zellen mit einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^3$  Zellen pro *well* in einer 96 *well*-Platte ausgesät. Dabei wurden 100  $\mu$ l Kultivierungsmedium pro *well* (RPMI + 10% FBS) vorgelegt und die Zellsuspension anschließend zugegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. An dem folgenden Tag wurde das Medium gegen 200  $\mu$ l/*well* Differenzierungsmedium (RPMI + 2% FBS), welches mit dem Wachstumsfaktor supplementiert war, ausgetauscht. Auf diese Weise wurde als Referenz eine Eichreihe mit rekombinantem BMP-2 aus *E. coli* gemessen. Um die Funktionalität des von den transfizierten HEK293-Zellen (2.2.5.4) sezernierten BMP-2 zu überprüfen, wurde der Kulturüberstand zunächst von 20 ml auf 60  $\mu$ l konzentriert und anschließend in Differenzierungsmedium 1:10 verdünnt und für den Assay eingesetzt.

Vier Tage nach Induktion der C2C12-Zellen wurde der Kulturüberstand entfernt und die Zellen zweimal mit je 200  $\mu$ l/*well* PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100  $\mu$ l AP-Lysepuffer (Tabelle 26) für 1-2 h bei Raumtemperatur lysiert. Jeweils 20  $\mu$ l des Zelllysates wurden für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration und der AP-Aktivität in neue 96 *well*-Platten überführt.

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den Zellen erfolgte mit dem *BCA-Assay Kit* (Thermo Scientific, Bonn) und diente der Normierung der Aktivität der AP. Eine Standardreihe mit 0 bis 350  $\mu$ g/ml BSA diente als Referenz. Die Messung der AP-Aktivität erfolgte durch die Verfolgung der Substratumsetzung mit einem *platereader*. Dazu wurde zu dem Zelllysate 180  $\mu$ l/*well* Substratlösung (Tabelle 26) gegeben, 10 s geschüttelt und über einen Zeitraum von 30 min alle 15 s die Absorption bei 405 nm detektiert. Der lineare Signalanstieg pro Zeiteinheit ( $\Delta E/\text{min}$ ) wurde mit der Gesamtproteinmenge ( $\mu$ g) verrechnet und die resultierende spezifische Aktivität der AP gegen die BMP-2 Konzentration aufgetragen.

Tabelle 26: Übersicht über die verwendeten Puffer für das AP-Assay.

AP-Puffer	AP-Lysepuffer	Substratlösung
100 mM Glycin/NaOH pH 9,6	AP-Puffer	AP-Puffer
1 mM MgCl <sub>2</sub>	1% (v/v) Nonidet P40	9 mM <i>p</i> -Nitrophenylphosphat (AppliChem, Darmstadt)
1 mM ZnCl <sub>2</sub>		

## 3. Ergebnisse

Im Rahmen der Promotion von Anja Hauburger wurde ein proteolyseresistentes Fragment der BMP-2-Prodomäne identifiziert, welches die Grundlage dieser Arbeit bildete [126]. Die Sequenz dieses 15 kDa großen Fragmentes wurde bereits durch Dorit Bennmann während eines Forschungsgruppenpraktikums in den Vektor pET11a kloniert und stand daher für die Arbeit zur Verfügung. Ziel war es, das Fragment, welches im Folgenden als 15 kDa-Kernfragment bezeichnet wird, biophysikalisch und strukturell zu analysieren, um Rückschlüsse auf die gesamte Prodomäne ziehen zu können. Zudem sollte Aufschluss über die biologische Funktion der BMP-2-Prodomäne bei der Biogenese von BMP-2 erhalten werden.

### 3.1 Analyse des 15 kDa-Kernfragmentes

#### 3.1.1 Rekombinante Genexpression und Reinigung

Die rekombinante Herstellung des 15 kDa-Kernfragmentes erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) pUBS520 (2.2.2.2). Aus 6 L Kulturmedium wurden durchschnittlich 15-20 g Zellfeuchtmasse erhalten. Das Protein wurde, wie alle in dieser Arbeit hergestellten Proteine, in den Zellen in unlöslicher Form als *Inclusion Bodies* (IBs) exprimiert. Die Präparation dieser Einschlusskörperchen erfolgte nach bestehendem Protokoll [128] (2.2.3.1). Aus 20 g Zellfeuchtmasse konnten im Durchschnitt 1-2 g IBs isoliert werden, die anschließend in Analogie zu der Vollängen-Prodomäne solubilisiert wurden [119]. Die heterologe Expression und IB-Präparation wurden mittels SDS-PAGE (2.2.3.5) dokumentiert. Es konnte eine deutliche Expressionsbande bei einem apparenten Molekulargewicht von 15 kDa detektiert werden (Abbildung 6A, Bahn 2), welche dem Kernfragment entsprach. Die isolierten IBs enthielten kaum Kontaminationen mit Fremdprotein (Bahn 3) und wurden daher direkt für die Renaturierung eingesetzt. Die Rückfaltung des Fragmentes erfolgte, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, mit L-Arginin als Additiv und ohne Redoxsystem, da das Kernfragment keine Cysteine enthält. Auf Grund des theoretischen pI-Wertes von 5,95 liegt das Kernfragment bei einem pH-Wert von 8,0 negativ geladen vor. Dadurch war eine Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie möglich (2.2.3.3). Das Chromatogramm (Abbildung 6B) zeigt, dass das Fragment bei einer Leitfähigkeit von 39 mS/cm, entsprechend einer Konzentration von 440 mM NaCl, in einem einzelnen symmetrischen Peak eluierte. Das Peak *tailing* wies auf eine zu dicht gepackte Säule hin. Die einzelne Bande bei einem

apparenten Molekulargewicht von 15 kDa im *Coomassie*-gefärbten SDS-PA-Gel bestätigte, dass das Fragment bis zur Homogenität gereinigt werden konnte (Abbildung 6A, Bahn 4). Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und gegen 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl (im Folgenden als nativer Puffer bezeichnet) dialysiert und aliquotiert. Durchschnittlich konnten aus 20 g Zellfeuchtmasse 20-30 mg gereinigtes Protein isoliert werden.

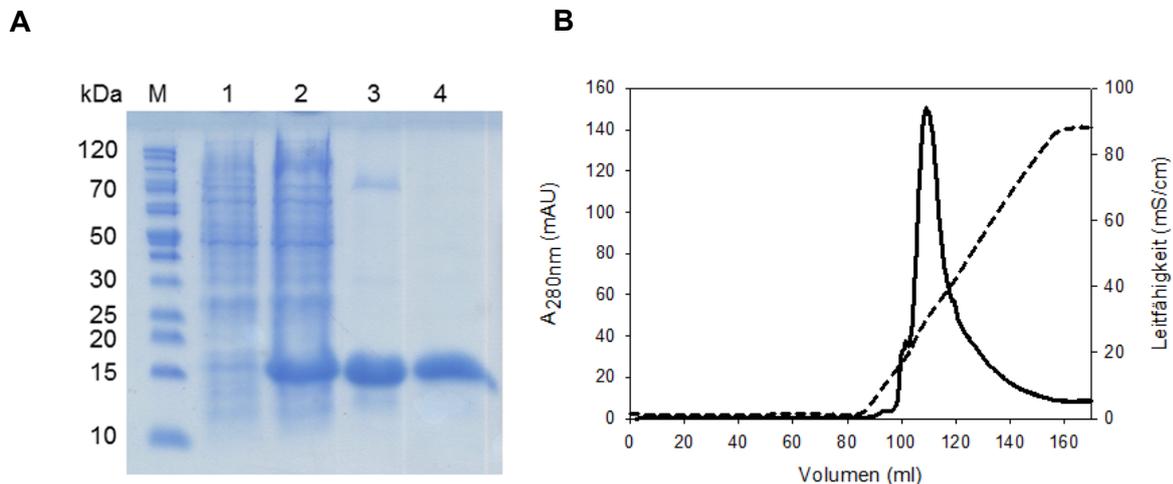


Abbildung 6: Rekombinante Genexpression und Reinigung des 15 kDa-Kernfragmentes. (A) Dokumentation der Expression und IB-Präparation mittels SDS-PAGE. (M) Proteingrößenstandard, (1) Zelllysat vor Induktion, (2) Zelllysat nach Induktion, (3) IB-Solubilisat, (4) gereinigtes Protein. (B) Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie (Säule: *Macro-Prep High Q Support*) des renaturierten Kernfragmentes. Gezeigt sind die Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie) und die Leitfähigkeit (gestrichelte Linie).

Die Verifizierung des Proteins erfolgte massenspektrometrisch durch MALDI-TOF-MS von Frau Dr. Angelika Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Naturstoffbiochemie). Bei der MS-Analyse wurde ein einzelnes Signal detektiert. Das ermittelte Molekulargewicht von 15028 Da wich allerdings von dem theoretisch berechneten (15159,9 Da, berechnet über die Plattform *Protparam* (<http://web.expasy.org/protparam>)) um 131,9 Da ab. Vermutlich ist der Unterschied auf die post-translationale Abspaltung des Start-Methionins zurückzuführen. Das theoretische Molekulargewicht des Fragmentes würde ohne das Methionin 15028,7 Da betragen und damit der massenspektrometrisch bestimmten Molekülmasse entsprechen. Da dem Methionin in der Primärsequenz eine der kleinsten Aminosäuren, ein Serin, folgt, handelt es sich um ein potentielles Substrat für Methionylaminopeptidasen [142], wodurch die Annahme der Methionin-Abspaltung unterstützt wird.

## 3.1.2 Biophysikalische Charakterisierung des 15 kDa-Kernfragmentes

### 3.1.2.1 CD-Spektroskopie

Für die Untersuchung des Faltungszustandes des renaturierten, gereinigten Fragmentes kamen unterschiedliche spektroskopische Methoden zur Anwendung. Zunächst wurden die Sekundärstrukturanteile mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektroskopie im Fern-UV-Bereich untersucht (2.2.4.2). Das Spektrum unter nativen Bedingungen unterschied sich deutlich von dem Spektrum in denaturierendem Puffer (Abbildung 7A). Das Spektrum in 6 M GdmCl wies zwischen 220 nm und 250 nm Amplituden auf, die charakteristisch für entfaltete Proteine sind. Dagegen verwies eine Amplitudenzunahme bei 220 nm im nativen Puffer (hier zu negativen Elliptizitäten) auf einen definierten Faltungszustand des Fragmentes. Ein absolutes Minimum zwischen 206 nm und 209 nm ließ auf eine Struktur mit hohem *random coil*- und  $\beta$ -Faltblatt-Anteil schließen, wobei der Verlauf der Spektren charakteristisch für  $\beta_{II}$ -Proteine war [143].  $\beta_{II}$ -Proteine führen zu CD-Spektren, die denen von unstrukturierten Proteinen ähneln [144]. Typisch sind negative Amplituden bei Wellenlängen um 200 nm. Im Gegensatz zu unstrukturierten Proteinen besitzen diese Proteine CD-Signale im Nah-UV-Bereich (siehe nächster Abschnitt).

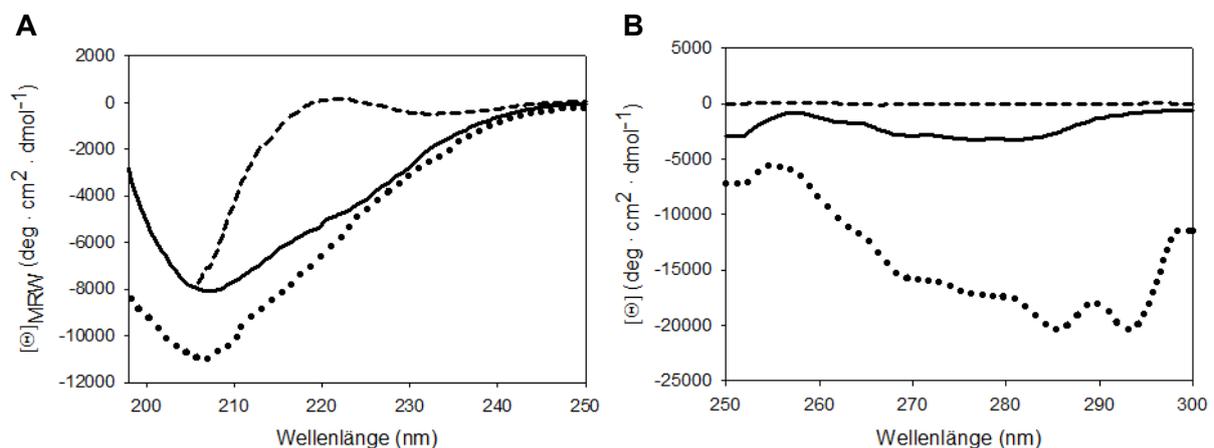


Abbildung 7: CD-Spektren des 15 kDa-Kernfragmentes und der Vollängen-Prodömäne. (A) Fern-UV-Bereich. (B) Nah-UV-CD-Spektren. Das Kernfragment wurde in nativem Puffer (durchgezogene Linie) und unter denaturierenden Bedingungen (gestrichelte Linie) analysiert. Das Spektrum der Prodömäne unter nativen Bedingungen ist zum Vergleich aufgezeichnet worden (gepunktete Linie). Die Messungen erfolgten bei 20 °C in nativem Puffer. Denaturierender Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl, 6 M GdmCl. Nativer Puffer für die Prodömäne: 0,1 M HEPES pH 7,0. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml für das 15 kDa-Fragment und 0,5 mg/ml für die Prodömäne.

Beim Vergleich mit dem Spektrum der Vollängen-Prodomäne wurde deutlich, dass der Verlauf der Spektren ähnlich war. Lediglich die "Schulter" bei 220 nm fehlte dem Spektrum des Kernfragmentes. Die geringeren negativen Amplituden bei 200 nm deuteten auf einen geringeren *random coil*-Anteil in dem Kernfragment hin. Auf Grund der hohen Absorption der Puffer bei Wellenlängen unterhalb von 195 nm konnten die Spektren nicht bei niedrigeren Wellenlängen aufgezeichnet werden.

CD-Spektren im Nah-UV-Bereich werden durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren erzeugt und zeigen den charakteristischen Fingerabdruck eines Proteins. Das 15 kDa-Fragment wies geringe Amplituden über den gesamten Bereich auf (Abbildung 7B). Im Vergleich dazu zeigte das Spektrum der Prodomäne sehr viel höhere negative Amplituden und einen anderen Verlauf. Die höheren Amplituden könnten darauf zurückzuführen sein, dass in der Prodomäne drei Tryptophane, drei Tyrosine und 14 Phenylalanine vorhanden sind, wogegen in dem Kernfragment nur zwei Tryptophane, ein Tyrosine und 10 Phenylalanine vorliegen. Aus den Nah-UV-CD-Spektren kann lediglich die Aussage getroffen werden, dass sich die in dem 15 kDa-Fragment vorhandenen aromatischen Aminosäuren in einer anderen molekularen Umgebung befinden. Vermutlich sind die Aromaten durch die fehlenden umgebenden Aminosäuren zum Teil lösungsmittlexponiert.

### 3.1.2.2 Intrinsische Fluoreszenz

Der Faltungszustand eines Proteins kann weiterhin durch die Messung der intrinsischen Fluoreszenz untersucht werden, welche eine Aussage über die chemische Umgebung der aromatischen Aminosäuren zulässt. Durch Anregung bei einer Wellenlänge von 280 nm kann die Umgebung aller aromatischen Reste analysiert werden, wogegen eine Anregung bei 295 nm vorwiegend Hinweise über die Lösungsmittlexposition der Tryptophane gibt. Das Kernfragment enthält zwei Tryptophane, die sich beide in dem C-terminalen Bereich befinden. In Abbildung 8A sind die Emissionsspektren nach Anregung bei 280 nm gezeigt. Unter denaturierenden Bedingungen verschob sich das Emissionsmaximum von 345 nm bathochrom auf 358 nm. Die Verlagerung des Maximums zu höheren Wellenlängen ist mit einer zunehmend polaren Umgebung der Aromaten zu erklären, die aufgrund der Entfaltung des Proteins erreicht wurde. Die Emissionsspektren nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 295 nm (Abbildung 8B) zeigten ähnliche Fluoreszenz-Maxima wie nach Anregung bei 280 nm. Durch Denaturierung in GdmCl verschob sich das Maximum von 345 nm auf 356 nm. Dies wies auf eine stärkere Lösungsmittlexposition der beiden Tryptophanreste nach Entfaltung hin. Daraus ist zu schließen, dass das Kernfragment im nativen Puffer gefaltet vorlag.

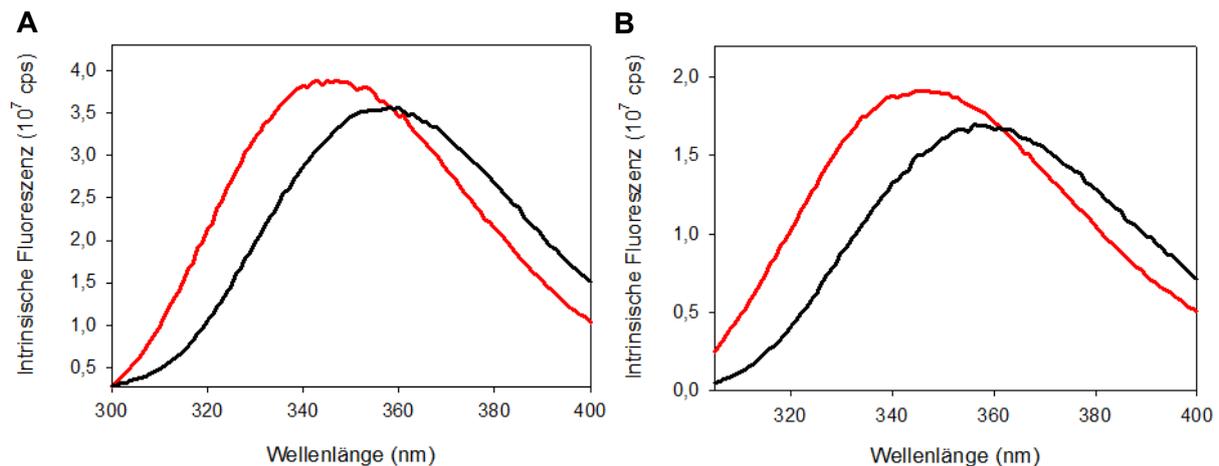


Abbildung 8: Intrinsische Fluoreszenz des 15 kDa-Kernfragmentes. (A) Anregung bei 280 nm und (B) bei 295 nm. Spektren wurden unter nativen (rote Linie) und unter denaturierenden (schwarze Linie) Bedingungen aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in nativem Puffer. Denaturierender Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl, 6 M GdmCl. Die Proteinkonzentration betrug 2  $\mu$ M.

### 3.1.2.3 Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge

Um Aussagen über die thermodynamische Stabilität des 15 kDa-Kernfragmentes treffen zu können, wurde die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  zwischen nativem und denaturiertem Zustand bestimmt. Zunächst wurden chemisch-induzierte Gleichgewichtsübergänge durch Verfolgung der Änderung der intrinsischen Fluoreszenz der beiden Tryptophane gemessen. Die Entfaltung des Kernfragmentes war vollständig reversibel (Abbildung 9A). Aus den Übergängen ist zu schließen, dass das 15 kDa-Kernfragment definierte Tertiärkontakte im nativen Puffer aufwies, die durch die Entfaltung mit Harnstoff verloren gingen. Unter Annahme eines Zweizustandsmodells wurde ein  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  von  $11,8 \pm 0,5$  kJ/mol ermittelt (3.1.2.3). Für die Kooperativität der Entfaltung wurde ein Wert von  $6$  kJ/mol  $\cdot$  M bestimmt. Alle thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Im Vergleich mit der gesamten Prodomäne ( $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 5,13 \pm 0,06$  kJ/mol,  $m = 4,9 \pm 0,05$  kJ/mol  $\cdot$  M [119]) besitzt das 15 kDa-Kernfragment eine signifikant höhere thermodynamische Stabilität.

Für die Verifizierung der ermittelten Daten wurde zusätzlich die Entfaltung durch Messung der Änderung des CD-Signals im Fern-UV-Bereich gemessen (Abbildung 9B). Die Änderung der molaren residuellen Elliptizität repräsentiert die durch Entfaltung auftretenden Veränderungen in den Sekundärstrukturanteilen. Die Übergänge unterschieden sich nicht von denen, die mittels Fluoreszenz gemessen wurden. Entsprechend ging bei der Entfaltung des Kernfragmentes der Verlust an Tertiärkontakten mit dem Verlust an Sekundärstrukturanteilen einher. Auch die mittels CD bestimmten  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte wichen nur geringfügig von den durch Fluoreszenz bestimmten Werten ab. Die Unterschiede sind

auf ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis beim CD-Signal zurückzuführen. Durch diese Daten wurde die ursprüngliche Annahme bestätigt, dass das Kernfragment nach einem Zweizustandsmodell, ohne das Auftreten von Intermediaten im Gleichgewicht, entfaltet. Um dies weiter zu bestätigen müssten allerdings Entfaltungs- und Faltungskinetiken aufgezeichnet werden.

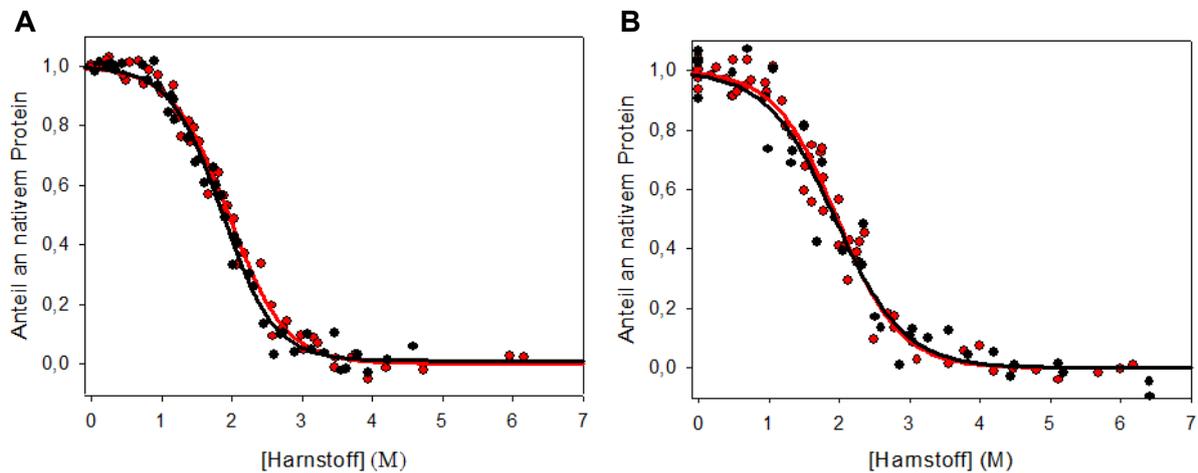


Abbildung 9: Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge des 15 kDa-Kernfragmentes. (A) Mittels Fluoreszenz und (B) Fern-UV-CD gemessen. Gezeigt sind jeweils die Entfaltung (rot) und Rückfaltung (schwarz). Die Messungen wurden mit 2 µM Protein bei 20 °C in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl mit variierenden Harnstoffkonzentrationen durchgeführt.

Tabelle 27: Thermodynamische Parameter der chemisch-induzierten Entfaltungsübergänge.

Method		$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ (kJ/mol)	$m$ (kJ/mol · M)	$D_{1/2}$ (M)
Fluoreszenz	Entfaltung	$11,8 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1$
	Rückfaltung	$12,3 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,1$
CD	Entfaltung	$10,9 \pm 0,6$	$5,5 \pm 0,3$	$2 \pm 0,2$
	Rückfaltung	$9,8 \pm 1,0$	$5,0 \pm 0,5$	$2 \pm 0,3$

### 3.1.3 Interaktionsstudien des Kernfragmentes mit BMP-2

#### 3.1.3.1 Untersuchung der Bindung des 15 kDa-Kernfragmentes an reifes BMP-2 mittels Oberflächenplasmonresonanz

Mittels spektroskopischer Methoden konnte nachgewiesen werden, dass das 15 kDa-Kernfragment einen definierten Faltungszustand aufwies. Im Folgenden wurde untersucht,

ob das Kernfragment an reifes BMP-2 bindet. Für die Vollängen-Prodomäne wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt, dass sie *in vitro* reversibel, nicht-kovalent mit dem reifen Wachstumsfaktor interagiert [121]. Für eine quantitative Charakterisierung der Bindung des Kernfragmentes an BMP-2 wurden BIAcore-Messungen durchgeführt (2.2.4.6). Dabei wird die Bindung mit Hilfe des Prinzips der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) gemessen. Für die Analyse wurde BMP-2 biotinyliert, um eine Immobilisierung auf einem mit Streptavidin beschichteten Sensorchip zu gewährleisten. Das Kernfragment wurde anschließend mit konstanter Flussgeschwindigkeit in verschiedenen Konzentrationen mit dem Chip inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine Referenzzelle, auf der kein BMP-2 immobilisiert war. Als Positivkontrolle wurden alle Messungen parallel mit der Vollängen-Prodomäne durchgeführt. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden Gleichgewichtsmessungen durchgeführt. Wie aus Abbildung 10A ersichtlich wird, konnte für das Kernfragment eine Bindung an reifes BMP-2 nachgewiesen werden. Die Zunahme des Messsignals mit steigenden Proteinkonzentrationen zeigte die Bindung an. Im Gegensatz zu der Prodomäne (Abbildung 10B) wurde auch bei sehr hohen Konzentrationen kein Maximalwert erreicht.

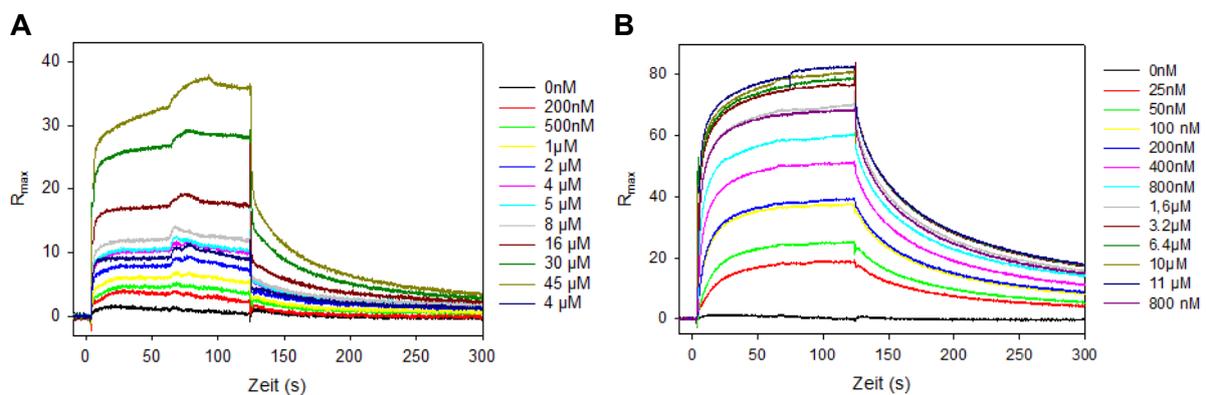


Abbildung 10: Sensorgramme der Interaktion zwischen reifem BMP-2 und (A) dem 15 kDa-Kernfragment bzw. (B) der Prodomäne. Die Interaktionsmessungen wurden bei 20 °C an einem BIAcore T100 durchgeführt.

Für die Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten wurden jeweils die maximalen RU-Werte ( $R_{max}$ ) im *steady state* bestimmt (zwischen 105 und 115 s) und gegen die Proteinkonzentration aufgetragen (Abbildung 11). Die Auswertung erfolgte unter Anpassung der Daten an eine Langmuir-Bindungsisotherme (2.2.4.6). Für das Kernfragment wurde neben einem Bindungsereignis mit hoher Affinität zusätzlich eine lineare Abhängigkeit des Signals bei hohen Konzentrationen beobachtet (Abbildung 11A). Es wurde angenommen, dass neben der spezifischen Bindung an BMP-2 ( $K_{D1}$ ) ein unspezifisches Bindungsereignis ( $K_{D2}$ ) stattfand. Daher wurde die Gleichung um einen zusätzlichen Term erweitert (Gleichung 12).

$$R = \frac{R_{\max 1} \cdot c}{K_{D1} \cdot c} + \frac{R_{\max 2} \cdot c}{K_{D2} \cdot c} \quad \text{Gleichung 12}$$

Dadurch war es möglich die unspezifische Bindung separat zu betrachten. Auch für die Prodomäne war ein leichter linearer Anstieg bei hohen Konzentrationen zu beobachten (Abbildung 11B), so dass der  $K_D$  ebenfalls mit Gleichung 12 berechnet wurde. Die erhaltenen apparenten Dissoziationskonstanten sind Tabelle 28 zu entnehmen.

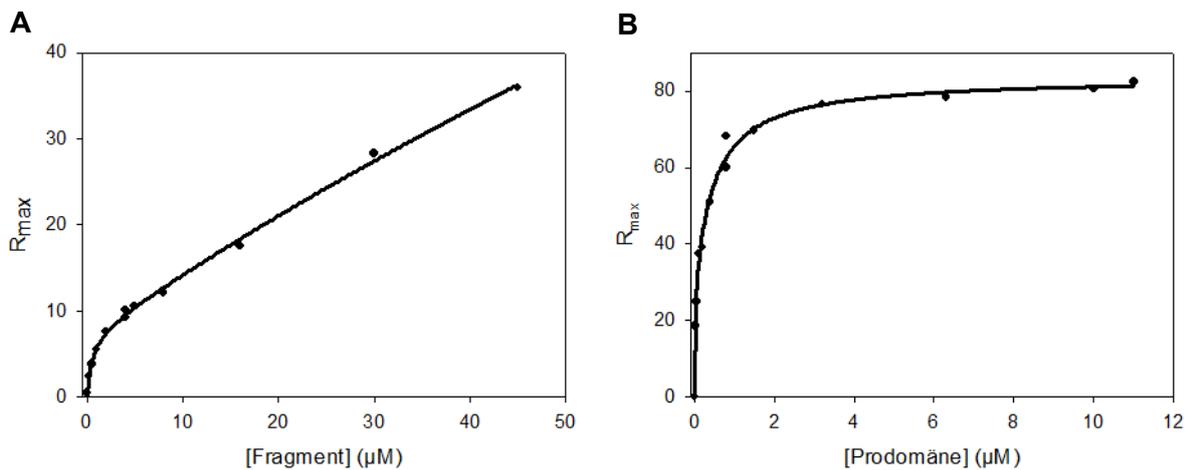


Abbildung 11: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Bindung (A) des Kernfragmentes und (B) der Prodomäne an immobilisiertes BMP-2. Aufgetragen wurde das Signal  $R_{\max}$  gegen die Proteinkonzentration. Die Kurven wurden an Gleichung 12 angepasst.

Tabelle 28: Übersicht über die ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten.

Protein	$K_{D1}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{D2}$ ( $\mu\text{M}$ )
Kernfragment	$0,430 \pm 0,160$	$314,02 \pm 289,46$
Prodomäne	$0,025 \pm 0,014$	$0,949 \pm 0,261$

Der  $K_D$ -Wert für die Prodomäne stimmt mit dem bereits publizierten Wert von  $28 \pm 16$  nM überein [121]. Das Kernfragment bindet mit einer 20-fach geringeren Affinität an den reifen Wachstumsfaktor im Vergleich zu der Vollängen-Prodomäne. Dem zweiten Bindungsereignis liegt vermutlich die unspezifische Bindung eines weiteren Fragment- bzw. Prodomänen-Moleküls zugrunde.

### 3.1.3.2 Identifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren

Für die Bestimmung, welche Elemente der Primärstruktur der Prodomäne bzw. des Kernfragmentes an der Bindung von BMP-2 beteiligt sind, wurden Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels Peptid-*microarray* untersucht. Dazu wurde die gesamte Sequenz

von prä-proBMP-2 in Form von überlappenden 15er Peptiden auf einem Chip immobilisiert und mit reifem BMP-2 inkubiert (2.2.4.7). Die Bindung von BMP-2 an bestimmte Sequenzbereiche wurde anschließend mit einem spezifischen BMP-2-Antikörper nachgewiesen (Abbildung A 1, Tabelle A 1). In einer Referenzmessung wurde das *microarray* nur mit dem Antikörper, ohne vorherige Inkubation mit BMP-2, behandelt (Abbildung A 2, Tabelle A 2). Mit Hilfe dieser Methode wurden einige Regionen identifiziert, die vermutlich eine entscheidende Funktion bei der Bindung der Prodomäne an BMP-2 übernehmen. Aus Abbildung 12 wird ersichtlich, dass bis auf zwei Ausnahmen alle an der Bindung beteiligten Segmente innerhalb des 15 kDa-Kernfragmentes liegen.

▼

MVAGTRCLLALLLPQVLLGGAAGLVPPELGRKFAAASSGRPSSQPSDEVLSEFELRLLSM  
 FGLKQRPTPSRDAVPPYMLDLYRRHSGQPGSPAPDHRLERAASRANTVRSFHHEESLEE  
 LPETSGKTTRRFFFNLSSIPTEEFITSAELQVFREQMQDALGNNSSFHHRINIYEI IKPA  
 TANSKFPVTRLLDTRLVNQNASRWESEFDVTPAVMRWTAQGHANHGFFVEVAHLEEKQGV  
 KRHVRIISRSLHQDEHSWSQIRPLLVTFGHDGKGHPLHKREKRQAKHKQRKRLKSSCKRHP  
 LYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKAC  
 CVPTELSAISMLYLDENEKVVLKKNYQDMVVEGCGCR

▼

Abbildung 12: Ergebnis der Bindungsanalyse von BMP-2 an prä-proBMP-2. Die mittels *microarray* identifizierten Bindungsstellen sind schwarz hervorgehoben, die Primärsequenz des 15 kDa-Kernfragmentes ist grau hinterlegt. Die schwarzen Dreiecke zeigen den Beginn der Prodomäne und des reifen BMP-2 an. Aus Kuhfahl *et al.*, 2011 [145].

Die identifizierten Bereiche innerhalb des reifen BMP-2 spiegeln Antikörper-Epitope wider. Das wurde durch eine Referenzmessung, bei der der Chip nur mit Antikörper inkubiert wurde, bestätigt (Abbildung A 2, Tabelle A 2).

### 3.1.4 Strukturuntersuchung des Kernfragmentes

#### 3.1.4.1 Strukturanalyse mittels NMR

Um Aufschluss über die Funktionen der Prodomäne von BMP-2 und weitere Einblicke in die Interaktion mit dem reifen Wachstumsfaktor zu erhalten, wäre die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Vorteil. Das Kernfragment liegt aufgrund seines geringeren Molekulargewichts von 15 kDa unterhalb der Größenlimitation für Strukturanalysen mittels

NMR. Daher war es Ziel, die Struktur des Kernfragmentes mittels Kernspinresonanz zu ermitteln. Um die Ausbeute an rekombinanten Protein und dessen Löslichkeit zu erhöhen, wurde ein Konstrukt mit *N*-terminalem FLAG-tag entsprechend 2.2.1.3 produziert. Zunächst wurden 1D-Protonenspektren aufgenommen (2.2.4.5). Ein Spektrum ist exemplarisch in Abbildung 13 gezeigt.

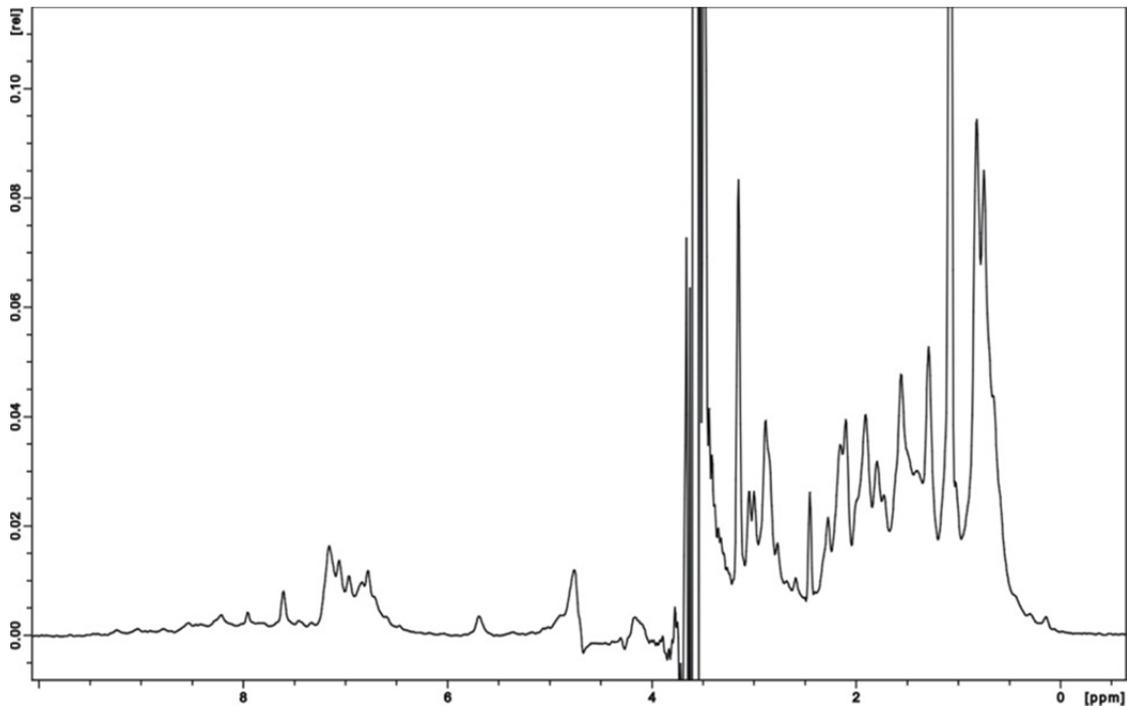


Abbildung 13: 1D-Protonenspektrum des 15 kDa-Fragmentes. Die Messungen wurden bei 20 °C mit 150 µM Protein in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl und 1/10 Vol. (v/v) D<sub>2</sub>O als Standard durchgeführt. Das hohe Resonanzsignal bei 3,8 ppm wurde durch Tris bedingt.

Charakteristisch für ein gefaltetes Protein sind Signale bei einer chemischen Verschiebung unterhalb von 0,7 ppm, die durch Resonanzen der Methylgruppen auftreten. Zudem sollten die Signale zwischen 6 und 10 ppm, welche durch die Amidprotonen des Peptidrückgrates und der Seitenketten Asparagin und Glutamin verursacht werden, eine große Dispersion aufweisen. Das Spektrum des Kernfragmentes zeigte um 0 ppm keine Signale (Abbildung 13). Auch zwischen 6 und 10 ppm konnten keine dispersen Signale beobachtet werden. Das Spektrum deutete daher auf ein unstrukturiertes Protein hin. Der Versuch die Bedingungen durch verschiedene pH-Werte und Salzkonzentrationen zu optimieren, brachte keine Verbesserung der Spektren.

Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu den CD-Daten und den Entfaltungsübergängen, nach denen das Kernfragment definierte Sekundär- und Tertiärstrukturen besitzt. Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen und eine aminosäurespezifische Auflösung zu erreichen, wurden heteronukleare <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N- bzw. <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-Korrelationsexperimente durchgeführt (2.2.4.5). Dazu wurde das Kernfragment ohne FLAG-tag, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, in

Minimalmedium, supplementiert mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $^{13}\text{C}$ -Glucose, exprimiert. Mittels Massenspektrometrie wurde bestätigt, dass 99,9% aller Stickstoff- und Kohlenstoff-Atome substituiert waren. Das doppelt markierte Protein wurde bis zu einer Konzentration von  $367\ \mu\text{M}$  aufkonzentriert, mit 1/10 Vol. (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  versetzt und 2D-Spektren aufgenommen. Das HSQC-Experiment liefert Kreuzsignale von N- und H-Atomen, wobei jedes Amid ein Signal ergibt. So würde jede Aminosäure, mit Ausnahme von Prolin, welches kein Amidproton besitzt, ein Signal produzieren. Zudem sollten Signale von den Amidprotonen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin detektiert werden.

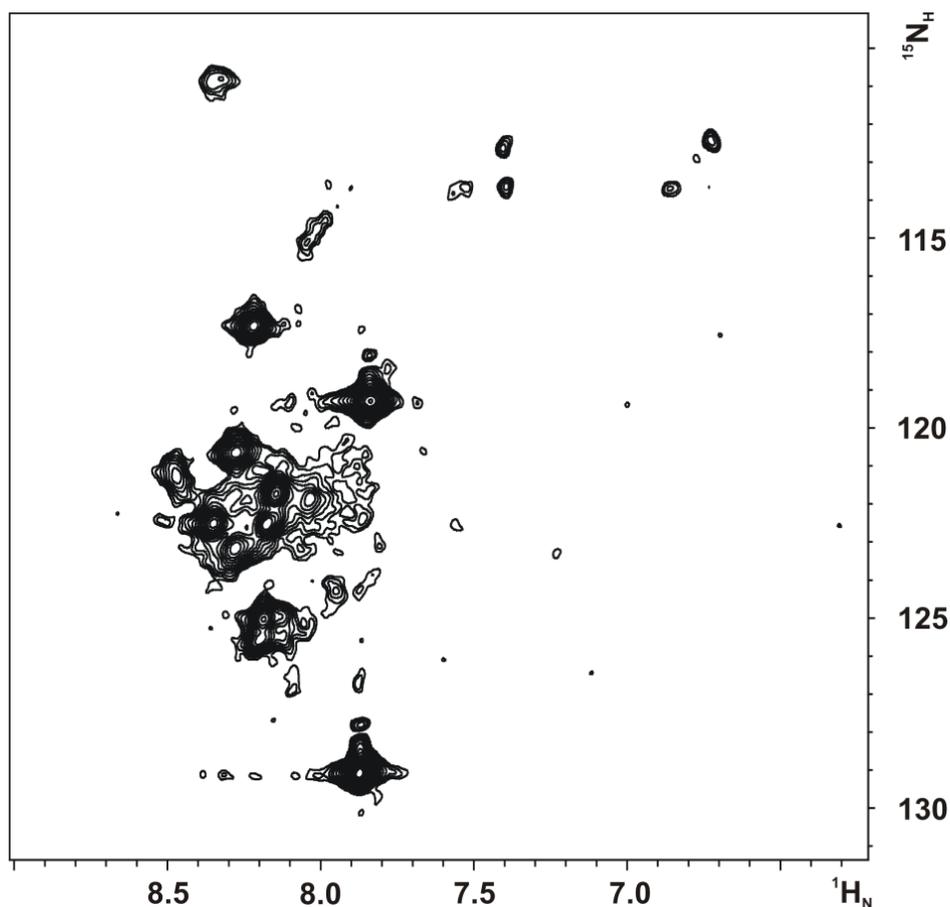


Abbildung 14:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des doppelt isotoopenmarkierten Kernfragmentes. Die Messungen wurden bei  $20\ ^\circ\text{C}$  durchgeführt. Jeder *peak* repräsentiert die Kreuzsignale von N- und H-Atomen der Amide der Peptidbindungen. Rechts oben (zw. 7,0 und 7,5 pm) sind immer zwei Signale bei gleicher  $^{15}\text{N}$ -Verschiebung zu sehen, welche auf Kreuzsignale der Amidprotonen in den Seitenketten von Asparagin und Glutamin zurückzuführen sind.

In Abbildung 14 ist exemplarisch das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum zu sehen. Nur wenige Kreuzsignale wiesen eine hohe Auflösung und Vereinzelung auf. Dass der größte Anteil an Signalen als *cluster* bei 8 ppm zusammen fiel, deutete auf einen hohen Anteil an unstrukturierten Bereichen in dem Fragment hin. Durch diese Überlappung der Resonanzen war eine Zuordnung der Aminosäuren nicht möglich.

Das  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum, welches die Korrelation der aliphatischen C-Atome mit den entsprechend gebundenen Protonen aufzeigt, wies ebenfalls nur überlappende Signale auf (Daten nicht gezeigt). Auch der Versuch eine bessere Auflösung durch  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente, die eine Linienverschmälerung der Resonanzsignale und somit eine höhere Sensitivität gewähren, führten zu keiner Verbesserung. Die Anwendung von Tripleresonanz (3D)-Techniken, die die Korrelationen zwischen allen drei Kernen ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ ) nutzen und das Problem der Überlagerungen durch die Dispersion von Signalen lösen, brachte nicht den gewünschten Erfolg. So wurde angenommen, dass eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie nicht möglich ist.

#### 3.1.4.2 Strukturaufklärung mit Hilfe von chemischen *cross-linking* und Massenspektrometrie

Auf Grund der widersprüchlichen Ergebnisse aus den Entfaltungsstudien und den NMR-Messungen, wurde eine andere Methode gesucht, die Aussagen über die Struktur des Kernfragmentes zulässt. Chemisches *cross-linking* in Verbindung mit Massenspektrometrie (MS) hat sich als alternative Methode zum Erlangen von Informationen über die dreidimensionale Struktur eines Proteins bewiesen [146]. Dieses Verfahren beruht auf der Einführung einer kovalenten Bindung zwischen funktionellen Gruppen von Aminosäuren innerhalb eines Proteins. Nach der Vernetzungsreaktion werden die verknüpften Peptide mittels hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Bildung des *cross-links* setzt einen bestimmten Abstand der zu verknüpfenden Aminosäuren zueinander voraus. Dadurch können Schlussfolgerungen über die Entfernung der Aminosäuren, die durch den *cross-linker* vernetzt wurden, in dem Protein getroffen werden [147].

Für die Untersuchung von intramolekularen *cross-links* innerhalb des 15 kDa-Kernfragmentes wurde das homobifunktionelle, aminreaktive Reagenz BS<sup>3</sup> (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat) verwendet, welches vorwiegend mit primären Aminen, wie sie am *N*-Terminus und in Lysin-Seitenketten zu finden sind, reagiert. Zudem werden auch Serin- und Threonin-Reste verknüpft, obwohl die Stabilität der entstehenden Ester in wässriger Lösung gering ist [148]. Das 15 kDa-Kernfragment enthält fünf Lysine, die sich gut über die Sequenz verteilen, und zudem 12 Serine und 10 Threonine, so dass viele potentielle Reaktionspartner für das Vernetzungsreagenz in dem Protein zu finden sind. Da das Kernfragment nur in Tris-Puffer löslich war, welcher ebenfalls freie Aminogruppen besitzt und damit ungeeignet für das Vernetzungsreagenz war, wurde für die Analysen das Kernfragment mit *N*-terminalem FLAG-*tag* verwendet, welches in HEPES-Puffer löslich war. Durch den angefügten *tag* besitzt das Fragment ein Molekulargewicht von 16154,9 Da. Die Volllängen-Prodome wurde ebenfalls analysiert.

Die Methode wurde nach dem sogenannten *bottom-up* Verfahren durchgeführt [148], wobei die Proteine nach dem *cross-linking* proteolytisch gespalten und die entstehenden Peptide anschließend mit Massenspektrometrie analysiert wurden (2.2.4.8). Um die chemische Vernetzungsreaktion zu überprüfen und die entstandenen Produkte zu trennen, wurden die Proteine zunächst auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen (Abbildung 15). Einen Hinweis auf eine erfolgreiche Vernetzung lieferte ein "Schmier" unter der entsprechenden Bande, welcher bei beiden Proteinen vorhanden war und auf eine kompaktere Struktur der Proteine durch die Vernetzung, und damit ein geringfügig anderes Laufverhalten, zurückzuführen ist. Zudem waren Banden detektierbar, die in ihrem Laufverhalten dimeren Proteinspezies entsprachen.

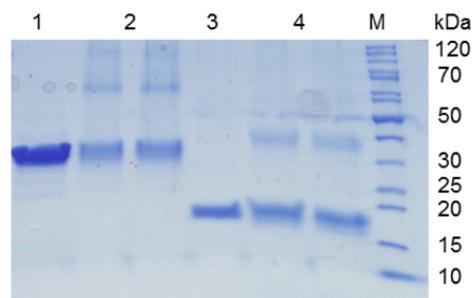


Abbildung 15: SDS-PA-Gel nach der *cross-linking* Reaktion. (1) Prodomäne, (2) Prodomäne nach chemischem *cross-linking*, (3) Kernfragment, (4) Kernfragment nach chemischem *cross-linking*. (M) Proteingrößenstandard. Die Bande bei 35 kDa entspricht der Prodomäne, die Bande bei 70 kDa verknüpften Dimeren. Das Kernfragment (bei 16 kDa auf Grund des FLAG-tags) wies ebenfalls nach Vernetzung Dimer-Banden zwischen 30 und 35 kDa auf.

Alle prominenten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und im Gel proteolytisch gespalten. Um eine möglichst große Sequenzabdeckung in der MS-Analyse zu erreichen, wurden die Endopeptidasen GluC und LysN gewählt. Das resultierende Peptidgemisch wurde anschließend mittels nano-HPLC/nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS analysiert (2.2.4.8). Die erhaltenen komplexen Datensätze wurden hinsichtlich der *cross-links* mit Hilfe des Programms StavroX2.0.6. ausgewertet [149]. Durch massenspektrometrische Analyse konnten sowohl für das Kernfragment als auch für die gesamte Prodomäne mehrere *cross-links* identifiziert werden (Tabelle A 3, Tabelle A 4). Insbesondere das Lysin 178 des Kernfragmentes ist mit verschiedenen Aminosäuren vernetzt worden. In Abbildung 16 sind die Daten der MS-Analyse eines *cross-links* exemplarisch gezeigt.

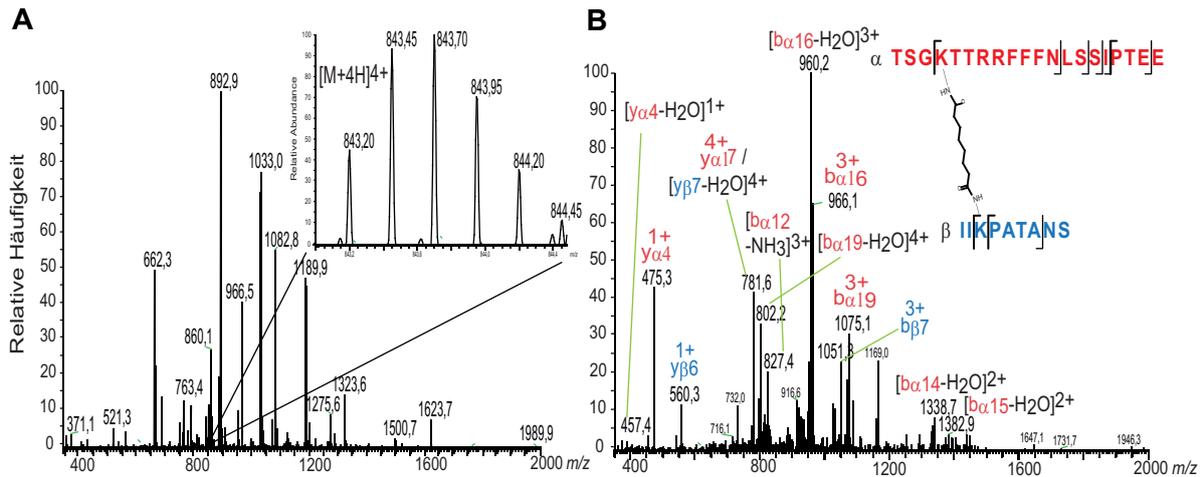


Abbildung 16: MS-Analyse eines intramolekularen *cross-links* des 15 kDa-Kernfragmentes. (A) Übersichtsspektrum mit dem hervorgehobenen Signal des *cross-link*-Produktes bei  $m/z$  843,198 (Ladung: +4). (B) Fragment-Ionen-Spektrum von dem *cross-link* zwischen K127 ( $\alpha$ -Sequenz 124-143, rot) und K178 ( $\beta$ -Sequenz 176-184, blau). Die Angabe der Position der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz von prä-proBMP-2 (Abbildung A 4).

Für die gesamte Prodomäne wurden, wie für das 15 kDa-Kernfragment, ebenfalls vier *cross-links* identifiziert (Tabelle A 4). In Abbildung 17 ist das Ergebnis der MS-Analyse eines dieser *cross-links* gezeigt.

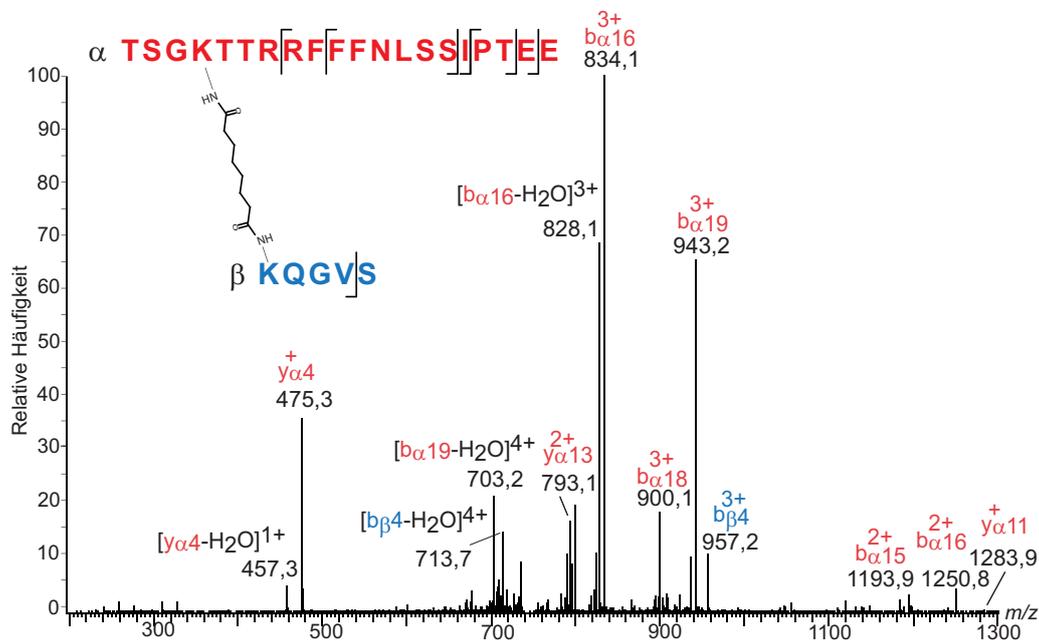


Abbildung 17: Fragment-Ionen-Spektrum des *cross-links* ( $m/z$  744,139 (Ladung: +4)) zwischen K127 ( $\alpha$ -Sequenz 124-143, rot) und K236 ( $\beta$ -Sequenz 236-240, blau) der Prodomäne. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz von prä-proBMP-2 (Abbildung A 4).

Der  $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\alpha$  Abstand zwischen zwei kovalent verbundenen Aminosäuren eines *cross-link*-Produktes kann, aufgrund der Länge des *spacers* in dem  $\text{BS}^3$ -Molekül, als maximal 25 Å

angenommen werden [150]. Mit dieser Einschränkung können Aussagen über die Entfernung der Aminosäuren in dem Protein getroffen werden. Für die Prodomäne von BMP-2 liegt bisher keine Kristallstruktur vor mit der die Abstände überprüft werden könnten. Es wurde daher die Struktur eines verwandten Proteins benutzt, um die *cross-links* einzuordnen. Die Kristallstruktur des *latency associated peptide* (LAP) von TGF- $\beta$ 1 [72] wurde als Referenz verwendet. Es ist die einzige bisher publizierte Kristallstruktur einer Prodomäne der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie. Zwischen den Prodomänen von TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 besteht eine 18%-ige Sequenzidentität und eine 29%-ige  $\Delta$ . Daher kann eine gewisse Ähnlichkeit zwischen den Strukturen angenommen werden. Im Rahmen eines Sequenzvergleichs wurde bereits angenommen, dass die Prodomänen innerhalb der Proteinfamilie gemeinsame Struktur-Motive besitzen [72]. Alle identifizierten Vernetzungsprodukte des 15 kDa-Kernfragmentes der BMP-2-Prodomäne wurden der Sequenz des LAP zugeordnet (Tabelle A 3) und in die Kristallstruktur eingetragen.

Aus Abbildung 18A wird deutlich, dass nahezu alle *cross-links* des 15 kDa-Kernfragmentes unter Beachtung der Abstandsbeschränkung von 25  $\text{\AA}$  in Übereinstimmung mit der Struktur des LAP sind. Lediglich für den *cross-link* zwischen K178 und K236, der in TGF- $\beta$ 1 den Aminosäuren S146 und S198 entspricht, ist der Abstand in dem LAP größer als 25  $\text{\AA}$  (30,3  $\text{\AA}$ ). Das Serin 198 liegt im LAP in einem  $\beta$ -Faltblatt (Abbildung 18A). Das 15 kDa-Fragment der BMP-2-Prodomäne enthält allerdings nur einen der beiden  $\beta$ -Stränge, welcher sich vermutlich nicht genauso anordnet wie das  $\beta$ -Faltblatt im LAP-Dimer. Es ist zu erwarten, dass der  $\beta$ -Strang im Kernfragment näher an den anderen  $\beta$ -Strängen liegt und daher auch die beiden Lysine näher beieinander sind, wodurch der *cross-link* erklärt werden könnte.

Diese Daten liefern einen Hinweis darauf, dass die Aminosäuren in dem Kernfragment von BMP-2 eine ähnliche Anordnung bzw. Entfernung zueinander aufweisen wie die entsprechenden Reste in der Prodomäne von TGF- $\beta$ 1. Es kann daher angenommen werden, dass die beiden Prodomänen über ähnliche Tertiärkontakte verfügen.

Die *cross-links* der Vollängen-Prodomäne von BMP-2 wurden ebenfalls in die Kristallstruktur des LAP eingefügt. Ein identifizierter *cross-link* (entspricht in Tabelle A 4 den ersten beiden Zeilen) konnte nicht der Sequenz des LAP zugeordnet werden. Eine der drei Verknüpfungen stimmt mit der des Kernfragmentes überein (Abbildung 18B). Ein *cross-link* liegt außerhalb des Kernfragmentes, der zudem in der LAP-Struktur die begrenzten 25  $\text{\AA}$  überschreitet. Somit wird auch hier eine strukturelle Ähnlichkeit der BMP-2-Prodomäne mit der Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 bestätigt.

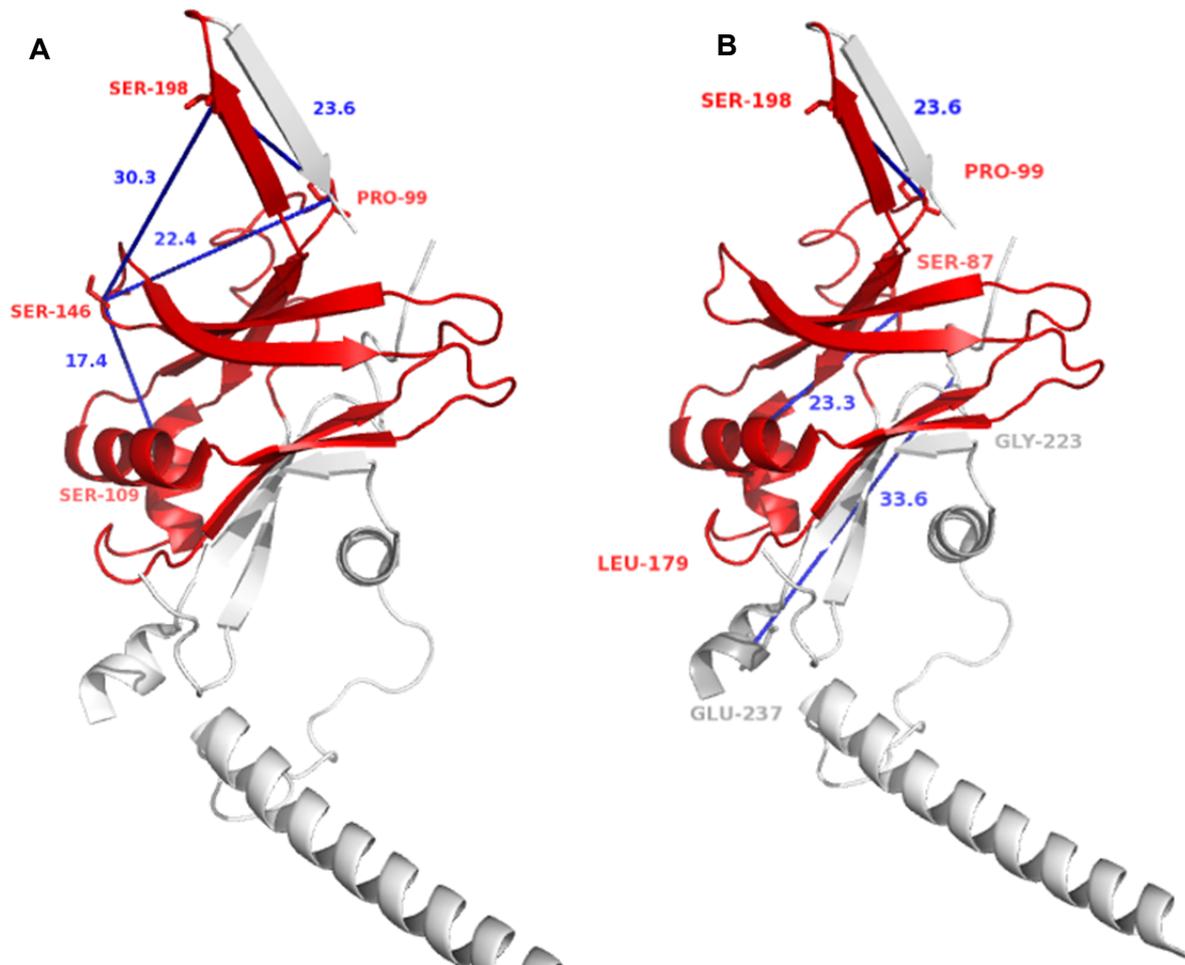


Abbildung 18: Identifizierte intramolekulare *cross-links* des (A) 15 kDa-Kernfragmentes und (B) der Prodomäne von BMP-2. Die *cross-links* sind in der Struktur des LAP von TGF- $\beta$ 1, welches in der *cartoon*-Darstellung gezeigt ist (pdb: 3RJR [72]), abgebildet. Zu sehen ist ein Prodomänen-Monomer in grau. Die dem 15 kDa-Kernfragment entsprechende Sequenz ist in rot hervorgehoben. Die identifizierten vernetzten Aminosäuren wurden der Sequenz des LAP zugeordnet (Tabelle A 3 und A 4) und sind in der Stab-Darstellung zu sehen. Die verknüpften Aminosäuren sind durch eine blaue Linie verbunden und der Abstand zwischen beiden C $\alpha$ -Atomen ist in Å angegeben.

Wie schon im SDS-PA-Gel zu beobachten war (Abbildung 15), wurden nach der Vernetzungsreaktion auch Dimere des 15 kDa-Fragmentes detektiert. Daher war anzunehmen, dass zusätzlich intermolekulare Verknüpfungen auftraten. Allerdings konnten intermolekulare *cross-links* nur dann eindeutig identifiziert werden, wenn jeweils die gleiche Peptidsequenz miteinander vernetzt war. Zusätzlich zu den intramolekularen *cross-links* wurden für das Kernfragment zwei intermolekulare gefunden (Tabelle A 3, letzten beiden Zeilen). Auch diese wurden in die LAP-Kristallstruktur eingetragen (Abbildung 19). Die entsprechenden Reste in dem LAP liegen genau in dem Dimerisierungsbereich der beiden Prodomänen-Moleküle.

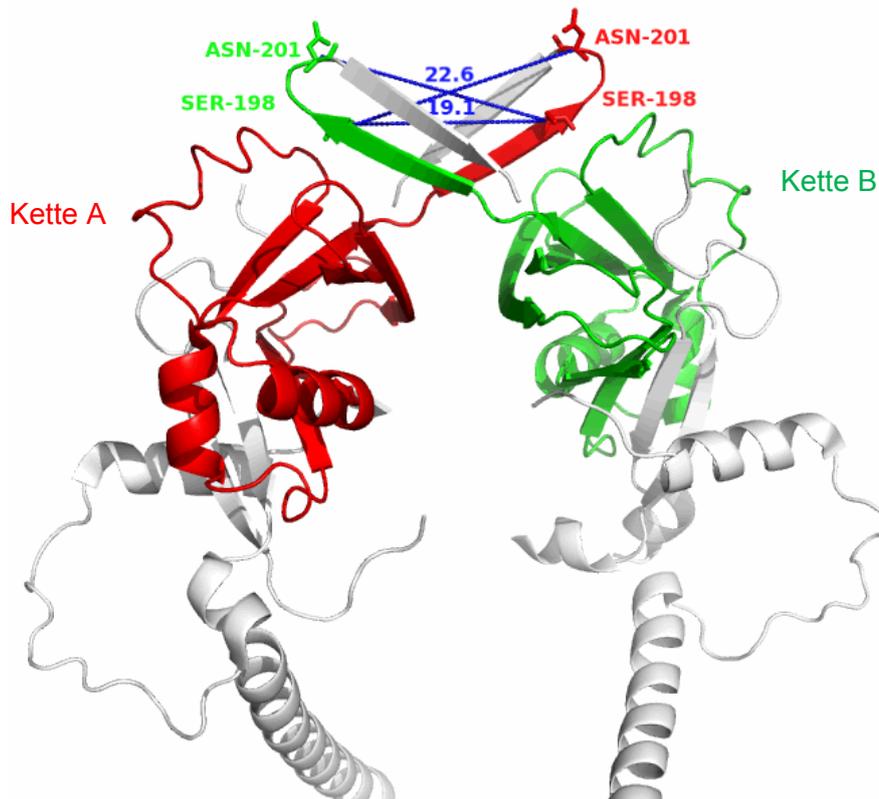


Abbildung 19: Intermolekulare *cross-links* des 15 kDa-Kernfragmentes. Die *cross-links* wurden der Struktur des LAP von TGF- $\beta$ 1 (pdb: 3RJR [72]), welches als *cartoon* dargestellt ist, zugeordnet. Die zwei Prodomänen-Monomere (Ketten A und B) sind in grau gezeigt. Die dem 15 kDa-Kernfragment entsprechende Sequenz ist in rot (Kette A) und in grün (Kette B) hervorgehoben. Die Entfernung zwischen den jeweils verknüpften Aminosäuren, welche in der Stab-Darstellung gezeigt sind, ist als blaue Linie dargestellt und der Abstand zwischen beiden C $\alpha$ -Atomen ist in Å angegeben.

### 3.1.5 Analyse der Dimerisierung/Oligomerisierung des 15 kDa-Fragmentes

Das Auftreten von intermolekularen *cross-links* für das Kernfragment der BMP-2-Prodomäne führte zu der Frage, ob das 15 kDa-Fragment *in vitro* nicht-kovalent dimerisiert. Mittels analytischer Ultrazentrifugation (2.2.4.4) (AUZ) wurde in Gleichgewichtsläufen das apparente Molekulargewicht bestimmt und in Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten der apparente Sedimentationskoeffizient ermittelt. Die Gleichgewichtsläufe, die bei drei verschiedenen Proteinkonzentrationen (3  $\mu$ M, 13  $\mu$ M, 40  $\mu$ M) gemessen wurden, wobei die Datenqualität bei 3  $\mu$ M nicht hoch genug für eine Auswertung war, ergaben durch Anpassung der Daten an Gleichung 10 (2.2.4.4) ein apparentes Molekulargewicht von 16100 Da. Das theoretische Molekulargewicht des Fragmentes ohne FLAG-*tag* liegt bei 15028,7 Da (ohne das Start-Methionin), wodurch sich eine Abweichung von 7% ergab. In Abbildung 20A sind die Daten repräsentativ für eine Proteinkonzentration von 40  $\mu$ M gezeigt. Da die durch AUZ ermittelte Molekülmasse keine Konzentrationsabhängigkeit aufwies, wurde angenommen, dass das Fragment unter diesen Bedingungen nicht dimerisiert.

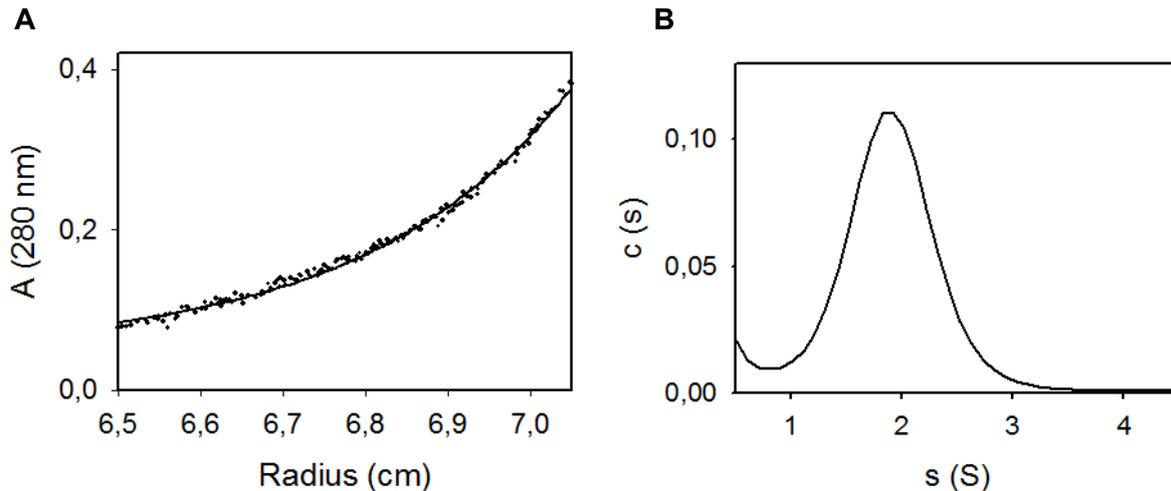


Abbildung 20: Analytische Ultrazentrifugation des 15 kDa-Kernfragmentes. A) Sedimentationsgleichgewicht von 40 µM Protein in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl. Die Messungen wurden bei 20 °C und 16000 rpm durchgeführt. B) Sedimentationskoeffizientenverteilung des Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiments. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wurde bei 20 °C und 40000 rpm gemessen.

Beim Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wird eine Änderung der Konzentrationsverteilung innerhalb der Messzelle registriert, die direkt in eine Sedimentationskoeffizientenverteilung (s-Verteilung) umgerechnet werden kann. Für das 15 kDa-Kernfragment wurde ein apparenter Sedimentationskoeffizient von 1,9 S bestimmt (Abbildung 20B). Da auch hier nur eine homogene Spezies und keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet wurden, war zu schlussfolgern, dass das Fragment in Lösung als Monomer vorliegt.

Für die weitere Überprüfung der Quartärstruktur wurden chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge in Abhängigkeit von der Konzentration an Kernfragment gemessen. Bei dimeren/oligomeren Proteinen sind die Übergangskurven abhängig von der Gesamtproteinkonzentration, da sich die Molekularität bei der Entfaltung verändert [151]. Es wird davon ausgegangen, dass die Dimere vorwiegend über Quartärkontakte stabilisiert werden und es zu keiner Akkumulation nativer Monomere kommt [152].



Damit ergibt sich eine Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstante von der Proteinkonzentration. Bei einer Dimerisierung des 15 kDa-Fragmentes würde erwartungsgemäß eine Verschiebung des Übergangsmittelpunktes zu höheren Harnstoffkonzentrationen bei steigenden Proteinkonzentrationen zu beobachten sein, da sich das Verhältnis zugunsten des nativen Dimers verschieben würde [153].

Für die Messungen wurde das Kernfragment mit *N*-terminalem FLAG-tag eingesetzt, da es eine höhere Löslichkeit aufwies und so besser konzentriert werden konnte. Es wurden

Übergänge bei drei verschiedenen Fragmentkonzentrationen gemessen (Tabelle 29). Die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen wurde aufgezeichnet. In Abbildung 21 sind exemplarisch die Übergänge für 2  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  Proteinkonzentration gezeigt.

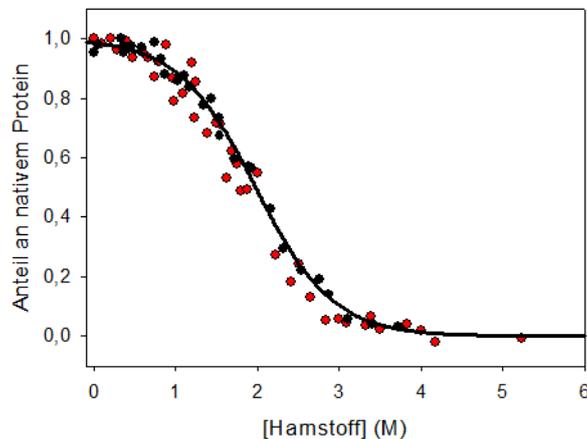


Abbildung 21: Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge in Abhängigkeit von der Konzentration an Fragment. Es wurde jeweils die Entfaltung über die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz gemessen. Die Messdaten für 2  $\mu\text{M}$  sind in rot gezeigt, die für 30  $\mu\text{M}$  in schwarz. Die Messungen wurden bei 20 °C in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl mit variierenden Harnstoffkonzentrationen durchgeführt.

Die Kurven waren identisch und die ermittelten thermodynamischen Parameter (Tabelle 29) unterschieden sich auch über einen 15-fachen Konzentrationsbereich nur geringfügig. Dadurch kann angenommen werden, dass das Gleichgewicht auf Seiten des Monomers lag. Der  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Wert weicht um 2 kJ/mol von dem ermittelten Wert für das Fragment ohne FLAG-*tag* ab (3.1.2.3). Das könnte auf eine geringfügige Destabilisierung durch den *tag* hinweisen.

Tabelle 29: Thermodynamische Parameter der chemisch-induzierten Entfaltungsübergänge bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen.

<b>[Proteinkonzentration]</b>	<b><math>\Delta G(\text{H}_2\text{O})</math> (kJ/mol)</b>	<b><math>m</math> (kJ/mol · M)</b>	<b><math>D_{1/2}</math> (M)</b>
2 $\mu\text{M}$	$10,2 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1$
20 $\mu\text{M}$	$10,0 \pm 0,6$	$5,5 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,1$
30 $\mu\text{M}$	$10,2 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$

Es wurde durch zwei unabhängige Methoden belegt, dass das 15 kDa-Kernfragment keine Dimere in Lösung bildet bzw. dass das Gleichgewicht auf Seiten der Monomere liegt. Die identifizierten intermolekularen *cross-links* scheinen daher nur ein zufälliges

Vernetzungsprodukt darzustellen. Durch die kovalente Verknüpfung von Monomeren durch den *cross-linker* wurden die entstehenden Dimere dem Gleichgewicht entzogen. Das Gleichgewicht verschob sich daher zu Seiten der Dimere, wodurch diese in der MS detektiert wurden.

Auch für die Vollängen-Prodomäne waren im SDS-PA-Gel Dimere nach chemischen *cross-linking* zu beobachten (Abbildung 15). Allerdings konnten hier mit der massenspektrometrischen Analyse nicht eindeutig intermolekulare Vernetzungsprodukte identifiziert werden. In einer vorangegangenen Dissertation wurde im Rahmen von Gleichgewichtssedimentationsexperimenten mittels analytischer Ultrazentrifugation gezeigt, dass die Prodomäne zwar Dimere in Lösung bildet, die Dissoziationskonstante aber so hoch war ( $9,19 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ), dass es fraglich ist, ob die Dimerisierung physiologisch relevant ist [154].

## 3.2 Untersuchung des 20 kDa-Fragmentes

Die Strukturuntersuchung des 15 kDa-Kernfragmentes mittels NMR-Spektroskopie war aufgrund der geringen Signaldispersion nicht möglich. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine Aggregation des Kernfragmentes unter den gegebenen Messbedingungen sein. Daher war es ein Ziel die thermodynamische Stabilität des Kernfragmentes zu erhöhen um eine mögliche Aggregation zu vermindern. Basierend auf der Kristallstruktur der TGF- $\beta$ 1-Prodomäne [72] wurde von Prof. Dr. Jay Groppe (Institut für Biomedizinische Wissenschaften, Texas A&M University, Dallas, USA) angenommen, dass die das entsprechende Kernfragment flankierenden  $\beta$ -Stränge 1 und 10 stabilisierend wirken. Um diese Annahme zu prüfen, wurde ein weiteres Konstrukt hergestellt, welches die beiden  $\beta$ -Stränge beinhaltet und im Folgenden aufgrund seines theoretischen Molekulargewichts als 20 kDa-Kernfragment bezeichnet wird.

### 3.2.1 Rekombinante Genexpression

Nach Abgleich mit der Struktur der TGF- $\beta$ 1-Prodomäne wurde das 15 kDa-Kernfragment *N*- und *C*-terminal erweitert, so dass die  $\beta$ -Stränge in dem neuen Konstrukt enthalten waren. Die resultierende Sequenz ist in Abbildung 22 gezeigt. Die entsprechende cDNA wurde, wie in 2.2.1.3 beschrieben, in den pET11a-Vektor kloniert und das Protein rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) pUBS520 hergestellt (2.2.2.2). Dabei wurde *N*-terminal ein FLAG-tag angefügt um die Löslichkeit und Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhöhen.

MVAGTRCLLALLLPQVLLGGAAGLVPELGRRKFAAASSGRPSSQPSDEVLSEFELRLLSM  
 FGLKQRPTPSRDAVVPPYMLDLYRRHSGQPGSPAPDHRLERAASRANTVRSFHHEESLEE  
 LPETSGKTTRRFFFNLSIPTEEFITSAELQVFREQMQDALGNNSSFHHRINIYEI IKPA  
 TANSKFPVTRLLDTRLVNQNASRWESFDVTPAVMRWTAQGHANHGFFVEVAHLEEKQGVSS  
 KRHVRI SRSLHQDEHSWSQIRPLLVTFGHDGKGGHPLHKREKRQAKHKQRKRLKSSCKRHP  
 LYVDFSDVGWWDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKAC  
 CVPTELSAISMLYLDENEKVVLKKNYQDMVVEGCGCR

Abbildung 22: Primärsequenz des 20 kDa-Kernfragmentes. Dargestellt ist die gesamte Sequenz von prä-proBMP-2, wobei das 15 kDa-Fragment schwarz hervorgehoben und das 20 kDa-Kernfragment rot hinterlegt ist. Die Sequenz, welche den beiden  $\beta$ -Strängen entspricht, ist unterstrichen. Die Dreiecke zeigen den Beginn der Prodomäne und des reifen BMP-2 an.

Aus 6 L Kulturmedium wurden durchschnittlich 20-30 g Zellfeuchtmasse erhalten, aus denen ca. 3-4 g IBs isoliert werden konnten. Wie das 15 kDa-Kernfragment, reicherte sich auch dieses Fragment in homogenen IBs an, die direkt für die Renaturierung eingesetzt wurden. Da der theoretische pI-Wert des Proteins bei 6,25 liegt, war auch hier die Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie möglich.

Das 20 kDa-Fragment eluierte bei einer Leitfähigkeit von 36 mS/cm, entsprechend einer NaCl-Konzentration von 500 mM (Abbildung 23B). Der einzelne symmetrische Peak (Abbildung 23B) und die Bande im SDS-PA-Gel (Abbildung 23A) bestätigten, dass das Fragment bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. Das Kernfragment wurde gegen 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl (nativer Puffer) dialysiert und aliquotiert.

Das gereinigte Fragment wurde massenspektrometrisch analysiert (Daten nicht gezeigt). Das ermittelte Molekulargewicht stimmte mit 20857,5 Da mit dem theoretischen (20857,1 Da, mit FLAG-tag) überein. Da auch in der MS-Analyse nur ein einzelner *peak* detektiert wurde, konnte bestätigt werden, dass eine homogene Proteinspezies in den Elutionsfraktionen enthalten war.

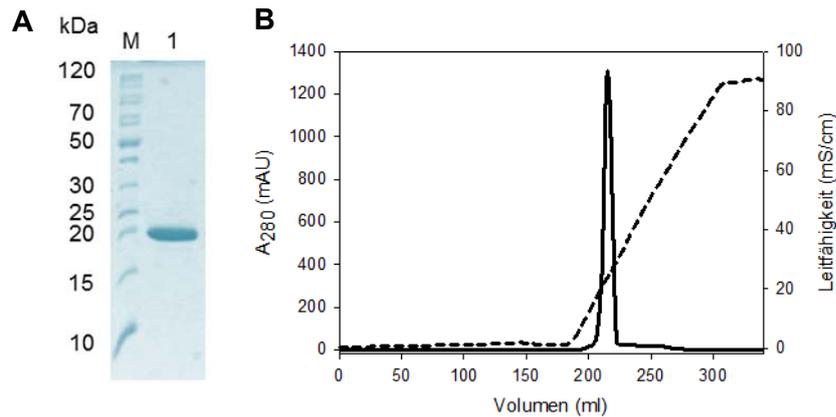


Abbildung 23: Rekombinante Genexpression und Reinigung des 20 kDa-Kernfragmentes. (A) SDS-PA-Gel zur Überprüfung des gereinigten renaturierten Proteins. (M) Proteingrößenstandard, (1) gereinigtes Protein nach Anionenaustauschchromatographie. (B) Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie (Säule: *Macro-Prep High Q Support*) des renaturierten 20 kDa-Fragmentes. Gezeigt sind die Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie) und die Leitfähigkeit (gestrichelte Linie).

## 3.2.2 Biophysikalische Charakterisierung des 20 kDa-Kernfragmentes

### 3.2.2.1 CD-Spektroskopie

Zunächst wurde überprüft, ob das renaturierte Fragment gefaltet vorlag. Die Fern-UV-CD-Spektren zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen dem nativen und denaturierten Kernfragment (Abbildung 24A). Daher wurde angenommen, dass das Fragment einen definierten Faltungszustand im nativen Puffer aufwies. Ein absolutes Minimum bei 210 nm unter nativen Pufferbedingungen deutete auf einen hohen *random coil*- und  $\beta$ -Faltblatt-Anteil hin. Das Spektrum des Kernfragmentes wich von dem der Prodomäne nur geringfügig ab, so dass geschlossen werden kann, dass ähnliche Sekundärstrukturanteile vorliegen. Die positive Amplitude bei Wellenlängen unterhalb von 200 nm verwies auf einen höheren  $\beta$ -Faltblatt-Anteil in dem Kernfragment.

Es wurden weiterhin CD-Spektren im Nah-UV-Bereich aufgenommen. Das Spektrum des 20 kDa-Fragmentes zeigte hohe negative Amplituden und einen nahezu identischen Verlauf wie das Spektrum der Prodomäne (Abbildung 24B). Der Unterschied in der Amplitude könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Kernfragment ein Tyrosin und drei Phenylalanine weniger enthält. Es kann vermutet werden, dass sich die aromatischen Aminosäuren in dem Fragment in ähnlicher molekularer Umgebung befinden wie in der Prodomäne.

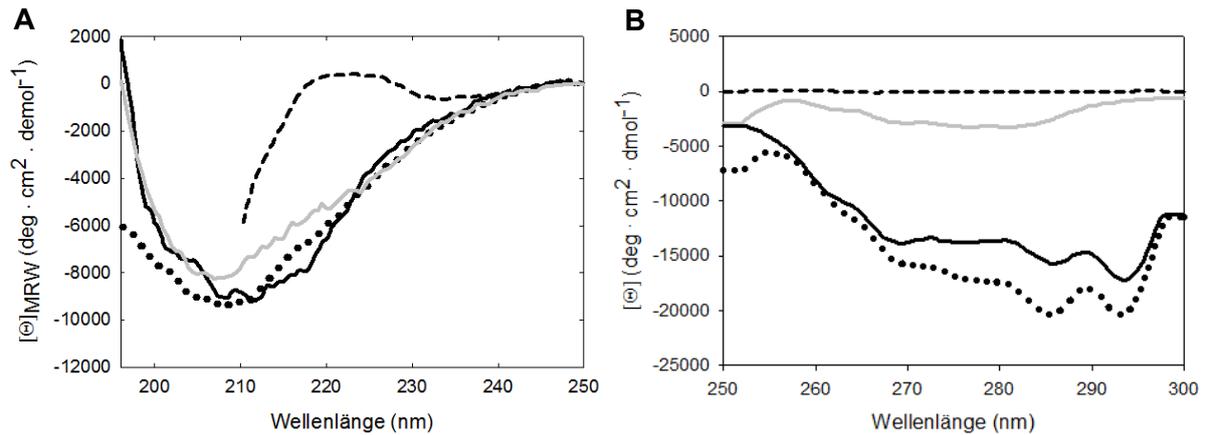


Abbildung 24: CD-Spektren des 20 kDa-Kernfragmentes und der Vollängen-Prodomäne. (A) Fern-UV-Bereich. (B) Nah-UV-CD-Spektren. Das 20 kDa-Kernfragment wurde in nativem Puffer (durchgezogene Linie) und unter denaturierenden Bedingungen (gestrichelte Linie) analysiert. Das Spektrum der Prodomäne (gepunktete Linie) sowie des 15 kDa-Fragmentes (graue Linie) unter nativen Bedingungen ist zum Vergleich aufgezeichnet worden. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in nativem Puffer. Denaturierender Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl, 6 M GdmCl. Nativer Puffer für die Prodomäne: 0,1 M HEPES pH 7,0. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml für die Fragmente und 0,5 mg/ml für die Prodomäne.

### 3.2.2.2 Intrinsische Fluoreszenz

Um weiterführend den Faltungszustand und die chemische Umgebung der aromatischen Aminosäuren zu untersuchen, wurde die intrinsische Fluoreszenz gemessen. Nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm verschob sich das Emissionsmaximum von 340 nm unter nativen Bedingungen auf 360 nm in denaturierendem Puffer (Abbildung 25A). Wurden spezifisch die in der Sequenz enthaltenen drei Tryptophane angeregt, verschob sich das Maximum durch Denaturierung von 342 nm auf 362 nm (Abbildung 25B). Die bathochrome Verschiebung der Maxima nach Entfaltung resultierte aus einer stärkeren Lösungsmittlexposition der aromatischen Aminosäuren und lies daher auf definierte Tertiärkontakte im nativen Puffer schließen. Die ermittelten Maxima sind denen der Prodomäne sehr ähnlich (340,5 nm bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 295 nm [154]). Damit wurden die bereits aus den Nah-UV-CD-Spektren vermuteten ähnlichen Tertiärkontakte bestätigt.

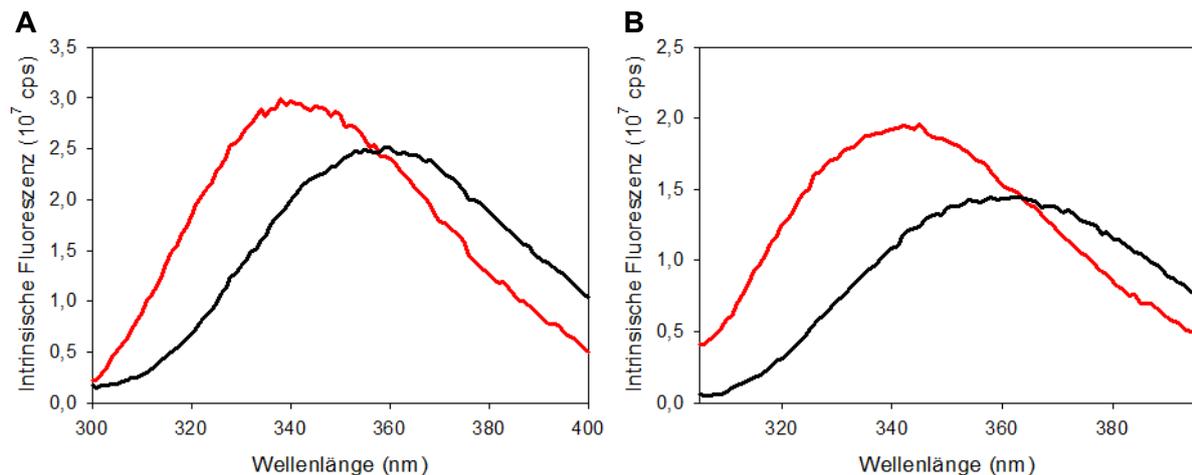


Abbildung 25: Intrinsic Fluoreszenz des 20 kDa-Fragmentes. (A) Anregung bei 280 nm und (B) bei 295 nm. Die Spektren wurden unter nativen (rote Linie) und unter denaturierenden (schwarze Linie) Bedingungen aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit 2  $\mu$ M Protein bei 20 °C in nativem Puffer. Denaturierender Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl, 6 M GdmCl.

### 3.2.2.3 Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge

Zur Überprüfung der Annahme, dass das 20 kDa-Kernfragment thermodynamisch stabiler ist als das 15 kDa-Kernfragment, wurde die Änderung der freien Enthalpie durch chemisch-induzierte Entfaltung und Rückfaltung bestimmt. Dafür wurde zunächst die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz gemessen (Abbildung 26A). Auch für dieses Fragment war die Entfaltung vollständig reversibel. Der  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Wert von  $20,0 \pm 0,8$  kJ/mol ist um 8 kJ/mol größer als der des 15 kDa-Kernfragmentes, wodurch eine höhere thermodynamische Stabilität für das 20 kDa-Fragment bestätigt wurde. Da der Übergangsmittelpunkt mit 2,3 M dem des 15 kDa-Fragmentes ähnlich ist, ist die erhöhte Stabilität auf eine größere Kooperativität ( $m = 8,7 \pm 0,4$  kJ/mol  $\cdot$  M) zurückzuführen. Das 20 kDa-Fragment ist weiterhin wesentlich stabiler als die gesamte Prodomäne ( $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  der Prodomäne =  $5,13 \pm 0,06$  kJ/mol,  $m = 4,9 \pm 0,05$  kJ/mol  $\cdot$  M [119]).

Um zu überprüfen, ob das Kernfragment nach einem Zweizustandsmodell entfaltet, wurden gleichermaßen Gleichgewichtsübergänge mittels CD-Spektroskopie gemessen. Aus Abbildung 26B wird ersichtlich, dass das Signal-Rausch-Verhältnis bei dieser Messung deutlich höher war. Dennoch war der Kurvenverlauf identisch zu den mittels intrinsischer Fluoreszenz erhaltenen Daten und auch die  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte wichen nur geringfügig voneinander ab (Tabelle 30). Damit wurde die zugrunde liegende Annahme, dass das Kernfragment nach einem Zweizustandsmodell ohne Intermediate im Gleichgewicht entfaltet, bestätigt. Allerdings sind kinetische Messungen für eine weitere Bestätigung notwendig.

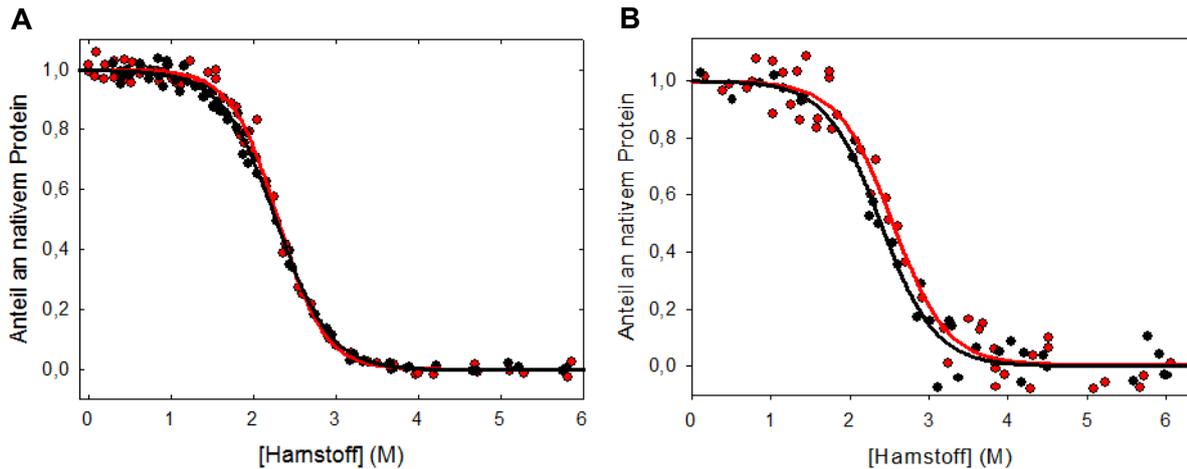


Abbildung 26: Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge des 20 kDa-Kernfragmentes. (A) Mittels Fluoreszenz und (B) Fern-UV CD gemessen. Gezeigt sind jeweils Entfaltung (rot) und Rückfaltung (schwarz). Die Messungen wurden mit 2 µM Protein bei 20 °C in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl mit variierenden Harnstoffkonzentrationen durchgeführt.

Tabelle 30: Thermodynamische Parameter der chemisch-induzierten Entfaltungsübergänge.

Method		$\Delta G(H_2O)$ (kJ/mol)	$m$ (kJ/mol · M)	$D_{1/2}$ (M)
Fluoreszenz	Entfaltung	$20,0 \pm 0,8$	$8,7 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,1$
	Rückfaltung	$17,0 \pm 0,6$	$7,5 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,1$
CD	Entfaltung	$18,1 \pm 2,9$	$7,1 \pm 1,1$	$2,5 \pm 0,2$
	Rückfaltung	$17,0 \pm 2,3$	$7,1 \pm 0,9$	$2,4 \pm 0,2$

### 3.2.3 Strukturuntersuchung

#### 3.2.3.1 Strukturanalyse mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Da die NMR-Analyse des 15 kDa-Kernfragmentes keine Strukturdaten lieferte, sollte die Analyse des stabileren 20 kDa-Fragmentes weitere Informationen liefern. Zunächst wurden 1D-Protonenspektren im nativen Puffer aufgezeichnet. Das Spektrum war identisch zu dem des 15 kDa-Kernfragmentes (Abbildung 13). Es konnten keine Signale bei einer chemischen Verschiebung unterhalb von 0,7 ppm und keine Signalaufspaltung zwischen 6 und 10 ppm beobachtet werden. Optimierungsversuche durch Messungen bei 4 °C und verschiedene Salzkonzentrationen im Puffer führten nicht zu dem gewünschten Ziel. Auch hier deuteten die Protonenspektren an, dass das Protein keine Tertiärkontakte aufweist. Dies widerspricht



Die identifizierten Vernetzungen wurden der Struktur der TGF- $\beta$ 1-Prodomäne zugeordnet. Zwei *cross-links* konnten nicht der Sequenz des LAP zugeordnet werden, da die Serine 247 und 249, die in dem LAP dem Segment 209-215 entsprechen, in einem beweglichen *loop* liegen, der nicht in der Kristallstruktur aufgelöst ist [71]. So wurde nur ein *cross-link* in die Struktur eingetragen, wobei dieser die Distanzbeschränkung von max. 25 Å überschreitet (Abbildung 28A). Der *cross-link* zwischen S166 und K236 entspricht beim LAP den Aminosäuren K134 und S198, welche im LAP 31 Å voneinander entfernt liegen. Das Serin 198 befindet sich innerhalb des ausgestreckten  $\beta$ -Faltblatts, welches an der Dimerisierung des LAP beteiligt ist (siehe Abbildung 19). In dem monomeren Kernfragment der BMP-2-Prodomäne hat dieses  $\beta$ -Faltblatt vermutlich eine weniger gestreckte Konformation, so dass das S166 und das K236 näher beieinander liegen. Dadurch würde sich der identifizierte *cross-link* erklären.

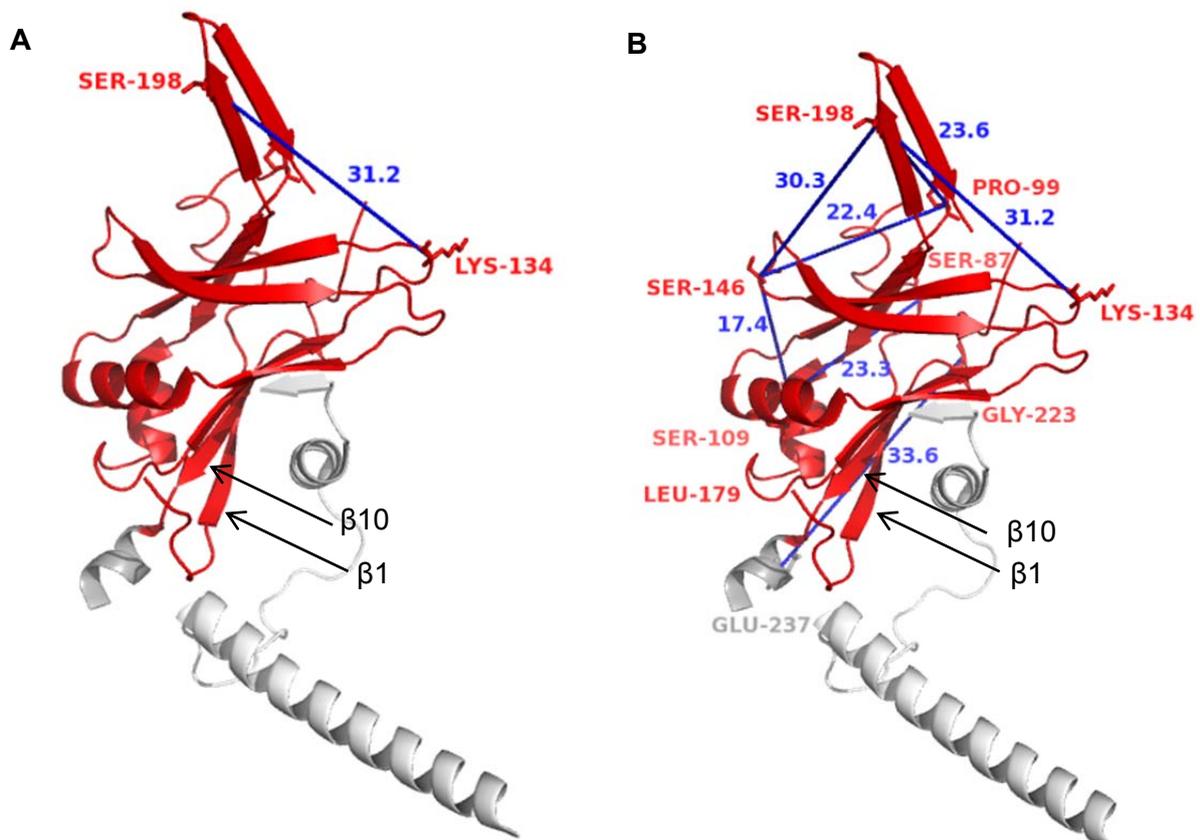


Abbildung 28: Identifizierte intramolekulare *cross-links* des (A) 20 kDa-Kernfragmentes. (B) Zusammenfassung der identifizierten *cross-links* des 15 kDa Fragmentes, des 20 kDa Fragmentes und der gesamten Prodomäne. Die *cross-links* sind jeweils in der Struktur des LAP von TGF- $\beta$ 1 (pdb: 3RJR [72]), welches in der *cartoon*-Darstellung abgebildet ist, gezeigt. Zu sehen ist ein Prodomänen-Monomer (grau). Die entsprechende Sequenz für das 20 kDa-Kernfragment ist in rot hervorgehoben. Die beiden zusätzlichen  $\beta$ -Stränge 1 und 10 sind mit Pfeilen markiert. Die identifizierten vernetzten Aminosäuren wurden der Sequenz des LAP zugeordnet und sind als rote Linien zu sehen. Die Distanzen zwischen den verknüpften Aminosäuren sind in blau hervorgehoben und der Abstand zwischen beiden C $\alpha$ -Atomen ist in Å angegeben.

Abschließend wurden alle *cross-links* der Prodomäne und der beiden Kernfragmente zusammen in die Struktur eingetragen (Abbildung 28B). Bei vier von sieben *cross-links* liegen die Aminosäuren in der TGF- $\beta$ 1-Prodomäne nicht weiter als 25 Å voneinander entfernt. Daraus kann abgeleitet werden, dass die entsprechenden Aminosäuren auch in der BMP-2-Prodomäne in einer ähnlichen Anordnung zueinander liegen.

### 3.3 Untersuchung der biologischen Funktion der BMP-2-Prodomäne in Zellkultur

Welche biologischen Funktionen die Prodomäne von BMP-2 übernimmt, ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Für die Prodomäne des TGF- $\beta$ 1 wurde gezeigt, dass sie nach Abspaltung nicht-kovalent mit dem reifen Wachstumsfaktor assoziiert und Latenz vermittelt [63]. Zudem fungiert sie als intramolekulares *chaperon*, welches die korrekte Faltung und Dimerisierung des reifen Wachstumsfaktors vermittelt [95]. Aufgrund der hier erhaltenen Belege für eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Prodomänen von BMP-2 und TGF- $\beta$ 1, wurde eine vergleichbare Funktion für die Prodomäne von BMP-2 vermutet. Daher bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, Aufschluss über die Funktion der BMP-2-Prodomäne bei der Biogenese des reifen Wachstumsfaktors in Zellkultur zu erhalten.

#### 3.3.1 Einfluss der Prodomäne auf die Biogenese von BMP-2

##### 3.3.1.1 Sekretionsanalyse von Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert wurden

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die oxidative Faltung und Dimerisierung von reifem BMP-2 *in vitro* unabhängig von der Prodomäne erfolgt [119]. Um zu untersuchen welchen Einfluss die Prodomäne auf die Biogenese von BMP-2 *in vivo* hat, wurde die Sekretion von BMP-2 in Zellkultur untersucht. Dazu wurden zunächst entsprechende Expressionskonstrukte hergestellt (2.2.1.3). Von Frau Dr. Elfie Rödel (JLU Gießen, Institut für Biochemie) wurde freundlicherweise das Konstrukt pSecTag2A mit der integrierten Sequenz für humanes proBMP-2 zur Verfügung gestellt. Der pSecTag2A-Vektor enthält die *Igk-chain leader*-Sequenz, welche die Sekretion der Proteine vermittelt und damit die Funktion der Prä-Sequenz übernimmt. Der Vektor wurde in HEK293-Zellen transfiziert (2.2.5.4) und der Kulturüberstand hinsichtlich der sezernierten Proteine analysiert. Dazu wurden die enthaltenen Proteine gefällt (2.2.3.4) und mittels *Western Blot* (2.2.3.6), unter

Verwendung eines gegen das reife BMP-2 gerichteten, spezifischen Antikörpers (Tabelle 7), untersucht.

#### *Prä-proBMP-2 führt zu der Sekretion verschiedener BMP-2-Spezies*

Der Kulturüberstand von Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, wies mehrere immunreaktive Banden auf, die von einem anti-BMP-2 Antikörper, welcher spezifisch reifes BMP-2 erkennt, detektiert wurden (Abbildung 29, Bahn ppB). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-) wurden drei verschiedene Banden mit apparenten Molekulargewichten zwischen 25 und 40 kDa detektiert (☐), die vermutlich verschiedenen dimeren BMP-2-Spezies entsprachen. Unter reduzierenden Bedingungen (+) waren nur zwei Banden detektierbar; eine bei einem apparenten Molekulargewicht von 15 kDa (☑) und eine bei 19 kDa (☒), die beide in ihrem Laufverhalten von dem monomeren BMP-2 aus *E. coli* abwichen (Bahn BMP). Es wurde angenommen, dass es sich bei beiden Proteinen um monomeres BMP-2 handelte. Diese BMP-2-Spezies könnten das Ergebnis einer unterschiedlichen Prozessierung des Vorläuferproteins oder das gleiche Protein mit verschiedenen Glykosylierungsmustern darstellen. Um dies zu untersuchen, wurden im Folgenden verschiedene Experimente durchgeführt (siehe nächster Abschnitt). Wahrscheinlich repräsentiert die Bande bei einem apparenten Molekulargewicht oberhalb von 100 kDa (☐) unter nicht-reduzierenden Bedingungen unprozessiertes, dimeres proBMP-2. Das "Verschwinden" dieser Bande durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol und die Detektion der 60 kDa-Bande (☑), welche entsprechend monomeres proBMP-2 aufzeigt, unterstützt diese Annahme. Die prominente Bande bei ca. 70 kDa (☒) stellt vermutlich halbprozessiertes proBMP-2 dar. Es ist davon auszugehen, dass es sich um ein Zwischenprodukt der Prozessierung des sezernierten proBMP-2-Dimers durch extrazelluläre Prohormonkonvertasen handelt, wobei nur eine Prodomäne von dem Vorläuferprotein abgespalten wurde. Israel *et al.* berichteten bereits von einem Heterodimer aus reifem BMP-2 und unprozessiertem proBMP-2, welches von CHO-2 $\Delta$ D-Zellen sezerniert wurde [155]. Unter reduzierenden Bedingungen spaltet sich das Heterodimer entsprechend in monomeres, reifes BMP-2 (☑) und monomeres proBMP-2 (☒) auf.

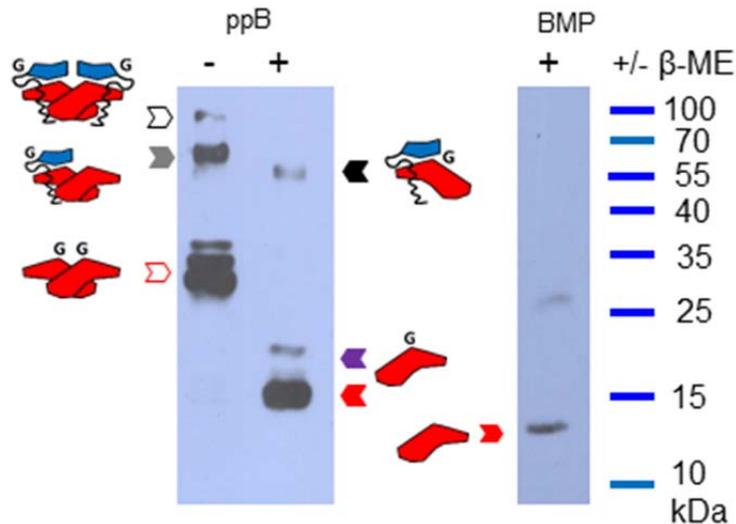


Abbildung 29: Sekretionsanalyse von BMP-2 nach Transfektion von HEK293-Zellen mit prä-proBMP-2. Der Kulturüberstand von Zellen, die mit prä-proBMP-2 (ppB) transfiziert waren, wurde mittels *Western Blot* hinsichtlich der sezernierten BMP-Spezies analysiert. BMP-2 aus *E. coli* (BMP) wurde als Referenz mitgeführt. Minus zeigt nicht-reduzierenden Probenpuffer an. Plus bedeutet, dass 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol in dem Probenpuffer enthalten waren. Die BMP-Spezies sind entsprechend gekennzeichnet: (▶, ▶) BMP-2-Monomere, (◁▷) BMP-2-Dimere, (▶) proBMP-2-Monomer, (◁▷) proBMP-2-Dimer, (◐) halb-prozessiertes proBMP-2. "G" verweist auf glykosyliertes Protein an.

#### Bestätigung der post-translationalen Glykosylierung von BMP-2

Da bereits in CHO-Zellen beobachtet wurde, dass BMP-2 post-translational glykosyliert wird [155,156], wurde vermutet, dass von den HEK-Zellen ebenfalls glykosyliertes BMP-2 sezerniert wurde und der Kulturüberstand daher mehrere Spezies mit unterschiedlichen Molekulargewichten aufwies. Um dies zu bestätigen, wurde N-Glykosidase F eingesetzt. Nach Abspaltung des Kohlenhydratanteils wies das 15 kDa-Protein (Abbildung 30, Bahn ppB) ein apparentes Molekulargewicht von 13 kDa (Bahn ppB<sup>de</sup>) auf und entsprach so dem Laufverhalten von *in vitro* gefaltetem, reduziertem BMP-2 (Bahn BMP). Damit wurde bewiesen, dass BMP-2 auch in HEK-Zellen glykosyliert wird.

Allerdings war nach Endoglykosidase-Spaltung weiterhin eine zweite Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 17 kDa detektierbar (Bahn ppB<sup>de</sup>). Diese Bande repräsentierte entsprechend nicht monomeres BMP-2 mit einem anderen Glykosylierungsmuster. Es wurde vermutet, dass es sich um das Produkt einer veränderten Prozessierung des Vorläuferproteins durch Prohormonkonvertasen handelte. Diese Hypothese wurde später durch eine Reihe weiterer Experimente untersucht (3.3.2.2).

Weiterhin war zu beobachten, dass das Protein bei 60 kDa unter reduzierenden Bedingungen (Bahn ppB) nach Deglykosylierung (Bahn ppB<sup>de</sup>) dem Laufverhalten von monomerem proBMP-2 aus *E. coli* (Bahn proBMP) entsprach. Dies belegt die Annahme, dass die Bande oberhalb von 100 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung

29) dimeres proBMP-2 darstellt und weist darauf hin, dass die Zellen auch unprozessiertes Vorläuferprotein sezernierten.

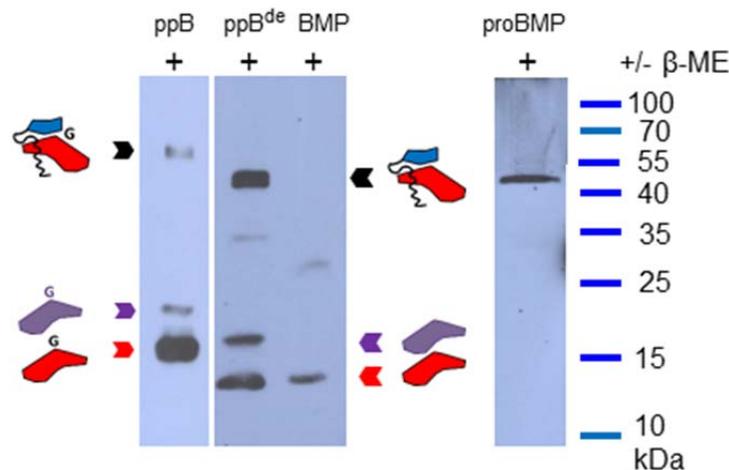


Abbildung 30: Untersuchung der Glykosylierung der sezernierten Proteine. Die gefällten Proteine aus dem Kulturüberstand von Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, wurden direkt (ppB) oder nach Inkubation mit N-Glykosidase F (ppB<sup>de</sup>) mittels *Western Blot* analysiert. BMP-2 (BMP) und proBMP-2 (proBMP) aus *E. coli* wurden als Referenz mitgeführt. Minus zeigt nicht-reduzierenden Probenpuffer an. Plus weist auf 2% β-Mercaptoethanol in dem Probenpuffer hin. Die BMP-Spezies sind entsprechend gekennzeichnet: (➔) 13 kDa-Monomer, (➔) 17 kDa-Monomer, (➔) proBMP-2-Monomer. "G" verweist auf glykosyliertes Protein.

Durch die Ergebnisse der Sekretionsanalyse wurde gezeigt, dass die Transfektion mit dem Expressionskonstrukt, welches für die komplette Sequenz von prä-proBMP-2 kodiert, zu der Sekretion von reifem, dimeren BMP-2 führt. Zudem wurde bestätigt, dass BMP-2 auch in HEK-Zellen post-translational glykosyliert wird, wodurch das höhere apparente Molekulargewicht im Vergleich zu *in vitro* gefaltetem BMP-2 erklärt werden konnte. Es blieb allerdings zu klären woher die zweite, 17 kDa große, Bande stammte (siehe 3.3.2.2).

### 3.3.1.2 Die Sekretion des reifen Wachstumsfaktors ist abhängig von der Prodomäne

Um die Rolle der Prodomäne bei der Biogenese von BMP-2 aufzudecken, wurde aus dem vorhandenen prä-proBMP-2-Konstrukt durch gezielte Mutagenese ein Plasmid hergestellt (2.2.1.3), welches lediglich die kodierende Sequenz für das reife BMP-2 (prä-BMP-2) enthält. Für Komplementationsexperimente wurde zudem ein Plasmid produziert, welches für die separate Prodomäne (ohne das reife BMP-2) kodiert (prä-PD) (Abbildung A 3).

## Analyse des Kulturüberstandes

Konditioniertes Medium von Zellen, die mit prä-BMP-2 transfiziert waren, wies keine Banden auf, die mit einem anti-BMP-2-Antikörper detektiert werden konnten (Abbildung 31A, Bahn pB). Das weist darauf hin, dass die Prodomäne essentiell für die Biogenese von reifem BMP-2 ist. Es wurde weiterhin ein Komplementierungsexperiment durchgeführt, in dem ein Konstrukt, das ausschließlich für die Prodomäne kodiert (prä-PD), mit dem prä-BMP-2-Plasmid in äquimolaren Mengen co-transfiziert wurde. Auch hier wurde kein sezerniertes BMP-2 (Bahn pB+PP) nachgewiesen, so dass vermutet werden kann, dass die Prodomäne kovalent an BMP-2 gebunden sein muss, um ihre Funktion ausüben zu können.

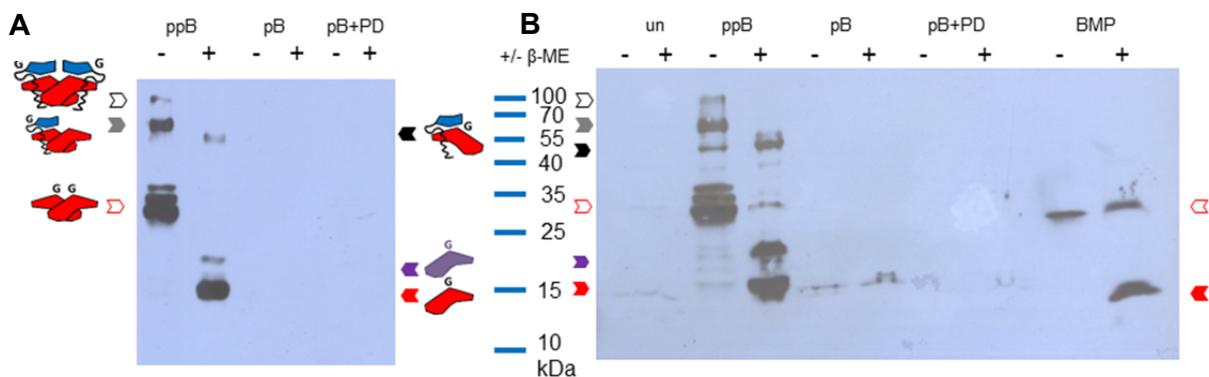


Abbildung 31: Untersuchung der Sekretion von BMP-2 nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit prä-proBMP-2 und prä-BMP-2. (A) Kulturüberstand. (B) Zelllysate. Die gefällten Proteine aus den Überständen bzw. Lysaten von untransfizierten Zellen (un), Zellen, die mit prä-proBMP-2 (ppB), prä-BMP (pB) sowie prä-BMP-2 und der Prodomäne (pB+PD) transfiziert waren, sind vergleichend dargestellt. BMP-2 (BMP) aus *E. coli* wurde als Referenz aufgetragen. Minus zeigt nicht-reduzierenden Probenpuffer an. Plus bedeutet, dass 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol in dem Probenpuffer enthalten waren. (▶) 13 kDa-Monomer, (◀) 17 kDa-Monomer, (◻) BMP-2-Dimere, (◼) proBMP-2-Monomer, (◽) proBMP-2-Dimer, (◾) halb-prozessiertes proBMP-2. "G" verweist auf glykosyliertes Protein.

## Analyse des Zelllysates

Um zu überprüfen ob die Proteine exprimiert wurden und in den Zellen akkumulierten, wurde das Zelllysate gleichermaßen untersucht. In dem Lysat der Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, war das gleiche Bandenmuster wie in dem Kulturüberstand zu beobachten (Abbildung 31B, Bahn ppB). Im Gegensatz dazu wiesen die Zellen nach Transfektion mit prä-BMP-2 und nach Co-Transfektion mit BMP-2 und der Prodomäne keine Banden in Höhe von dimerem BMP-2 auf (Bahn pB und pB+PD). Auch auf Höhe von monomerem BMP-2 waren nur sehr schwache Signale detektierbar. Die Prodomäne scheint daher essentiell für die korrekte Faltung und/oder intrazelluläre Dimerisierung von BMP-2 zu sein.

### Untersuchung der Transkription

Zur Bestätigung, dass die Plasmide transkribiert wurden, wurde Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert und die entsprechende cDNA hergestellt (2.2.1.2). Mittels spezifischer Primer wurde anschließend überprüft, ob die Konstrukte transkribiert wurden. Wie in Abbildung 32 zu erkennen ist, zeigten alle Konstrukte eine spezifische Bande. Auch die co-transfizierten Zellen wiesen Transkripte beider Plasmide auf (Bahn 5).

Daher ist anzunehmen, dass die Proteine zwar transkribiert und vermutlich auch translatiert, aber nicht sezerniert wurden. Wahrscheinlich wurden sie aufgrund von Fehlfaltung abgebaut und sind daher in dem *Western Blot* nicht oder nur schwach detektierbar.

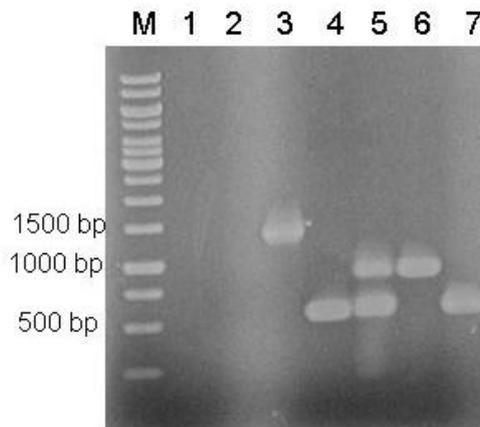


Abbildung 32: PCR-Produkte nach reverser Transkription von Gesamt-RNA. Gesamt-RNA wurde aus den transfizierten Zellen isoliert und cDNA synthetisiert. Mit spezifischen Primern wurde die DNA amplifiziert und die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. (1) Negativkontrolle, (2) untransfizierte Zellen, (3) prä-proBMP-2, (4) prä-BMP-2, (5) Co-Transfektion von prä-BMP-2 und prä-PD, (6) prä-PD, (7) GAPDH als Referenz.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Biogenese von BMP-2 abhängig von der Anwesenheit der Prodomäne ist. Da die Expression der Prodomäne *in trans* die Funktionalität nicht wiederherstellen kann, ist zu schlussfolgern, dass die Prodomäne in kovalenter Bindung zu dem reifen Wachstumsfaktor vorliegen muss, um eine korrekte Faltung und die anschließende Sekretion zu gewährleisten.

### 3.3.2 Einfluss des 20 kDa-Kernfragmentes auf die Biogenese von BMP-2

#### 3.3.2.1 Das 20 kDa-Fragment ist für die Biogenese von BMP-2 ausreichend

Aus der Schlussfolgerung, dass die Prodomäne essentiell für die Biogenese von reifem BMP-2 ist, ergab sich die Fragestellung, ob das 20 kDa-Kernfragment die Funktion der Vollängen-Prodomäne übernehmen kann. Um dies zu untersuchen wurde ein weiteres Expressionskonstrukt hergestellt, bei dem die Sequenz des 20 kDa-Fragmentes an die Sequenz des BMP-2 fusioniert war (prä-F20BMP) (Abbildung A 3). HEK293-Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert und der Kulturüberstand analysiert. In dem Kulturüberstand waren eindeutig Banden detektierbar (Abbildung 33A, Bahn F20B), die in ihrem Laufverhalten vergleichbar mit dem sezernierten BMP-2 von prä-proBMP-2-transfizierten Zellen waren (Bahn ppB). Um einen direkten Vergleich zu gewährleisten, wurden die Proteine deglykosyliert. Die beiden Banden bei einem apparenten Molekulargewicht von 13 kDa und 17 kDa (Abbildung 33B, Bahn F20B<sup>de</sup>) entsprachen genau der Doppelbande die bei prä-proBMP-2-transfizierten Zellen detektiert wurde (Bahn ppB<sup>de</sup>).

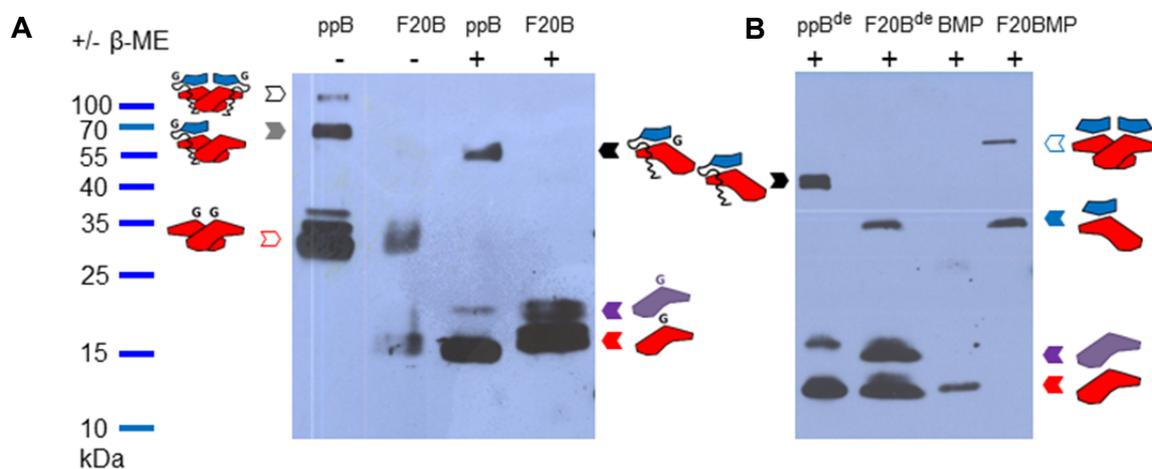


Abbildung 33: Transiente Expression von F20BMP in HEK293-Zellen. (A) Der Kulturüberstand von Zellen, die mit prä-proBMP-2 (ppB) bzw. F20BMP (F20B) transfiziert waren, wurde mittels *Western Blot* hinsichtlich der sezernierten BMP-Spezies analysiert. Von dem Überstand der mit F20B transfizierten Zellen wurde jeweils das fünffache Volumen aufgetragen wie für ppB, damit die Banden deutlich zu sehen waren. (B) Analyse der Proteine nach Deglykosylierung. BMP-2 (BMP) und F20BMP aus *E. coli* wurden als Referenz mitgeführt. Minus bedeutet, dass nicht-reduzierender Probenpuffer verwendet wurde. Plus zeigt 2% β-Mercaptoethanol in dem Probenpuffer an. Die BMP-Spezies sind entsprechend gekennzeichnet: (■) 13 kDa-Monomer, (■) 17 kDa-Monomer, (◻) BMP-2-Dimere, (■) proBMP-2-Monomer, (◻) proBMP-2-Dimer, (■) halb-prozessiertes proBMP-2, (■) F20BMP-Monomer, (◻) F20BMP-Dimer. "G" verweist auf glykosyliertes Protein.

Die 13 kDa-Bande glich in ihrem Laufverhalten dem monomeren BMP-2 aus *E. coli* (Bahn BMP). Diese Daten belegten, dass das 20 kDa-Kernfragment ausreicht, um die Biogenese von reifem BMP-2 zu vermitteln. Die Bande bei 35 kDa (Bahn F20B<sup>de</sup>) stimmte in ihrem Laufverhalten mit dem *in vitro* gefaltetem F20BMP überein. Auch hier wurde anscheinend unprozessiertes Vorläuferprotein sezerniert.

### 3.3.2.2 Unterschiedliche Prozessierung des Vorläuferproteins führt zu verschiedenen BMP-2-Spezies

In dem Überstand von HEK-Zellen, die mit prä-proBMP-2 und prä-F20BMP transfiziert waren, wurden zwei Spezies von monomeren BMP-2 detektiert. Abgesehen von der 13 kDa Bande nach Endoglykosidase-Spaltung, die monomeren BMP-2 aus *E. coli* entsprach, war stets eine zweite Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 17 kDa detektierbar. Es stellte sich die Frage nach der Ursache für das größere Molekulargewicht. Aus der Primärsequenz von prä-proBMP-2 (Abbildung A 4) geht hervor, dass innerhalb der Prodomäne mehrere Erkennungssequenzen für Prohormonkonvertasen existieren: Die Prohormonkonvertase Furin spaltet *in vivo* die Prodomäne an der Sequenz R<sup>279</sup>EKR<sup>282</sup> des Vorläuferproteins proBMP-2. Es wurde vermutet, dass die zweite Konsensussequenz R<sup>245</sup>ISR<sup>248</sup> (S2) ebenfalls von intrazellulären Proteasen erkannt wird und dann zu dem größeren 17 kDa-Protein führt. Eine Prozessierung von proBMP-2 an der S2-Stelle wurde bereits für CHO-Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, gezeigt [155]. Um zu überprüfen, ob das auch hier der Fall ist, wurde ein Plasmid produziert, bei welchem die S1-Erkennungssequenz (R<sup>279</sup>EKR<sup>282</sup>) deletiert war (prä-F20BMP<sup>ΔS1</sup>) (Abbildung A 3). Wie erwartet, konnte in dem Kulturüberstand von Zellen, die mit diesem Konstrukt transfiziert waren, BMP-2 nachgewiesen werden (Abbildung 34A, Bahn F20B<sup>ΔS1</sup>), wobei unter reduzierenden Bedingungen (+) diesmal nur eine Bande detektiert wurde. Diese entsprach in ihrem Laufverhalten der zweiten Bande, die auch in dem Überstand von prä-proBMP-2-transfizierten Zellen identifiziert wurde (Bahn ppB, +). Die Abspaltung von Zuckerketten durch N-Glykosidase F resultierte in einer Bande (Abbildung 34B, Bahn F20B<sup>ΔS1de</sup>), die dem 17 kDa-Protein von prä-F20BMP- und prä-proBMP-2-transfizierten Zellen glich (Bahn F20B<sup>de</sup>, ppB<sup>de</sup>). Diese Daten belegten, dass die Deletion der S1-Erkennungssequenz zu der Prozessierung des Vorläuferproteins an der S2-Sequenz und somit zu einem größeren monomeren BMP-2-Molekül mit einem Molekulargewicht von 17 kDa führt. Die beiden monomeren BMP-2-Spezies, das 13 kDa-Monomer und das 17 kDa-Monomer, führen in Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, vermutlich zu der Bildung von drei verschiedenen dimeren Spezies (D, D, D).

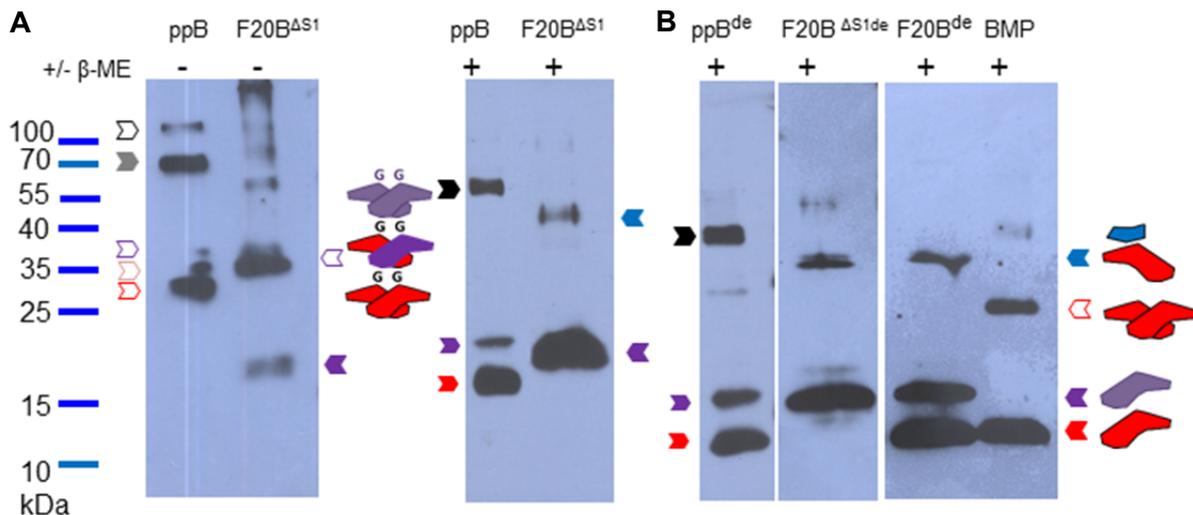


Abbildung 34: Kulturüberstand von F20BMP<sup>ΔS1</sup>-transfizierten HEK293-Zellen. (A) Der Kulturüberstand von Zellen, die mit prä-proBMP-2 (ppB) bzw. F20BMP<sup>ΔS1</sup> (F20B<sup>ΔS1</sup>) transfiziert waren, wurde mittels *Western Blot* hinsichtlich der sezernierten BMP-Spezies analysiert. Von dem Überstand der mit F20B<sup>ΔS1</sup> transfizierten Zellen wurde jeweils das fünffache Volumen aufgetragen wie für ppB, damit die Banden deutlich zu sehen waren. (B) Analyse der Proteine nach Deglykosylierung. BMP-2 (BMP) aus *E. coli* wurde als Referenz und F20B zum Vergleich mitgeführt. Minus zeigt nicht-reduzierenden Probenpuffer an. Plus weist auf 2% β-Mercaptoethanol in dem Probenpuffer hin. Die BMP-Spezies sind entsprechend gekennzeichnet: (■) 13 kDa-Monomer, (■) 17 kDa-Monomer, (◻) BMP-2-Dimer aus zwei 13 kDa-Monomeren, (◻) BMP-2-Dimer aus einem 13 kDa-Monomer und einem 17 kDa-Monomer, (◻) BMP-2-Dimer aus zwei 17 kDa-Monomeren, (■) proBMP-2-Monomer, (◻) proBMP-2-Dimer, (■) halb-prozessiertes proBMP-2, (■) F20BMP-Monomer. "G" verweist auf glykosyliertes Protein.

Für eine weitere Bestätigung, dass es sich bei den unterschiedlich großen Proteinen um verschieden prozessiertes BMP-2 handelte, wurde ein Konstrukt hergestellt, bei welchem die S1-Sequenz deletiert und die Arginine der S2-Stelle zu Glycinen mutiert waren (prä-F20BMP<sup>D</sup>) (Abbildung A 3). Dieses Protein sollte nicht von Prohormonkonvertasen prozessiert werden. In dem Kulturüberstand wurde, wie erwartet, eine einzige immunreaktive Bande zwischen 40 und 55 kDa beobachtet (Abbildung 35, Bahn F20B<sup>D</sup>), die vermutlich unprozessiertes Vorläuferprotein darstellt. Es konnte keine Bande detektiert werden, die dimeres BMP-2 repräsentiert. Die Bande bei einem Molekulargewicht bei ca. 100 kDa entsprach wahrscheinlich dimerem Vorläuferprotein, da sie in dem reduzierenden Puffer nicht nachweisbar war. Bei der schwachen Bande unterhalb von 15 kDa unter reduzierenden Bedingungen (Bahn F20B<sup>D</sup>, +) handelte es sich vermutlich um eine Verunreinigung im Probenpuffer.

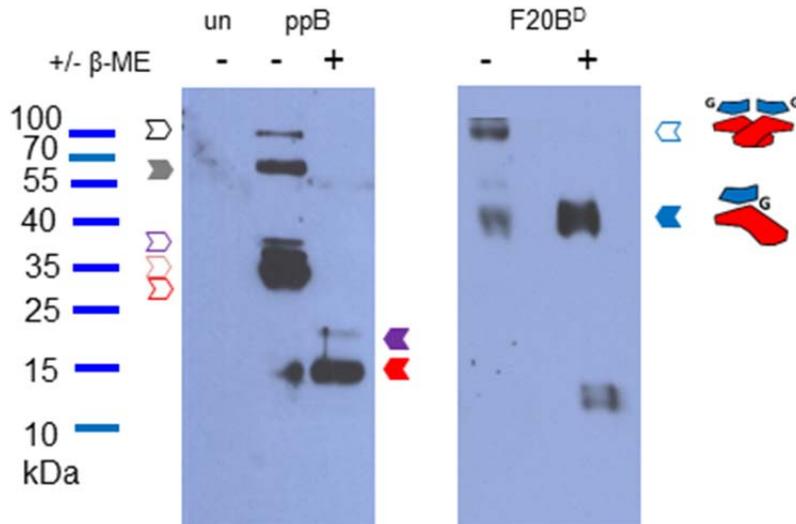


Abbildung 35: Analyse der Sekretion von F20BMP<sup>D</sup>-transfizierten HEK293-Zellen. Der Kulturüberstand von Zellen, die mit prä-proBMP-2 (ppB) bzw. F20BMP<sup>D</sup> (F20B<sup>D</sup>) transfiziert waren, wurde mittels *Western Blot* hinsichtlich der sezernierten BMP-Spezies analysiert. Minus zeigt nicht-reduzierenden Probenpuffer an. Plus deutet auf 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol in dem Probenpuffer hin. Die BMP-Spezies sind entsprechend gekennzeichnet: (▶) 13 kDa-Monomer, (▶) 17 kDa-Monomer, (▶) BMP-2-Dimere, (▶) F20BMP-Monomer, (▶) F20BMP-Dimer. "G" verweist auf glykosyliertes Protein.

Damit konnte bestätigt werden, dass aufgrund der fehlenden Spaltstellen kein reifes BMP-2 sezerniert wurde und die beiden monomeren BMP-2-Formen, die bei Transfektion von prä-proBMP-2 und prä-F20BMP beobachtet wurden, in der Tat unterschiedlich prozessiertes BMP-2 repräsentierten.

### 3.3.3 Quantifizierung des sezernierten BMP-2

Um zu bestimmen wie effizient das 20 kDa-Kernfragment die Biogenese von BMP-2 unterstützt, wurde die Menge an sezerniertem BMP-2 bestimmt. Die Quantifizierung wurde mittels *Sandwich*-ELISA durchgeführt (2.2.5.5) und auf die Gesamtproteinmenge der Zellen, die mit Hilfe eines BCA-Assay Kits bestimmt wurde (2.2.5.6), bezogen. Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, sezernierten im Durchschnitt 300 pg BMP-2 pro ml Kulturüberstand und pro  $\mu$ g Gesamtprotein (Abbildung 36, (2)). Im Vergleich dazu wiesen die Kulturüberstände der untransfizierten Zellen (1) sowie der mit prä-BMP-2 (3), prä-PD (4) und den co-transfizierten Zellen (5) kein sezerniertes BMP-2 auf. Dadurch konnten die Beobachtungen aus den *Western Blot*-Analysen, dass diese Konstrukte zu keinem sezernierten BMP-2 führen, nochmals bestätigt werden. Zellen, die mit dem 20 kDa-Fragment-Konstrukt prä-F20BMP transfiziert waren, sezernierten durchschnittlich 10 pg/ml  $\cdot$   $\mu$ g BMP-2 (6). Das 20 kDa-Fragment kann demnach zwar als intramolekulares

*chaperon* wirken, allerdings mit sehr viel geringerer Effizienz. Das Konstrukt mit deletierter S1-Prozessierungsstelle führte lediglich zu einer geringen Menge ( $\sim 3 \text{ pg/ml} \cdot \mu\text{g}$ ) an BMP-2 (7), die nur minimal über dem Hintergrund-Signal lag. Der Überstand von Zellen, die mit dem Konstrukt ohne Prozessierungsstellen transfiziert waren, enthielt wie die Negativkontrolle kein BMP-2 (Bahn 8).

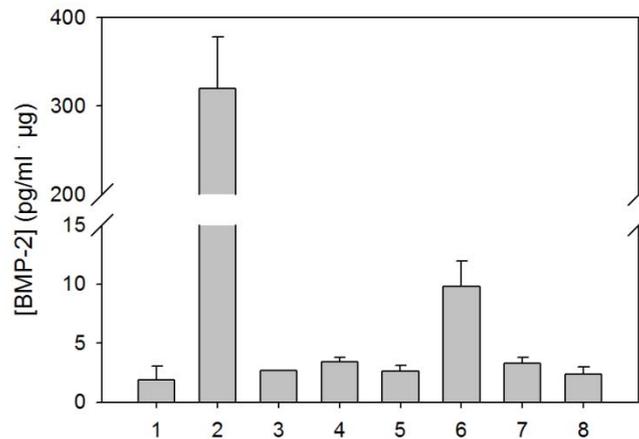


Abbildung 36: Quantifizierung von sezerniertem BMP-2 mittels ELISA. (1) untransfizierte Zellen, (2) prä-proBMP-2, (3) prä-BMP-2, (4) Co-Transfektion prä-BMP-2 + prä-PD, (5) prä-PD, (6) prä-F20BMP, (7) prä-F20BMP<sup>ΔS1</sup>, (8) prä-F20BMP<sup>D</sup>.

Die Ergebnisse aus der Quantifizierung bestätigen die schon in den *Western Blot* Analysen beobachteten Daten. Die Volllängen-Prodomäne führt, wenn kovalent mit BMP-2 verbunden, am effizientesten zu sezerniertem dimeren BMP-2. Ohne die Prodomäne erfolgt keine Sekretion von BMP-2. Daraus ist zu schließen, dass diese als intramolekulares *chaperon* für den reifen Wachstumsfaktor fungiert und für die Biogenese des BMP-2 essentiell ist. Das 20 kDa-Kernfragment ist in der Lage diese Funktion teilweise zu übernehmen, allerdings in sehr viel geringerem Ausmaß.

### 3.3.4 Überprüfung der Funktionalität des sezernierten BMP-2

Um zu überprüfen, ob das von den HEK-Zellen sezernierte BMP-2 korrekt gefaltet und funktionell ist, wurde ein Assay durchgeführt (2.2.5.6) [141]. BMP-2 bewirkt die Transdifferenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten [30]. Diese kann durch die Induktion des Knochenmarkerenzym Alkalische Phosphatase (AP) quantitativ nachgewiesen werden. Für den Assay wurde der Kulturüberstand von HEK293-Zellen nach Transfektion mit den verschiedenen Konstrukten mit Hilfe von *Amicon Ultra Centrifugal Filter Units* (Merck Millipore) von 20 ml auf 60 µl konzentriert und 1:10 in Differenzierungsmedium

verdünnt für den Assay eingesetzt. Die jeweilige Konzentration an sezerniertem BMP-2 (pg pro ml Kulturüberstand) in dem konzentrierten Ansatz wurde jeweils durch *Sandwich*-ELISA bestimmt (2.2.5.5). Als Referenz wurde eine Standardreihe mit rekombinanten BMP-2 aus *E. coli* mitgeführt (Abbildung 37A). Die Induktion der AP durch den Kulturüberstand von untransfizierten Zellen (Abbildung 37B), entsprach der basalen AP-Aktivität von C2C12-Zellen (0 nM eingesetztes rekombinantes BMP-2 aus *E. coli*). BMP-2, welches von Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, sezerniert wurde, bewirkte, wie erwartet, eine Induktion der AP in den C2C12-Zellen. Allerdings war die AP-Aktivität im Vergleich zu dem *in vitro* gefalteten BMP-2 geringer. 60 nM des sezernierten BMP-2 führten zu einer Aktivität von ca. 5  $\Delta E/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ , wogegen bereits 45 nM des *in vitro* hergestellten BMP-2 eine Induktion der AP von 9  $\Delta E/\text{min} \cdot \mu\text{g}$  bewirkten (Abbildung 37B, ppB). Möglicherweise ist der Unterschied in der AP-Aktivität auf die Art der Konzentrationsbestimmung zurückzuführen. Die Konzentration von *in vitro* gefaltetem BMP-2 wurde mittels UV-Licht bestimmt, wogegen das von HEK-Zellen sezernierte BMP-2 durch ELISA ermittelt wurde. BMP-2 von Zellen, die mit prä-F20BMP transfiziert waren, induzierte ebenfalls die AP (F20B), wobei diese im Vergleich zu dem *in vitro* hergestellten BMP-2 größer war. 5 nM des rekombinanten BMP-2 aus *E. coli* wiesen eine Induktion der AP von ca. 1  $\Delta E/\text{min} \cdot \mu\text{g}$  auf. Das von prä-F20BMP-Zellen sezernierte BMP-2 verursachte im Vergleich dazu bereits bei einer Konzentration von 0,8 nM eine Aktivität von ca. 2  $\Delta E/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ . Es bleibt nachzuweisen, ob das sezernierte BMP-2 tatsächlich eine höhere Aktivität als das *E. coli*-BMP-2 auslöst.

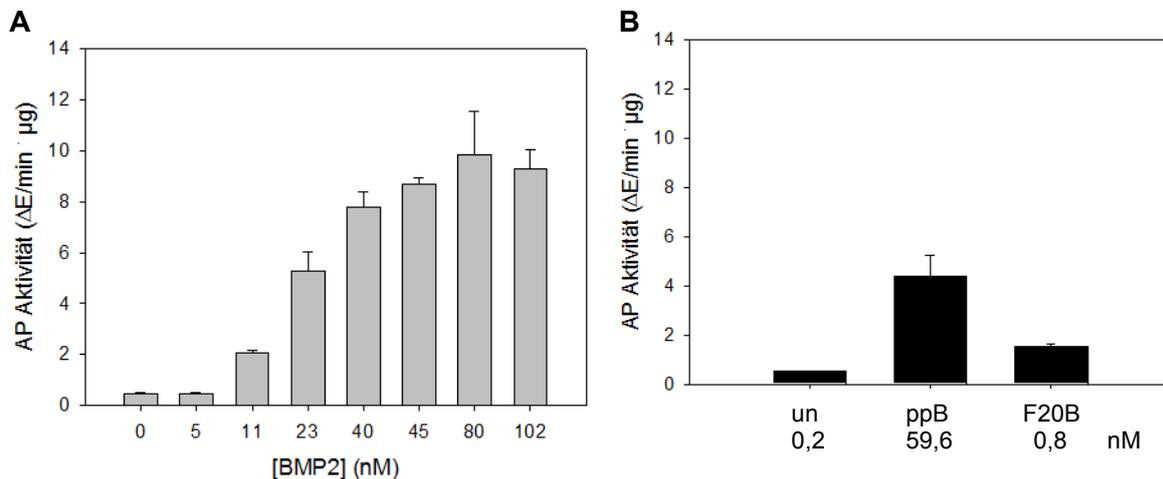


Abbildung 37: AP-Aktivität der verschiedenen sezernierten BMP-2 Spezies. A) Eine Referenzreihe wurde mit BMP-2 aus *E. coli* aufgenommen. B) Die Aktivität der sezernierten BMP-2 Varianten ist eingetragen: (un) untransfizierte Zellen 0,2 nM, (ppB) prä-proBMP-2 59,6 nM, (F20B) prä-F20BMP 0,8 nM.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Kernfragmente der Prodomäne von BMP-2

*Vergleich der Kernfragmente mit der Gesamtlängen-Prodomäne auf biophysikalischer Ebene*

Die Prodomänen der Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie erfüllen essentielle Funktionen bei der Biogenese und der Regulation der Aktivität der reifen Proteine. Die Aufklärung der Struktur dieser multifunktionellen Prodomänen könnte einen Einblick in die komplexen Mechanismen und Interaktionen, die für die Ausübung der Funktionen erforderlich sind, gewähren. Die dreidimensionale Struktur von Prodomänen der TGF- $\beta$ -Familie ist für die meisten Mitglieder bis heute allerdings nicht aufgeklärt. Lediglich zwei Kristallstrukturen von Prodomänen der Cystinknotenproteine sind gelöst: die des PDGF-A und von TGF- $\beta$ 1 [72,125].

Die strukturelle Untersuchung der Prodomäne von BMP-2 beschränkte sich bisher auf biophysikalische Analysen. Um weitere Informationen zu erhalten, wurde mittels limitierter Proteolyse ein proteolyseresistentes Fragment (15 kDa-Fragment) der Prodomäne identifiziert [126]. Für die Prodomänen von GDF-5 und DPP, verwandten Proteinen aus der TGF- $\beta$ -Familie, wurden ebenfalls proteolyseresistente Kernfragmente identifiziert [145]. Diese Fragmente scheinen innerhalb der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie konserviert zu sein und den strukturellen Kern der Prodomänen zu repräsentieren. Die Fragmente von GDF-5 und DPP entsprechen dem 15 kDa-Kernfragment der BMP-2-Prodomäne plus zwei weiteren  $\beta$ -Strängen (basierend auf der Sequenz der Prodomäne von TGF- $\beta$ 1:  $\beta$ 1 und  $\beta$ 10 [72]). Von Prof. Dr. Jay Groppe (Institut für Biomedizinische Wissenschaften, Texas A&M University, Dallas, USA) wurde vermutet, dass die beiden  $\beta$ -Stränge zwar in der BMP-2-Prodomäne in für die Protease zugänglichen Bereichen liegen, aber innerhalb anderer Mitglieder der Proteinfamilie zu dem Strukturkern und zu der Stabilität des Kernfragmentes beitragen. Das 15 kDa-Fragment wurde daher N- und C-terminal erweitert, so dass in dem entsprechenden 20 kDa-Fragment die zusätzlichen  $\beta$ -Stränge enthalten waren. Die Kernfragmente wurden biophysikalisch und strukturell untersucht, um Hinweise auf die Struktur der gesamten Prodomäne zu erhalten.

Die CD-spektroskopischen Analysen ließen auf eine Struktur mit hohem  $\beta$ -Faltblatt-Anteil schließen, wobei der Verlauf der Spektren charakteristisch für  $\beta_{II}$ -Proteine war [143]. Im Vergleich zu der Volllängen-Prodomäne wiesen die Fragmente einen geringeren *random coil*-Anteil auf. In den Kernfragmenten scheint entsprechend eine kompaktere Struktur vorzuliegen. Vermutlich stellen die zusätzlichen Regionen in der Prodomäne flexible, unstrukturierte oder  $\alpha$ -helikale Bereiche dar, die mit als erstes bei der limitierten Proteolyse

abgebaut werden. Die CD-Spektren waren außerdem dem Spektrum der Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 ähnlich [124]. Das belegt, dass die Kernfragmente und entsprechend auch die Prodomänen der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie ähnliche Sekundärstrukturanteile, insbesondere einen hohen  $\beta$ -Faltblatt-Anteil, besitzen. Strukturelle Gemeinsamkeiten der Prodomänen wurden bereits im Rahmen eines Sequenzvergleichs von Shi *et al.* postuliert [72]. So sind wahrscheinlich einige Sekundärstrukturelemente bei allen Mitgliedern konserviert.

Hinweise für eine gefaltete Struktur der Kernfragmente wurden durch Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge erhalten. Die Entfaltung war vollständig reversibel und wies für das 15 kDa-Fragment eine mäßige Stabilität mit wenig ausgeprägter Kooperativität auf. Entfaltungsübergänge des 20 kDa-Fragmentes belegten, dass die zusätzlichen  $\beta$ -Stränge zu einer Stabilisierung des 15 kDa-Kernfragmentes von  $\Delta\Delta G = 8$  kJ/mol führten. Die beiden  $\beta$ -Stränge scheinen demzufolge entscheidend zu der Stabilität des Kernfragmentes beizutragen. Die  $\beta$ -Stränge sind von Argininen umgeben (Abbildung 22), so dass die flankierenden Bereiche ein Substrat für Trypsin darstellen. Vermutlich sind diese Regionen für die Protease leicht erreichbar. Deshalb sind die beiden  $\beta$ -Stränge nach limitierter Proteolyse nicht in dem 15 kDa-Fragment enthalten, obwohl sie zum strukturellen Kern gehören.

Durch die Messung von zwei verschiedenen Parametern, der intrinsischen Fluoreszenz und des CD-Signals, wurde belegt, dass bei der Entfaltung der Verlust an Sekundärstrukturen mit dem Verlust von Tertiärkontakten einherging. Da sich bei beiden Messungen ähnliche  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte ergaben, wurde weiter angenommen, dass die Fragmente nach einem Zweizustandsmodell und ohne das Auftreten von Intermediaten im Gleichgewicht entfalten. Eine Bestätigung des Zweizustandsmodells bleibt nachzuweisen. Dafür eignen sich insbesondere kinetische Analysen, wie beispielsweise *stopped flow*-Messungen.

Die ermittelten  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte waren signifikant größer als der für die gesamte Prodomäne berechnete Wert von 5 kJ/mol [119]. Das weist daraufhin, dass die zusätzlichen Segmente innerhalb der Prodomäne das gesamte Protein destabilisieren. Basierend auf der Kristallstruktur der Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 handelt es sich dabei um  $\alpha$ -helikale Segmente und *loop*-Regionen [72], die möglicherweise eine offenere Konformation und eine bessere Angriffsfläche für Denaturierungsmittel bewirken, wodurch das Gesamtlängen-Protein eine geringere thermodynamische Stabilität besitzt. Für eine offenere Konformation der Prodomäne spricht der bei Entfaltungsübergängen ermittelte geringe *m*-Wert von 4,9 kJ/mol  $\cdot$  K [119]. Der *m*-Wert ist proportional zur Änderung der lösungsmittlexponierten Oberfläche bei Entfaltung [157]. Der kleine Wert für die Prodomäne deutet an, dass bereits im nativen Zustand ein Großteil der Proteinoberfläche lösungsmittlexponiert vorliegt.

Die spektroskopischen Analysen und die Entfaltungsstudien wiesen eindeutig auf die Faltung der beiden Kernfragmente hin. Die höhere thermodynamische Stabilität gegenüber der

Vollängen-Prodomäne bei ähnlichen Sekundärstrukturanteilen, lieferte einen Hinweis auf eine kompaktere Struktur in den Fragmenten. Vermutlich repräsentiert insbesondere das 20 kDa-Fragment den strukturellen Kern der BMP-2-Prodomäne. Insgesamt belegten die biophysikalischen Daten, dass die beiden Fragmente kompakte Strukturen darstellen, welche unabhängig von den restlichen Segmenten der Prodomäne *in vitro* falten. Obwohl der Begriff "Domäne" bis heute mehrere Definitionen hat, impliziert eine Erklärung, dass eine Domäne separat von dem gesamten Molekül eine stabil gefaltete Struktur darstellt [158] und eine eigenständige Funktion besitzt. Nach Rose *et al.* ergibt sich zudem eine hierarchische Abfolge von Strukturelementen innerhalb globulärer Proteine, so dass Domänen aus Subdomänen aufgebaut sind [159]. Dabei repräsentieren Subdomänen eine kompakte Struktur, die zu der gesamten Einheit der Proteinstruktur beitragen. Entsprechend könnte das 15 kDa-Kernfragment als strukturelle Subdomäne [160] der Prodomäne angesehen werden. Es könnte aber auch sein, dass das 20 kDa-Fragment die eigentliche Subdomäne darstellt, da dieses den strukturellen Kern zu repräsentieren scheint und ähnliche Kernfragmente innerhalb der Proteinfamilie konserviert sind. Ob diese Subdomäne als erstes faltet und damit als Gerüst für die Faltung der restlichen Segmente fungiert, bleibt zu klären. Die zeitliche Abfolge der Faltung und damit die Bestätigung, welches der Kernfragmente eine Subdomäne darstellt, könnte beispielsweise durch Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie, im Speziellen mittels intramolekularem *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-Experimenten, nachgewiesen werden.

#### *Bindung der 15 kDa-Subdomäne an reifes BMP-2*

Ein weiterer Beleg für die Faltung des 15 kDa-Fragmentes lieferte die Tatsache, dass das Kernfragment an reifes BMP-2 bindet. Die Dissoziationskonstante lag im unteren micromolaren Bereich. Die Diskrepanz zwischen dem publizierten  $K_D$ -Wert von 9  $\mu\text{M}$  [145] und dem in dieser Arbeit angegebenen Wert von 0,4  $\mu\text{M}$  ist auf die Art der Datenauswertung zurückzuführen. Die Auswertung der Bindungskurven mit der *BIACore software* erfolgte auf Basis der einfachen Langmuir Bindungsisotherme, wohingegen eine detaillierte Auswertung unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung den im Ergebnisteil angegebenen Wert ergab. Unabhängig von der Datenevaluierung wurde für das Kernfragment stets eine 20-fach geringere Affinität zu dem reifen Wachstumsfaktor als bei der gesamten Prodomäne erhalten. Es ist anzunehmen, dass zusätzliche Segmente innerhalb der Prodomäne, die nicht in dem proteolyseresistenten 15 kDa-Fragment liegen, die Affinität zu dem reifen Wachstumsfaktor erhöhen. Um diese Annahme zu prüfen, wurden die an der Bindung beteiligten Aminosäuren durch ein *Peptid-microarray* identifiziert. Bis auf zwei Ausnahmen lagen alle Bindungsstellen innerhalb des 15 kDa-Kernfragmentes. Die höhere Affinität der Vollängen-Prodomäne scheint daher auf die beiden zusätzlichen

Segmente in dem N-terminalen Bereich zurückzuführen zu sein. Diese beiden Positionen liegen vermutlich in für die Protease zugänglichen Bereichen. Da diese Bindungsstellen auch nicht innerhalb des 20 kDa-Fragmentes liegen, tragen sie wahrscheinlich nicht zu der strukturellen Integrität der Prodomäne bei. Dass diese Segmente aber wichtig für die Bindung an reifes BMP-2 zu sein scheinen und eine Funktion bei der Biogenese erfüllen, wird anhand der Ergebnisse in Zellkultur deutlich, die eine geringere Ausbeute an sezerniertem BMP-2 aufzeigen, wenn die Zellen mit dem F20BMP-Konstrukt transfiziert waren.

### *Strukturanalyse der Kernfragmente*

Um mehr Informationen über die Struktur der Kernfragmente und damit auch der Prodomäne zu erhalten, wurden NMR-Messungen durchgeführt. Das 1D-Protonenspektrum sowie die 2D-HSQC-Spektren des doppelt markierten 15 kDa-Fragmentes zeigten allerdings charakteristische Signalverteilungen für unstrukturierte Proteine und deuteten damit das Fehlen von Tertiärkontakten an. Der Versuch Strukturdaten des 20 kDa-Fragmentes mittels NMR zu erhalten, führte ebenfalls nicht zu den gewünschten Ergebnissen. Obwohl das Protein thermodynamisch stabiler ist, wurden auch hier keine Protonenspektren erhalten, die auf ein gefaltetes Protein hinweisen. Ein ähnliches, für unstrukturierte Proteine charakteristisches, Protonenspektrum wurde bereits für die gesamte Prodomäne des Cystinknotenproteins NGF beobachtet [120]. Die isolierte Prodomäne wies keinen kooperativen Übergang bei Entfaltung mit GdmCl auf, wodurch das Fehlen von stabilisierenden Tertiärkontakten bestätigt wurde. Dagegen entfaltet die Prodomäne von BMP-2 in isolierter Form kooperativ, auch wenn diese Kooperativität nicht stark ausgeprägt ist [119]. Beide Prodomänen werden durch die Interaktion mit der reifen Domäne über Tertiärkontakte stabilisiert. Für das 15 kDa- und das 20 kDa-Kernfragment konnten eindeutig kooperative Übergänge nachgewiesen werden, so dass angenommen werden kann, dass definierte Tertiärkontakte vorliegen. Weiterhin spricht die Tatsache, dass das 20 kDa-Fragment teilweise die Funktion der Prodomäne bei der Biogenese von reifem BMP-2 übernehmen kann, für eine gefaltete Struktur. Daher stehen die Ergebnisse der NMR-Analyse im Widerspruch zu den biophysikalischen Daten. Möglicherweise kommt es bei der Messung zum Teil zur Aggregation bzw. Entfaltung der Kernfragmente und diese Signale überlagern die der nativen Spezies. Eine Stabilisierung, beispielsweise durch Interaktion mit reifem BMP-2, ist aber aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der Proteine schwierig umzusetzen (BMP-2 ist nur im sauren pH löslich, wogegen die Subdomäne nur bei neutralem pH nativ vorliegt).

Da eine Strukturaufklärung mittels NMR nicht möglich war, wurde eine alternative Methode verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass chemisches *cross-linking* in Verbindung mit

Massenspektrometrie Strukturinformationen über ein Protein liefern kann [146,147,161]. Die Bildung der *cross-links* innerhalb des Proteins setzt einen bestimmten Abstand der kovalent verknüpften Aminosäuren zueinander voraus und erlaubt damit eine Aussage über die Struktur. Die Analyse von *cross-link*-Produkten mittels Massenspektrometrie bringt einige Vorteile gegenüber NMR und Röntgen-Kristallographie mit sich: (1) die Masse des Proteins ist aufgrund der proteolytischen Spaltung in Peptide nicht limitierend, (2) geringe Proteinkonzentrationen sind für die Analysen ausreichend und (3) Einblicke in die dreidimensionale Struktur von Proteinen in Lösung werden in kürzester Zeit erhalten [148]. Schon wenige *cross-links* geben Aufschluss über den Aufbau des Proteins, wenn die Struktur eines ähnlichen Proteins bereits bekannt ist. Im Fall der BMP-2-Prodomäne wurde die Kristallstruktur der Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 als Referenz verwendet. Alle identifizierten Vernetzungsprodukte der 15 kDa-Subdomäne, des 20 kDa-Fragmentes und der Gesamtlängen-Prodomäne wurden der Sequenz des LAP zugeordnet und in die Kristallstruktur eingetragen. Anhand der berechneten Abstände der Aminosäuren in dem LAP zueinander, konnten Aussagen über die Anordnung der Aminosäuren in dem Kernfragment getroffen werden. Bei Betrachtung aller identifizierten *cross-links* wurde deutlich, dass die Kernfragmente, und entsprechend auch die gesamte Prodomäne von BMP-2, eine ähnliche Struktur besitzen wie die Prodomäne von TGF- $\beta$ 1.

Basierend auf der LAP-Kristallstruktur wurde von Prof. Dr. Jay Groppe eine Struktur für das 20 kDa-Fragment von BMP-2 modelliert (Abbildung 38A). Das Modell wurde mit dem *ModWeb*-Programm des Sali Labors der Universität von San Francisco (UCSF) generiert [162]. Ausgehend von einer Primärstruktur werden mit diesem Programm Modell-Strukturen berechnet, wobei eine "template"-Struktur aus der Proteindatenbank (PDB) die Grundlage für die Berechnungen bildet. In diesem Fall war die Grundlage die Kristallstruktur der Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 (pdb: 3RJR [72]). In der Modell-Struktur des 20 kDa-Kernfragmentes ist das Fragment überwiegend aus  $\beta$ -Faltblättern und unstrukturierten Bereichen aufgebaut (Abbildung 38A). Damit spiegeln sich die aus den CD-Spektren erhaltenen Daten, dass das 20 kDa-Kernfragment überwiegend *random coil*- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturanteile besitzt, in dem Modell wider. Das Einfügen der identifizierten *cross-links* für die Kernfragmente und die gesamte Prodomäne in dieses Homologie-Modell zeigt, dass, bis auf eine Ausnahme, die Abstände zwischen den Aminosäuren die Beschränkung von 25 Å nicht überschreiten (Abbildung A 5). Das Modell könnte daher die Struktur des Fragmentes im Wesentlichen wiedergeben.

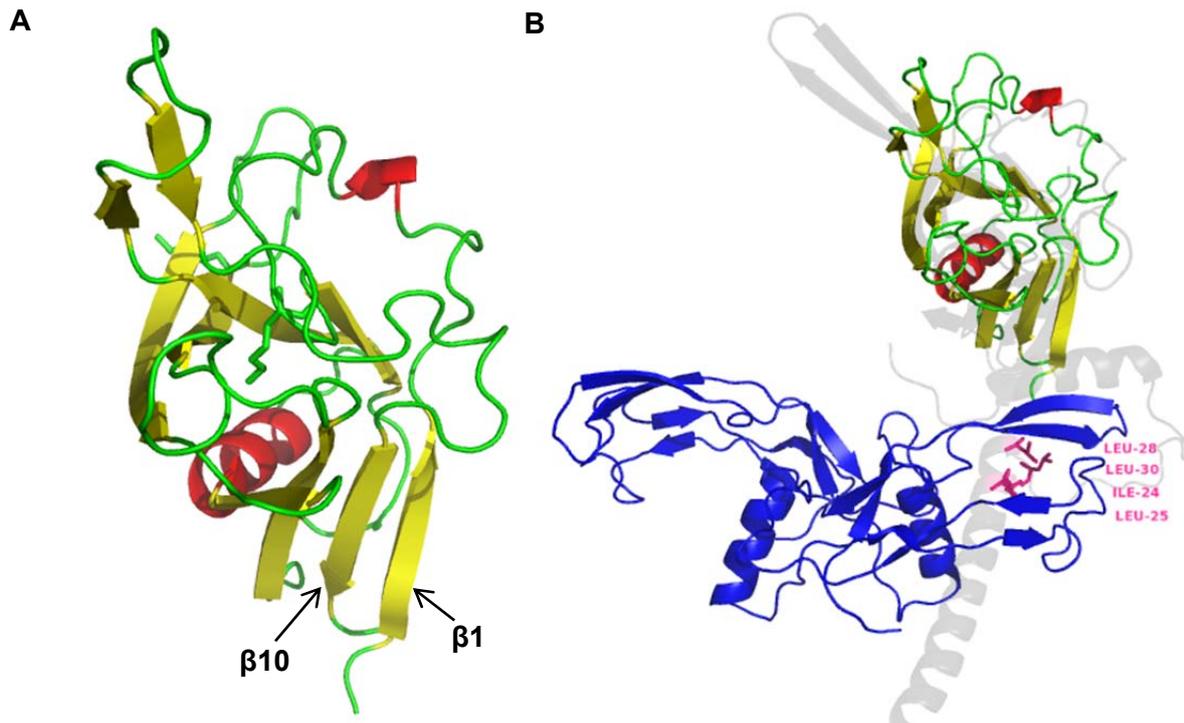


Abbildung 38: Homologie-Modell des 20 kDa-Kernfragmentes. A) Modell-Struktur des Fragmentes in der *cartoon*-Darstellung. Die beiden zusätzlichen  $\beta$ -Stränge  $\beta 1$  und  $\beta 10$  sind gekennzeichnet.  $\beta$ -Stränge sind als gelbe Pfeile und  $\alpha$ -Helices als rote Spiralen dargestellt. B) Interaktionsbereich zwischen dem 20 kDa-Fragment und reifem BMP-2. Basierend auf der Kristallstruktur von proTGF- $\beta 1$  (pdb: 3RJR [72]) wurde die Struktur des reifen BMP-2 (blau) (pdb: 2BMP [20]) mit der des reifen TGF- $\beta 1$ -Dimers überlagert. Die Modell-Struktur des Fragmentes (bunt) wurde deckungsgleich mit den entsprechenden Resten der Prodomäne von TGF- $\beta 1$  integriert. Ein Prodomänen-Monomer von TGF- $\beta 1$  ist transparent im Hintergrund zu sehen. Die pink hervorgehobenen Reste gehören zu dem hydrophoben Motiv, welches mutmaßlich die Bindung des LAP an reifes TGF- $\beta 1$  vermittelt [96] (siehe Abschnitt 4.3.2).

Neben den Ähnlichkeiten auf Strukturebene bestehen aber auch bedeutende Unterschiede zwischen den Prodomänen von TGF- $\beta 1$  und BMP-2: (1) die Prodomäne von TGF- $\beta 1$  dimerisiert über zwei intermolekulare Disulfidbrücken [62,65], wogegen die Prodomäne von BMP-2 keine Cysteine besitzt und eine nicht-kovalente Dimerisierung zumindest *in vitro* nicht nachgewiesen werden konnte. (2) Zudem verfügt die Prodomäne von TGF- $\beta 1$  über ein drittes regulatorisches Cystein, welches eine intermolekulare Disulfidbrücke zu dem reifen TGF- $\beta$  ausbildet und so eine entscheidende Rolle bei der Latenzvermittlung einnimmt [62]. (3) Das RGD-Motiv in den "Schulterregionen" des LAP, das für die Aktivierung des latenten TGF- $\beta$  eine Rolle zu spielen scheint, fehlt ebenfalls in der BMP-2-Prodomäne. Die Prodomäne von BMP-2 besitzt daher lediglich bedingte Gemeinsamkeiten zu der Prodomäne von TGF- $\beta 1$ . Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Prodomäne von BMP-2 könnte entscheidende Hinweise über die Funktionen der Prodomäne geben.

Insgesamt trug die Identifizierung von gefalteten Kernfragmenten innerhalb der Prodomäne von BMP-2 dazu bei, strukturelle Informationen über die gesamte Prodomäne zu erhalten.

Da auch für andere Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie ähnliche proteolyseresistente Fragmente innerhalb der Prodomänen identifiziert werden konnten [145], kann vermutet werden, dass diese Subdomänen als Gerüst für die Faltung der Vollängen-Prodomänen fungieren können.

## 4.2 Rolle der Prodomäne bei der Biogenese von reifem BMP-2

### 4.3.1 Die Prodomäne von BMP-2 ist essentiell für die Biogenese des reifen Wachstumsfaktors

Bei *in vitro*-Studien zu der Faltung von BMP-2 und proBMP-2 wurde gezeigt, dass die Prodomäne nicht erforderlich ist, um natives, biologisch aktives Homodimer zu erhalten [119]. Sowohl die Ausbeute an reifem BMP-2 als auch die Kinetik der Faltung unterschieden sich nicht in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Prodomäne. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten wiesen allerdings auf eine essentielle Rolle der Prodomäne bei der Biogenese von reifem BMP-2 in Zellkultur hin. Nur wenn die Zellen mit dem Expressionskonstrukt, welches für das gesamte prä-proBMP-2 kodiert, transfiziert waren, wurde dimeres, biologisch aktives BMP-2 in dem Kulturüberstand nachgewiesen. Dabei wurden mehrere Spezies detektiert. Es wurde zunächst vermutet, dass es sich um verschiedene Glykosylierungsmuster handelt. ProBMP-2 besitzt vier potentielle Glykosylierungsstellen, eine davon liegt in der reifen Domäne [6]. Bereits in CHO-Zellen wurde die post-translationale Glykosylierung von BMP-2 beobachtet [155,156]. Entsprechend konnte auch in HEK293-Zellen eine post-translationale Glykosylierung des sezernierten BMP-2 nachgewiesen werden. Dennoch waren auch nach Deglykosylierung verschiedene BMP-2-Spezies mit unterschiedlichem Molekulargewicht zu verzeichnen. Isreal *et al.* demonstrierten bereits früher, dass CHO-Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, zwei N-terminale Isoformen von monomerem BMP-2 mit apparenten Molekulargewichten von 18 und 22 kDa sezernierten [155]. Diese Isoformen waren auf die Prozessierung an unterschiedlichen Konsensussequenzen für Prohormonkonvertasen zurückzuführen. So wurde durch Sequenzierung der Proteine nachgewiesen, dass die 18 kDa-Spezies bei Aminosäure 283 von prä-proBMP-2 beginnt, wogegen die 22 kDa-Spezies an Position 249 anfängt. Entsprechend entsteht die 18 kDa-Isoform durch Prozessierung an der Sequenz R<sup>279</sup>EKR<sup>282</sup> (S1) und die 22 kDa-Isoform durch Spaltung an R<sup>245</sup>ISR<sup>248</sup> (S2) (Abbildung A 4). Aus den beiden monomeren Spezies bilden sich drei verschiedene BMP-2-Dimere [155]. In verschiedenen Experimenten im Rahmen dieser

Arbeit wurde belegt, dass die beiden von HEK-Zellen sezernierten monomeren Spezies von BMP-2 (13 kDa und 17 kDa), gleichermaßen den beiden verschiedenen prozessierten Isoformen entsprechen. Diese monomeren Isoformen führten zu der Bildung von drei verschiedenen dimeren Spezies, die sich aus den folgenden monomeren Subspezies zusammensetzten: 13:13 kDa, 13:17 kDa und 17:17 kDa.

Die Funktionalität und korrekte Faltung des sezernierten BMP-2 wurde anhand eines gebräuchlichen Assays, welcher die Induktion des Knochenmarkerenzym Alkalische Phosphatase (AP) in C2C12-Zellen testet, bestätigt. Allerdings führte sezerniertes BMP-2 zu einer geringeren Induktion der AP als BMP-2, welches *in vitro* gefaltet wurde. Möglicherweise ist dieses geringere Potential auf die mehrstufige Handhabung des Kulturüberstandes zurückzuführen. Eine andere Erklärung besteht darin, dass die BMP-2-Konzentration in dem Medium mit dem ELISA-Test unzureichend bestimmt wurde. Der verwendete Antikörper war gegen reifes BMP-2 gerichtet, so dass auch das sezernierte, unprozessierte proBMP-2 mit in die Konzentrationsbestimmung einbezogen wurde. Dies könnte das Ergebnis verändern, da aus einer früheren Arbeit bekannt ist, dass proBMP-2 eine verspätete und geringere Induktion der AP bewirkt [122]. Des Weiteren gehen alle BMP-2-Isoformen mit in die Konzentrationsbestimmung ein, wobei nicht geklärt ist, wie sich diese auf die Transdifferenzierung der C2C12-Zellen auswirken. Es wäre also möglich, dass die tatsächlich wirkende BMP-2-Konzentration geringer und dadurch die gemessene AP-Aktivität niedriger war.

Da in dem Kulturüberstand nur in Anwesenheit der kovalent gebundenen Prodomäne sezerniertes BMP-2 detektiert wurde, ist zu schlussfolgern, dass die Prodomäne essentiell für die Biogenese des reifen Wachstumsfaktors ist. Durch den Nachweis der Transkription der RNA und das Vorhandensein von schwachen Banden in dem Zelllysat, die monomeren BMP-2 in ihrem Laufverhalten entsprachen, wurde belegt, dass die Plasmide exprimiert wurden. Bei welchem molekularen Faltungsprozess der Biogenese die Prodomäne mitwirkt, wird aus diesen Ergebnissen nicht ersichtlich. Möglicherweise erfolgt die Translokation der Proteine in das ER, wo die korrekte Faltung in Abwesenheit der Prodomäne nicht erfolgen kann und die Proteine abgebaut werden. Die schwachen Banden in dem Zelllysat könnten auf eine Akkumulation der falsch gefalteten monomeren Spezies im ER hinweisen.

Die Ergebnisse belegten zum Teil die für TGF- $\beta$ 1 und Activin A erhaltenen Daten, die die Funktion der Prodomänen bei der korrekten Faltung und Dimerisierung der reifen Domänen belegen [95]. Die Expression der Prodomänen *in trans* führte hier zu der Wiederherstellung der Funktion und zu der Sekretion von reifem, biologisch aktivem Protein. Für einige Proteasen wurde ebenfalls beobachtet, dass die separat exprimierten Prodomänen die Faltung der reifen Proteine unterstützen [88,163]. Im Gegensatz dazu führte die separate Expression der Prodomäne von BMP-2 nicht zu der Sekretion von reifem Wachstumsfaktor.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die BMP-2-Prodomäne eine lediglich moderate Affinität zu dem reifen BMP-2 aufweist, wie *in vitro* nachgewiesen wurde [121,164]. Dagegen bindet die Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 mit hoher Affinität ( $K_D$ : 1-3 nM) an die reife Domäne [165,166].

Eine andere Ursache dafür, dass die *in trans* exprimierte Prodomäne nicht die Faltung von reifem BMP-2 unterstützen kann, könnte die geringe Stabilität der isolierten Prodomäne sein. Erst die Bindung an die reife Domäne führt zu der Stabilisierung der Prodomäne über die Ausbildung von Tertiärkontakten [119]. Eine ähnliche Stabilisierung der Prodomäne in Assoziation mit dem reifen Wachstumsfaktor wurde auch für NGF gezeigt [120].

### 4.3.2 Das 20 kDa-Kernfragment kann teilweise die Funktionen der Prodomäne übernehmen

Es wurde angenommen, dass das 20 kDa-Kernfragment eine Funktion bei der Biogenese von BMP-2 übernehmen kann. HEK-Zellen, die mit einem Konstrukt transfiziert waren, bei dem das Kernfragment an die Sequenz des reifen BMP-2 fusioniert war, sezernierten tatsächlich reifes, dimeres BMP-2. Allerdings wurde in dem Kulturüberstand weit weniger BMP-2 als bei Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, detektiert. Das Kernfragment scheint in der Lage zu sein, die Funktionen der Vollängen-Prodomäne zumindest partiell übernehmen zu können. Es repräsentiert daher neben einer strukturellen auch eine funktionelle Subdomäne der Prodomäne [160].

Die geringere Ausbeute an korrekt gefaltetem BMP-2 könnte auf Segmente zurückzuführen sein, die in der Sequenz des 20 kDa-Fragmentes fehlen. So ist die Region in dem N-terminalen Bereich der Prodomäne zwischen AS 46-64 (die Nummerierung ist bezogen auf prä-proBMP-2), insbesondere die hydrophoben Reste <sup>57</sup>LLSMFGL<sup>63</sup>, nicht in dem 20 kDa-Fragment enthalten (Abbildung A 4). Das entsprechende Segment in dem LAP von TGF- $\beta$ 1 ist Teil der  $\alpha$ -Helix 1 (Abbildung 38B, pink hervorgehoben) und scheint eine entscheidende Rolle bei der Assemblierung des Wachstumsfaktors und des SLC einzunehmen. Mutagenese-Analysen belegten die reduzierte Produktion und Sekretion von reifem, dimerem TGF- $\beta$ 1, wenn die hydrophoben Reste zu Alaninen mutiert waren [97]. Das hydrophobe Motiv am N-Terminus ist vermutlich an der Interaktion zu dem reifen TGF- $\beta$  und damit an der Assemblierung, Sekretion und Latenz des Wachstumsfaktors beteiligt. Auch für Inhibin A wurde gezeigt, dass die Mutation von hydrophoben Resten in dem N-terminalen Segment die Dimerisierung und Sekretion der  $\alpha$ - und  $\beta_A$ -Untereinheiten verhindert [96]. Es wird postuliert, dass die hydrophoben Reste in der Lage sind die reifen, monomeren Proteine in einer Konformation zu halten, die die Dimerisierung erlaubt. Die Abwesenheit dieses Motivs

in dem 20 kDa-Fragment von BMP-2 könnte daher die verminderte Menge an sezerniertem BMP-2, aufgrund der fehlenden Interaktions-Oberfläche zu dem reifen Wachstumsfaktor, erklären (Abbildung 38B). So konnte auch in dem *microarray*-Versuch gezeigt werden, dass Aminosäuren in genau dieser Region an der Bindung von reifem BMP-2 beteiligt sind [145]. Es kann nicht abgeleitet werden, bei welchem Prozess der Biogenese das Kernfragment die Funktionen der gesamten Prodomäne übernehmen kann. So kommen für die geringere Ausbeute an dimerem BMP-2 mehrere molekulare Ursachen in Frage: (1) die korrekte Faltung des monomeren Vorläuferproteins und/oder (2) die Dimerisierung des Vorläuferproteins könnten beeinträchtigt sein. Dass die in dem 20 kDa-Kernfragment fehlenden Segmente wichtig für die Dimerisierung des Vorläuferproteins zu sein scheinen, wird durch die Detektion von vorwiegend monomeren Vorläuferprotein in dem Lysat der Zellen, die mit F20BMP transfiziert waren, deutlich (Daten nicht gezeigt). Ob die monomeren Spezies zum Teil falsch gefaltet waren oder lediglich nicht dimerisieren konnten, bleibt zu klären.

Die Funktionalität des von F20BMP-transfizierten Zellen sezernierten BMP-2 wurde durch die Induktion der AP belegt. Da hier allerdings sehr viel weniger BMP-2 von den Zellen sezerniert wurde als von Zellen, die mit prä-proBMP-2 transfiziert waren, musste für das Assay eine geringere Konzentration an Wachstumsfaktor eingesetzt werden. Dennoch wiesen die C2C12-Zellen die Aktivierung der AP auf. Die Aktivität der AP war zudem höher als bei einer vergleichbaren Konzentration an *in vitro* hergestelltem BMP-2. Hier bleibt nachzuweisen, ob das von F20BMP-Zellen sezernierte BMP-2 die AP wirklich stärker induziert.

Wurde die S1-Prozessierungsstelle für Prohormonkonvertasen in dem Konstrukt mit dem 20 kDa-Fragment deletiert, konnte dennoch sezerniertes BMP-2 detektiert werden. Es wurde nachgewiesen, dass das reife BMP-2 durch Prozessierung an der S2-Sequenz entstand. Der reife Wachstumsfaktor war entsprechend um den 4 kDa-*linker*, der zwischen der S1- und der S2-Stelle liegt, erweitert. Auch für BMP-4 wurde gezeigt, dass die Mutation der S1-Stelle zu einem größeren BMP-4 Konstrukt führt, welches an der S2-Stelle prozessiert wurde. Dieses wies jedoch nur eine minimale biologische Aktivität auf [84]. Inwieweit das erweiterte BMP-2 fähig ist an Rezeptoren zu binden und eine Signalkaskade auszulösen, bleibt zu testen.

Das sezernierte Vorläuferprotein, welches bei Transfektion der Zellen mit F20BMP<sup>D</sup> beobachtet wurde, sollte in weiterführenden Analysen ebenfalls auf seine Fähigkeit die AP zu induzieren getestet werden. Für das *Drosophila melanogaster* BMP5/6/7-Ortholog *Glass bottom boat* (Gbb) wurde gezeigt, dass eine dritte Prozessierungsstelle in dem N-terminalen Bereich der Prodomäne existiert, die zu einem großen BMP-Liganden führt, welcher eine höhere und längere biologische Aktivität aufweist [167]. Basierend auf der Struktur von proTGF- $\beta$ 1 wird vermutet, dass dem größeren Gbb-Liganden die  $\alpha$ -Helix 1 und der *latency*

*I*asso fehlt, so dass das reife Gbb nicht in einer "Zwangsjacke" gehalten wird und daher unprozessiert an die entsprechenden Rezeptoren binden kann. Diese dritte Prozessierungsstelle (NS-Stelle) scheint innerhalb der TGF- $\beta$ -Superfamilie konserviert zu sein. In proBMP-2 liegt die der NS-Stelle entsprechende Sequenz genau vor dem 20 kDa-Fragment (Abbildung A 2). Damit würde der große BMP-Ligand dem unprozessierten Vorläuferprotein von Zellen, die mit F20BMP<sup>D</sup> transfiziert waren, entsprechen. Somit könnte auch dieses größere BMP-2-Protein eine höhere biologische Aktivität aufweisen.

Aufgrund der Sequenzhomologie von BMP-2 und BMP-4 ist eine ähnliche Funktion der Prodomänen zu vermuten. So enthält auch die Prodomäne von BMP-2 weitere Prozessierungsstellen *upstream* von der optimalen Furin-Schnittstelle. Da eine Prozessierung an der S2-Stelle erfolgen kann, ist es möglich, dass der S2-Prozessierungsstelle eine Funktion bei der Regulation der Aktivität des reifen Wachstumsfaktors zukommt.

Aus den Zellkultur-Analysen lassen sich Parallelen zwischen der Prodomäne von BMP-2 und TGF- $\beta$ 1 ableiten. Obwohl die reifen Proteine *in vitro* unabhängig gefaltet werden können [94,119], nimmt die Prodomäne *in vivo* offenbar eine entscheidende Funktion bei der Biogenese der Wachstumsfaktoren ein. Dabei scheint die Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 einen Einfluss auf die Sekretion, Dimerisierung und Maturierung der reifen Domäne zu haben [25,95]. Bei der Prodomäne von BMP-2 konnte nicht aufgeklärt werden, bei welchem molekularen Prozess der Biogenese die Prodomäne essentiell ist. Es existieren aber auch Unterschiede zwischen beiden Prodomänen. So vermittelt die Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 Latenz über die Bildung eines Komplexes mit der reifen Domäne, wogegen für die Prodomäne von BMP-2 ein nicht-kovalenter Komplex *in vivo* bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Mutationsanalysen, wie sie für die Prodomänen von TGF- $\beta$ 1 und BMP-4 vorgenommen wurden [98,168,169], werden weiteren Aufschluss über die Funktion der Prodomäne von BMP-2 bei der Biogenese und Regulation des reifen Wachstumsfaktors geben.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fragen zu der Struktur und Funktion der Prodomäne von BMP-2 angesprochen. Ein proteolyseresistentes Kernfragment der Prodomäne von BMP-2 wurde biophysikalisch analysiert und in den Kontext des Vollängen-Proteins eingeordnet. Es wurde gezeigt, dass das 15 kDa-Fragment eine unabhängig faltende Einheit darstellt und an reifes BMP-2 binden kann. Des Weiteren wurde das um  $\Delta\Delta G = 8$  kJ/mol thermodynamisch stabilere 20 kDa-Kernfragment hergestellt. Das 20 kDa-Fragment konnte ebenfalls *in vitro* gefaltet werden und wies die wesentlichen Sekundärstrukturanteile der gesamten Prodomäne auf. Strukturanalysen mittels chemischen *cross-linking* und Massenspektrometrie verwiesen auf eine zu der Prodomäne von TGF- $\beta$ 1 ähnliche dreidimensionale Struktur. Die Unterschiede zwischen den Prodomänen gilt es durch die detaillierte Aufklärung der Struktur der Prodomäne von BMP-2 aufzudecken. Dazu müssen Bedingungen identifiziert werden, unter denen die Prodomäne oder die Kernfragmente beispielsweise durch Interaktion mit reifem BMP-2 stabilisiert werden können und unter denen eine NMR-Analyse der isopenmarkierten Prodomäne oder der Kernfragmente möglich ist.

In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Biogenese von reifem BMP-2 abhängig von der Anwesenheit der Prodomäne ist. Ein Expressionskonstrukt, welches ausschließlich für die reife Domäne kodierte, führte nicht zu der Sekretion von BMP-2. Komplementationsexperimente, bei denen die Prodomäne *in trans* zu dem reifen Wachstumsfaktor exprimiert wurde, führten nicht zu der Wiederherstellung der Funktion. Die Prodomäne muss demnach kovalent an die reife Domäne gebunden vorliegen, um ihre Aufgaben erfüllen zu können. Es bleibt zu klären, bei welchem molekularen Schritt der Biogenese die Prodomäne essentiell ist. Dafür würden sich Mutationsanalysen eignen, durch die geprüft werden kann, welche Regionen des Proteins Einfluss auf welche Phase der Biosynthese haben.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das 20 kDa-Kernfragment in der Lage ist die Funktionen der gesamten Prodomäne zu übernehmen: durch ein Fusionskonstrukt, bei dem das Fragment an die reife Domäne fusioniert war, konnte sezerniertes BMP-2 erhalten werden. Die Menge an dimerem, biologisch aktivem BMP-2 war allerdings im Vergleich zu dem Konstrukt mit der Vollängen-Prodomäne reduziert.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* (80- ). **150**, 893–899.
- 2 Urist MR & Strates BS (1971) Bone Morphogenetic Protein. *J. Dent. Res.* **50**, 1392–1406.
- 3 Sampath TK & Reddi AH (1981) Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7599–603.
- 4 Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS & Wozney JM (1988) Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9484–8.
- 5 Wozney JM (1992) The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* **32**, 160–7.
- 6 Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM & Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**, 1528–34.
- 7 Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, Woods WI & Reddi AH (1989) Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J. Biol. Chem.* **264**, 13377–80.
- 8 Dijke P (2006) Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Curr. Med. Res. Opin.* **22**, 7–11.
- 9 Reddi A (1998) Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat. Biotechnol.* **16**, 247–252.
- 10 Dumermuth E, Sterchi EE, Jiang WP, Wolz RL, Bond JS, Flannery a V & Beynon RJ (1991) The astacin family of metalloendopeptidases. *J. Biol. Chem.* **266**, 21381–5.
- 11 Wang EA (1993) Bone morphogenetic proteins (BMPs): therapeutic potential in healing bony defects. *Trends Biotechnol.* **11**, 379–83.
- 12 Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste a J, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney JM & Rosen V (1997) Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J. Clin. Invest.* **100**, 321–30.
- 13 Ducy P & Karsenty G (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* **57**, 2207–14.
- 14 Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, Gruenig E, Janssen B, Koehler R, Seeger W, Eickelberg O, Olschewski H, Elliott CG, Glissmeyer E, Carlquist J, Kim M, Torbicki A, Fijalkowska A, Szewczyk G, Parma J, Morisaki T, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O & Soubrier F (2006) Mutations of the TGF- $\beta$  type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum. Mutat.* **27**, 121–132.

- 15 Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, Choi IH, Connor JM D, P, Glaser DL, LeMerrer M, Morhart R, Rogers JG, Smith R, Triffitt JT U & JA, Zasloff M, Brown MA KF (2006) A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat. Genet.* **38**, 525–527.
- 16 Mcdonald NQ & Hendrickson WA (1993) A Structural Superfamily of Growth Factors Containing a Cystine Knot Motif Minireview. *Cell* **73**, 421–424.
- 17 Sun PD & Davies DR (1995) THE CYSTINE-KNOT. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 269–291.
- 18 Isaacs NW (1995) Cystine knots. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 391–395.
- 19 Vitt UA, Hsu SY & Hsueh AJ (2001) Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol. Endocrinol.* **15**, 681–694.
- 20 Scheufler C, Sebald W & Hulsmeyer M (1999) Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* **287**, 103–115.
- 21 Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC & Carlson WD (1996) Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 878–83.
- 22 Rider CC & Mulloy B (2010) Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem. J.* **429**, 1–12.
- 23 Hart C & Bowen-Pope D (1990) Platelet-derived growth factor receptor: current views of the two-subunit model. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 53S–57S.
- 24 Israel D, Nove J & Kerns K (1996) Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* **13**, 291–300.
- 25 Constam DB & Robertson EJ (1999) Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J. Cell Biol.* **144**, 139–49.
- 26 Cui Y, Jean F, Thomas G & Christian JL (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J.* **17**, 4735–43.
- 27 Saremba S, Nickel J, Seher A, Kotzsch A, Sebald W & Mueller TD (2008) Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J.* **275**, 172–83.
- 28 Lories RJU, Derese I, Ceuppens JL & Luyten FP (2003) Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum.* **48**, 2807–18.
- 29 Beck S, Le Good JA, Guzman M, Ben Haim N, Roy K, Beermann F & Constam DB (2002) Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat. Cell Biol.* **4**, 981–5.
- 30 Katagiri T, Yamaguchi a, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara a & Suda T (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the

- differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* **127**, 1755–66.
- 31 Zhang H & Bradley a (1996) Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **122**, 2977–86.
- 32 Winnier G & Blessing M (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**, 2105–2116.
- 33 Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V & Lyons KM (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat. Genet.* **27**, 84–8.
- 34 Luo G, Hofmann C, Bronckers a L, Sohocki M, Bradley a & Karsenty G (1995) BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* **9**, 2808–2820.
- 35 Dudley AT, Lyons KM & Robertson EJ (1995) A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* **9**, 2795–2807.
- 36 Chen C, Grzegorzewski KJ, Barash S, Zhao Q, Schneider H, Wang Q, Singh M, Pukac L, Bell AC, Duan R, Coleman T, Duttaroy A, Cheng S, Hirsch J, Zhang L, Lazard Y, Fischer C, Barber MC, Ma Z-D, Zhang Y-Q, Reavey P, Zhong L, Teng B, Sanyal I, Ruben SM, Blondel O & Birse CE (2003) An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat. Biotechnol.* **21**, 294–301.
- 37 Chen H, Shi S, Acosta L, Li W, Lu J, Bao S, Chen Z, Yang Z, Schneider MD, Chien KR, Conway SJ, Yoder MC, Haneline LS, Franco D & Shou W (2004) BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* **131**, 2219–31.
- 38 Hentunen TA, Lakkakorpi PT, Tuukkanen J, Lehenkari PP, Sampath TK VH (1995) Effects of recombinant human osteogenic protein-1 on the differentiation of osteoclast-like cells and bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 433–443.
- 39 Kaneko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, Nakagawa M, Toyama Y, Yabe Y, Kumegawa M & Hakeda Y (2000) Direct Stimulation of Osteoclastic Bone Resorption by Bone Morphogenetic Protein ( BMP ) -2 and Expression of BMP Receptors in Mature Osteoclasts. *Bone* **27**, 479–486.
- 40 Dupreza D, Bell EJDH, Richardsonb MK, Archep CW, Wolpert L, Brickella PM & Q PHF (1996) Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech. Dev.* **57**, 145–157.
- 41 Francis-West PH, Abdelfattah a, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, Allen S, MacPherson S, Luyten FP & Archer CW (1999) Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* **126**, 1305–15.
- 42 De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, Mericq V BJ (2001) Regulation of Growth Plate Chondrogenesis by Bone. *Endocrinology* **142**, 430–436.
- 43 Zhang J & Li L (2005) BMP signaling and stem cell regulation. *Dev. Biol.* **284**, 1–11.

- 44 Xu R-H, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP & Thomson J a (2002) BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1261–4.
- 45 Xie T & Spradling AC (1998) decapentaplegic Is Essential for the Maintenance and Division of Germline Stem Cells in the Drosophila Ovary. *Cell* **94**, 251–260.
- 46 Liu A & Niswander LA (2005) Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 945–54.
- 47 Macias D, Gañan Y, Sampath TK, Piedra ME, Ros MA & Hurlé JM (1997) Role of BMP-2 and OP-1 ( BMP-7 ) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109–1117.
- 48 Song Q, Mehler MF & Kessler JA (1998) Bone Morphogenetic Proteins Induce Apoptosis and Growth Factor Dependence of Cultured Sympathoadrenal Progenitor Cells. *Dev. Biol.* **127**, 119–127.
- 49 Piscione TD, Phan T, Rosenblum ND, Sims-lucas S, Giovanni V Di, Schaefer C, Cusack B, Veraragavan P, Lee W, Hough MT, Liu W, Ekiert R, Lindström NO, Davies JA, Hartwig S, Ho J, Pandey P, Macisaac K, Taglienti M, Alterovitz G, Ramoni M, Fraenkel E & Kreidberg JA (2001) BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis via Smad1-dependent and -independent pathways BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis via Smad1-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Ren. Physiol* **280**, F19–F33.
- 50 Omi M, Sato-maeda M & Ide H (2000) Role of chondrogenic tissue in programmed cell death and BMP expression in chick limb buds. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 381–388.
- 51 Massagu J (1998) TGF-  $\beta$  SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 753–791.
- 52 Ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH MK (1994) Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.* **269**, 16985–16988.
- 53 Koenig B, Cook J & Wolsing D (1994) Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5961–5974.
- 54 Macias-Silva M (1998) Specific Activation of Smad1 Signaling Pathways by the BMP7 Type I Receptor, ALK2. *J. Biol. Chem.* **273**, 25628–25636.
- 55 Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH MK (1995) Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J. Cell Biol.* **130**, 217–26.
- 56 Tsutomu Nohno, Tetsuya Ishikawa, Taiichi Saito, Keiichi Hosokawa, Sumihare Noji DHW and JSR (1995) Identification of a Human Type II Receptor for Bone Morphogenetic Protein-4 That Forms Differential Heteromeric Complexes with Bone Morphogenetic Protein Type I Receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 22522–22526.
- 57 Rosenzweig B (1995) Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **92**, 7632–7636.

- 58 Massagué J, Attisano L & Wrana JL (1994) The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* **4**, 172–8.
- 59 Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI & Knaus P (2002) The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **277**, 5330–8.
- 60 Gilboa L, Nohe a, Geissendörfer T, Sebald W, Henis YI & 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.
- 61 Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE & Leduc R (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **270**, 10618–10624.
- 62 Brunner AM, Marquardt H, Malacko AR, Lioubin MN & Purchios AF (1989) Site-directed Mutagenesis of Cysteine Residues in the Pro Region of the Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Precursor. *J. Biol. Chem.* **264**, 13660–13664.
- 63 Gentry LE & Nash BW (1990) The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry* **29**, 6851–6857.
- 64 Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC & Sporn MB (1988) Latent Transforming Growth Factor-beta from Human Platelets. *Biol. Chem.* **263**, 7646–7654.
- 65 Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C & Heldins C (1988) Latent High Molecular Weight Complex of Transforming Growth. *Biol. Chem.* **263**, 6407–6415.
- 66 Kanzaki T, Olofsson a, Morén a, Wernstedt C, Hellman U, Miyazono K, Claesson-Welsh L & Heldin CH (1990) TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* **61**, 1051–61.
- 67 Morén a, Olofsson a, Stenman G, Sahlin P, Kanzaki T, Claesson-Welsh L, ten Dijke P, Miyazono K & Heldin CH (1994) Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 32469–78.
- 68 Yin W, Smiley E & Germiller J (1995) Isolation of a novel latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein gene (LTBP-3). *J. Biol. Chem.* **270**, 10147–10160.
- 69 Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC & Sporn MB (1988) Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* **263**, 7646–7654.
- 70 Lyons RM, Gentry LE, Purchio a F & Moses HL (1990) Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J. Cell Biol.* **110**, 1361–7.
- 71 Lawrence DA (1985) Conversion of a high molecular weight latent  $\beta$ -TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active  $\beta$ -TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **133**, 1026–1034.
- 72 Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T & Springer T a (2011) Latent TGF- $\beta$  structure and activation. *Nature* **474**, 343–9.

- 73 Radaev S, Zou Z, Huang T, Lafer EM, Hinck AP & Sun PD (2010) Ternary complex of transforming growth factor-beta1 reveals isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the superfamily. *J. Biol. Chem.* **285**, 14806–14.
- 74 Lee SJ & McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9306–9311.
- 75 Hill JJ, Davies M V, Pearson A a, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM & Qiu Y (2002) The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Biol. Chem.* **277**, 40735–41.
- 76 Thies RS, Chen T, Davies M V, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA & Wolfman NM (2001) GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* **18**, 251–259.
- 77 Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TOB, Whittemore L-A & Khurana TS (2005) Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J.* **19**, 543–9.
- 78 Ge G, Hopkins DR, Ho W & Greenspan DS (2005) GDF11 Forms a Bone Morphogenetic Protein 1-Activated Latent Complex That Can Modulate Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells. **25**, 5846–5858.
- 79 Jones W, Richmond E & White K (1994) Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-. *Growth Factors* **11**, 215–225.
- 80 Gregory KE, Ono RN, Charbonneau NL, Kuo C-L, Keene DR, Bächinger HP & Sakai LY (2005) The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **280**, 27970–80.
- 81 Sengle G, Ono RN, Lyons KM, Bächinger HP & Sakai LY (2008) A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. *J. Mol. Biol.* **381**, 1025–39.
- 82 Brown MA, Zhao Q, Baker KA, Naik C, Chen C, Pukac L, Singh M, Tsareva T, Parice Y, Mahoney A, Roschke V, Sanyal I & Choe S (2005) Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 25111–8.
- 83 Cui Y, Hackenmiller R, Berg L, Jean F, Nakayama T, Thomas G & Christian JL (2001) The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. , 2797–2802.
- 84 Sopory S, Nelsen SM, Degrin C, Wong C & Christian JL (2006) Regulation of bone morphogenetic protein-4 activity by sequence elements within the prodomain. *J. Biol. Chem.* **281**, 34021–31.
- 85 Inouye M (1991) Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding. *Enzyme* **45**, 314–321.
- 86 Ikemuras H & Inouyes M (1987) Requirement of Pro-sequence for the Production of Active Subtilisin E in. *J. Biol. Chem.* **262**, 7859–7864.

- 87 Soerensen P & Winther J (1993) The pro region required for folding of carboxypeptidase Y is a partially folded domain with little regular structural core. *Biochemistry* **32**, 12160–12166.
- 88 JL S & DA. A (1989) The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain in vivo. *Nature* **341**, 462–464.
- 89 Rattenholl A, Ruoppolo M, Flagiello A, Monti M, Vinci F, Marino G, Lilie H, Schwarz E & Rudolph R (2001) Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J. Mol. Biol.* **305**, 523–33.
- 90 Rattenholl A, Lilie H, Grossmann A, Stern A, Schwarz E & Rudolph R (2001) The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3296–303.
- 91 Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL & Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**, 843–848.
- 92 Ibáñez CF (2002) Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci.* **25**, 284–6.
- 93 Bauskin AR, Zhang HP, Fairlie WD, He XY, Russell PK, Moore a G, Brown D a, Stanley KK & Breit SN (2000) The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J.* **19**, 2212–20.
- 94 Cerletti N, McMaster G, Cox D, Schmitz A & Meyhack B (1997) Process for refolding recombinantly produced TGF-β-like proteins. **7**, US Patent 5,650,494.
- 95 Gray AM & Mason AJ (1990) Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science (80- )*. **247**, 1328–1330.
- 96 Walton KL, Makanji Y, Wilce MC, Chan KL, Robertson DM & Harrison C a (2009) A common biosynthetic pathway governs the dimerization and secretion of inhibin and related transforming growth factor beta (TGFbeta) ligands. *J. Biol. Chem.* **284**, 9311–20.
- 97 Walton KL, Makanji Y, Chen J, Wilce MC, Chan KL, Robertson DM & Harrison C a (2010) Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the latent transforming growth factor-beta1 complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 17029–37.
- 98 Sha X, Yang L & Gentry LE (1991) Identification and analysis of discrete functional domains in the pro region of pre-pro-transforming growth factor beta 1. *J. Cell Biol.* **114**, 827–39.
- 99 Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ & Rosen V (2006) BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat. Genet.* **38**, 1424–9.
- 100 Daopin S, Piez K a, Ogawa Y & Davies DR (1992) Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* **257**, 369–73.
- 101 Kirsch T, Sebald W & Dreyer M (2000) Crystal structure of the BMP-2–BRIA ectodomain complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **7**, 492–496.

- 102 Nickel J, Dreyer MK, Kirsch T & Sebald W (2001) The crystal structure of the BMP-2:BMPR-IA complex and the generation of BMP-2 antagonists. *J. bone Jt. Surg.* **83**, 7–14.
- 103 Allendorph GP, Vale WW & 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.
- 104 Takada T, Katagiri T, Ifuku M, Morimura N, Kobayashi M, Hasegawa K, Ogamo A & Kamijo R (2003) Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 43229–35.
- 105 Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Yanai T, Fukuda T, Chung U, Koike T, Takaoka K & Kamijo R (2006) Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J. Biol. Chem.* **281**, 23246–53.
- 106 Cheng H, Jiang W & Phillips F (2003) Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. bone Jt. Surg.* **85**, 1544–1552.
- 107 Teixeira JO & Urist MR (1998) Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **117**, 27–34.
- 108 Govender S & Csimma C (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J. Bone Jt. Surg.* **84**, 2123–2134.
- 109 Kain M & Einhorn T (2005) Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures. *Foot Ankle Clin.* **10**, 639–650.
- 110 Carlisle E & Fischgrund JS (2005) Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *Spine J.* **5**, 240S–249S.
- 111 Smith D & Cooper G (2008) Bone morphogenetic protein 2 therapy for craniofacial surgery. *J Craniofacial Surg.* **19**, 1244–1259.
- 112 Wikesjö UM, Guglielmoni P, Promsudthi a, Cho KS, Trombelli L, Selvig K a, Jin L & Wozney JM (1999) Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J. Clin. Periodontol.* **26**, 392–400.
- 113 Shields LBE, Raque GH, Glassman SD, Campbell M, Vitaz T, Harpring J & Shields CB (2006) Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine (Phila. Pa. 1976).* **31**, 542–7.
- 114 Benglis D, Wang M & Levi A (2008) A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* **62**, ONS423–431.
- 115 Bishop GB & Einhorn T a (2007) Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int. Orthop.* **31**, 721–7.
- 116 Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Khademhosseini A & Kobayashi H (2007) Bone regeneration through controlled release of bone morphogenetic protein-2 from 3-D tissue engineered nano-scaffold. *J. Control. Release* **117**, 380–6.

- 117 Li RH & Wozney JM (2001) Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol.* **19**, 255–65.
- 118 Betz O, Betz V & Nazarian A (2006) Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J. Bone Jt. Surg.* **88**, 355–365.
- 119 Hillger F, Herr G, Rudolph R & Schwarz E (2005) Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *J. Biol. Chem.* **280**, 14974–80.
- 120 Kliemannel M, Rattenholl A & Golbik R (2004) The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett.* **566**, 207–212.
- 121 Hauburger A, von Einem S, Schwaerzer GK, Buttstedt A, Zebisch M, Schräml M, Hortschansky P, Knaus P & Schwarz E (2009) The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *FEBS J.* **276**, 6386–98.
- 122 Von Einem S, Erler S, Bigl K, Frerich B & Schwarz E (2011) The pro-form of BMP-2 exhibits a delayed and reduced activity when compared to mature BMP-2. *Growth Factors* **29**, 63–71.
- 123 Rudolph, R., Schwarz, E., Herr, G. & Hillger F (2008) Production of recombinant BMP-2. , US Patent 7,354,901 B2.
- 124 McMahon GA, Dignam JD & Gentry LE (1996) growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 1-latency-associated peptide. *Biochem J* **313**, 343–351.
- 125 Shim AH, Liu H, Focia PJ, Chen X, Lin PC & He X (2010) Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11307–11312.
- 126 Hauburger A (2010) Die Pro-Form des Knochenwachstumsfaktors BMP-2: Charakterisierung der Rezeptorbindung und Identifizierung einer Subdomäne. .
- 127 Brinkmann U, Mattes RE & Buckel P (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**, 109–114.
- 128 Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., and Jaenicke R (1997) Folding proteins. *IRL Oxford Univ. Press. Oxford Protein Fu*, 57–59.
- 129 Hevehan D & De Bernardez C (1997) Oxidative renaturation of lysozyme at high concentrations. *Biotechnol Bioeng* **54**, 221–230.
- 130 Reddy K, Lilie H, Rudolph R & Lange C (2005) L -Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci.* **14**, 929–935.
- 131 Arnold U & Ulbrich-Hofmann R (1999) Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal. Biochem.* **271**, 197–9.
- 132 Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–705.

- 133 Pace CN & Shaw KL (2000) Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins Suppl* **4**, 1–7.
- 134 Pace C (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266–280.
- 135 Santoro MM & Bolen DW (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063–8.
- 136 Laue T (2001) Analytical Centrifugation : Equilibrium Approach. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 1–13.
- 137 T. Svedberg KOP (1940) The Ultracentrifuge. *Oxford Univ. Press.*
- 138 Piotto M, Saudek V & Sklenář V (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665.
- 139 Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J BA (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* **6**, 277–293.
- 140 Johnson B (2004) Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Protein NMR Tech.* **278**, 313–352.
- 141 Kirsch T, Nickel J & Sebald W (2000) BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J.* **19**, 3314–24.
- 142 Ben-bassat A, Bauer K, Chang S, Myambo KEN & Boosman A (1987) Processing of the initiation methionine from proteins : properties of the Escherichia coli methionine aminopeptidase and its gene Processing of the Initiation Methionine from Proteins : Properties of the Escherichia coli Methionine Aminopeptidase and Its. *J. Bacteriol.* **169**, 751–757.
- 143 Sreerama N & Woody RW (2003) Structural composition of  $\beta$ I - and  $\beta$ II -proteins. *Protein Sci.* **12**, 384–388.
- 144 J W, JT Y & CS W (1992)  $\beta$ II conformation of all- $\beta$  proteins can be distinguished from unordered form by circular dichroism. *Anal Biochem* **200**, 359–364.
- 145 Kuhfahl S, Hauburger A, Thieme T, Groppe J, Ihling C, Tomic S, Schutkowski M, Sinz A & Schwarz E (2011) Identification of a core domain within the proregion of bone morphogenetic proteins that interacts with the dimeric, mature domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 300–305.
- 146 Young MM, Tang N, Hempel JC, Oshiro CM, Taylor EW, Kuntz ID, Gibson BW & Dollinger G (2000) High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *PNAS* **97**, 5802–5806.
- 147 Sinz A (2003) Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J. Mass Spectrom.* **38**, 1225–37.

- 148 Sinz A (2006) Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 663–82.
- 149 Götze M, Pettelkau J, Schaks S, Bosse K, Ihling CH, Krauth F, Fritzsche R, Kühn U & Sinz A (2012) StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 76–87.
- 150 Dimova K, Kalkhof S, Pottratz I, Ihling C, Rodriguez-Castaneda F, Liepold T, Griesinger C, Brose N, Sinz A & Jahn O (2009) Structural insights into the calmodulin-Munc13 interaction obtained by cross-linking and mass spectrometry. *Biochemistry* **48**, 5908–21.
- 151 Ragone R (2000) How the protein concentration affects unfolding curves of oligomers. *Biopolymers* **53**, 221–225.
- 152 Neet KE & Timm DE (1994) Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* **3**, 2167–74.
- 153 Rumfeldt J a O, Galvagnion C, Vassall K a & Meiering EM (2008) Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **98**, 61–84.
- 154 Hillger F (2004) Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von proBMP-2 , BMP-2 und dem BMP-2-Propeptid. .
- 155 Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK & Kaufman RJ (1992) Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* **7**, 139–150.
- 156 Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM & LaPan P (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2220–4.
- 157 Myers JK, Pace CN & Scholtz JM (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* **4**, 2138–48.
- 158 Taylor WR (1999) Protein structural domain identification. *Protein Eng.* **12**, 203–16.
- 159 Rose GD (1979) Hierarchic organization of domains in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **134**, 447–70.
- 160 Sowdhamini R & Blundell T (1995) An automatic method involving cluster analysis of secondary structures for the identification of domains in proteins. *Protein Sci.* **4**, 506–520.
- 161 Pearson KM, Pannell LK & Fales HM (2002) Intramolecular cross-linking experiments on cytochrome c and ribonuclease A using an isotope multiplet method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 149–59.
- 162 Eswar N, John B, Mirkovic N, Fiser A, Ilyin VA, Pieper U, Stuart AC, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Yerkovich B, Sali A. Eswar N, John B, Mirkovic N, Fiser A, Ilyin VA, Pieper U, Stuart AC, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Yerkovich B SA (2003) Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3375–3380.

- 163 Zhu X, Ohta Y, Jordan F & Inouye M (1989) Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* **339**, 483–484.
- 164 Sengle G, Charbonneau NL, Ono RN, Sasaki T, Alvarez J, Keene DR, Bächinger HP & Sakai LY (2008) Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J. Biol. Chem.* **283**, 13874–88.
- 165 Miller DM, Ogawa Y, Iwata KK, Dijke P, Purchio AF, Soloff MS & Get LE (1992) Characterization of the Binding of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and - $\beta$ 3 to Recombinant  $\beta$ 1-Latency-Associated Peptide. *Mol Endocrinol* **6**, 694–702.
- 166 Bailly S, Brand C, Chambaz EM & Feige J-J (1997) Analysis of Small Latent Transforming Growth Factor-beta Complex Formation and Dissociation by Surface Plasmon Resonance. ABSENCE OF DIRECT INTERACTION WITH THROMBOSPONDINS. *J. Biol. Chem.* **272**, 16329–16334.
- 167 Akiyama T, Marqués G & Wharton K a (2012) A large bioactive BMP ligand with distinct signaling properties is produced by alternative proconvertase processing. *Sci. Signal.* **5**, ra28.
- 168 Degnin C, Jean F, Thomas G & Christian JL (2004) Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5012–20.
- 169 Goldman DC, Hackenmiller R, Nakayama T, Sopory S, Wong C, Kulesa H & Christian JL (2006) Mutation of an upstream cleavage site in the BMP4 prodomain leads to tissue-specific loss of activity. *Development* **133**, 1933–42.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Å	Angström (1 Å = 0,1 nm)
ALK	activin-like receptor kinase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AU	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
BISC	<i>BMP-induced signaling complex</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
bp	Basenpaare
BS <sup>3</sup>	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	komplementäre DNA
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPP	<i>decapentaplegic</i>
ECD	extrazelluläre Domäne
ECM	extrazelluläre Matrix
ECL	<i>enzyme-dependent chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESC	<i>embryonic stem cell</i>
ESI	Elektrosprayionisation
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FDA	<i>American Food and Drug Association</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	<i>growth and differentiation factor</i>
GdmCl	Guanidinium-Hydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high-pressure liquid chromatography</i>
IB	<i>inclusion body</i>
IMC	<i>intramolekulare chaperone</i>

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$K_D$	Dissoziationskonstante
LAP	<i>latent associated peptide</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LLC	<i>large latent complex</i>
LTBP	<i>latent TGF-<math>\beta</math> binding protein</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MIC-1	<i>macrophage-inhibitory cytokine</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulare Ausschlußgröße ( <i>molecular weight cut-off</i> )
NaDOC	Desoxycholsäure-Natriumsalz
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pdb	Proteindatenbank
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFC	<i>pre-formed complex</i>
pl	Isoelektrischer Punkt
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	<i>small latent complex</i>
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>salt-optimized broth with carbon-source</i>
SPC	<i>subtilisin-like proprotein convertase</i>
SV	Säulenvolumen
TBS	tris-buffered saline
TBST	<i>tris-buffered saline tween</i>
TCA	Trichloracetat
TE	Trypsin-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Vol.	Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung

## 8. Anhang

### Ergänzende Abbildungen und Tabellen

#### Ergebnis des Peptid-Microarray

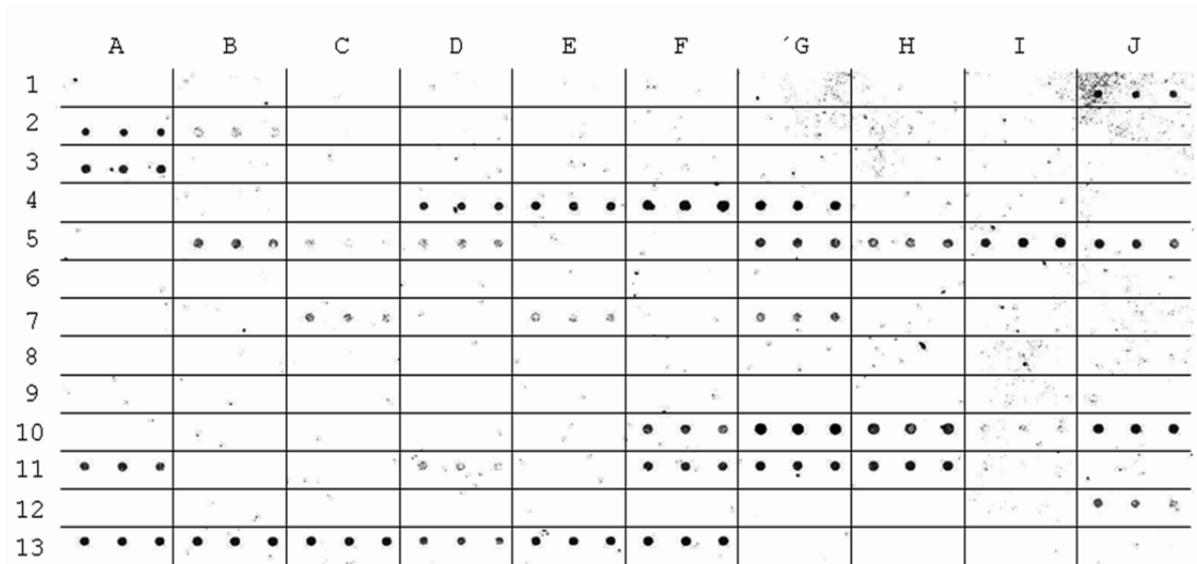


Abbildung A 1: *Subarray* mit den detektierten Antikörper-Signalen nach Inkubation des Chips mit BMP-2. Jedes Peptid wurde in Dreifachbestimmung immobilisiert. Damit repräsentiert jede Spalte ein Peptid.

Tabelle A 1: Auflistung der den Signalen in Abbildung A 1 entsprechenden Peptiden.

Zeile	Spalte	Peptid	Zeile	Spalte	Peptid
1	J	AAASSGRPSSQPSDE	10	F	LKSSCKRHPHYVDFS
2	A	SSGRPSSQPSDEVLS	10	G	SCKRHPHYVDFSDVG
2	B	RPSSQPSDEVLSEFE	10	H	RHPHYVDFSDVGNW
3	A	PTPSRDAVPPYMLD	10	I	LYVDFSDVGNWVIV
4	D	ANTVRSFHHEESLEE	10	J	DFSDVGNWVIVAPP
4	E	VRSFHHEESLEELPE	11	A	DVGNWVIVAPPGYH
4	F	FHHEESLEELPETSG	11	D	APPGYHAFYCHGEC
4	G	EESLEELPETSGKTT	11	F	AFYCHGECPFPLADH
5	B	RRFFNLSSIPTEEF	11	G	CHGECPFPLADHLNS
5	C	FFNLSSIPTEEFITS	11	H	ECPFPLADHLNSTNH
5	D	LSSIPTEEFITSDEL	12	J	TELSAISMLYLDENE
5	G	ITSDELQVFREQMQD	13	A	SAISMLYLDENEKVV
5	H	DELQVFREQMQDALG	13	B	SMLYLDENEKVV LKN
5	I	QVFREQMQDALGNNS	13	C	YLDENEKVV LKNYQD
5	J	REQMQDALGNNSSFH	13	D	ENEKVV LKNYQDMVV
7	C	DTRLVNQNASRWESF	13	E	KVV LKNYQDMVVEGC
7	E	QNASRWESFDVTPAV	13	F	LKNYQDMVVEGCGR
7	G	ESFDVTPAVMRWTAQ			

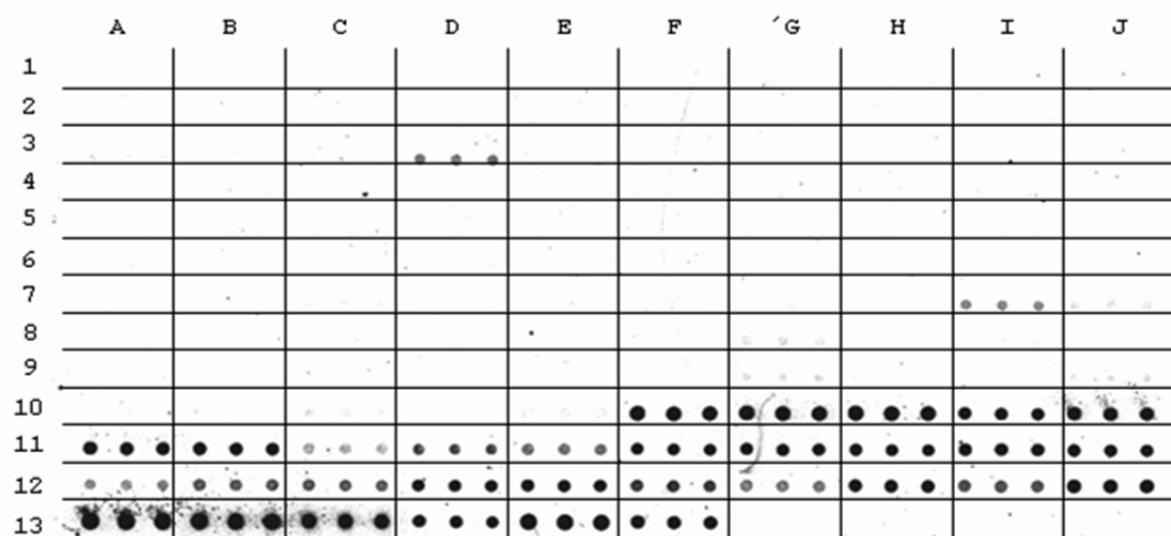


Abbildung A 2: *Subarray* der Referenzmessung. Der Chip wurde nur mit dem Antikörper, ohne vorherige Inkubation mit BMP-2, behandelt. Jedes Signal entspricht daher einem Antikörper-Epitop. Die Peptide wurden in Dreifachbestimmung immobilisiert. Jede Spalte repräsentiert ein Peptid.

Tabelle A 2: Auflistung der den Signalen in Abbildung A 2 entsprechenden Peptiden.

Zeile	Spalte	Peptid	Zeile	Spalte	Peptid
3	D	PPYMLDLYRRHSGQP	11	J	ADHLNSTNHAIQTL
7	I	PAVMRWTAQGHANHG	12	A	LNSTNHAIQTLVNS
7	J	MRWTAQGHANHGFFV	12	B	TNHAIQTLVNSVNS
10	F	LKSSCKRHPLYVDFS	12	C	AIVQTLVNSVNSKIP
10	G	SCKRHPLYVDFSVDVG	12	D	QTLVNSVNSKIPKAC
10	H	RHPLYVDFSVDVGWND	12	E	VNSVNSKIPKACVCP
10	I	LYVDFSVDVGWNDWIV	12	F	VNSKIPKACCVPTTEL
10	J	DFSVDVGWNDWIVAPP	12	G	KIPKACCVPTELSAI
11	A	DVGWNDWIVAPPGYH	12	H	KACCVPTELSAISML
11	B	WNDWIVAPPGYHAFY	12	I	CVPTELSAISMLYLD
11	C	WIVAPPGYHAFYCHG	12	J	TELSAISMLYLDENE
11	D	APPGYHAFYCHGEC	13	A	SAISMLYLDENEKVV
11	E	GYHAFYCHGECPFPL	13	B	SMLYLDENEKVV LKN
11	F	AFYCHGECPFPLADH	13	C	YLDENEKVV LKNYQD
11	G	CHGECPFPLADHLNS	13	D	ENEKVV LKNYQDMVV
11	H	ECPFPLADHLNSTNH	13	E	KVV LKNYQDMVVEGC
11	I	FPLADHLNSTNHAIV	13	F	LKNYQDMVVEGCGCR

## Ergebnisse des chemischen *cross-linking* und der Massenspektrometrie

Tabelle A 3: Intra- und intermolekulare *cross-links* des 15 kDa-Kernfragmentes. z - Ladung des Ions, ppm - Angabe der Massenabweichung. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz von prä-proBMP-2 (Abbildung A 4). Die vernetzten Aminosäuren wurden der Sequenz des proTGF- $\beta$ 1 [72] zugeordnet; die entsprechenden Reste sind in der letzten Spalte aufgelistet. In den letzten beiden Zeilen sind intermolekulare *cross-links* aufgelistet, die aus der Dimer-Bande (Abbildung 15) identifiziert wurden.

<b>[M+H]<sup>+</sup><sub>th</sub></b>	<b>m/z</b>	<b>z</b>	<b>ppm</b>	<b>Sequenz 1</b>	<b>Sequenz 2</b>	<b>AS LAP</b>
3369,768	843,198	+4	1,4	K127 / T128 / T129 <sup>124</sup> TSGKTTRRRFFFLSSIPTEE <sup>143</sup>	K178 <sup>176</sup> I IKPATANS <sup>184</sup>	P99- S146
3369,768	843,198	+4	1,4	S137 <sup>124</sup> TSGKTTRRRFFFLSSIPTEE <sup>143</sup>	K178 <sup>176</sup> I IKPATANS <sup>184</sup>	S109- S146
2973,531	744,138	+4	0,4	K127 <sup>124</sup> TSGKTTRRRFFFLSSIPTEE <sup>143</sup>	K236 <sup>236</sup> KQGVSK <sup>240</sup>	P99- S198
1697,979	566,664	+3	-0,7	K178 <sup>176</sup> I IKPATANS <sup>184</sup>	K236 <sup>236</sup> KQGVSK <sup>241</sup>	S146- S198
1429,837	715,423	+2	1,2	K236 <sup>236</sup> KQGVSK <sup>241</sup>	K241 <sup>236</sup> KQGVSK <sup>241</sup>	
1429,837	477,28	+3	-0,6	K236 <sup>236</sup> KQGVSK <sup>241</sup>	K236 <sup>236</sup> KQGVSK <sup>241</sup>	

Tabelle A 4: Intramolekulare *cross-links* der Prodomäne. z - Ladung des Ions, ppm - Angabe der Massenabweichung. Die Angabe der Aminosäureposition bezieht sich auf die Sequenz von prä-pro-BMP-2 (Abbildung A4). Die vernetzten Aminosäuren wurden der Sequenz des proTGF-β1 [72] zugeordnet; die entsprechenden Reste sind in der letzten Spalte aufgelistet.

[M+H] <sup>th</sup>	m/z	z	ppm	Sequenz 1	Sequenz 2	AS LAP
3188.686	532.287	+6	-0.4	K272 <sup>255</sup> HSWSQIRPLLVTFGHDGKGHPLH <sup>277</sup>	K278 <sup>278</sup> KRE <sup>280</sup>	
3188.686	638.543	+5	-0.4	K272 <sup>255</sup> HSWSQIRPLLVTFGHDGKGHPLH <sup>277</sup>	K278 <sup>278</sup> KRE <sup>280</sup>	
2973.531	744.139	+4	0.4	S125 / K127 / T128 / T129 <sup>124</sup> TSGKTRRRFFNLSSIPTEE <sup>143</sup>	K236 <sup>236</sup> KQGV <sup>241</sup>	P99- S198
2775.447	694.617	+4	-0.1	S258 <sup>255</sup> HSWSQIRPLLVTFGHDG <sup>271</sup>	K272 <sup>272</sup> KGHPLH <sup>277</sup>	G223- E237
3357.670	480.531	+7	0.5	T217 <sup>209</sup> VTPAVMRWTAQGHANHGFFVVEVAHLE <sup>234</sup>	S117 <sup>117</sup> SLE <sup>119</sup>	L179- S87

Tabelle A 5: Intramolekulare *cross-links* des 20 kDa-Kernfragmentes. z - Ladung des Ions, ppm - Angabe der Massenabweichung. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz von prä-proBMP-2 (Abbildung A 4). Die vernetzten Aminosäuren wurden der Sequenz des proTGF-β1 [72] zugeordnet; die entsprechenden Reste sind in der letzten Spalte aufgelistet.

[M+H] <sup>th</sup>	m/z	z	ppm	Sequenz 1	Sequenz 2	AS LAP
3162.521	633.309	+5	-0.9	S166 <sup>156</sup> QMQDALGNSSFFHHRINIYE <sup>175</sup>	K236 <sup>235</sup> EKQGV <sup>240</sup>	K134- S198
2420.342	605.841	+4	-0.5	S249 <sup>241</sup> KRHVRISRSLHQD <sup>253</sup>	K236 / S240 <sup>235</sup> EKQGV <sup>240</sup>	R214- D200
2420.342	484.874	+5	-1.2	S247 <sup>241</sup> KRHVRISRSLHQD <sup>253</sup>	K236 <sup>235</sup> EKQGV <sup>240</sup>	S212- S198



## Homologie-Modell

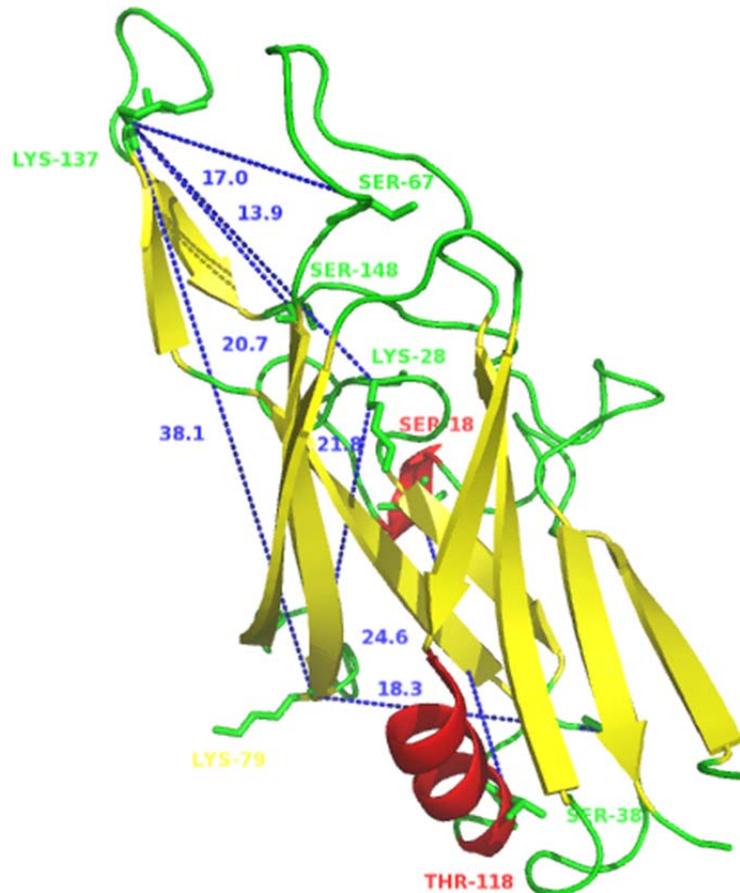


Abbildung A 5: Modell-Struktur des 20 kDa-Kernfragmentes mit den identifizierten *cross-links*. Die Struktur ist in der *cartoon*-Darstellung gezeigt. Die für das 15 kDa-Fragment sowie das 20 kDa-Fragment und die Prodomäne identifizierten *cross-links* sind eingezeichnet, sofern sie in der Sequenz des 20 kDa-Fragmentes vorhanden waren. Die verknüpften Aminosäuren sind in der Stab-Darstellung abgebildet. Die Abstände zwischen den Aminosäuren sind in blau hervorgehoben. Der Abstand zwischen beiden C $\alpha$ -Atomen ist in Å angegeben. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz des 20 kDa-Fragmentes (Abbildung A 6).

```

      β1 10      20      30      40      50      60
ERAASRANTV RSFHHEESLE ELPETSGKTT RRRFFNLSSI PTEEFITSAE LQVFREQMQD
      70      80      90      100     110     120
ALGNSSSFHH RINIYEIIKP ATANSKFPVT RLLDTRLVNQ NASRWESFDV TPAVMRWTAQ
      130     140     150     160     β10 170
GHANHGFBVVE VAHLEEKQGV SKRHVRISRS LHQDEHSWSQ IRPLLVTFGH DG
  
```

Abbildung A 6: Primärsequenz des 20 kDa-Kernfragmentes. Die Sequenzen, die den beiden im LAP vorhandenen  $\beta$ -Strängen  $\beta 1$  und  $\beta 10$  [72] entsprechen, sind unterstrichen.



# Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Schwarz möchte ich mich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken. Ich hatte eine schöne Zeit und habe mich immer wohl gefühlt. Danke für die gute Betreuung während der gesamten Zeit, die Anregungen und Ideen und für die Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Den "alten" "Fibrillen-Menschen" Anja Buttstedt und Reno Winter danke ich für die herzliche Aufnahme in die Gruppe und dass sie jeden Tag zu einem spaßigen Arbeitstag gemacht haben. Es war mit euch echt wunderbar! Sehr bedanken möchte ich mich auch bei meinem "Bonie"-Kollegen Tino Thieme, den ich schon seit Anfang meines Studiums kenne. Wie im Studium hatten wir auch bei der Promotion viel Spaß zusammen und haben eng zusammen gearbeitet.

Den "alten" "Bonies" Anja Hauburger und Sabrina von Einem danke ich für die gute Einführung in mein Thema und die Beantwortung aller Fragen, auch als sie schon ganz woanders gearbeitet haben. Aber auch den neu hinzugekommenen "Fibrillen" Jens Liebold und Steffen Damm möchte ich danken. Ihr habt die Arbeitsgruppe wieder aufleben lassen, als sie immer kleiner wurde.

Unserer TA Christiane Harnisch danke ich für die tolle Zuarbeit im Labor und ihre Herzlichkeit.

Im Weiteren möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken:

Frau Prof. Dr. Andrea Sinz danke ich für die gute Zusammenarbeit bei allen *cross-linking* Experimenten und massenspektrometrischen Analysen. Insbesondere Sabine Herbst danke ich für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der *cross-linking*-Versuche. Vor allem für ihre Ausdauer bei den ständigen Nachfragen zu dem Auswerteprogramm und den zahlreichen Optimierungsversuchen danke ich ihr sehr.

Herrn PD Dr. Hauke Lilie danke ich für die Durchführung und Auswertung der Analytischen Ultrazentrifugation. Zudem bedanke ich mich dafür, dass er immer ein offenes Ohr für Fragen hatte und für seine Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Mike Schutkowski bedanke ich mich für die Kooperation bei den *microarray*-Versuchen und die Bereitstellung der Chips. Dr. David Rauh und Antonia Masch danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der *microarray*-Experimente.

Herrn Prof. Dr. Jay Groppe danke ich für die Kristallisationsversuche und die Bereitstellung einer Modell-Struktur.

Herrn Prof. Dr. Jochen Balbach danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den NMR-Messungen. Bei Rica Patzschke bedanke ich mich für die Durchführung der NMR-Messungen und die zahlreichen, leider vergeblichen, Versuche doch noch ein schönes Spektrum zu erhalten.

Herrn Prof. Dr. Thomas Müller danke ich für die Bereitstellung des Protokolls für die Isotopenmarkierung der Proteine.

Frau Dr. Sladjana Tomic danke ich für die Einführung ins das BIAcore T100.

Bei Frau Dr. Angelika bedanke ich mich für die massenspektrometrischen Analysen.

Besonderer Dank gilt auch meinen Freunden. Ihr habt die Studienzeit und die Promotion zu einem unvergesslichen Abschnitt in meinem Leben gemacht. Ich werde mich immer an die Charivari- und Turm-Abende während des Studiums erinnern. Die während der Promotion neu gewonnen Kollegen sind zu Freunden geworden und die Pubquiz- und Bauernclub-Abende waren legendär.

An dieser Stelle danke ich im Speziellen noch Christian für seine Hilfe bei Verständnisproblemen und für seine Diskussionsbereitschaft.

Zum Abschluss danke ich noch meiner Familie für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit. Meine Eltern waren immer für mich da und haben mich ermutigt meinen Weg zu gehen. Ganz besonderer Danke gilt meinem Mann, Michael, der immer an mich geglaubt hat und mich auch in Zeiten größter Verzweiflung wieder aufgebaut hat. Danke auch für das Ertragen meiner Launen und dass du mich bei allem unterstützt hast.

# Lebenslauf

## Zu meiner Person

Name:	Kuhfahl, geb. Bauer	Vorname: Silke
Geburtsdatum:	14. November 1984	Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand:	verheiratet	Nationalität: deutsch
Geschlecht:	weiblich	

## Bildungsweg

### Promotion

seit 12/2009	Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg an dem Institut für Biochemie/ Biotechnologie in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Schwarz
--------------	---

### Hochschulausbildung

09/2009	Studienabschluss als Diplom-Biochemikerin (Gesamtnote: 1,3)
11/2008-09/2009	Anfertigung der Diplomarbeit an dem Institut für Humangenetik in der Arbeitsgruppe von Prof. I. Hansmann
10/2004-09/2009	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg

### Schulbildung

07/2004	Abitur (Gesamtnote: 1,3)
09/1995-07/2004	Schulbildung an dem Südstadt-Gymnasium, Halle/Saale
09/1991-07/1995	Grundschule "Thomas Mann", Halle/Saale

## Publikation

**Kuhfahl, S.**, Hauburger, A., Thieme, T., Groppe, J., Ihling, C., Tomic, S., Schutkowski, M., Sinz, A., and Schwarz, E. Identification of a core domain within the proregion of bone morphogenetic proteins that interacts with the dimeric, mature domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2011**, 408, 300–305.

## In Vorbereitung

**Kuhfahl, S.**, Herbst, S., Groppe, J., Sinz, A., Schwarz, E. A core domain of the BMP2 proregion can support the biogenesis of the mature homodimeric growth factor.

## Präsentationen

### Poster-Präsentationen

8<sup>th</sup> International Conference on Bone Morphogenetic Proteins (September 2010). Löwen, Belgien

22<sup>th</sup> Protein Faltertage (Oktober 2011). Regensburg, Deutschland

9<sup>th</sup> International Conference on Bone Morphogenetic Proteins: Bone Morphogenetic Proteins - Regenerative Medicine and Stem Cells (Juni 2012). Lake Tahoe, Kailifornien, USA.

23<sup>th</sup> Protein Faltertage (Oktober 2012). Regensburg, Deutschland

### Mündliche Präsentationen

Anlässlich von Gesamtarbeitsbesprechungen im September 2010 und März 2012 des Protein-Kompetenznetzwerks-Halle: „tools, targets and therapeutics“ ProNet-T<sup>3</sup>

9<sup>th</sup> International Conference on Bone Morphogenetic Proteins: Bone Morphogenetic Proteins - Regenerative Medicine and Stem Cells (Juni 2012). “Biophysical and Structural Characterization of a Folded Core Fragment within the Prodomain of Therapeutic Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)”. Lake Tahoe, Kailifornien, USA.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Ich versichere weiterhin, dass ich mich mit dieser Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Ich habe mich mit der vorliegenden Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben.

Silke Kuhfahl