

Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von proBMP-2, BMP-2 und dem BMP-2-Propeptid

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frank Hillger
geb. am 27.12.1973 in Dessau

Gutachter:

1. PD Dr. Elisabeth Schwarz
2. Prof. Dr. Johannes Buchner
3. PD Dr. Ursula Rinas

Promotionsgesuch eingereicht am: 11. Oktober 2004

Tag der öffentlichen Verteidigung am: 19. Januar 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000007975

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007975>]

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung	I
1.1	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i> (BMPs)	1
1.2	Propeptide und Proproteine	10
1.3	Ziele der Arbeit	13
2	Material & Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Proteine	15
2.1.2	Lösungen, Medien, Puffer	17
2.1.3	Primer	20
2.1.4	Plasmide	21
2.1.5	Bakterienstämme	21
2.1.6	Geräte, Kits, Standards & Zubehör	23
2.2	Methoden	27
2.2.1	Molekular- und mikrobiologische Methoden	27
2.2.1.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.1.2	DNA-Isolierung	27
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion & DNA-Sequenzierung	28
2.2.1.4	Herstellung der Expressionsplasmide	29
2.2.1.5	Überexpression rekombinanter Gene in <i>E. coli</i>	30
2.2.2	Renaturierung von Proteinen aus <i>inclusion bodies</i> (IBs)	32
2.2.3	Allgemeine proteinchemische Methoden	33
2.2.3.1	Proteinfällung für die SDS-PAGE	33
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	34
2.2.3.3	Western Blot für N-terminale Sequenzierung	35
2.2.3.4	N-terminale Sequenzierung & Massenspektrometrie	35
2.2.3.5	Konzentrierung von Proteinlösungen	36
2.2.3.6	Lyophilisation von Proteinen	37
2.2.3.7	Limitierte Proteolyse	37
2.2.4	Chromatographische Methoden	37
2.2.4.1	Imobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie	37
2.2.4.2	Heparin-Affinitätschromatographie	38
2.2.4.3	Hydroxyapatit-Chromatographie	39
2.2.4.4	RP-HPLC	40
2.2.4.5	Hydrophobe Chromatographie	40

2.2.5	Spektroskopische Methoden	41
2.2.5.1	UV-Absorptionsspektroskopie	41
2.2.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	42
2.2.5.3	CD-Spektroskopie	44
2.2.6	Chemisch induzierte Proteinfaltung und -rückfaltung	45
2.2.6.1	Thermodynamische Analyse	45
2.2.6.2	Kinetische Analyse	47
2.2.7	Analytische Ultrazentrifugation	50
2.2.8	Bestimmung der biologischen Aktivität	51
3	Ergebnisse & Diskussion	54
3.1	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	54
3.2	Renaturierung & Reinigung der BMP-Varianten	57
3.2.1	Renaturierung & Reinigung von proBMP-2	57
3.2.1.1	Renaturierung von proBMP-2	57
3.2.1.2	Reinigung von proBMP-2	58
3.2.2	Renaturierung & Reinigung von BMP-2	62
3.2.2.1	Renaturierung von BMP-2	62
3.2.2.2	Reinigung von BMP-2	62
3.2.3	Renaturierung & Reinigung des Propeptids	63
3.2.3.1	Renaturierung des Propeptids	63
3.2.3.2	Reinigung des Propeptids	65
3.2.4	Gewinnung von drBMP-2	66
3.2.5	Die Herstellung der BMP-2-Varianten im Vergleich	68
3.3	Charakterisierung der BMP-Varianten	70
3.3.1	Biologische Aktivität von BMP-2, drBMP-2 & proBMP-2	70
3.3.1.1	Aktivität von drBMP-2 und proBMP-2 im Tiermodell	70
3.3.1.2	Aktivität von drBMP-2 und BMP-2 in Zellkultur	72
3.3.2	Oligomerisierung von proBMP-2 & des Propeptids	74
3.3.3	Spektroskopische Charakterisierung der BMP-Varianten	77
3.3.3.1	Spektroskopische Charakterisierung von proBMP-2	77
3.3.3.2	Spektroskopische Charakterisierung von BMP-2	82
3.3.3.3	Spektroskopische Charakterisierung des Propeptids	86
3.4	Untersuchungen zur Stabilität der BMP-Varianten	90
3.4.1	Vergleich der thermodynamischen Stabilität der BMP-2-Varianten	90
3.4.2	Kinetik der Propeptidfaltung & -entfaltung	97
3.5	Zusammenfassung und Ausblick	105
	Anhang	107
	Abkürzungen	109
	Tabellenverzeichnis	III
	Abbildungsverzeichnis	III
	Literaturverzeichnis	III

I EINLEITUNG

I.1 BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMPs)

Entdeckung und Nomenklatur Im Jahr 1965 beschrieb Urist erstmals die Induktion von Knochenneubildung durch demineralisierte Knochenmatrix *in vivo*, die er und van de Putte in etwa 300 Experimenten nachweisen konnten. Bereits zuvor gab es Hinweise auf die Bildung von Knochengewebe, hervorgerufen durch heterogene, diffundierbare Faktoren [Goldhaber, 1961; Moss, 1960; Saxen & Taivonen, 1962]. Sechs Jahre nach Urist's Veröffentlichung konnten er und seine Mitarbeiter die Eigenschaft demineralisierter Knochenmatrix, endochondrale Osteogenese *de novo* zu induzieren, auf einen Glykoproteinkomplex zurückführen, den sie als *bone morphogenetic protein* (BMP) bezeichneten. In den folgenden Jahren gab es zahlreiche Versuche, den BMP-Komplex zu extrahieren und anzureichern [z.B.: Sampath & Reddi, 1981; Urist & Mikulski, 1979; Urist *et al.*, 1983]. Schließlich konnten — mehr als 20 Jahre nach Urist's Pionierarbeit — einzelne Proteinkomponenten des Komplexes isoliert werden [Hauschka *et al.*, 1986; Sampath *et al.*, 1987; Urist *et al.*, 1984]. 1988 wurden die ersten drei von ihnen charakterisiert, die für sie kodierenden Nucleotidsequenzen mittels einer humanen cDNA-Bank identifiziert und die Proteine als BMP-1, -2A und -3 bezeichnet [Wang *et al.*, 1988; Wozney *et al.*, 1988]. Inzwischen sind mehr als 30 BMP-ähnliche Proteine bekannt; sie stellen eine eigene Familie von Wachstumsfaktoren innerhalb der *transforming growth factor* (TGF-) β -Superfamilie dar. Zur BMP-Familie zählen die BMPs, die *osteogenic proteins* (OPs), die *cartilage-derived morphogenetic proteins* (CDMPs), die *growth and differentiation factors* (GDFs), BMP-Homologe aus *Drosophila*, wie *Decapentaplegic* (DPP), 60A (*glass bottom boat*, *gbb*) und *Screw*, und aus *Xenopus levis*, wie der *vegetalizing factor* 1 (Vg-1), sowie *Nodal* und *Lefty* [Ducy & Karsenty, 2000; Balemans & van Hul, 2002]. Die Nomenklatur der BMPs ist jedoch historisch bedingt uneinheitlich. Daher existieren für ein Protein oft mehrere Bezeichnungen (Tab. 1.1). Die Klassifizierung der BMPs ist aufgrund der Tatsache, daß sie *in vivo* sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden, zusätzlich komplex.

Tabelle 1.1: Humane BMPs: Aliasse und homologe Proteine. Daten aus *Horst Ibelgauft's COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia* (<http://www.copewithcytokines.de/>, Stand: 17.08.2004), „TGF- β Superfamily“ (*R&D Systems*, <http://www.rndsystems.com/>, PDF-Dokument: 25.02.2003, Download: 17.08.2004) und [Ducy & Karsenty \[2000\]](#).

BMP	Aliasse, (Homologe) [†]	# Aminosäurereste der reifen Monomere; Bemerkungen
BMP-2	BMP-2A, (DPP)	114; eine Subfamilie mit BMP-4
BMP-3	Osteogenin	110; Antiosteogen!
BMP-3B	GDF-10	110; Antiosteogen! (83 % Identität mit BMP-3)
BMP-4	BMP-2B, DVR-4, (DPP)	116; eine Subfamilie mit BMP-2
BMP-5	(60A)	138
BMP-6	DVR-6, Vgr-1, (60A)	139
BMP-7	OP-1, (60A)	139
BMP-8	BMP-8A, OP-2	139
BMP-8B	OP-3	139
BMP-9	GDF-2	110
BMP-10	–	108; Expression nur im embryonalen Herz
BMP-11	GDF-11	109
BMP-12	GDF-7, CDMP-3	104
BMP-13	GDF-6, CDMP-2	120
BMP-14	GDF-5, CDMP-1	120
BMP-15	GDF-9B, (GDF-9)	125; Gen in Säugern X-chromosomal lokalisiert; nur 6 Cysteine, Bildung von Homodimeren (und Heterodimeren mit dem Homologen GDF-9) ohne intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den Monomeren [Liao et al., 2003]
BMP-16	(<i>Nodal</i>)	110 [Celeste & Murray, 2001]
BMP-17	(<i>Lefty</i>)	224 [Celeste & Murray, 2002]
BMP-18	(<i>Lefty</i>)	231 [Celeste & Murray, 2002]

[†] 60A/*glass bottom boat* (gbb, *Drosophila*), CDMP = *cartilage-derived morphogenetic protein*, DPP = *Decapentaplegic* (*Drosophila*), DVR = *DPP-Vg-related*, GDF = *growth and differentiation factor*, *Lefty* (*Xenopus levis*), *Nodal* (*Xenopus levis*), TGF- β = *transforming growth factor* β , Vg-1 = *vegetalizing factor 1* (*Xenopus levis*), Vgr-1 = *Vg-1-related*

Biologische Funktionen von BMPs BMPs sind auto- und parakrin wirkende Cytokine und entwicklungsbiologisch von enormer Bedeutung. In *Drosophila* beeinflussen BMPs, wie DPP, Screw und 60A, beispielsweise die Imaginalscheibenentwicklung und die *dorsal/ventral*-Polarisierung im frühen Embryonalstadium [Raferty & Sutherland, 1999]. In Vertebraten steuern BMPs neben der Ausbildung der Körperachsen unter anderem die Differenzierung und das Wachstum von Organen und Gliedmaßen während der Embryonalentwicklung [Hogan, 1996]. BMP-Nullmutationen führen in den meisten Fällen zum Tod des Embryos beziehungsweise zu schweren Mißbildungen an Skelett, Gliedmaßen und inneren Organen [Ducy & Karsenty, 2000; Wozney, 2002; Zhang & Bradley, 1996]. Außerdem konnten für einzelne Zelllinien sowohl apoptoseinduzierende als auch -hemmende Wirkungen einiger BMPs gezeigt werden [Hay et al., 2001; Izumi et al., 2001; Song et al., 1998]. Nicht zuletzt sind die Mitglieder dieser Proteinfamilie im adulten Organismus am Knochenumbau und der Heilung von Schäden am Skelett beteiligt [Bostrom, 1998].

Ursprünglich sollte die Bezeichnung *bone morphogenetic protein* die Fähigkeit dieser Proteine, ektopisch¹ die endochondrale² Osteogenese zu induzieren, hervorheben. Doch gibt es diesbezüglich große Unterschiede innerhalb der BMP-Familie. Die durch BMPs hervorgerufenen Differenzierungsvorgänge, die schließlich zur Bildung von neuem Knochengewebe führen, lassen sich auch in Zellkultur verfolgen. Durch Verwendung unterschiedlich differenzierter Zelllinien, wie C3H10T1/2 (pluripotente mesenchymale Vorläuferzellen der Maus), C2C12 (nicht ausdifferenzierte Maus-Myoblasten) und TE-85 (Osteosarkomzellen), konnten Cheng et al. in einer vergleichenden Untersuchung zur Aktivität von 14 humanen BMPs (BMP-2 bis BMP-15) zeigen, daß BMP-2, -6 und -9 über das größte osteoinduktive Potential von den untersuchten BMPs verfügen, sowie in etwas geringerem Maße auch BMP-4 und -7 [Cheng et al., 2003]. BMP-2, -6 und -9 bewirkten als einzige auch die Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen zu Osteoblasten. Mit BMP-3 und -12 wiederum konnte selbst in der Osteosarkomzelllinie TE-85 keine alkalische Phosphatase, ein Reporterenzym für die Knochenneubildung, induziert werden. Neben der Aktivität alkalischer Phosphatase wurde in dieser Studie die differenzierende Wirkung der BMPs auch anhand der Osteocalcinsynthese und der extrazellulären Ablagerung von Calciummineralien (Matrixmineralisierung) bestimmt.

¹ ektopisch = nicht auf oder in der Nähe von bereits vorhandenen Knochen

² endochondrale Knochenbildung = nach vorheriger Bildung von Knorpelsubstanz stattfindende Umwandlung in Knochengewebe; im Unterschied zur intramembranen, ohne vorherige Knorpelbildung.

Eine besondere Stellung innerhalb der BMPs nehmen die Proteine BMP-3 (Osteogenin) und BMP-3B ein. Für beide wurde ein antiosteogener Effekt nachgewiesen; das heißt, sie können die osteoinduktive Wirkung anderer BMPs, wie BMP-2, inhibieren [Daluiski *et al.*, 2001; Bahamonde & Lyons, 2001; Cheng *et al.*, 2003]. Möglicherweise geschieht dies sogar durch verschiedene Mechanismen. Neben der Konkurrenz um Rezeptoren und *downstream*-Elemente der Signalkaskade wird auch die Bildung von Heterodimeren aus proBMP-3 und anderen, reifen BMPs als Ursache diskutiert [Hino *et al.*, 2003, 2004].

Anwendung und Herstellung von BMPs Die einzigartige Fähigkeit der BMPs, Osteogenese *de novo* zu induzieren, macht sie zu einer therapeutisch interessanten Wirkstoffklasse. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß sich BMPs insbesondere für die Behandlung schlecht heilender Frakturen eignen. Sie beschleunigten den Heilungsprozeß erheblich; die oft Monate dauernde Schließung von Lücken zwischen zwei Knochensegmenten war bei Einsatz von BMP-haltigen Trägermaterialien innerhalb weniger Wochen abgeschlossen [Teixeira & Urist, 1998; Wang, 1993]. In klinischen Studien wurden diese Befunde bestätigt, sodaß BMP-2 inzwischen für die Behandlung von Schienbeinfrakturen zugelassen ist (InductOs[®], Dibotermis alfa[®]). Allerdings führte der (noch nicht zugelassene) Einsatz von BMP-2 bei spinalen Fusionen³ mitunter zu schweren Nebenwirkungen [Pharmazeutische Zeitschrift Nr. 37/2004, 7. September 2004]. Neben der Behandlung von Frakturen und degenerativen Erkrankungen der Wirbelsäule werden seit einigen Jahren die Anwendungsmöglichkeiten von BMPs bei der Therapie von Osteoporose, sowie in der Kiefer- und Zahnmedizin intensiv erforscht [Hofbauer *et al.*, 1998; McKay & Sandhu, 2002; Miyazawa *et al.*, 1996; Siggelkow & Hufner, 1999]. Für die Studien am lebenden Organismus wird in den meisten Fällen auf ein Trägermaterial aufgetragenes, rekombinant hergestelltes BMP verwendet. Die Trägermaterialien werden in vier Gruppen unterteilt: anorganische Träger, wie Hydroxyapatit und Tricalciumphosphat, natürliche Polymere, wie Collagen oder Fibrin, synthetische Polymere, wie Poly(α -Hydroxysäuren), und Verbundmaterialien aus den anderen drei Gruppen [Seeherman *et al.*, 2002].

³ Operative Maßnahmen, die eine durch rheumatische Erkrankungen, Tumore, Spondylolythosis (Wirbelverschiebung) oder andere degenerative Prozesse geschädigte Wirbelsäule durch Verbindung einzelner Wirbelkörper stabilisieren, werden als spinale Fusionen bezeichnet.

Wie bei vielen therapeutisch interessanten Proteinen ist auch die Anwendbarkeit der BMPs aufgrund ihrer komplizierten beziehungsweise teuren Gewinnung limitiert. So ist die Isolierung von BMPs aus Knochensubstanz ein extrem aufwendiger Prozeß mit Ausbeuten von nur 1 µg Protein je Kilogramm Knochen und birgt zudem nicht unerhebliche medizinische Risiken [Wang *et al.*, 1988]. Daher setzte sich schnell die rekombinante Herstellung dieser Proteine mittels eukaryontischer Zellkulturen durch [Wang *et al.*, 1990; Israel *et al.*, 1992]. Inzwischen kommen auch verstärkt Herstellungsverfahren zum Einsatz, die auf der rekombinanter Genexpression in *Escherichia coli* und anschließender Renaturierung der BMPs aus *inclusion bodies* (IBs) basieren [Ruppert *et al.*, 1996; Vallejo *et al.*, 2002; Vallejo & Rinas, 2004]. Diese liefern weit höhere Ausbeuten als die auf Zellkulturen basierten Verfahren.

Biosynthese der BMPs BMPs werden in eukaryontischen Zellen als Präproteine synthetisiert. Der N-terminalen Signalsequenz schließt sich ein bis über 300 Aminosäuren langes, cysteinfreies Propeptid bislang unbekannter Funktion an, gefolgt von der circa 100 bis 140 Aminosäurereste enthaltenden Polypeptidkette des eigentlichen Cytokins. Eine Ausnahme bilden die *Lefty*-Homologen, wie BMP-17 und -18; die reifen Proteine sind hier bis über 230 Aminosäuren lang.

Nach dem signalsequenzvermittelten Transport des Proteins in das endoplasmatische Retikulum (ER) bilden die sechs hochkonservierten Cysteinreste im C-terminalen Abschnitt, also innerhalb des später freigesetzten reifen BMPs, drei Disulfidbrücken in Form eines sogenannten Cystin-Knotens aus (S. 6). In den meisten Fällen wird zudem eine weitere Disulfidbrücke, ebenfalls in der C-terminalen Region, zwischen zwei proBMP-Molekülen gebildet; gegenwärtig bekannte Ausnahmen sind BMP-15 und GDF-9, die nicht-kovalent dimerisieren [Liao *et al.*, 2003], sowie *Lefty* und GDF-3. Wie bereits erwähnt, besteht auch die Möglichkeit der Heterodimerisierung von BMPs, die eine Ebene der Regulation der BMP-Aktivität darstellt (S. 8). Im ER und im Golgi-Apparat werden die proBMPs sowohl im N-terminalen als auch im C-terminalen Bereich N-glycosyliert.

Der letzte Schritt bei der Reifung des BMPs ist die Abspaltung des Propeptids. Im Fall von proBMP-4 konnte bereits gezeigt werden, daß dieser Schritt während der Embryonalentwicklung von SPC1⁴ (Furin) beziehungsweise SPC6 katalysiert wird [Cui *et al.*, 1998]. Es ist anzunehmen, daß die anderen proBMPs ebenfalls von SPCs prozessiert werden. Diese Proteasen

⁴ SPCs = *subtilisin-like proprotein convertases* [Steiner *et al.*, 1992].

spalten relativ spezifisch nach einem dibasischen Sequenzmotiv (–Arg–X–Arg/Lys–Arg–). Nach Abschluß der posttranslationalen Modifizierung werden die reifen Proteine von der Zelle sezerniert. Allerdings findet die Prozessierung mitunter nicht statt oder ist unvollständig. Die Folge ist die Sezernierung der Proformen. Daß dieses Phänomen physiologisch relevant ist und nicht nur bei der rekombinanten Überexpression in Zellkultur auftritt, zeigen die Untersuchungen von [Lories *et al.*](#), bei denen in der Synovialflüssigkeit von an rheumatoider Arthritis leidenden Patienten ausschließlich die Proformen von BMP-2 und BMP-6 nachgewiesen werden konnten [[Lories *et al.*, 2003](#)]. Die Autoren vermuten hierbei eine Schutzfunktion durch Induktion von Apoptose. [Beck *et al.*](#) [2002] haben zudem gezeigt, daß proBMPs auch außerhalb der Zellen von SPCs prozessiert werden.

BMP-2-Struktur Wie bereits erwähnt, bilden die sechs innerhalb der BMP-Familie hochkonservierten Cysteinreste drei Disulfidbrücken in Form eines Cystin-Knotens aus. Der Cystin-Knoten ist eine topologisch komplexe Struktur, bei der zwei Disulfidbrücken zusammen mit dem Peptidrückgrat einen Ring formen, durch welchen sich eine dritte Disulfidbrücke erstreckt. Dieses Strukturmotiv ist charakteristisch für die TGF- β -Superfamilie, findet sich jedoch auch bei einer Vielzahl anderer Proteine, wie zum Beispiel den Neurotrophinen, *platelet-derived growth factor* (PDGF), sowie sehr kleinen Proteinen, wie den ω -Conotoxinen und einigen Protease-Inhibitoren [[Daopin *et al.*, 1992](#); [McDonald & Hendrickson, 1993](#); [Oefner *et al.*, 1992](#); [Pallaghy *et al.*, 1994](#); [Price-Carter *et al.*, 1996](#); [Wentzel *et al.*, 1999](#)]

Im Fall von BMP-2 wird der Cystin-Knoten durch die Disulfidbrücken Cys⁴³–Cys¹¹¹ und Cys⁴⁷–Cys¹¹³, den zwei Cystinen des Rings, sowie Cys¹⁴–Cys⁷⁹ gebildet. Zudem sind die antiparallel orientierten Untereinheiten des BMP-2-Dimers über eine Disulfidbrücke an Position 78 kovalent miteinander verknüpft (Abb. 1.1). BMP-2 verfügt über keinen hydrophoben Kern; stattdessen befinden sich zahlreiche hydrophobe Aminosäureseitenketten an der Proteinoberfläche [[Scheufler *et al.*, 1999](#)]. In der Kontaktregion zwischen den zwei Untereinheiten sind viele polare und geladene Seitenketten lokalisiert, woraus die gegenüber dem BMP-2-Monomer stärkere Hydrophobizität des nativen Dimers resultiert. Das charakteristische Sekundärstrukturmerkmal von BMP-2 sind stark verdrehte, antiparallele β -Faltblätter. Das Protein enthält außerdem eine α -Helix. Der flexible N-Terminus von BMP-2 vermittelt die Bindung des Proteins an Heparin [[Ruppert *et al.*, 1996](#)].

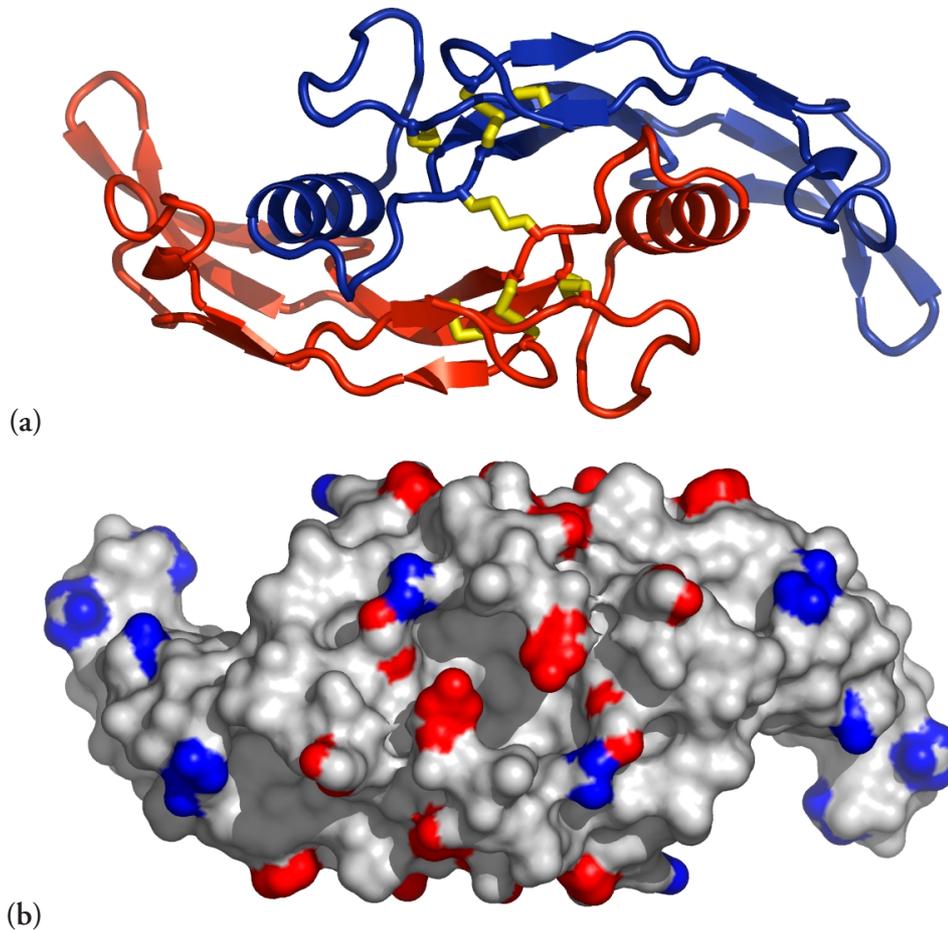


Abbildung 1.1: BMP-2-Dimer — Kristallstruktur [Scheufler *et al.*, 1999]. (a) *Cartoon*-Darstellung der Sekundärstrukturelemente der zwei Untereinheiten (rot und blau), sowie der Disulfidbrücken (gelb). Zum besseren Verständnis der Struktur ist in der Literatur der Vergleich eines BMP(-2)-Dimers mit zwei (linken, dreifingerigen) Händen gebräuchlich [Griffith *et al.*, 1996, BMP-7-Struktur]. Der Daumen einer Hand entspricht dem N-Terminus eines Monomers, der in dieser Abbildung zum Betrachter weist und in der Kristallstruktur nur teilweise aufgelöst ist. Die zwei anderen Finger weisen hier beide nach links bzw. rechts und entsprechen den antiparallelen, verdrehten β -Strängen von BMP-2. An den Enden dieser zwei Finger befinden sich die Rezeptorbindestellen des Moleküls, außen — an den Knöcheln — für die Typ II-Rezeptoren und innen für die Rezeptoren vom Typ I (Abb. 1.2). Die α -Helix eines BMP-2-Monomers wird dem Handballen gleichgesetzt. (b) VAN-DER-WAALS-Oberfläche des Moleküls. Carboxylgruppen in blau und Amino-/Guanidino-gruppen in rot.

Signaltransduktion und Regulation der BMP-Aktivität Die dimere BMP-Struktur führt mit je zwei Bindestellen für zwei verschiedene Rezeptortypen je Monomer zur Bildung heterooligomerer Rezeptorkomplexe. Die bekannten BMP-Rezeptoren gehören zur Klasse der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und werden in Typ I- und Typ II-Rezeptoren unterschieden [ten Dijke *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 1994]. Typ I-Rezeptoren binden an die Innenseite und Typ II-Rezeptoren an die Außenseite der „Finger(spitzen)“ eines BMP-Dimers (Abb. 1.1 u. 1.2). Man unterscheidet bislang vier Typ I-Rezeptoren (ALK-1, BMPRIA (ALK-3), BMPRII (ALK-6), ActR-IA (ALK-2)) und drei Typ II-Rezeptoren (BMPRII, ActR-II und ActR-IIB).⁵ Komplexe aus einem BMP-Liganden und jeweils einer extrazellulären Domäne (ECD) eines Typ I- beziehungsweise Typ II-Rezeptors konnten inzwischen kristallisiert und die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen durch Mutagenesestudien charakterisiert werden [Greenwald *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2004; Kirsch *et al.*, 2000a,b; Sebald & Mueller, 2003]. In Abbildung 1.2 ist ein BMP-7-Dimer im Komplex mit den extrazellulären Domänen von BMPRII und ActR-II dargestellt [Sebald & Mueller, 2003].

Welche der möglichen Signalkaskaden durch ein BMP-Molekül ausgelöst wird, ist abhängig davon, ob es an einen vorgeformten Rezeptorkomplex bindet oder ob die Rezeptoroligomerisierung erst durch die Ligandenbindung ausgelöst wird. Die Bindung an bereits vorhandene Typ-I-II-Rezeptorkomplexe aktiviert intrazellulär den Smad-Signalweg⁶, während die BMP-induzierte Dimerisierung von zwei Typ I-Rezeptoren und die darauf folgende Rekrutierung von Typ II-Rezeptoren in diesen Komplex den p38/MAPK⁷-Signalweg auslöst [Gilboa *et al.*, 2000; Nohe *et al.*, 2002]. Der p38-Weg bewirkt die Induktion alkalischer Phosphatase, dem Reporterenzym für die Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten. Die dritte Variante der BMP-Rezeptor-Komplexbildung führt über die Bindung des Liganden an zwei hochaffine Typ II-Rezeptoren und die nachfolgende Assoziation mit zwei niedrigaffinen Typ I-Rezeptoren zur Aktivierung des Smad-Signalwegs [Greenwald *et al.*, 2003; Sebald & Mueller, 2003].

Die Heterooligomerisierung der BMP-Rezeptoren ist essentiell für die Auslösung einer Signalkaskade in der Zielzelle. Im BMP-Rezeptor(I/II)-Komplex aktiviert die intrazelluläre Kinasedomäne eines Typ II-Rezeptors einen Typ I-Rezeptor durch Phosphorylierung dessen

⁵ BMPRII = BMP-Rezeptor; ActR = Activin-Rezeptor; ALK = *activin receptor-like kinase*. BMPRII/IA/B und II sind spezifisch für BMPs, während ActR-IA und ActR-II(B) auch die Signaltransduktion von Activinen vermitteln. Activine sind TGF- β -Proteine, die die Freisetzung des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) aus der Hypophyse bewirken.

⁶ Smad = *smad + mothers against DPP* [Savage *et al.*, 1996; Sekelsky *et al.*, 1995]

⁷ MAPK = *mitogen activated protein kinase*

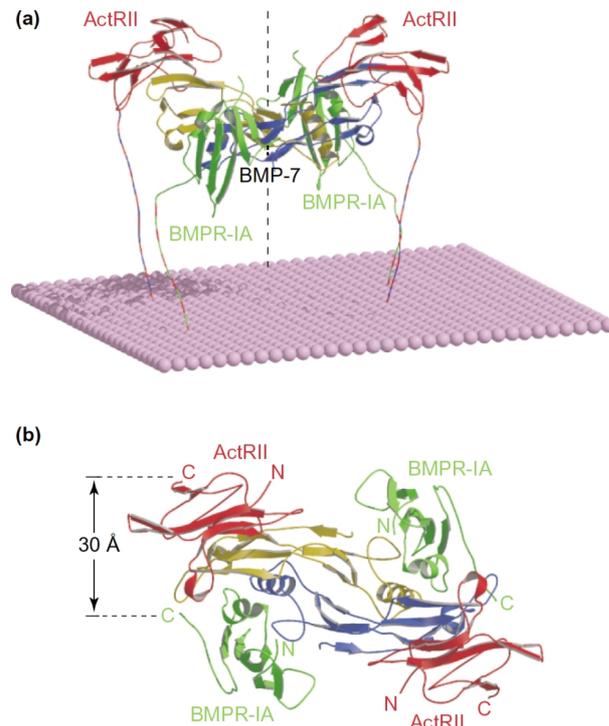


Abbildung 1.2: BMP-7-Dimer (blau und gelb) im Komplex mit BMPR-IA (ECD, grün) und ActR-II (ECD, rot). (a) Die zweizählige Symmetrieachse ist mit einer unterbrochenen Linie senkrecht zur Cytoplasmamembran dargestellt. (b) Der Komplex mit Blick auf die von der Zelle abgewandten Seite. Es wird deutlich, daß die extrazellulären Domänen der zwei Rezeptortypen nicht miteinander in Kontakt stehen. Abbildung aus [Sebald & Mueller \[2003\]](#) (Überlagerung von zwei Kristallstrukturen [[Greenwald *et al.*, 2003](#); [Kirsch *et al.*, 2000b](#)]).

Glycin-Serin-reicher (GS-)Domäne. Der aktivierte Typ I-Rezeptor wiederum phosphoryliert die initialen *downstream*-Elemente der entsprechenden Signalwege [[Wrana *et al.*, 1994](#)]. Ausführliche Übersichtsartikel zu diesen Themen stammen von [Balemans & van Hul \[2002\]](#), von [Bubnoff & Cho \[2001\]](#), [Canalis *et al.* \[2003\]](#) und [Chen *et al.* \[2004\]](#).

Die komplexe Regulation der BMP-Aktivität spielt vor allem während der Embryonalentwicklung eine große Rolle, da hier die Ausbildung von definierten Gradienten der beteiligten Morphogene entscheidend für die richtige Polarisierung des Embryos ist [[Eldar *et al.*, 2002](#)]. In jüngster Zeit wurden daher vor allem die regulatorischen Elemente im extrazellulären Raum intensiv erforscht. Dazu zählen lösliche BMP-Inhibitoren (Noggin, Chordin/Sog, Chordin-ähnliche, Follistatin, DAN/Cerberus, Sclerostin), Coinhibitoren (Tsg), die Inhibitoren spaltenden Proteasen (BMP-1/Tolloid/Xolloid), membranständige Pseudorezeptoren (BAMBI) und spezielle Proteoglycane (Biglycan) [[Marqués *et al.*, 1997](#); [Oelgeschläger *et al.*, 2000](#); [Onichtchouk *et al.*, 1999](#); [Scott *et al.*, 2000](#)].⁸

Das aufgrund fehlender Homologie nicht mehr zur BMP-Familie zählende BMP-1 nimmt dabei gleich mehrfach indirekten Einfluß auf die endochondrale Ossifikation. Es ist nicht nur

⁸ Sog = *Drosophila short gastrulation*, DAN = *differential screening-selected gene aberrant in neuroblastoma*, Tsg = *twisted gastrulation*, BAMBI = *BMP and activin membrane-bound inhibitor*

in der Lage, die BMP/DPP-Antagonisten Chordin und Sog zu inaktivieren, sondern bewirkt auch die Reifung von Collagen und Biglycan, einem Proteoglycan mit positiv-regulatorischem Einfluß auf die Knochenbildung [Kessler *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Marqués *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 2000]. Die Rolle von Mucopolysacchariden und Proteoglycanen im „Netzwerk“ der BMP-Effektoren wird erst seit kurzem genauer untersucht [Fujise *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2000]. Weitere Regulationsmechanismen sind die Bildung von BMP-Heterodimeren und, im Cytosol, die Bindung von inhibitorischen und Co-Smads an die von den BMP-Rezeptoren aktivierten Smads [Liao *et al.*, 2003; Savage *et al.*, 1996; Sekelsky *et al.*, 1995]

Im Zusammenhang mit der Regulation der BMP-Aktivität ist auch die Prozessierung der proBMPs besonders interessant, da das extrazelluläre Vorkommen der Proformen die Frage aufwirft, inwieweit die nachfolgenden Elemente bis hin zur Rezeptorbindung und -oligomerisierung davon beeinflusst werden. Zugleich ist diese Ebene der Regulation der BMP-Aktivität bislang nur wenig verstanden und erforscht.

I.2 PROPEPTIDE UND PROPROTEINE

Obwohl nach Anfinsen [1973] die Tertiärstruktur einer Polypeptidkette durch ihre Aminosäuresequenz determiniert ist, sind an den Faltungsprozessen *in vivo* oft weitere Proteine beteiligt. Dazu zählen Proteindisulfidisomerasen (PDI, DsbA/C, DsbB/D), Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (Cyclophiline, FKBP, Parvuline), sowie molekulare Chaperone [Übersichtsartikel: Beissinger & Buchner, 1998; Fischer *et al.*, 1998; Freedman *et al.*, 1994; Gothel & Marahiel, 1999; Creighton, 1991; Schwarz *et al.*, 1996]. Aber auch bei der *in vitro*-Faltung läßt sich durch Einsatz nicht-stöchiometrischer Mengen dieser „Faltungshelfer“ die Ausbeute an nativem Protein erhöhen.

Bei vielen Proteinen ist die *in vivo*-Faltung abhängig von ihrem Propeptid, einem Abschnitt der Polypeptidkette, der nach der Biosynthese und Faltung durch Proteasen abgespalten wird. Werden diese Proteine ohne ihr Propeptid synthetisiert, sind sie nicht in der Lage, in ihre native Konformation zu falten. Mitunter genügt aber die Synthese der Propeptide in *trans*, also als separates Polypeptid, um die Faltung der betreffenden Proteine zu bewirken. Diese Propeptide werden auch als *intramolekulare chaperones* (IMCs) bezeichnet [Inouye, 1991]. Sie unterscheiden sich von den oben genannten molekularen Chaperonen durch eine extrem

hohe Substratspezifität. Zwar handelt es sich bei IMCs um echte Katalysatoren, da sie die Aktivierungsenergie für die Faltung durch Interaktion mit der reifen Polypeptidkette verringern [Eder *et al.*, 1993]. Allerdings sind sie in der Regel nur in äquimolaren Mengen wirksam, da sie nach abgeschlossener Faltung mit dem reifen Protein nicht-kovalent verbunden bleiben. Diese Art der propeptidabhängigen Proteinfaltung wurde erstmals für Subtilisin E gezeigt und später bei einer Vielzahl weiterer Proteasen beobachtet [Ikemura *et al.*, 1987; Silen & Agard, 1989; Winther & Sørensen, 1991]. Die Propeptide fungieren in den meisten Fällen auch als hochaffine Inhibitoren der jeweiligen Protease [Baker *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1991]. Ein anderer Mechanismus der propeptidvermittelten Proteinfaltung findet sich beispielsweise beim *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI). Hier bildet das sehr kurze N-terminale Propeptid während der Faltung Disulfidintermediate mit dem reifen Protein [Creighton *et al.*, 1993].

Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit untersuchten BMP-2-Varianten sind vor allem Funktionen interessant, die bislang schon für Propeptide von Cystin-Knoten-Proteinen gezeigt werden konnten. Im Fall von β *nerve growth factor* (β -NGF) konnte die bereits erwähnte Katalyse der *in vitro*-Faltung des Proteins durch das Propeptid nachgewiesen werden [Rattenholl, 2001; Rattenholl *et al.*, 2001a,b]. Allerdings gibt es für proNGF auch einen Rezeptor, der eine andere Signalkaskade auslöst, als die Rezeptoren für NGF [Lee *et al.*, 2001; Nykjaer *et al.*, 2004].

Das Propeptid des *macrophage-inhibitory cytokine* (MIC-)1, einem Mitglied der TGF- β -Familie, fungiert als eine Art Qualitätskontrolle für die korrekte Faltung des reifen Cytokins. Falsch gefaltete Formen werden durch den N-Terminus des Propeptids dem Abbau in Proteasomen zugeführt [Bauskin *et al.*, 2000].

Für TGF- β 1 konnte gezeigt werden, daß das Protein nur bei Expression der Proform beziehungsweise bei Coexpression von Propeptid und reifem Protein von eukaryontischen Zellen sezerniert wird [Gray & Mason, 1990]. Diese Untersuchungen erlauben aber keine Rückschlüsse auf die Faltung des Proteins. Bislang liegen auch noch keine Daten zur *in vitro*-Faltung von proTGF- β 1 vor. Das reife Protein konnte jedoch — im Unterschied zu β -NGF — mit hohen Ausbeuten *in vitro* renaturiert werden [Cerletti *et al.*, 1997]. Daher läßt sich spekulieren, daß in diesem Fall die Rolle des Propeptids bei der Biosynthese des reifen Proteins eher in der Steuerung der posttranslationalen Modifizierung und Sekretion besteht. Dafür sprechen auch die Untersuchungen von Sha *et al.* [1991] zu funktionellen Domänen innerhalb des TGF- β 1-

Propeptids; Deletions- und Insertionsmutanten des Propeptids hatten, abhängig davon, ob sie in *cis* beziehungsweise *trans* mit dem reifen Cytokin exprimiert wurden, unterschiedliche Effekte auf die Maturation und Sekretion von TGF- β 1. Die Untersuchungen von Brunner *et al.* [1989] lassen aber vermuten, daß zumindest die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen zwei TGF- β 1-Propeptiden einen Einfluß auf die kovalente Dimerisierung des reifen TGF- β 1 haben könnte.

Neben ihren noch nicht aufgeklärten Aufgaben bei der Biosynthese fungieren die kovalent dimerisierten Propeptide von TGF- β 1, -2 und -3 auch als Inhibitoren der reifen Proteine. Die dimeren Propeptide werden daher auch *latency-associated peptides* (LAPs) bezeichnet [Bownewald *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1992]. Latenter TGF- β besteht aus einem TGF- β - und einem LAP-Dimer und kann durch proteolytische Spaltung oder pH-induzierte Dissoziation des LAPs aktiviert werden [Lawrence *et al.*, 1985; Lyons *et al.*, 1990]. Die Wechselwirkungen zwischen dem LAP und TGF- β sind bislang völlig unzureichend charakterisiert worden. Die einzigen in der Literatur verfügbaren spektroskopischen Daten sind Fern-UV-CD-Spektren von TGF- β 1, β 1-LAP und dem Komplex beider Proteine [McMahon *et al.*, 1996]. Diese Daten sprechen für Wechselwirkungen zwischen TGF- β 1 und dem β 1-LAP, die mit Änderungen der Sekundärstruktur in einem oder in beiden Proteinen verbunden sind. Spektroskopische Analysen zu Proproteinen der TGF- β -Familie wurden bislang jedoch nicht veröffentlicht.

Im Unterschied zu den TGF- β -LAPs ist die biologische Bedeutung der BMP-Propeptide bislang nur wenig erforscht. Zwar werden reife BMPs nur nach Expression im Kontext mit einem Propeptid von eukaryontischen Zellen sezerniert, gegen einen unmittelbaren, spezifischen Effekt der Propeptide auf die Faltung der BMPs spricht allerdings die erfolgreiche *in vitro*-Renaturierung von Mitgliedern dieser Proteinfamilie in ihrer reifen Form, wie BMP-2 und DPP [Ruppert *et al.*, 1996; Groppe *et al.*, 1998; Vallejo *et al.*, 2002; Vallejo & Rinas, 2004]. Auch die *in vivo*-Untersuchungen zum Einfluß der Propeptide auf die biologische Aktivität der verschiedenen BMPs lassen an einer IMC-Funktion zweifeln. Hierbei konnten zahlreiche Fusionen von Propeptiden mit nur entfernt verwandten reifen BMPs unter Sezernierung der biologisch aktiven Cytokine erfolgreich exprimiert werden [z.B.: Constam & Robertson, 1999; Dale *et al.*, 1993; Kessler & Melton, 1995; Thomsen & Melton, 1993]. Für proBMP-4 konnten Cui *et al.* [2001] zeigen, daß nach der Spaltung der primären Erkennungssequenz, unmittelbar N-terminal von reifem BMP-4, die Spaltung an einer zweiten, 35 Aminosäuren oberhalb befindlichen Stelle erfolgen muß, damit reifes BMP-4 von den Zellen

sezerniert wird. Die Autoren vermuten, daß das Propeptid mit dem reifen Wachstumsfaktor verbunden bleibt, bis diese zweite Spaltung erfolgt ist. Diese Ergebnisse lassen auf einen Einfluß der BMP-Propeptide auf die posttranslationale Modifizierung, Sekretion, Diffusion und Aktivierung beziehungsweise den *turnover* der BMPs schließen. Im Unterschied zu den LAPs der TGF- β s enthalten die BMP-Propeptide jedoch keine Cysteinreste. Mögliche Interaktionen untereinander und mit reifen BMPs bis hin zu einer LAP-ähnlichen Funktion könnten also grundsätzlich anderer Natur als im Fall von TGF- β sein.

1.3 ZIELE DER ARBEIT

Wie in den vorangehenden Abschnitten deutlich wurde, besteht durchaus die Notwendigkeit, die Proformen und Propeptide der BMPs näher zu charakterisieren, da sie sehr wahrscheinlich eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Biosynthese und Aktivität der Knochenwachstumsfaktoren spielen. Für die funktionelle und strukturelle Analyse werden homogene Präparationen von proBMPs beziehungsweise den BMP-Propeptiden benötigt. Bislang existieren aber keine Herstellungsverfahren, mit denen sich die erforderlichen Proteinmengen bereitstellen lassen.

BMP-2 ist das bislang am besten untersuchte Mitglied dieser Proteinfamilie. Zudem zählt es zu den wirksamsten Induktoren endochondraler Knochenneubildung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die Proform und das Propeptid von BMP-2 untersucht werden. In Abbildung 1.3 ist die Sequenz von proBMP-2 und der Aufbau des Proteins schematisch dargestellt.

Die erste Aufgabe bestand darin, die für proBMP-2 und das Propeptid codierenden cDNAs rekombinant in *E. coli* zu exprimieren. Danach sollten effiziente Renaturierungs- und Reinigungsverfahren für die bei der Expression in Form von *inclusion bodies* erhaltenen Proteine etabliert werden. Parallel dazu war reifes BMP-2 unter den selben Bedingungen wie proBMP-2 zu renaturieren, um die Frage zu beantworten, inwieweit das Propeptid die Faltung von BMP-2 *in vitro* beeinflusst.

Die Arbeiten von [Constam & Robertson \[1999\]](#) und [Cui et al. \[2001\]](#) sprechen stark für einen Einfluß der Propetide auf die BMP-Aktivität. Daher mußte eine Methode zur proteolytischen Freisetzung von BMP-2 aus der Proform entwickelt werden, um dessen Aktivität mit der von renaturiertem, reifem BMP-2 vergleichen zu können.

-284	MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MGAAGLVPEL	GRRKFAAASS	GRPSSQPSDE	VLSEFELRL	-225
-224	SMFGLKQRPT	PSRDAVPPY	MLDLYRRHSG	QPGSPAPDHR	LERAASRANT	VRSFHHEESL	-165
-164	EELPETS ^u GKT	TRRFFFLSS	IPTEEFITSA	ELQVFREQMQ	DALGNNSSFH	HRINIYEIIK	-105
-104	PATANSKFPV	TRLLDTRLVN	QNASRWESFD	VTPAVMRWTA	QGHANHGFVV	EVAHLEEKQG	-45
-44	VSKRHVRISR	SLHQDEHSWS	QIRPLLVTFG	HDGKGHPLHK	REKRQAKHKQ	RKRLKSSCKR	16
17	HPLYVDFSDV	GWNDWIVAPP	GYHAFYCHGE	CPFPLADHLN	STNHAIVQTL	VNSVNSKIPK	76
77	ACCVPELSA	ISMLYLDENE	KVVLKQNYQDM	VVEGCGCR			114

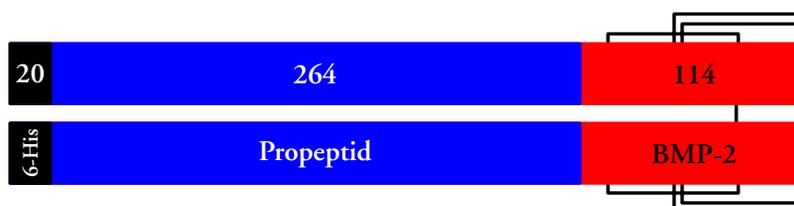


Abbildung 1.3: Aminosäuresequenz und schematische Darstellung des in dieser Arbeit untersuchten proBMP-2 (blau + rot) mit N-terminalem His-*Tag* (schwarz). Die Numerierung der Aminosäurereste erfolgt jeweils relativ zur Spaltstelle zwischen Propeptid (blau) und reifem BMP-2 (rot), den zwei anderen hier untersuchten BMP-Varianten. Die Prolinreste des Proteins sind unterstrichen. In der schematischen Darstellung ist die Disulfidverbrückung des nativen, dimeren Proteins durch die schwarzen Linien gekennzeichnet; die Zahlen entsprechen den Aminosäureresten in den drei Sequenzabschnitten.

Anschließend sollten proBMP-2, BMP-2 und das Propeptid mittels spektroskopischer Methoden miteinander verglichen werden. Ziel war es, Unterschiede in Struktur und Stabilität zwischen Propeptid beziehungsweise BMP-2 in isolierter Form und als Bestandteil von proBMP-2 aufzudecken. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten zu einem besseren Verständnis der Interaktion zwischen BMPs und ihren Propeptiden, sowie möglicher Funktionen der proBMPs und Propeptide beitragen.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Proteine

Tabelle 2.1: Chemikalien (Reinheit mindestens p.a., falls nicht angegeben)

Chemikalie	Hersteller
Aceton	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Acetonitril, ROTISOLV®	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Agar Agar, für die Mikrobiologie	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Agarose, für die Molekularbiologie	<i>MP Biomedicals† (Eschwege)</i>
Ammoniumchlorid	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Ammoniumperoxodisulfat	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Ampicillin, für die Mikrobiologie	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
L-Arginin / L-Arginin-HCl, 98,5 %	<i>Ajinomoto (Tokyo, Japan)</i>
Borsäure	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Coomassie Brilliant Blue R250	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Dimethylsulfid (DMS)	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Dithiothreitol, Electrophoresis Grade	<i>MP Biomedicals† (Eschwege)</i>
EDTA, TITRIPLEX®, p.a.	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Essigsäure, 96 %, p.a.	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Essigsäure, 99–100 %, p.a. (Eisessig)	<i>Mallinckrodt Baker (Deventer, Holland)</i>
Ethanol, ROTISOLV®	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Ethidiumbromid, 1 % wässrige Lösung	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Formaldehyd, 37 %	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Glucose, DAB Qualität	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Glutathion, oxidiert (GSSG)	<i>Roche Diagnostics (Penzberg)</i>
Glutathion, reduziert (GSH)	<i>MP Biomedicals† (Eschwege)</i>
Glycerin, wasserfrei	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Glycerin, 85 %	<i>Merck (Darmstadt)</i>

Tabelle 2.1: Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Hersteller
Glycin	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Guanidiniumchlorid, C-Grade	<i>Nigu Chemie (Waldkraiburg)</i>
Harnstoff	<i>MP Biomedicals[†] (Eschwege)</i>
Harnstoff, Ultra (99,5 %)	<i>Fluka-Chemica (Neu-Ulm)</i>
Hefeextrakt, OHLY KAV	<i>Deutsche Hefewerke (Hamburg)</i>
Hefeextrakt, für die Mikrobiologie	<i>DIFCO (Detroit, USA)</i>
HEPES, Biotechnology Grade	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
HEPES, SigmaUltra	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Heptafluorobuttersäure	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
IPTG	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Jodacetamid	<i>MP Biomedicals[†] (Eschwege)</i>
Kaliumchlorid	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Kalium- <i>di</i> -hydrogenphosphat	<i>Merck (Darmstadt)</i>
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Kaliumhydroxid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Kalziumchlorid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Kanamycin, für die Mikrobiologie	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Kupfer-(II)-chlorid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Magnesiumchlorid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Magnesiumsulfat	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
MES, Pufferqualität	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Methanol, ROTISOLV [®]	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
MOPS, Pufferqualität	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Natriumazid	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Natriumcarbonat, wasserfrei	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Natriumchlorid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Natriumdesoxycholat	<i>Berlin-Chemie (Berlin)</i>
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Natrium- <i>di</i> -hydrogenphosphat	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Natriumthiosulfat-5H ₂ O	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Phenol	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
o-Phosphorsäure, 85 %, p.a.	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
PLURIOL [®] P2000 (PPG, 50 %)	<i>BASF (Ludwigshafen)</i>
Polyethylenglykol 400, 4000 & 35000	<i>Fluka-Chemica (Neu-Ulm)</i>
2-Propanol, ROTISOLV [®]	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>

Tabelle 2.1: Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Hersteller
Salzsäure, 25 % & 32 %	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
SDS	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Silbernitrat	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
TEMED	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Thiamin	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Trichloressigsäure	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Trifluoressigsäure, zur (Peptid-)Synthese	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Tris, Ultra Pure	<i>MP Biomedicals[†] (Eschwege)</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Trypton-Pepton	<i>DIFCO (Detroit, USA)</i>
Tween 20	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Zitronensäure	<i>Merck (Darmstadt)</i>

[†] MP Biomedicals ehem. ICN Biomedicals

Tabelle 2.2: Enzyme & Proteine

Enzym/Protein	Hersteller
<i>Bam</i> HI, Puffer B	<i>Roche Diagnostics (Penzberg)</i>
Benzonase	<i>Merck (Darmstadt)</i>
DNase I	<i>Roche Diagnostics (Penzberg)</i>
Lysozym, aus Hühnerei	<i>Roche Diagnostics (Penzberg)</i>
<i>Nde</i> I, Puffer B	<i>Roche Diagnostics (Penzberg)</i>
BSA, pH 5,2 Fraktion	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
RNase, aus Rinderpankreas	<i>Roche Diagnostics (Penzberg)</i>
Thrombin	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Trypsin, aus Rinderpankreas	<i>Roche Diagnostics (Penzberg)</i>
Trypsin-Inhibitor, aus Sojabohnen	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>

2.1.2 Lösungen, Medien, Puffer

Molekularbiologie

DNA-Probenpuffer (5×): 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM EDTA, 30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

DNA-Sequencer-Gel: 30 ml Sequagel XR (*Biozym, Hess. Oldendorf*) Komplett-Puffer + 7,5 ml Sequagel XR Acrylamidlösung + 400 µl DMSO + 300 µl APS (10 % (w/v))

TAE-Puffer (50×): 2 M Tris (Base), 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA (pH 8,5)

TBE-Puffer (10×): 890 mM Tris (Base), 890 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA (pH 8,3)

Mikrobiologie

Mit † markierte Lösungen wurden 60 min bei 121 °C autoklaviert. Lösungen, die sterilfiltriert wurden, sind mit ‡ markiert. Die Zugabe von nicht autoklavierten Lösungen zu autoklavierten erfolgte erst nach deren Abkühlung unter 55 °C.

Antibiotika-Stammlösungen: 100 mg/ml Ampicillin, 50 mg/ml Kanamycin†

LB-Medium (modifiziert): 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 375 µl/l 10 M NaOH† ± 0,1 % (v/v) Antibiotika-Stammlösung‡

LB-Agarplatten: 1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Medium† ± 0,1 % (v/v) Antibiotika-Stammlösung‡

SOB-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl†

SOC-Medium: SOB-Medium† + 1 % (v/v) Magnesium-Stammlösung (1 M MgSO₄, 1 M MgCl₂)‡ + 1 % (v/v) 40 % (w/v) Glucose‡

2YT-Medium: 17 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 375 µl/l 10 M NaOH† + 0,1 % (v/v) Antibiotika-Stammlösung‡

Lösungen für die Fermentation:

- | | | |
|-----------|---------------------------------------|--|
| • 2×10 ml | 10 % (w/v) Ampicillin† | <ul style="list-style-type: none"> • 2×1,5 l <i>Feeding</i>-Lösung†: 30 % (w/v) OHLY KAV 25 % (v/v) Glycerin • Hauptmedium (für 7 l)†: – 350 g OHLY KAV – 77 g Glycerin – 3,5 g NH₄Cl H₂O ad 6 l |
| • 1×10 ml | 5 % (w/v) Kanamycin† | |
| • 1×10 ml | 8 % (w/v) Thiamin† | |
| • 1×10 ml | 1 M IPTG‡ | |
| • 0,5 l | PLURIOL® P2000† | |
| • 0,5 l | 1 M K ₂ HPO ₄ † | |
| • 0,5 l | 1 M MgSO ₄ † | |
| • 0,5 l | 25 % (v/v) o-Phosphorsäure | |
| • 0,5 l | 10 % (w/v) KOH | |

OHLY KAV ist eine durch Autolyse gewonnene Hefeextraktpaste.

IB-Isolierung, IB-Solubilisierung & Proteinrenaturierung

Zellaufschlußpuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0, 1 mM EDTA

IB-Tritonpuffer: 60 mM EDTA, 6 % (v/v) Triton X-100, 1,5 M NaCl

IB-Waschpuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0, 20 mM EDTA

IB-Solubilisierungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, 6 M GdmCl, 5 mM EDTA, 200 mM DTT

IB-Dialysepuffer: 5 M GdmCl, 10 mM Essigsäure

Renaturierungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 1,0 M L-Arginin-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH

Renaturierung durch Dialyse:

- Solubilisierungspuffer: 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 6 M Harnstoff, 5 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 20 mM DTT
- Additivpuffer: 2,0 M L-Arginin-HCl, 2,0 M Tris/HCl, pH 8,0
- Dialysepuffer 1: 1,0 M Tris/HCl, pH 8,0
- Dialysepuffer 2: 25 mM K-HEPES, pH 7,0

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteinprobenpuffer: 12,5 % (v/v) SDS-PAGE-Sammelpuffer, 2,5 % (w/v) SDS, 4 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau ± 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

Laufpuffer (10×): 250 mM Tris/HCl, pH 8,3, 1 % (w/v) SDS, 1,87 M Glycin

Sammelpuffer (4×): 500 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer (4×): 3 M Tris/HCl, pH 8,85, 0,4 % (w/v) SDS

Trenngel (12 %): 6 ml AA/BAA (29:1) + 3,75 ml Trenngelpuffer + 5,25 ml H₂O + 50 µl TEMED + 120 µl APS (10 % (w/v)); 130×80×1 mm

Trenngel (14 %): 7 ml AA/BAA (29:1) + 3,75 ml Trenngelpuffer + 4,25 ml H₂O + 50 µl TEMED + 120 µl APS (10 % (w/v)); 130×80×1 mm

Sammegel (6 %): 1 ml AA/BAA (29:1) + 1,25 ml Sammelgelpuffer + 2,75 ml H₂O + 40 µl TEMED + 80 µl APS (10 % (w/v)); 130×30×1 mm

Färbelösung: 40 % EtOH od. MeOH, 10 % Essigsäure, 1 g/l Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärber: 40 % EtOH, 10 % Essigsäure

Trocknungslösung: 40 % EtOH, 5 % Glycerin

Western Blot Puffer: 50 mM H₃BO₃/NaOH, pH 9,0, 20 % (v/v) MeOH

Lösungen für die Silberfärbung nach [Nesterenko et al. \[1995\]](#):

- 1 % Essigsäure
- 50 % (v/v) Aceton
- 37 % (w/v) HCHO
- 50 % (w/v) TCA
- 10 % (w/v) Na₂S₂O₃·5H₂O
- 20 % (w/v) AgNO₃

Chromatographie — Laufmittel & Puffer

Der pH der Puffer wurde bei 20 °C eingestellt. Die Puffer wurden, mit Ausnahme der RP-Laufmittel, filtriert und entgast.

Immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie

Puffer A: 20 mM KH₂PO₄, pH 7,5, 4 M GdmCl

Puffer B: 20 mM KH₂PO₄, pH 6,3, 4 M GdmCl

Puffer C: 20 mM KH₂PO₄, pH 4,5, 4 M GdmCl

Reversed Phase-High Performace Liquid Chromatography

Laufmittel A: H₂O

Laufmittel B: ACN oder 2-Propanol

mit jeweils 0,05–0,5 % TFA oder HFBA

Heparin Affinitätschromatographie

Dialysepuffer: 0,1 M Tris, 75 mM Essigsäure, 0,2 M KH_2PO_4 , 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff

Puffer A: 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff

Puffer B: 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff, 1 M NaCl

Hydroxyapatit Chromatographie

Puffer A: 0,1 M K-HEPES, pH 7,0

Puffer B: 0,1 M K-HEPES, pH 7,0, 1 M KH_2PO_4

Hydrophobe Chromatographie

Puffer A: 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0

Puffer B: 50 mM Na-Acetat, pH 5,0

Puffer C: 50 mM Na-Acetat, pH 5,0, 4 M Harnstoff

Puffer D: 50 mM Na-Acetat, pH 5,0, 1 M L-Arg-HCl

Puffer E: 0,2 M Essigsäure, 6 M GdmCl

Gelpermeationschromatographie

Puffer: 0,1 M K-HEPES, pH 7,0, 350 mM KH_2PO_4

2.1.3 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR- und Sequenzierprimer wurden von *MWG Biotech (Ebersberg)* in HPSF™-Qualität¹ hergestellt. Die Primer für die Amplifikation von *bmp-2* und *bmp-2-propeptide* mittels PCR (Abschnitt 2.2.1.3) sind im folgenden in 5'→3'-Richtung aufgeführt. Zum besseren Verständnis sind außerdem die komplementären DNA-Stränge, 3'→5', und die sich daraus ableitenden Aminosäuresequenzen angegeben. Die Primer für die DNA-Sequenzierung waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 5'-markiert.

bmp-2-propeptide-5'-PCR-Primer

Met Gly Ala Ala Gly Leu Val →

5'-CG GAA TTC CA↓T A TG GGT GCG GCT GGC CTC GTT CC-3'

3'-GC CTT AAG GT A T↑AC CCA CGC CGA CCG GAG CAA GG-5'

NdeI

bmp-2-propeptide-3'-PCR-Primer

BamHI

5'-C G↓GA TC C TTA ACG TTT TTC TCT TTT GTG G-3'

3'-G C CT AG↑G AAT TGC AAA AAG AGA AAA CAC C-5'

Stp Arg Lys Glu Arg Lys His ←

¹ *High Purity Salt Free*

bmp-2-5'-PCR-Primer

Met Gln Ala Lys His Lys Gln →

5'-CG GAA TTC CA↓T A TG CAA GCC AAA CAC AAA CAG CG-3'

3'-GC CTT AAG GT A T↑AC GTT CGG TTT GTG TTT GTC GC-5'

NdeI

bmp-2-3'-PCR-Primer

BamHI

5'-CC G↓GA TC C TTA CTA GCG ACA CCC ACA ACC-3'

3'-GG C CT AG↑G AAT GAT CGC TGT GGG TGT TGG-5'

Stp Stp Arg Cys Gly Cys Gly←

5'-Sequenzierprimer (T7-Promotor, p TLT7 nach [Lisse \[2001\]](#))

5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'

3'-Sequenzierprimer (T7-Terminator, t T7 nach [Schäffner \[2000\]](#))

5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'

2.1.4 Plasmide

Matrizen-DNA pcDNA3-*preprobmp-2* (*Invitrogen, Carlsbad, USA / Roche Diagnostics, Penzberg*; Abbildung 2.1): *amp^r*, *neo^r* (pSV40/pA), *preprobmp-2* (cDNA, *EcoRI XbaI*), pT7, pSp6, pCMV, BGHpA, SV40 ori, ColE1 ori, fl ori

Klonierungsvektoren pET-11a, pET-15b (*Novagen, Bad Soden*): ColE1 ori, pT7/*lac*, *amp^r*, *lacI* — pET-15b unterscheidet sich von pET-11a durch einen zusätzlichen, 60 bp langen Bereich zwischen T7-Promotor und multipler Klonierungsregion, der für einen Hexa-Histidin-Tag (His-Tag[®]) und eine Thrombinspaltstelle codiert.

pET-15-*probmp-2* (Abbildung 2.1 [[Hillger, 1999](#)])

Hilfsplasmid pUBS520 [[Brinkmann et al., 1989](#)]: *dnaY*, p15A ori, *lacI^q*, *kan^r*

2.1.5 Bakterienstämme

E. coli BL21(DE3) (*Novagen, Bad Soden*)

E. coli B F⁻ *dcm ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal λ(DE3)*

E. coli XL1-Blue (*Stratagene, La Jolla, USA*)

E. coli *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q ΔM15(lacZ)* Tn10 (*tet^r*)]

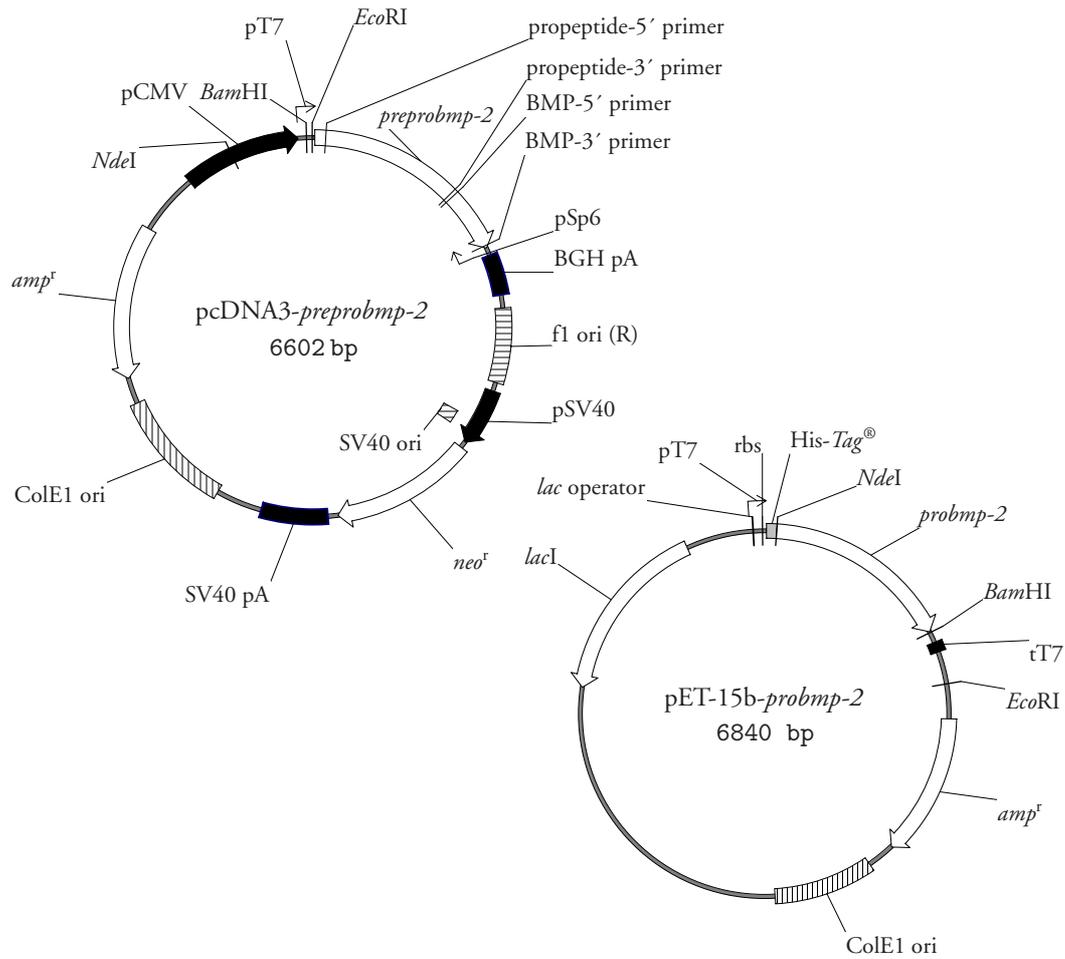


Abbildung 2.1: Plasmide pcDNA3-preprobmp-2 & pET-15b-probmp-2.

2.1.6 Geräte, Kits, Standards & Zubehör

Tabelle 2.3: Geräte, Kits, Standards & Zubehör

Produkt	Hersteller
Mikrobiologie & Zellaufschluß	
Dampfsterilisator Varioklav®500E	<i>H+P Labortechnik (Oberschleißheim)</i>
Gene Pulser II Elektroporator	<i>Bio-Rad (München)</i>
Gene Pulser Elektroporations-Küvetten 0,2cm	<i>Bio-Rad (München)</i>
Laminar-Flow-Box HeraSafe	<i>Heraeus Instruments (Hanau)</i>
Schüttelinkubator Multitron	<i>Infors (Bottmingen, Schweiz)</i>
Schüttelinkubator Certomat BS-T	<i>B. Braun Biotech (Melsungen)</i>
Bioreaktor Biostat ED (10l, DCU/MCFSwin)	<i>B. Braun Biotech (Melsungen)</i>
Ultra-Turrax® T25 & T50DPX	<i>IKA Labortechnik (Staufen)</i>
Hochdruckhomogenisatoren Gaulin Micron Lab 40 & Lab 60	<i>APV (Lübeck)</i>
Zentrifugation	
Tischzentrifugen pico & fresco	<i>Heraeus Instruments (Hanau)</i>
Zentrifugen Avanti J-20, J-25 & J-30I	<i>Beckman (München)</i>
analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A	<i>Beckman (München)</i>
Ultrazentrifuge Optima TLX	<i>Beckman (München)</i>
Rotoren: TLA-100.3, TLA-100.4, JS-4.3, JA-25.50, JA-30.50, JLA-16.250, JLA-10.500, JLA-8.1000	<i>Beckman (München)</i>
Elektrophorese	
Spannungsquelle EPS 300 & 600	<i>Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)</i>
Kammern, Rahmen & Glasplatten	<i>(Werkstattanfertigung)</i>
SemiPhore TE-70 Elektroblotter	<i>Hoefer Scientific Instr. (San Francisco, USA)</i>
BioTrace™ 0,45 µm PVDF-Membran	<i>Pall-Gelman (Dreieich)</i>
Li-Cor 4000 DNA-Sequencer	<i>MWG Biotech (Ebersberg)</i>
Dialyse & Filtration	
Dialyseschläuche Spectrapor MWCO 6000–8000	<i>Spectrum Lab (Rancho Dominguez, USA)</i>
Cross-Flow-Filtrationsanlage Minisetite & Maximate	<i>Pall-Gelman (Dreieich)</i>
Cross-Flow-Ultrafiltrationsmembranen Omega (8, 10, 30 & 50 kDa <i>open channel</i>)	<i>Pall-Gelman (Dreieich)</i>
Rapid Vakuumfilter 250 ml PES 0,2 µm	<i>Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)</i>
Rundfilter 0,4 µm	<i>Millipore (Bedford, USA)</i>

Tabelle 2.3: Geräte, Kits, Standards & Zubehör (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
Spritzenvorsatzfilter Minisart RC15 (0,2 µm)	Sartorius (Göttingen)
Spritzenvorsatzfilter CA & PES (0,2/0,4 µm)	Schubert Laborfachhandel (Leipzig)
Zentrifugenkonzentratoren:	
Macrosep 10000 MWCO	Pall-Gelman (Dreieich)
Vivaspin 15R HY (10000 & 30000 MWCO)	Vivascience (Hannover)
Chromatographieeinheiten	
ÄKTAFPLC & Explorer100	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gynkotek HPLC (DG 1310, P 480 / 580, Gina 50, UVD 170S / 340S, Chromeleon v4.32)	Dionex (Idstein)
Chromatographie — gepackte Säulen	
Butyl-Sepharose FF HiTrap™ 1 & 5 ml	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Heparin-Sepharose HP HiTrap™ 1 & 5 ml	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Superdex™ 75 prep grade	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Nucleosil 500-5 C3 PPN (125×4 & 250×10 mm)	Macherey-Nagel (Düren)
Vydac 214MS54 (250×4,6 mm)	MZ-Analysentechnik (Mainz)
Protein-RP (150×3 mm)	YMC (Schermbeck)
Chromatographie — Säulenmaterial	
Fractogel®EMD Phenyl (S)	Merck (Darmstadt)
Heparin-Sepharose 6 FF	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
SP-Sepharose HP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Ni-NTA His•bind Superflow™	Novagen (Bad Soden)
Macro-Prep CHT-I (40 µm)	Bio-Rad (München)
HA Ultrogel	Biosepra (Cergy-Saint-Christophe, Frankreich)
Source 15 RPC	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Chromatographie — Leersäulen	
XK 16/240 & 26/240	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Spektroskopie/-metrie	
Ultrospec 3000 Photometer	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
DU 7400 Diodenarray-Spektrophotometer	Beckman (München)
Uvikon 941 Spektrophotometer	Bio-Tek Kontron Instruments (Neufahrn)
Fluoreszenzspektrometer FluoroMax-2 & -3	ISA-Spex Instruments (Edison, USA)
CD-Spektrometer 62A DS	AVIV (Lakewood, USA)

Tabelle 2.3: Geräte, Kits, Standards & Zubehör (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
CD-Spektrometer J710	<i>Jasco (Gross-Umstadt)</i>
Stopped-flow-Instrument SX.18MV	<i>Applied Photophysics (Leatherhead, UK)</i>
Quarzglasküvetten Suprasil®	<i>Hellma (Müllheim)</i>
UV/CD: 104-QS (10 mm), 106-QS (0,1, 0,2 & 0,5 mm)	
Fluoreszenz: 101F-QS (1×1 cm; Sternrührer), 108F-QS (0,4×1 cm)	
Proteinkristallisation	
Proteinkristallisationskits (Anzahl der Puffer)	
JBScreen 1–10 (je 24)	<i>JenaBioscience (Jena)</i>
Cristallization Basic Kit for Proteins (50), Crystallization Basic Kit for Membrane Proteins (50)	<i>Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Factorial Solutions (96)	<i>Abt. Huber MPI (Martinsried); (hergestellt von AG Stubbs, Inst. f. Biotechnologie, Halle (Saale))</i>
Crystal Screen™ (50), Crystal Screen™ II (48), MembFac™ (48), Detergent Screen 1/2/3 (je 24), Additive Screen 1/2/3 (je 24)	<i>Hampton Research (Laguna Niguel, USA)</i>
Proteinkristallisation — Zubehör	
Linbro® Zellkulturplatten	<i>MP Biomedicals(Eschwege)</i>
CombiClover™ Platten	<i>Emerald Biostructures (Bainbridge Island, USA)</i>
Crychem™ Platten	<i>Hampton Research (Laguna Niguel, USA)</i>
Crystalquick Platten	<i>Greiner BIO-ONE (Frickenhausen)</i>
Crystal Clear Klarsichtklebefolie	<i>Manco (Avon, Taiwan)</i>
MZ16 Mikroskop	<i>Leica Microsystems (Wetzlar)</i>
DC150 Digitalkamera	<i>Leica Microsystems (Wetzlar)</i>
Diverses	
Feinwaage Analytical Standard 60	<i>Ohaus (Florham Park, USA)</i>
Waage BP4100S	<i>Sartorius (Göttingen)</i>
pH-Meter pH526 (Elektrode SenTix61)	<i>WTW (Weilheim)</i>
Peltier-Thermostat LFI3751	<i>Wavelength Electronics (Bozeman, USA)</i>
Schlauchpumpe P-1	<i>Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)</i>
Personal Cycler	<i>Biometra (Göttingen)</i>
Trio-Thermoblock	<i>Biometra (Göttingen)</i>
Hybaid Omn-E Thermocycler	<i>MWG Biotech (Ebersberg)</i>
Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Vertikalschüttler 3025	<i>GFL (Burgwedel)</i>

Tabelle 2.3: Geräte, Kits, Standards & Zubehör (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries (Bohemia, USA)</i>
H ₂ O-Deionisationsanlage Pure Lab Plus	<i>USF Seral (Ransbach-Baumbach)</i>
Potter S Homogenisator mit 2 ml Glasröhrchen und gekerbten PTFE- Aufsatz	<i>B. Braun Biotech (Melsungen)</i>
Membranvakuumpumpe CVC2	<i>Vacuubrand (Wertheim)</i>
Lyophilisationsanlage Beta 1-16 / LMC-1	<i>Christ (Osterode)</i>
Präzisionspritzen 1001 RNR & 1725 RNR	<i>Hamilton (Reno, USA)</i>
Kolbenhubpipetten Research: 0,5–10, 2–20, 20–200 & 500–5000 µl Reference: 0,1–2,5 & 100–1000 µl	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Polypropylen Mikroreaktionsgefäße (0,5, 1,5 & 2,0 ml)	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Polypropylengefäße mit Schraubdeckel (15 & 50 ml)	<i>Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)</i>
Glasflaschen mit Schraubdeckel 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 & 5000 ml	<i>Schott (Jena)</i>
Kits & Standards	
Wizard PCR Prep, DNA Purification System	<i>Promega (Mannheim)</i>
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	<i>Qiagen (Hilden)</i>
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen (Hilden)</i>
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase-Kit	<i>Promega (Mannheim)</i>
dNTPs	<i>Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)</i>
T4-DNA-Ligase-Kit	<i>Gibco-BRL (Paisley, UK)</i>
Sequi Therm Excel II Long-Read DNA Sequencing Kit-LC	<i>Epicentre Technologies (Madison, USA)</i>
DNA-Standard: 100bp/1kb-Leiter	<i>Gibco-BRL (Paisley, UK)</i>
LMW Electrophoresis Calibration Kit (Phosphorylase B (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20 kDa), α-Lactalbumin (14 kDa))	<i>Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)</i>
AP Test-Kit Ecoline 25	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Complete™ Proteaseinhibitortabletten	<i>Roche Diagnostics (Mannheim)</i>

2.2 METHODEN

2.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurde die Methode der Elektroporation [Dower, 1990] angewendet. Zur Vervielfältigung wurde Plasmid-DNA in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Für die Überexpression rekombinanter Gene wurden *E. coli*-Zellen des Stammes BL21(DE3) eingesetzt, die bereits zuvor mit dem Plasmid pUBS520 [Brinkmann *et al.*, 1989] transformiert worden waren.

40 µl der elektrokompenten Zellen wurden auf Eis mit 100–500 ng Plasmid-DNA oder 1–4 µl eines Ligationsansatzes gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand pipettiert. Der Stromstoß wurde mit folgenden Einstellungen ausgelöst: U = 2,5 kV, R = 200 Ω, C = 25 µF. Unmittelbar danach wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und 30–45 min bei 37 °C geschüttelt. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte durch Ausstreichen auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten. Zellen, die neben pET-Plasmiden auch pUBS520 enthielten, wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin und Kanamycin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Kultivierung von *E. coli* für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde LB-Medium mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und mindestens 10 h bei 37 °C im Kolben geschüttelt. Das Medium enthielt das zur Selektion von plasmidhaltenden Zellen nötige Antibiotikum. Das Kulturvolumen betrug je 2 ml für sogenannte *Quickpreps* beziehungsweise je 10 ml für *Minipreps* (Abschnitt 2.2.1.2).

2.2.1.2 DNA-Isolierung

Für die schnelle Suche nach *E. coli*-Klonen, deren Plasmide das gewünschte Gen enthielten, wurden je 100 µl Übernachtskultur mit 50 µl Phenol und 20 µl DNA-Probenpuffer gemischt und 3 min bei 9500 × g zentrifugiert (*Quickprep*). 25 µl des Überstands wurden durch Gelelektrophorese unter Verwendung eines geeigneten Standards analysiert.

Plasmid-DNA als Matrize für die PCR, für die Spaltung mit Restriktionsenzymen und die DNA-Sequenzierung wurde nach dem QIAprep-Spin-Protokoll isoliert (*Miniprep*). Mit Restriktionsenzymen behandelte DNA wurde zunächst gelelektrophoretisch gereinigt und

nach dem QIAquick-Gel-Extraction-Protokoll isoliert. Durch PCR synthetisierte DNA wurde ebenfalls nach diesem Protokoll gereinigt.

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten DNA erfolgte spektroskopisch durch Messung der Lichtabsorption bei 260 nm. $A_{260} = 1$ entspricht dabei 50 µg/ml dsDNA. Für die Berechnung molarer DNA-Konzentrationen wurde die durchschnittliche Masse eines Basenpaares im DNA-Doppelstrang von 600 Da zugrundegelegt [Ausubel *et al.*, 1987; Maniatis *et al.*, 1989].

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) & DNA-Sequenzierung

Zur Vervielfältigung von DNA wurde die Polymerasekettenreaktion nach Mullis *et al.* [1986] und Saiki *et al.* [1988] angewendet. Als Matrizen-DNA für die Amplifizierung der für BMP-2 und das BMP-2-Propeptid codierenden Sequenzen diente das Plasmid pcDNA3-*preprobmp-2* (Abb. 2.1 auf Seite 22). Details zu den verwendeten Primern finden sich in den Abschnitten 2.1.3 & 2.2.1.4.

Zur Synthese wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet, die über eine Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität) verfügt. Um eine Amplifizierung der gewünschten Sequenzen zu erreichen, wurden DMSO-Konzentration, MgCl₂-Konzentration und Hybridisierungstemperatur variiert. Für beide DNA-Sequenzen wurden unter folgenden Bedingungen PCR-Produkte erhalten:

50 µl PCR-Ansatz:

- 0,07 nM Matrizen-DNA
- je 600 nM Primer
- je 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- 1/10 Volumen 10× *cloned Pfu* Puffer
- 1/100 Volumen DMSO
- 3 mM MgCl₂
- 0,03 U/µl *cloned Pfu* DNA-Polymerase

Reaktionszeiten und -temperaturen:

- 60 s, 95 °C
- 30 Zyklen:
 - 45 s, 95 °C (Denaturierung)
 - 45 s, 45 °C (Hybridisierung)
 - 120 s, 72 °C (Synthese)
- 300 s, 72 °C
- 4 °C

Die Bestimmung der Basensequenz von DNA-Molekülen erfolgte nach der Kettenabbruchmethode im *Cycle-Sequencing*-Verfahren mit *Taq*-DNA-Polymerase nach Vorschrift des Herstellers unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern [Krishnan *et al.*, 1991; Sanger *et al.*, 1977].

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit einem Li-Cor 4000 DNA-Sequencer, der semiautomatischen Analysesoftware ImageAnalysis 4200 und durch computergestütztes Alignment mit dem Programm **MACAW** (NCBI, Bethesda, USA) ausgewertet.

2.2.1.4 Herstellung der Expressionsplasmide

Die Länge der Signalsequenz von präproBMP-2 war zu Beginn der Arbeit noch nicht experimentell bestimmt. Sie wurde daher theoretisch, mit Hilfe des PSORT WWW-Servers (<http://psort.nibb.ac.jp>) ermittelt. Die von diesem Rechner verwendeten Algorithmen zur Ermittlung potentieller Erkennungsmotive für Signalpeptidasen ergaben für die Sequenz von präproBMP-2 mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Schnittstelle zwischen den Aminosäuren² Gly⁻²⁶⁴ und Gly⁻²⁶³ [von Heijne, 1986; McGeoch, 1985; Nakai & Kanehisa, 1991, 1992]. Für die Klonierung der *probmp-2*-, *bmp-2*- und *bmp-2-propeptide*-cDNA-Fragmente wurden die auf Seite 20 aufgeführten Primer abgeleitet. Die Primer für das 5'-Ende der Propeptid-cDNA-Sequenz beziehungsweise für das 3'-Ende der BMP-2-cDNA-Sequenz waren bereits zur Amplifikation von *probmp-2* erfolgreich eingesetzt worden [Hillger, 1999].

Die für BMP-2 beziehungsweise für das Propeptid codierende cDNA-Sequenz wurde, wie unter Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über die *NdeI*- und *BamHI*-Spaltstellen zunächst in das Plasmid pET-11a kloniert. Der enzymatische Verdau der DNA erfolgte dabei nach Vorschrift des Herstellers gleichzeitig mit *NdeI*- und *BamHI*.

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase ligiert. Ein Ligationsansatz enthielt linearisiertes Plasmid und PCR-Fragment im Verhältnis von circa 30:90 fmol in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Nach 16-stündiger Inkubation bei 13 °C wurden 1–4 µl des Ansatzes direkt zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue-Zellen eingesetzt. Die Selektion plasmidhaltender Zellen erfolgte auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten. Die Plasmid-DNA einzelner Klone wurde durch enzymatische Spaltung mit *NdeI*- und *BamHI* auf das Vorhandensein der rekombinanten DNA hin überprüft und anschließend sequenziert.

Wie schon für pET-11a-*probmp-2* [Hillger, 1999] konnte auch für das Konstrukt pET-11a-*bmp-2-propeptide* keine Expression des rekombinanten Gens im coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Es wurde daher über die Schnittstellen für *NdeI* und

² Als Referenz für die Numerierung von Aminosäuren dient die erste Aminosäure des reifen Wachstumsfaktors BMP-2, Gln¹. Die letzte Aminosäure des Propeptids ist demzufolge Arg⁻¹. Siehe auch Abbildung 1.3 auf Seite 14.

*Bam*HI in pET-15b umkloniert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die so gewonnenen Plasmide pET-11a-*bmp-2* und pET-15b-*bmp-2-propeptide* (Abb. 2.2), sowie das bereits vorhandene Plasmid pET-15b-*probmp-2* ([Hillger, 1999], Abb. 2.1) verwendet.

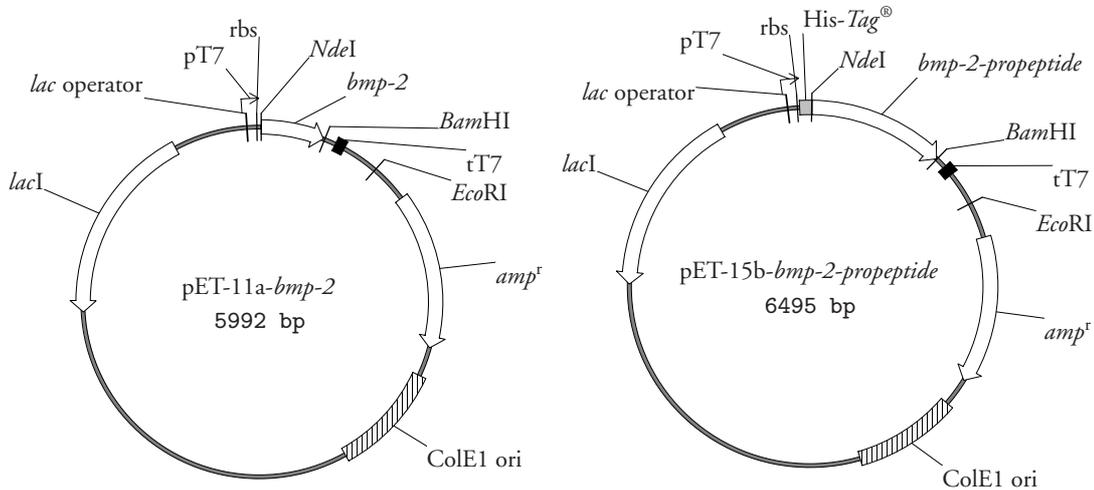


Abbildung 2.2: Plasmide pET-11a-*bmp-2* & pET-15b-*bmp-2-propeptide*.

2.2.1.5 Überexpression rekombinanter Gene in *E. coli*

Das in dieser Arbeit genutzte System zur Überexpression rekombinanter Gene in *E. coli* basiert auf deren Transkriptionskontrolle durch den Promotor der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 [Rosenberg *et al.*, 1987; Studier & Moffatt, 1986]. Der Promotor befindet sich im 5'-Bereich der multiplen Klonierungsregionen der verwendeten pET-Plasmide 11a und 15b. Das T7-RNA-Polymerase-Gen ist in dem verwendeten Expressionsstamm BL21(DE3) Bestandteil des Bakterienchromosoms. Es wird durch Promotor und Operator des *lac*-Operators reguliert. Der *lac*-Repressor (LacI) ist — zusätzlich zum chromosomalen Gen — auf den pET-Plasmiden codiert und wird konstitutiv exprimiert. Durch Zugabe von IPTG oder Lactose zum Kulturmedium wird die Affinität von LacI zum *lac*-Operator reduziert und infolge dessen T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Die sehr hohe Aktivität dieser Polymerase bewirkt eine starke Transkription der unter Kontrolle des T7-Promotors stehenden Gene.

15 der insgesamt 30 Argininreste³ in der Sequenz von proBMP-2 sind durch die Tripletts AGA und AGG codiert. Die verwendeten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden daher mit dem Plasmid pUBS520 transformiert, welches das Gen *dnaY* für die tRNA dieser Codons enthält.

³ In pET-15b ist ein weiteres Arginin im His-Tag[®] codiert.

Die Verfügbarkeit von *dnaY* ist bei der heterologen Genexpression in *E. coli* oft limitierend [Brinkmann *et al.*, 1989].

Vorkulturen Zum Animpfen der Vorkulturen wurden Einzelkolonien von Transformationen verwendet, die nicht älter als 24 h waren. Für die Kultivierung im Schüttelkolben wurden 10–20 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm geschüttelt. Das Volumen der Vorkulturen für die Anzucht im Bioreaktor betrug 1,5 l. Die Medien enthielten 100 µg/l Ampicillin und 50 µg/l Kanamycin.

Kultivierung im Schüttelkolben Für die Anzucht im Maßstab von 20 ml bis 1,5 l wurde ampicillin- und kanamycinhaltiges 2YT-Medium mit 1–2 % (v/v) einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8–1,3 geschüttelt. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit 1 mM IPTG.

Kultivierung im Bioreaktor (Fermentation) Die Fermentationen wurden in einem Biostat ED Reaktor mit 10 l Arbeitsvolumen und digitalem Meß- und Regelsystem (DCU) unter Verwendung des Prozeßleitsystems MCF5win durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte im *fed-batch*-Verfahren mit Hefeextrakt und Glycerin als Kohlenstoffquelle. Im Gegensatz zu dem von Kopetzki *et al.* [1989] beschriebenen Verfahren wurden hier die Parameter so gewählt, daß das jeweilige rekombinante Protein in großen Mengen, in unlöslicher, nicht-nativer Form gewonnen werden konnte.

350 g OHLV KAV (Hefeextrakt), 3,5 g NH₄Cl und 77 g Glycerin wurden in 6 l deionisiertem Wasser gelöst, für 60 min bei 121 °C im Bioreaktor autoklaviert, anschließend steril mit 1 M K₂HPO₄ auf pH 7,0–7,4 eingestellt und mit Wasser auf 6,5 l aufgefüllt. Die Zugabe von 2,8 mM MgSO₄, 0,01 % (w/v) Thiamin, sowie 0,1 % (w/v) Ampicillin und 0,05 % (w/v) Kanamycin erfolgte durch einen 20 µm Sterilfilter. Es wurde mit 500 ml einer 7–8 h alten Vorkultur in 2YT-Medium angeimpft und bei 36 °C kultiviert. Der Sollwert der Sauerstoffsättigung, pO₂, betrug 20 % und wurde über die Kaskade: {(1) Rührung, (2) Belüftung, (3) O₂} konstant gehalten. Die pH-Regulation erfolgte über Zufuhr von H₃PO₄/KOH. Das *Feeding* wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 16–20 gestartet. 3 l *Feeding*-Lösung wurden dem Reaktor mittels einer Schlauchpumpe innerhalb von 3–4 h kontinuierlich zugeführt und bei Anstieg der OD₆₀₀ um 10 Einheiten jeweils 1 mmol MgSO₄ zugesetzt. Bei einer OD₆₀₀ von 40–60 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG die Genexpression induziert. Nach 2,5–3 h Induktion wurde die Fermentation beendet.

Zellernte Nach Ende der Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation bei $4500 \times g$ für 15 min sedimentiert. Das Medium wurde anschließend dekantiert, die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Renaturierung von Proteinen aus *inclusion bodies* (IBs)

IB-Isolierung Als Grundlage für die Isolierung von IBs aus *E. coli* diente die Vorschrift von Rudolph *et al.* [1997, Protokoll 3, S. 66]. Zum enzymatischen Verdau von DNA wurde Benzonase verwendet. Der Aufschluß kleinerer Volumina (≤ 500 ml) erfolgte im Micron-Lab 40-Gaulin-Homogenisator mit 80–120 MPa in 3–4 Passagen. Größere Volumina an Zellsuspension wurden im semikontinuierlichen Betrieb mit dem Hochdruckhomogenisator Lab 60 bei einem Druck von 60 MPa in drei Passagen aufgeschlossen. Die IBs wurden mindestens fünf Mal gewaschen.

IB-Solubilisierung Die Solubilisierung von BMP-2- und proBMP-2-IBs erfolgte nach Rudolph *et al.* [1997, Protokoll 4, S. 67]. Dazu wurden 10 g IBs und eine Complete™ Proteaseinhibitortablette in 50 ml Solubilisierungspuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, 6 M GdmCl, 5 mM EDTA) für mindestens 4 h bei Raumtemperatur gelöst. Nach Zugabe von 200 mM DTT wurde die Lösung in einem luftdicht verschlossenen Gefäß für weitere 2–3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der pH mit Essigsäure auf 3–4 eingestellt und die Lösung zweimal gegen das 10-fache Volumen 5 M GdmCl, 10 mM Essigsäure für 6 und 16 h bei Raumtemperatur dialysiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei $48000 \times g$ für 30 min abgetrennt.

Im Falle des cysteinfreien BMP-2-Propeptids wurden, für die Reinigung des denaturierten Proteins über Heparin-Sepharose, 3,5 g IBs und eine Complete™ Tablette in 50 ml 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff und 0,1 M NaCl solubilisiert und unlösliche Bestandteile, wie oben beschrieben, entfernt. Um möglichen Modifikationen des Proteins durch Cyanat vorzubeugen, wurde zur Herstellung des Puffers ausschließlich Harnstoff in der Qualität „ultra pure“ der Firma *MP Biomedicals* (Eschwege) verwendet und erst nach Zugabe der Essigsäure aufgelöst. Für die Reinigung über IMAC wurden 1,5 g Propeptid-IBs in 50 ml 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 4 M GdmCl solubilisiert und zweimal gegen 1 l dieses Puffers dialysiert.

Präparative Proteinrenaturierung Die Renaturierung von BMP-2 und proBMP-2 aus IBs erfolgte unter für proBMP-2 optimierten Bedingungen [Hillger, 1999]. Der Renaturierungspuffer setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0
- 1,0 M L-Arginin-HCl
- 5 mM EDTA
- 5 mM GSSG, 2 mM GSH.

Der Puffer wurde vor Zugabe von GSH mit Stickstoff entgast und anschließend auf 10 °C gekühlt. Die Zugabe des IB-Solubilisats erfolgte im Verhältnis 1:100 (v/v) unter schnellem Verdünnen durch Einsatz eines Rührers. Renaturiert wurde bei 10 °C für fünf bis zehn Tage. Die Proteinkonzentration im Renaturierungspuffer betrug 3–3,5 µM, bezogen auf die monomere Spezies, und die Restkonzentration an GdmCl 50–60 mM. Volumina bis zu 5 l wurden in Glasflaschen und 25 l-Ansätze in Kunststoffbehältern renaturiert. Anschließend wurden die Ansätze konzentriert, dialysiert und chromatographisch gereinigt (Abschnitte 2.2.3.5 und 2.2.4).

Die Renaturierung des Propeptids erfolgte durch Dialyse im Anschluß an die chromatographische Reinigung des IB-Solubilisats (Abschnitte 2.2.2 und 2.2.4.2). Dazu wurde das Eluat der Heparin-Chromatographie 1:2 in 2 M L-Arginin-HCl, 2 M Tris/HCl, pH 8,0 verdünnt und zunächst gegen 1 M Tris/HCl, pH 8,0, sowie anschließend gegen 25 mM Kalium-HEPES, pH 7,0 dialysiert. Das renaturierte Protein wurde durch Hydroxyapatit-Chromatographie gereinigt (Abschnitt 2.2.4.3).

2.2.3 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Proteinfällung für die SDS-PAGE

Ähnlich wie SDS bindet Desoxycholat — die deprotonierte, wasserlösliche Form der Desoxycholsäure — an Proteinmoleküle. Durch Zugabe von TCA wird Desoxycholat protoniert und somit wasserunlöslich. Gebundenes Protein kopräzipitiert dabei mit der sich bildenden Desoxycholsäure. Die hier zur Entsalzung von Proben für die SDS-PAGE verwendete Variante der Proteinfällung mittels Natriumdesoxycholat (NaDoc) erlaubt die nahezu quantitative Präzipitation von Protein auch aus GdmCl-haltigen Lösungen [Arnold & Ulbrich-Hofmann, 1999]. Proben mit niedrigem pH wurden dazu zunächst neutralisiert. Nach Zugabe von 10 % (v/v) einer wässrigen Natriumdesoxycholatlösung (NaDoc, 1 %, w/v) wurden die Proben durch

schnelles Mischen mit 20 % (v/v) einer TCA-Lösung (10 %, w/v) angesäuert. Das sich bildende Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei $16000 \times g$ sedimentiert und anschließend mit Aceton gewaschen.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [1970] wurde zur Analyse von IB- und Proteinpräparationen, sowie von Zellextrakten eingesetzt.

E. coli-Zellen und IBs wurden dazu in β -ME-haltigem Probenpuffer (5 %, v/v) aufgenommen, homogenisiert und 3–5 min bei 95 °C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung, Reduktion und Solubilisierung der Proteine zu erreichen. In gleicher Weise wurden disulfidhaltige Proteinproben behandelt, die in reduzierter Form analysiert werden sollten. Für die Analyse disulfidverbrückter Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde Probenpuffer ohne reduzierendes Agens verwendet und die Probe nicht erhitzt. Proteinproben, die sowohl freie Cysteine, als auch Cystine enthielten, wurden zuvor mit 10 % (v/v) 0,4 M Jodacetamid in 0,1 M Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden alle freien SH-Gruppen blockiert und eine Neukombination, *reshuffling*, der Disulfidbrücken unmöglich.

Die Proben wurden durch Elektrophorese bei konstant 35 mA in 1 mm starken, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das 6 %ige Sammel- und das 12 %ige Trenngel hatten eine Länge von 1,5 cm beziehungsweise 8 cm. Als Referenz diente ein Molekulargewichtsmarker.⁴

Die SDS-Gele wurden im Anschluß an die Elektrophorese mit ethanolischer Coomassielösung gefärbt und nach Entfärbung des Hintergrunds getrocknet [Fairbanks *et al.*, 1971]. Die Nachweisgrenze für coomassiegefärbte Proteinbanden betrug etwa $0,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ Gel. Bis zu $0,05 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ Gel ließen sich durch Silberfärbung nach Nesterenko *et al.* [1995] nachweisen. Diese Methode ist zur besseren Übersicht in Tabelle 2.4 wiedergegeben. SDS-PAGE wurde auch eingesetzt um Proteinproben für die N-terminale Sequenzierung durch Western Blot zu präparieren (Abschnitt 2.2.3.3).

⁴ *Low Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)*: α -Lactalbumin aus Kuhmilch (14,4 kDa), Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (20,1 kDa), Carboanhydrase aus Rinder-Erythrozyten (20 kDa), Ovalbumin aus Hühnereiweiß (43 kDa), Albumin aus Rinderserum (67 kDa) und Phosphorylase B aus Kaninchen-Muskel (94 kDa)

Tabelle 2.4: Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen [Nesterenko *et al.*, 1995]

Aktion	Lösung	Zeit
Fixieren	60 ml 50 % (v/v) Aceton + 1,5 ml 50 % (w/v) TCA + 25 µl 37 % (v/v) HCHO	5 min
Waschen	H ₂ O	5 min
Vorbehandeln (1)	60 ml 50 % (v/v) Aceton	5 min
Vorbehandeln (2)	60 ml H ₂ O + 0,1 ml 10 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	1 min
Waschen	H ₂ O	3×5 s
Imprägnieren	60 ml H ₂ O + 0,8 ml 20 % (w/v) AgNO ₃ + 0,6 ml 37 % (v/v) HCHO	8 min
Waschen	H ₂ O	2×5 s
Entwickeln	60 ml H ₂ O + 1,2 g Na ₂ CO ₃ + 25 µl 37 % (v/v) HCHO + 25 µl 10 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	10–60 s
Stoppen	1 % (v/v) Essigsäure	30 s
Waschen	H ₂ O	3×5 s

2.2.3.3 Western Blot für N-terminale Sequenzierung

Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen [Towbin *et al.*, 1979/1992], die zuvor für 3×5 s in reinem Methanol aktiviert worden war. Der Transfer erfolgte *semi dry*, nach der Methode von Kyhse-Andersen [1984], bei konstant 1 mA/cm² über 5 h. Anschließend wurde die Membran für maximal 5 s in 0,1 %iger, methanolischer Coomassielösung gefärbt [Fairbanks *et al.*, 1971], der Hintergrund entfärbt und die Membran getrocknet.

2.2.3.4 N-terminale Sequenzierung & Massenspektrometrie

Für die N-terminale Sequenzierung von Proteinen wurden die betreffenden Proben zuvor, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, präpariert. Die Sequenzierung erfolgte nach Edman & Begg [1967] und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Peter Rücknagel (Max-Planck Forschungsstelle für *Enzymologie der Proteinfaltung*, Halle (Saale)) auf einem Gasphasensequenzierautomat 476 A (*Applied Biosystems*, Foster City, USA) durchgeführt.

Frau Dr. Angelika Schierhorn (ebenfalls Max-Planck Forschungsstelle für *Enzymologie der Proteinfaltung*, Halle (Saale)) führte freundlicherweise die Molekularmassenbestimmung von

Proteinen mittels MALDI-TOF- und ESI-Massenspektrometrie auf einem REFLEX Spektrometer beziehungsweise einem Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer (beide *Bruker-Franzen Analytik*, Bremen) durch. Die Proben wurden zuvor mittels RP-HPLC entsalzt.

Gegebenenfalls wurden zur Reduktion von Sulfoxiden des Methionins 50 µl Probe mit 40 µl 37 % HCl und 10 µl Dimethylsulfid (DMS) versetzt und nach 2 h bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom eingengt [Shechter, 1986]. Der HCl- und DMS-freie Rückstand wurde mittels NaDoc gefällt, in 8 M Harnstoff aufgenommen und durch RP-HPLC entsalzt.

2.2.3.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Für Konzentrierung von Proteinlösungen wurden, abhängig vom Volumen, der Ausgangskonzentration und dem Puffersystem, verschiedene Methoden verwendet:

Polyethylenglykol Proben mit einem Volumen zwischen 20 und 250 ml wurden in einem Dialyseschlauch bei 4 bis 7 °C in Polyethylenglykol, PEG, mit einem mittleren Molekulargewicht von 35000 Da gelagert. Abhängig vom Puffersystem und dem Salzgehalt der Probe waren zum Teil mehr als 24 h nötig, um die gewünschte Proteinkonzentration zu erreichen. Die Proteinmoleküle werden bei dieser osmosebasierten Methode durch die Dialysemembran an der Diffusion gehindert. Allerdings werden auch Pufferbestandteile konzentriert, obwohl sie mit ihrer geringen Größe die Membran passieren könnten. Der Grund dafür ist ihre zum Teil schlechte Löslichkeit in der außen befindlichen, hoch konzentrierten PEG-Lösung. Deshalb wurde insbesondere die Konzentrierung von phosphathaltigen Proben in mehreren Schritten mit zwischengeschalteter Dialyse durchgeführt. Umgekehrt war es zudem möglich, daß — aufgrund der statistischen Verteilung der Molekularmasse — entsprechend kleine PEG-Moleküle in die Probe gelangen konnten.

Ultrafiltration Proben mit einem Volumen bis 50 ml wurden mit Hilfe von Zentrifugenkonzentratoren bei 4 °C nach Vorschrift des Herstellers eingengt. Die bei der präparativen Renaturierung von Proteinen (Abschnitt 2.2.2) anfallenden Probenvolumina von 0,5 bis 25 l wurden durch Ultrafiltration im *cross-flow*-Verfahren maximal 25-fach konzentriert. Die Ausschlußgrenzen der verwendeten Membranen betragen für BMP-2 und das Propeptid 8 beziehungsweise 10 kDa (*screen channel*), sowie 30 beziehungsweise 50 kDa (*open channel*) für proBMP-2.

2.2.3.6 Lyophilisation von Proteinen

Für die Lyophilisation wurden die Proteine bei einer Konzentration von 1–2 mg/ml gegen 10 mM Ammoniumacetat/Essigsäure, pH 4,8 dialysiert und bei –80 °C eingefroren. Der Prozeß wurde bei 25 °C für 24–48 h in einer Gefriertrocknungsanlage Beta 1-16/LMC-1 geführt. Das Lyophilisat wurde anschließend bei –20 °C gelagert und bei Bedarf in dem entsprechenden Puffer rekonstituiert.

2.2.3.7 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse von renaturiertem BMP-2 und proBMP-2 zur Gewinnung von BMP-2 ohne N-terminale Heparinbindestelle, auch als *digit removed* BMP-2 (drBMP-2) bezeichnet, wurde ähnlich dem von [Koenig et al. \[1994\]](#) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Renaturierungsansätze wurden zunächst konzentriert und in zwei Schritten gegen:

1. 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff
2. 1 M Tris/HCl, pH 7,5, 4 M Harnstoff, 1 mM EDTA

dialysiert. Bei Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 und 3 mg/ml wurde anschließend mit Trypsin im Verhältnis 1:100 (w/w) 12 h auf Eis verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines mindestens 8-fach molaren Überschusses SBTI abgestoppt und das Protein, wie in Abschnitt [2.2.4.5](#) beschrieben, gereinigt [[Rudolph et al., 2002](#)].

2.2.4 Chromatographische Methoden

2.2.4.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Diese Reinigung wurde für BMP-2-Propeptid-IBs angewendet, die mittels GdmCl solubilisiert worden waren. Es wurde eine mit 100 ml (190×26 mm, $l \times d$) Ni-NTA His•bind Superflow™ gepackte Säule eingesetzt. Das Puffersystem bestand aus 20 mM Kaliumphosphat, 4 M GdmCl, pH 7,5 (A), pH 6,3 (B) und pH 4,5 (C) [[Kolodziej & Young, 1991](#)]. Die Säule wurde mit Puffer A äquilibriert, mit 50 ml IB-Solubilisat bei 0,1 ml/min beladen und anschließend mit Puffer B über 5 SV gewaschen. Die Elution erfolgte in einem Gradienten von 0 % bis 100 % Puffer C über 5,5 SV bei 3 ml/min.

2.2.4.2 Heparin-Affinitätschromatographie

Heparin-Affinitätschromatographie wurde in dieser Arbeit zur Reinigung der Propeptid-IBs sowie zur Präparation der dimeren Formen von BMP-2 und proBMP-2 nach der Renaturierung eingesetzt. Das Puffersystem bestand aus 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA und 6 M Harnstoff (A) mit 1 M NaCl im Eluenten (B). Aus der Pufferzusammensetzung resultiert ein pH von 5,9. Um möglichen Modifikationen des Proteins durch Cyanat vorzubeugen, wurde zur Herstellung des Puffers ausschließlich Harnstoff in der Qualität „ultra pure“ der Firma *MP Biomedicals* (Eschwege) verwendet und erst nach Zugabe der Essigsäure aufgelöst. Die Reinigung wurde für BMP-2 und proBMP-2 bei 5–7 °C auf ÄKTA-Chromatographiesystemen vom Typ Explorer oder FPLC durchgeführt. Die im folgenden spezifizierten Bedingungen beziehen sich auf die Verwendung von 5 ml HiTrap™ Heparin-Sepharose Säulen:

BMP-2-Propeptid: Die Reinigung des Propeptids wurde bei 20 °C durchgeführt. Die mit Puffer A äquilibrierte Säule wurde mit 25 ml IB-Solubilisat (40–45 mg Propeptid) bei 3 ml/min beladen und mit 75 SV 20 % Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte bei 4 ml/min in einem Gradienten von 20 % bis 70 % Puffer B über 20 SV.

proBMP-2: Nach der Faltung des Proteins *in vitro* (Abschnitt 2.2.2) wurde der Renaturierungsansatz, wie in Abschnitt 2.2.3.5 beschrieben, konzentriert und der pH mit Essigsäure auf 5–6 eingestellt. Die konzentrierte Lösung wurde gegen 0,1 M Tris, 75 mM Essigsäure, 0,2 M KH_2PO_4 , 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff dialysiert und danach filtriert (Rapid Vakuumfilter 250 ml PES 0,2 μm). Aus der Pufferzusammensetzung resultiert ein pH von 6,1. Anschließend wurde die mit 30 % Puffer B äquilibrierte Säule bei einem Fluß von 4 ml/min mit 50 ml (150 mg) des renaturierten Proteins beladen und mit mindestens 20 SV bei einer Konzentration von 58 % Puffer B gewaschen, wobei die Leitfähigkeit, κ , des Puffergemischs kontrolliert wurde. Die an die Säule gebundenen monomeren Spezies konnten bei $\kappa = 39\text{--}40 \text{ mS/cm}$ quantitativ abgetrennt werden. Dimeres proBMP-2 wurde anschließend in einem Gradienten von 58 % bis 78 % Puffer B über 5 SV eluiert.

BMP-2: Die Probenvorbereitung erfolgte wie für proBMP-2 beschrieben. Dialysiert wurde jedoch gegen Puffer A. Die Säule wurde bei 4 ml/min mit 30 ml (30 mg) des renaturierten Proteins beladen. Die Abtrennung der BMP-2-Monomere erfolgte durch Waschen mit 10 SV 30 % Puffer B. BMP-2-Di- und Oligomere wurden mit bis zu 10 SV 55 % B ($\kappa = 36\text{--}37 \text{ mS/cm}$) eluiert. Fast ausschließlich BMP-2-Dimere wurden in einem Stufengradienten von 55 auf 70 % Puffer B erhalten.

Proben des Eluats wurden mit SDS-PAGE analysiert, homogene Fraktionen vereinigt und im Falle von BMP-2 und proBMP-2, wie in Abschnitt 2.2.3.6 beschrieben, lyophilisiert. Das BMP-2-Propeptid wurde unmittelbar im Anschluß an die Reinigung renaturiert (Abschnitt 2.2.2).

2.2.4.3 Hydroxyapatit-Chromatographie

Das BMP-2-Propeptid und proBMP-2 wurden abschließend durch Hydroxyapatit-Chromatographie gereinigt. Als Säulenmaterialien wurden HA-Ultrogel und Macro-Prep CHT-I verwendet, wobei sich das keramikbasierte Macro-Prep CHT-I als geeigneter erwies. Die nachfolgend spezifizierten Bedingungen sind daher für letzteres optimiert worden und beziehen sich auf eine mit 15 g (30 ml) Material selbst gepackte Säule. Es sind volumetrische Flüsse angegeben. Aus den Dimensionen des gepackten Säulenbetts, 57×26 mm ($l \times d$), lassen sich die linearen Flußraten errechnen. Als Puffersystem diente 0.1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (A) mit 1 M Kaliumphosphat im Eluenten (B). Die Chromatographien wurde bei 5–7 °C durchgeführt und die Säule vor dem Beladen mit Puffer A äquilibriert.

BMP-2-Propeptid: Die mit 100 % Puffer A äquilibrierte Säule wurde bei 7,5 ml/min mit 75 mg des wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben renaturierten Proteins (0,5 mg/ml 25 mM Kalium-HEPES, pH 7,0, 1 mM CaCl_2) beladen und bei 5 ml/min mit 1,5 SV 100 % Puffer A und 3 SV 7 % Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte mit 25 % Puffer B ($\kappa = 31$ mS/cm) über 3–4 SV im Anschluß an einen Gradienten von 7 % bis 25 % Puffer B über 2 SV bei 5 ml/min. Die Analyse des Eluats erfolgte durch SDS-PAGE. Homogene Fraktionen wurden vereinigt, in PEG 35000 auf 50 % des ursprünglichen Volumens konzentriert und gegen 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 dialysiert.

proBMP-2: 50 mg des über Heparin-Sepharose gereinigten und lyophilisierten proBMP-2 wurden in 25 ml 10 mM Kaliumacetat, pH 4,5 rekonstituiert, mit 25 ml Puffer A gemischt und für mindestens 12 h auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend bei 7,5 ml/min vollständig auf die mit 100 % Puffer A äquilibrierten Säule aufgetragen. Danach wurde bei 5 ml/min über jeweils 4 SV mit 10 % beziehungsweise 20 % Puffer B gewaschen. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 20 % bis 40 % Puffer B über 2 SV gestartet und die Hauptfraktion bei konstant 40 % Puffer B über weitere 2 SV erhalten. Nach Analyse mittels SDS-PAGE wurden die homogenen Fraktionen vereinigt und gegen 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 dialysiert.

2.2.4.4 Reversed Phase-High Performace Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Für analytische Zwecke wurde eine Nucleosil 500-5 C3 PPN Säule mit 125×4 mm ($l \times d$) und für präparative Zwecke mit 250×10 mm eingesetzt. Ebenfalls zur Proteinpräparation, aber auch zum Entsalzen von Proben für die Massenspektrometrie (Abschnitt 2.2.3.4) wurde eine selbstgepackte 50×3 mm Source 15RPC Säule verwendet. Alle Säulen wurden in einem Gynkotek HPLC-System betrieben.

Als Laufmittelsysteme dienten H₂O/Acetonitril (ACN) beziehungsweise H₂O/2-Propanol, mit 0,05–0,5 % Trifluoressigsäure (TFA) oder Heptafluorobuttersäure (HFBA) als Ionenpaarreagenz. Es wurde mit Gradienten zwischen 0,1 % und 2 % Laufmittel B/min eluiert. Der Fluß betrug für die Analytik 0,5–1 ml/min, für die Präparation und das Entsalzen 2–3,5 ml/min. Die Temperatur des Säulenofens wurde zwischen 20 °C und 40 °C variiert. Die Beladung der Säulen entsprach den Empfehlungen der Hersteller.

2.2.4.5 Hydrophobe Chromatographie

Die Reinigung von drBMP-2 erfolgte unmittelbar im Anschluß an den tryptischen Verdau (Abschnitt 2.2.3.7) mittels hydrophober Chromatographie. Dazu wurde der Ansatz mit 20–25 % (v/v) Fractogel®EMD Phenyl (S) versetzt und zweimal gegen das 10-fache Volumen 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 dialysiert. Um sicherzustellen, daß das unter diesen Pufferbedingungen unlösliche drBMP-2 an das Säulenmaterial bindet, anstatt auszufallen, wurde die Dialyse in einem Zentrifugenbecher durchgeführt. Der Dialyseschlauch wurde dabei durch den Schraubverschluß des Bechers fixiert. Durch Verwendung eines Schüttlers gelang es, das Säulenmaterial dabei gleichbleibend homogen zu verteilen. Nach Abschluß der Dialyse wurde das so beladene Säulenmaterial in eine Leersäule überführt. Der Durchlauf wurde gesammelt und die Säule wie folgt gewaschen:

1. 5 SV Dialysepuffer
2. 5 SV 50 mM Natriumacetat, pH 5,0
3. 2 SV 50 mM Natriumacetat, pH 5,0, 4 M Harnstoff
4. 2 SV 50 mM Natriumacetat, pH 5,0, 1 M L-Arginin-HCl

Die Elution erfolgte mit 6 M GdmCl, 0,2 M Essigsäure. Die drBMP-2-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen 0,1 % TFA dialysiert und abschließend sterilfiltriert [Rudolph *et al.*, 2002].

2.2.5 Spektroskopische Methoden

2.2.5.1 UV-Absorptionsspektroskopie

Da sowohl das BMP-2-Propeptid, als auch BMP-2 Tyrosin- und Tryptophanreste enthalten, wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration die Lichtabsorption bei $\lambda = 280$ nm verwendet, die dem in Gleichung 2.1 wiedergegebenen LAMBERT-BEERSCHEN Gesetz gehorcht. Dabei sind ϵ der molare Absorptionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, c die molare Konzentration in M und l die Länge des Lichtwegs in der Meßzelle in cm.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times c \times l \quad (2.1)$$

Der molare Absorptionskoeffizient eines Proteins bei $\lambda = 280$ nm, ϵ_{280} , resultiert aus seinem Tryptophan-, Tyrosin- und Cystingehalt und läßt sich nach Gleichung 2.2 berechnen (n_{Trp} , n_{Tyr} und $n_{\text{S-S}}$ entsprechen Mol Tryptophan, Tyrosin beziehungsweise Cystin je Mol Protein und die Faktoren den molaren Absorptionskoeffizienten für N-Acetyl-L-Tryptophanamid, Gly-L-Tyr-Gly beziehungsweise Cystin bei $\lambda = 280$ nm [Edelhoch, 1967; Gill & von Hippel, 1989; Wetlaufer, 1962]). Die für die verwendeten BMP-Varianten berechneten Werte sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Sie gelten für 6 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, pH 6,5 bei Raumtemperatur.

$$\epsilon_{280} = (5690 n_{\text{Trp}} + 1280 n_{\text{Tyr}} + 120 n_{\text{S-S}}) \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad (2.2)$$

Für die Berechnung der UV-Differenzspektren wurden gleiche Verdünnungen des untersuchten Proteins in den jeweiligen Puffer und in 6 M GdmCl 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 hergestellt und die UV-Absorptionsspektren aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde aus der Absorption der Verdünnung in 6 M GdmCl nach Tabelle 2.5 berechnet und aus der Proteinkonzentration wiederum die molaren Absorptionsspektren beziehungsweise -koeffizienten unter den anderen Pufferbedingungen.

Um Artefakte durch unvollständige Dialyse beziehungsweise Aggregate ausschließen zu können, wurden stets Spektren von 240 nm bis 340 nm aufgenommen. Der entsprechende Dialysepuffer diente dabei als Referenz. Die Proben wurden gegebenenfalls auf eine Absorption zwischen 0,05 und 1,00 verdünnt, was einer Transmission von 90 % beziehungsweise 10 % des eingestrahnten Lichts entspricht. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in 1 cm-Küvetten aus Quarzglas.

Tabelle 2.5: Mit Hilfe von Gleichung 2.2 berechnete molare Absorptionskoeffizienten, ϵ_{280} , der untersuchten BMP-2-Varianten in 6 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, pH 6,5. Für proBMP-2 und BMP-2 ergaben sich jeweils zwei Werte unter der Annahme vollständig reduzierter beziehungsweise vollständig oxidierter Cysteinreste, für das Cystein-freie BMP-2-Propeptid dagegen nur ein Wert. Die Angaben beziehen sich auf die monomeren Spezies.

BMP-2-Variante	ϵ_{280} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	
	reduziert	nicht reduziert
proBMP-2	38690	39110
BMP-2	17780	18200
BMP-2-Propeptid	20910	20910

Die Proteinkonzentrationsbestimmung in IB-Solubilisaten wurde nach der Methode von [Warburg & Christian \[1941\]](#) durchgeführt. Die Absorptionen bei $\lambda = 260$ nm beziehungsweise 280 nm wurden dazu in Gleichung 2.3 eingesetzt. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten der Proteine dienten die so ermittelten Werte lediglich zur Abschätzung der tatsächlichen Proteinkonzentrationen.

$$[\text{Protein}] = (1,552 A_{280} - 0,757 A_{260}) \text{mg ml}^{-1} \quad (2.3)$$

2.2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die spektralen Eigenschaften der aromatische Aminosäurereste werden stark durch ihre Flexibilität und die Polarität ihrer Umgebung beeinflusst, die beide von der Proteinstruktur abhängig sind. Das betrifft Wechselwirkungen der Chromophore mit anderen Aminosäureresten und dem umgebenden Lösungsmittel, sowie ihre Beweglichkeit. Änderungen in den Absorptionseigenschaften, also der Verschiebung des Absorptionsmaximums oder von ϵ des Proteins, können deshalb zur Untersuchung von Strukturänderungen herangezogen werden. Weitaus stärker als ihre Absorptionseigenschaften, ändern sich jedoch die Fluoreszenzeigenschaften der aromatischen Aminosäurereste, insbesondere die des Tryptophans, bei der Faltung beziehungsweise Entfaltung eines Proteins [[Cantor & Schimmel, 1980](#); [Demchenko, 1986](#); [Eftink, 1994](#)]. Spektren von tryptophanhaltigen Proteinen lassen sich — abhängig von der Umgebung der Tryptophanreste — in drei Hauptklassen einteilen. Die Einteilung erfolgt nach der Lage des Emissionsmaximums (λ_{max}^F) und der Bandbreite, also der Breite des Spektrums bei der Hälfte der maximalen Intensität, auch Halbwertsbreite ($\Delta\lambda_{\text{max}/2}^F$) genannt. Proteinspektren

der Klasse I sind auf Tryptophanreste in unpolarer Umgebung zurückzuführen ($\lambda_{\max} = 330\text{--}332\text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\max/2}^F = 48\text{--}50\text{ nm}$), Proteinspektren der Klasse II dagegen auf Tryptophanreste an der Proteinoberfläche, die von nur wenig beweglichen Wassermolekülen umgeben sind ($\lambda_{\max} = 340\text{--}342\text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\max/2}^F = 53\text{--}55\text{ nm}$). Proteine mit Spektren der Klasse III enthalten Tryptophanreste an der Proteinoberfläche, die von frei beweglichen Wassermolekülen umgeben sind ($\lambda_{\max} = 350\text{--}353\text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\max/2}^F = 59\text{--}61\text{ nm}$) [Burstein *et al.*, 1973, 1977; Demchenko, 1986]. Da bei den hier durchgeführten Messungen die spektrale Korrekturfunktion des Fluoreszenzdetektors des verwendeten Spektrometers nicht berücksichtigt wurde, ließen sich die in Abschnitt 3 dargestellten Spektren bezüglich der Lage Emissionsmaximums nicht direkt den genannten Klassen zuordnen. Allerdings wurde eine Beurteilung anhand der Bandbreite der Spektren versucht. Auch die relative Verschiebung von λ_{\max}^F zwischen den Proteinspektren unter verschiedenen Bedingungen sowie die relativen Unterschiede zwischen den Spektren der untersuchten Proteine wurde berücksichtigt.

Die Aufnahme von Emissionsspektren wurde mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Die Spaltbreiten für Anregungs- und Emissionsstrahlengang betrugen 2 nm beziehungsweise 5 nm. Bei konstanter Anregungswellenlänge wurde die Emission in 0,5 nm Schritten mit jeweils 0,1 s Integrationszeit im S/R-Modus (Signal/Referenz-Modus) gemessen. Dazu wurde eine reduzierte Halbmikroküvette (0,4 × 1 cm) vom Typ 108F-QS verwendet. Die Emissionsspektren der entsprechenden Puffer dienten als Referenz.

Die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität bei chemisch induzierter Faltung und Entfaltung wurden mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Hierfür wurde eine Küvette vom Typ 101F-QS mit Magnetrührer verwendet. Die Totzeit nach dem Reaktionsstart betrug dabei circa 3 s. Die Emission wurde im S/R-Modus bei konstanter Anregungs- und Emissionswellenlänge im Abstand von 0,5 s mit 0,37 s Integrationszeit gemessen. Die Spaltbreiten betrugen 2 nm für den Anregungs- und 5 nm für den Emissionsstrahlengang. Zur Bestimmung der Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeiten von 0–3 s nach Reaktionsstart wurde zudem ein SX.18MV *stopped-flow*-Instrument mit Doppelmonochromator für den Anregungsstrahlengang (Bandbreite je 5 nm) und Fluoreszenzdetektor eingesetzt. Die Totzeit betrug hierbei lediglich 1 ms. Die Fluoreszenzintensität wurde mittels eines Ausschlußfilters gemessen, das heißt, über das gesamte Spektrum oberhalb einer bestimmten Wellenlänge, dem sogenannten *cut-off*. Es wurden jeweils 1000 Meßpunkte mit einer Integrationszeit von 370 µs aufgenommen, die, entsprechend dem Meßmodus, über den gesamten

Akkumulationszeitraum (*single time base*) oder zu jeweils 500 über zwei unterschiedlich lange Zeiträume (*split time base*) gleichverteilt waren. Die *stopped-flow*-Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung durch Dr. Ralph Golbik vom *Institut für Biochemie* der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Angaben zu Temperatur, Puffer, Proteinkonzentration, Verdünnung, Akkumulationszeit, sowie zur Anregungs-, Emissions- und *cut-off*-Wellenlänge finden sich in Abschnitt 2.2.6 beziehungsweise in den Abbildungslegenden im Ergebnisteil (Abschnitt 3).

2.2.5.3 CD-Spektroskopie

Die Messungen der Absorptionsdifferenz zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht, des Circulardichroismus (CD), von Proteinproben wurden mit den CD-Spektrometern AVIV 62A DS beziehungsweise Jasco J710 bei 20 °C durchgeführt. Es wurden Quarzglaszuvetten mit Schichtdicken von 0,01 cm, 0,02 cm beziehungsweise 0,05 cm verwendet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Auflösung von 0,5 beziehungsweise 1 nm und einer Zeitkonstante von 2 s. Von der betreffenden Probe wurden je zehn Spektren gemittelt und mit dem Spektrum des entsprechenden Dialysepuffers korrigiert. Messungen der Elliptizität bei einzelnen Wellenlängen wurden mit identischen Einstellungen durchgeführt und die Daten über einen Zeitraum von je 30 s gemittelt.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \times M_r \times 100}{c \times l \times N_{\text{AA}}} \quad (2.4)$$

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times M_r \times 100}{c \times l} \quad (2.5)$$

$$[\Theta] = 32982 \times (\epsilon_L - \epsilon_R) \quad (2.6)$$

Die gemessene Elliptizität, Θ , wurde nach Gleichung 2.4 oder 2.5 in die residuelle Elliptizität, $[\Theta]_{\text{MRW}}$, beziehungsweise die molare Elliptizität, $[\Theta]$, umgerechnet [Schmid, 1997]. Dabei ist M_r die molare Masse des Proteins in Dalton, c die Proteinkonzentration in mg/ml, l die Länge des Lichtwegs in der Meßzelle in cm und N_{AA} die Anzahl der Aminosäurereste je Proteinmolekül. Die molare Elliptizität ergibt sich aus den unterschiedlichen molaren Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht, ϵ_L beziehungsweise ϵ_R (Gleichung 2.6).

2.2.6 Chemisch induzierte Proteinfaltung und -rückfaltung

Die Seitenketten der verschiedenen Aminosäuren unterscheiden sich stark in ihrer Hydrophilie. Im gefalteten Protein befinden sich die hydrophoben Seitenketten überwiegend im Inneren, während die hydrophilen lösungsmittel exponiert sind. Bei einer entfalteten Polypeptidkette zwingen die nun ebenfalls lösungsmittel exponierten hydrophoben Seitenketten die umgebenden Wassermoleküle in eine eisähnliche Struktur. Der Entropiegewinn durch das Freiwerden der so gebundenen Wassermoleküle wird als treibende Kraft bei der Faltung von Proteinen angesehen. Der mit der Faltung verbundene und durch Einschränkung der Freiheitsgrade der Polypeptidkette hervorgerufene Entropieverlust wird so überkompensiert. In wässrigen Lösungen von Denaturierungsmitteln, wie Harnstoff und GdmCl, lassen sich Proteine entfalten. Das beruht im wesentlichen auf deren Eigenschaft, Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen zu stören und auch die hydrophoben Teile einer Polypeptidkette, besonders Aromaten, sowie das Peptidrückgrat zu solubilisieren [Schellman, 1994]. Die thermodynamische Stabilität der Strukturen von BMP-2, proBMP-2 und dem BMP-2-Propeptid, sowie die Kinetik der Entfaltung und Rückfaltung des BMP-2-Propeptids und der Propeptidomäne von proBMP-2 wurden durch Messung der Fluoreszenz bei chemisch induzierter Denaturierung mittels Harnstoff beziehungsweise GdmCl untersucht.

2.2.6.1 Thermodynamische Analyse

Bei einem Zweizustandsmodell der Proteinfaltung im Gleichgewicht aus denaturiertem (**d**) und nativem Protein (**n**), $d \rightleftharpoons n$, ist die Änderung der freien Enthalpie bei der Entfaltung, $\Delta G_{n \rightarrow d}$, durch Gleichung 2.7 definiert, wobei $[n]$ und $[d]$ die Konzentration der nativen beziehungsweise denaturierten Spezies im Gleichgewicht, R die universelle Gaskonstante und T die absolute Temperatur sind. Nach Tanford [1968, 1970] ist die freie Enthalpie der Überführung von Aminosäureseitenketten und dem Peptidrückgrat von Wasser in wässrige Lösungen eines Denaturierungsmittels in erster Näherung linear abhängig von dessen Konzentration. Daher läßt sich bei einer gegebenen Temperatur $\Delta G_{n \rightarrow d}$ in Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration, $[D]$, mit Gleichung 2.8 beschreiben. Dabei sind $\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}}$ die Änderung der freien Enthalpie bei der Proteindenaturierung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und $m_{n \rightarrow d}$ der Proportionalitätsfaktor, definiert durch Gleichung 2.9 [Pace, 1986]. Die Konzentration an Denaturierungsmittel, bei der denaturierte und native Spezies

zu gleichen Anteilen vorliegen, $D_{1/2}$, ergibt sich aus Gleichung 2.8 zu Gleichung 2.10, da hier $\Delta G_{n \rightarrow d} = 0$.

$$\Delta G_{n \rightarrow d} = -RT \ln \left(\frac{[d]}{[n]} \right) \quad (2.7)$$

$$\Delta G_{n \rightarrow d} = \Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{n \rightarrow d} \times [D] \quad (2.8)$$

$$m_{n \rightarrow d} = -\frac{\partial(\Delta G_{n \rightarrow d})}{\partial([D])} \quad (2.9)$$

$$[D]_{1/2} = \frac{\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}}}{m_{n \rightarrow d}} \quad (2.10)$$

Für die Bestimmung der freien Enthalpie der Proteindenaturierung im Gleichgewicht wurden native beziehungsweise denaturierte Proben des jeweiligen Proteins in unterschiedliche Konzentrationen des Denaturierungsmittels im Verhältnis 1:10 verdünnt. Dazu wurden Präzisionspritzen vom Typ Hamilton 1001 RNR und 1725 RNR verwendet. Das Gesamtvolumen der einzelnen Proben betrug jeweils 800 μl . Nach Inkubation bei 20 °C für 24 h wurden die Fluoreszenzemissionsspektren der Proben, wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben, aufgenommen und die effektive Konzentration des jeweiligen Denaturierungsmittels nach Gleichung 2.11 für Harnstoff beziehungsweise 2.12 für GdmCl refraktometrisch (ΔN) bestimmt [Nozaki, 1972; Pace, 1986; Warren & Gordon, 1966].

$$[\text{Harnstoff}] = (117,66(\Delta N) + 29,753(\Delta N)^2 + 185,56(\Delta N)^3) \text{ M} \quad (2.11)$$

$$[\text{GdmCl}] = (57,147(\Delta N) + 38,68(\Delta N)^2 - 91,60(\Delta N)^3) \text{ M} \quad (2.12)$$

Die Auswertung erfolgte jeweils bei einer bestimmten Wellenlänge des Emissionsspektrums, unter Annahme eines Zweizustandsmodells nach Pace [1986]. Dazu wurden zunächst die Fluoreszenzänderungen der nativen und der denaturierten Spezies des jeweiligen Proteins in Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration linear extrapoliert und der Anteil der nativen Spezies in jeder Probe, α , nach Gleichung 2.13 berechnet. Dabei sind F die gemessene Fluoreszenz, F_d die extrapolierte Fluoreszenz der denaturierten Spezies und F_n die der nativen Spezies. Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter erfolgte nach Gleichung

2.14 mit Hilfe des Computerprogramms Mathematica (v4.1) durch nicht-lineare Regression nach der LEVENBERG-MARQUARDT-Methode.

$$\begin{aligned}\alpha &= \frac{F - F_d}{F_n - F_d} \quad \text{für } F_n > F_d \quad \text{bzw.} \\ &= \frac{F - F_n}{F_d - F_n} \quad \text{für } F_n < F_d\end{aligned}\quad (2.13)$$

$$\alpha = \frac{\exp\left(\frac{\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{n \rightarrow d} \times [\text{D}]}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{n \rightarrow d} \times [\text{D}]}{RT}\right)}\quad (2.14)$$

Um Artefakte durch Proteinaggregation auszuschließen, wurden Streulichtmessungen durchgeführt ($\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$).

2.2.6.2 Kinetische Analyse

Für die Bestimmung kinetischer Parameter der Faltung und Entfaltung wurde jeweils unmittelbar nach Verdünnung des nativen beziehungsweise denaturierten Proteins in unterschiedlich konzentrierte Lösungen des Denaturierungsmittels die Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (Abschnitt 2.2.5.2).

Die Daten wurden bei einem monophasischem Verlauf mit Hilfe einfach exponentieller Funktionen 1. Ordnung ausgewertet (Gleichungen 2.15 (Signalabnahme) und 2.16 (Signalzunahme)) und bei einem biphasischem Verlauf mit Hilfe doppelt exponentieller Funktionen 1. Ordnung (Gleichungen 2.17 (Signalabnahme) und 2.18 (Signalzunahme)). Dabei ist A_0 die Intensität im Gleichgewicht, also nach Abschluß der Reaktion. A_1 und A_2 sind die Amplituden der ersten und zweiten Phase, sowie k_{obs1} und k_{obs2} die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der ersten und zweiten Phase.

$$F = A_0 + A_1 \times e^{-k_{\text{obs1}} \times t} \quad (2.15)$$

$$F = A_0 + A_1 \times (1 - e^{-k_{\text{obs1}} \times t}) \quad (2.16)$$

$$F = A_0 + A_1 \times e^{-k_{\text{obs1}} \times t} + A_2 \times e^{-k_{\text{obs2}} \times t} \quad (2.17)$$

$$F = A_0 + A_1 \times (1 - e^{-k_{\text{obs1}} \times t}) + A_2 \times (1 - e^{-k_{\text{obs2}} \times t}) \quad (2.18)$$

Multiphasische Faltungs- und Entfaltungskinetiken werden oft beobachtet, wenn das untersuchte Protein ein oder mehrere Reste der Iminosäure Prolin enthält. Die *trans*-Konformation der N-terminalen Peptidbindung eines Prolylrestes ist, im Gegensatz zu einem Aminosäurerest, gegenüber der *cis*-Konformation nur geringfügig stabiler. In kurzen Peptiden liegen bis zu 35 % der Prolylpeptidbindungen als *cis*-Isomere vor [Brandts *et al.*, 1975; Schwarzinger *et al.*, 2001]. Die *cis*-Konformation ist aber auch oft Bestandteil nativer Proteinstrukturen. In einem vollständig denaturierten Protein ist das Verhältnis von *cis*- zu *trans*-Isomeren mit durchschnittlich etwa 15:85 ähnlich dem von synthetischen Peptiden. Da die Aktivierungsenergie für die Isomerisierung mit ungefähr 80 kJ/mol sehr hoch ist, sind die Geschwindigkeitskonstanten mit etwa 0.015 s^{-1} und 0.003 s^{-1} für die *cis*→*trans*- beziehungsweise *trans*→*cis*-Isomerisierung bei Raumtemperatur entsprechend gering [Goto & Hamaguchi, 1982; Kiefhaber *et al.*, 1990; Nall *et al.*, 1978].

Die Geschwindigkeitskonstanten von Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen sind in der Regel von der Konzentration des Denaturierungsmittels unabhängig [Schmid & Baldwin, 1979]. Dagegen sind intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten der eigentlichen Faltung beziehungsweise Entfaltung von der Konzentration des Denaturierungsmittels abhängig. Der Idealfall ist in den Gleichungen 2.19 (Faltung) und 2.20 (Entfaltung) wiedergegeben, wobei $m_{d \rightarrow n}$ und $m_{n \rightarrow d}$ die entsprechenden Proportionalitätsfaktoren sind [Tanford, 1968, 1970].

$$\ln k_{d \rightarrow n} = \ln k_{d \rightarrow n}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{d \rightarrow n} \times [\text{D}], \quad \text{für } [\text{D}] < [\text{D}_{1/2}] \quad (2.19)$$

$$\ln k_{n \rightarrow d} = \ln k_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}} + m_{n \rightarrow d} \times [\text{D}], \quad \text{für } [\text{D}] > [\text{D}_{1/2}] \quad (2.20)$$

Für ein Zweizustandsmodell, $d \rightleftharpoons n$, gilt: $k_{\text{obs}} = k_{n \rightarrow d} + k_{d \rightarrow n}$. Daraus resultiert Gleichung 2.21 für die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante von der Konzentration des Denaturierungsmittels. Gleichung 2.22 lässt sich unter Verwendung der ARRHENIUS-Gleichung herleiten und berücksichtigt die Temperaturabhängigkeit der freien Aktivierungsenthalpien für die Faltung und für die Entfaltung.

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln \left(k_{d \rightarrow n}^{\text{H}_2\text{O}} \times e^{-m_{d \rightarrow n}[\text{D}]} + k_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}} \times e^{m_{n \rightarrow d}[\text{D}]} \right) \quad (2.21)$$

$$= \ln \left(k_{d \rightarrow n}^{\text{H}_2\text{O}} \times e^{(-m_{d \rightarrow n}/RT)[\text{D}]} + k_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}} \times e^{(m_{n \rightarrow d}/RT)[\text{D}]} \right) \quad (2.22)$$

Dabei sind $m_{d \rightarrow \ddagger}$ und $m_{n \rightarrow \ddagger}$ die Proportionalitätsfaktoren für die Änderung der freien Enthalpie beim Übergang vom denaturierten beziehungsweise nativen Zustand zum Übergangszustand (\ddagger) analog zu Gleichung 2.9. Die Auftragung von $\ln k_{\text{obs}}$ gegen die Konzentration des Denaturierungsmittels wird auch als CHEVRON-Plot bezeichnet. Dieser ergibt meist eine V-förmige Kurve. Insbesondere für die Faltung weist der CHEVRON-Plot vieler Proteine jedoch eine Abweichung von der Linearität auf. Die für proBMP-2 und das BMP-2-Propeptid durchgeführten kinetischen Messungen wurden mit Hilfe von CHEVRON-Plots und bei biphasischem Verlauf auch durch Auftragung der relativen Amplituden der beiden Phasen, $\alpha_1 = \frac{A_1}{A_1+A_2}$ und $\alpha_2 = \frac{A_2}{A_1+A_2}$, gegen die Konzentration des Denaturierungsmittels ausgewertet. Im Falle des Propeptids ergab sich im CHEVRON-Plot ein nicht-linearer Verlauf des „Faltungsarmes“ der dritten, sehr schnellen Phase. Die Auswertung wurde hier auch für ein Dreizustandsmodell, $d \rightleftharpoons i \rightleftharpoons n$, also die Faltung des Proteins über ein Intermediat (i) vorgenommen. Unter der Annahme, daß das Intermediat eine Voraussetzung für die Bildung der nativen Spezies ist, und daß die Gleichgewichtseinstellung zwischen denaturiertem Protein und Intermediat viel schneller erfolgt als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Übergang vom Intermediat zum nativen Protein, gilt Gleichung 2.23.

$$k_f = f_i \times k_{i \rightarrow n} = \frac{K_{d \rightleftharpoons i}}{1 + K_{d \rightleftharpoons i}} \times k_{i \rightarrow n} \quad (2.23)$$

Aus diesem Zusammenhang resultiert für die beobachtete Geschwindigkeitskonstante Gleichung 2.24 [Khorasanizadeh *et al.*, 1996].

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln \left(\frac{K_{d \rightleftharpoons i} \times e^{(-m_{d \rightarrow i}/RT)[D]}}{1 + K_{d \rightleftharpoons i} \times e^{(-m_{d \rightarrow i}/RT)[D]}} \times k_{i \rightarrow n}^{\text{H}_2\text{O}} \times e^{(-m_{i \rightarrow \ddagger}/RT)[D]} + k_{n \rightarrow i}^{\text{H}_2\text{O}} \times e^{(m_{n \rightarrow \ddagger}/RT)[D]} \right) \quad (2.24)$$

Durch Einsetzen der mit Hilfe der Gleichungen 2.22 und 2.24 ermittelten Geschwindigkeitskonstanten läßt sich die freie Enthalpie der Denaturierung nach Gleichung 2.25 für ein Zweizustandsmodell beziehungsweise Gleichung 2.26 für ein Dreizustandsmodell berechnen.

$$\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}} = -RT \ln \left(\frac{k_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{d \rightarrow n}^{\text{H}_2\text{O}}} \right) \quad (2.25)$$

$$\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{H}_2\text{O}} = -RT \ln \left(\frac{1}{K_{d \rightleftharpoons i}} \times \frac{k_{n \rightarrow i}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{i \rightarrow n}^{\text{H}_2\text{O}}} \right) \quad (2.26)$$

Alle Parameteranpassungen erfolgten durch nicht-lineare Regression nach der LEVENBERG-MARQUARDT-Methode mit Hilfe des Computerprogramms Mathematica (v4.1).

2.2.7 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde eingesetzt, um Informationen über die apparenten Molekularmassen, die hydrodynamischen Eigenschaften und den Assoziationsgrad der betreffenden Proteine zu erhalten. Die Analysen wurden freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lillie vom *Institut für Biotechnologie* der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit einer Optima XL-A Zentrifuge durchgeführt. Der Einsatz eines AN60Ti-Rotors mit Zwei- beziehungsweise Sechskanalzellen ermöglichte die gleichzeitige Messung von 7 beziehungsweise 21 verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Proteins. Dabei wurde die Sedimentationsgeschwindigkeit und die Konzentrationsverteilung innerhalb der jeweiligen Meßzelle im Gleichgewicht absorptionspektroskopisch bestimmt. Für die Berechnungen wurde das partielle spezifische Volumen der Proteinmoleküle mit $\bar{v} = 0.73 \text{ ml/g}$ angenommen [Harding, 1997]. Weitere Details sind in den entsprechenden Abbildungslegenden im Ergebnisteil (Abschnitt 3) angegeben.

Die nicht-kovalente Assoziation des Propeptids beziehungsweise von proBMP-2 wurde durch Bestimmung sowohl der apparenten Sedimentationskonstanten, s_{app} , als auch der apparenten Molekularmassen im Sedimentationsgleichgewicht, M_{rapp} , untersucht. Bei Homodimerisierung des Analyten, $2 \text{ Monomere (M)} \rightleftharpoons \text{Dimer (D)}$, gilt für die apparente Sedimentationskonstante Gleichung 2.27 und für die apparente Molekularmasse im Gleichgewicht Gleichung 2.28.

$$s_{\text{app}} = s_{\text{M}} \frac{[\text{M}]}{[\text{M}] + [\text{D}]} + s_{\text{D}} \frac{[\text{D}]}{[\text{M}] + [\text{D}]} \quad (2.27)$$

$$M_{\text{rapp}} = \frac{M_{\text{rM}} [\text{M}] + M_{\text{rD}} [\text{D}]}{[\text{M}] + [\text{D}]} \quad (2.28)$$

Dabei sind M_{rM} und M_{rD} die Molekularmassen, s_{M} und s_{D} die Sedimentationskonstanten, sowie $[\text{M}]$ und $[\text{D}]$ die in Lösung vorhandenen Konzentrationen der monomeren beziehungsweise dimeren Spezies. Da für die Gesamtmonomerkonzentration, $[\text{M}_{\text{total}}]$, Gleichung 2.29 und für die Dimerkonzentration in Lösung Gleichung 2.30 gilt, folgt für die Monomerkonzentration in Lösung Gleichung 2.31. Durch Kombination der Gleichungen 2.30 und 2.31

mit Gleichung 2.27 beziehungsweise 2.28 lässt sich aus der Abhängigkeit des apparenten s -Werts beziehungsweise der apparenten Molekularmasse von der Gesamtmonomerkonzentration die Dissoziationskonstante, K_D , berechnen. Die Berechnung der Dissoziationskonstante des proBMP-2-Tetramers aus der relativen Amplitude im Sedimentationslauf erfolgte mit Hilfe der Gleichungen 2.31 und 2.32.

$$[M_{\text{total}}] = [M] + 2[D] \quad (2.29)$$

$$[D] = \frac{[M]^2}{K_D} \quad (2.30)$$

$$[M] = -\frac{1}{4}K_D + \sqrt{\frac{1}{16}K_D^2 + \frac{1}{2}K_D[M_{\text{total}}]} \quad (2.31)$$

$$\text{relative Amplitude} = \frac{[D]}{[M_{\text{total}}]} = \frac{[M]}{[M] + K_D} \quad (2.32)$$

2.2.8 Bestimmung der biologischen Aktivität

Tiermodell Die Fähigkeit von drBMP-2 und proBMP-2 zur Induktion ektopischer Knochenneubildung wurde in einem Tiermodell an Ratten überprüft. Mit Ausnahme der Bestimmung der Aktivität alkalischer Phosphatase (AP) in den Explantaten, wurden die Experimente von Dr. Gerhard Herr (*Advanced Tissue Regeneration GmbH*, Wetzlar) durchgeführt. Die Proteine wurden zuvor gegen ein 50 %iges ACN-Wasser-Gemisch (v/v) dialysiert und, durch Trocknung unter einem sterilen Luftstrom, auf würfelförmigen Keramikkörpern folgenden Typs fixiert⁵:

- Hersteller — Fa. *Mathys* (Bettlach, Schweiz)
- Handelsname — chronOs
- Phasenreinheit — >95 % β -TCP
- Porenvolumenanteil — 72 ± 6 %
- Porengröße — 80–650 μm
- Porenstruktur — interkonnektierend
- Festigkeit — $7,7 \pm 1,2$ MPa

Anschließend wurden acht ausgewachsenen, circa 400 g schweren, männlichen Ratten je vier dieser Keramikkörper implantiert. Zwei der Implantate waren mit circa 200 μg proBMP-2

⁵ Die Effizienz der Methode wurde nach Beschichtung einzelner Keramikkörper mit Cytochrom C durch visuelle und mikroskopische Kontrolle der inneren und äußeren Oberflächen der Matrix auf homogene Färbung nachgewiesen.

und eins mit circa 40 µg drBMP-2 beschichtet. Das vierte Implantat diente als Negativkontrolle und war lediglich mit dem Dialysepuffer (ACN/H₂O) behandelt worden. Die Einbringung erfolgte ektopisch, zwischen zwei schrägen Lagen der Bauchmuskulatur. Nach 30 Tagen Liegedauer wurden die Tiere getötet, die Implantate mit dem umgebendem Gewebe entnommen und makroskopisch und histologisch auf Knochenneubildung untersucht. Unmittelbar nach Explantation wurde eine Hälfte jedes Implantats einschließlich des anhaftenden Gewebes zur späteren Bestimmung der AP-Aktivität bei –80 °C eingefroren und die andere für die histologischen Untersuchungen in 70 % Ethanol fixiert. Die fixierten Implantate wurden mit Ethanol dehydratisiert, in Methylmethacrylat eingeschlossen und in Scheiben von 100–150 µm Dicke geschnitten. Nach dem Abschleifen auf eine Stärke von circa 50 µm wurden die Präparate mit Toluidin O gefärbt.

Zur Bestimmung der AP-Aktivität wurden die Implantate — jeweils unmittelbar vor der Präparation — separat aufgetaut. Alle anschließenden Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Die Implantate wurden mit einem Skalpell zerkleinert und zusammen mit 1 ml Homogenisierungspuffer (0.1 M Tris/HCl, 1 % Triton X-100, pH 7.4) in ein vorgekühltes Homogenisiererröhrchen gegeben. Die Proben wurden mit einem Potter S-Homogenisator bei 1200 rpm durch 5 × 4 vollständige Auf- und Abbewegungen des gekerbten PTFE-Aufsatzes — mit je 45 s Abkühlpause — aufgeschlossen. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) gegeben und mit Homogenisierungspuffer auf 4 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation bei 4200 × g für 20 min wurde aufgetriebenes Fett entfernt und ein 1 ml Aliquot des klaren Überstandes zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Diese wurde am Tag der Präparation mit Hilfe eines Merck Ecoline 25 Test-Kits durchgeführt. Dazu wurde die Probe 1:2, 1:3 beziehungsweise 1:5 in Homogenisierungspuffer verdünnt und 25 µl der Verdünnung, gemäß Vorschrift des Herstellers, in 1 ml frisch präparierten Testpuffer pipettiert. Die Zunahme der Absorption bei λ = 405 nm wurde photometrisch gemessen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

$$V = 41000 \frac{\Delta A}{\epsilon \times l \times t} \quad (2.33)$$

Die Enzymaktivität, V (in µmol min⁻¹ ml⁻¹), wurde nach Gleichung 2.33 berechnet, wobei der molare Absorptionskoeffizient von 4-Nitrophenol mit $\epsilon = 18518 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ eingesetzt wurde. $\Delta A/t$ ist die Änderung der Absorption pro Minute und l die Schichtdicke der Küvette in cm. Der Faktor 41000 resultiert aus der Verdünnung der Probe.

Die Enzymaktivitäten wurden blockweise (1 Versuchstier = 1 Block) miteinander verglichen. Dazu wurden Rangvarianzanalysen für verbundene Stichproben durchgeführt (FRIEDMAN-Test und paarweise Vergleiche nach WILCOXON & WILCOX [Sachs, 1992]). Die Prüfgröße, $\hat{\chi}_R^2$, wurde nach Gleichung 2.34 berechnet. Dabei sind n die Anzahl der Blöcke, k die Anzahl der untersuchten Faktoren und R_i die Rangsummen der Faktoren. $\hat{\chi}_R^2$ wurde mit den 5 %-Irrtumswahrscheinlichkeiten für den jeweiligen Test verglichen (Tabellen 280 und 287 in Sachs [1992]).

$$\hat{\chi}_R^2 = \left[\frac{12}{n k (k + 1)} \sum_{i=1}^k R_i^2 \right] - 3 n (k + 1) \quad (2.34)$$

Zellkultur Die Induktion alkalischer Phosphatase in C2C12-Zellen ist ein von Kirsch *et al.* [2000a] etablierter Test zur Quantifizierung der biologischen Aktivität von BMP-2. Diese nicht ausdifferenzierte Myoblasten-Zelllinie exprimiert die Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-II und in nur geringem Mengen BMPR-IB. Die biologische Relevanz der Bindung von BMP-2 an BMPR-IA für den osteoinduktiven Effekt auf C2C12-Zellen ist von Chalaux *et al.* [1998] und Namiki *et al.* [1997] gezeigt worden. Die Analysen zur Aktivität von BMP-2 und drBMP-2 wurden von Krause [2003] im Rahmen seiner Diplomarbeit am *Institut für Biotechnologie* der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

3 ERGEBNISSE & DISKUSSION

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Proteine, BMP-2, proBMP-2 und das BMP-2-Propeptid, wurden durch heterologe Expression der jeweiligen humanen cDNA in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* (IBs) gewonnen (Abschnitt 3.1). Die IB-Proteine wurden solubilisiert, renaturiert und gereinigt (Abschnitt 3.2) und anschließend charakterisiert (Abschnitt 3.3). Die Stabilitäten der BMP-2-Varianten wurden mittels chemisch induzierter Faltung und Entfaltung untersucht (Abschnitt 3.4).

Nachfolgend bezeichnet der Begriff „Propeptiddomäne“ das Propeptid als Bestandteil von proBMP-2. Die Begriffe „BMP-Domäne“ und „Cystin-Knoten-Domäne“ werden für BMP-2 als Bestandteil von proBMP-2 verwendet. Hierbei sind nicht Proteindomänen im Sinne der Proteinfaltung gemeint. Zudem wurde auf den Zusatz „rh“ (rekombinant, human) bei den Proteinbezeichnungen verzichtet.

3.1 HETEROLOGE GENEXPRESSION IN *E. COLI*

Experimente zur heterologen Expression von *probmp-2* in *E. coli* hatten gezeigt, daß durch Verwendung eines Fusionskonstruktes mit N-terminalem His-Tag[®] die Ausbeute an rekombinantem Protein erheblich gesteigert werden konnte [Hillger, 1999]. Vermutlich wird die Translationsinitiation, die oftmals limitierend für die Expressionrate ist, durch die für *E. coli* optimierte DNA-Sequenz des Tags erleichtert. Zur rekombinanten Herstellung von proBMP-2 wurde daher der Vektor pET-15b-*probmp-2* eingesetzt. Die Vermutung, daß auch die *bmp-2-propeptide*-cDNA, die identisch mit der 5'-Sequenz von *probmp-2* ist, ohne Tag nur mit schlechten Ausbeuten zu exprimieren sein würde, konnte experimentell bestätigt werden. Sie wurde daher ebenfalls in den Vektor pET-15b kloniert (Abb. 2.2, S. 30). Die *bmp-2*-cDNA ließ sich jedoch auch ohne His-Tag[®] (Vektor: pET-11a) in ausreichenden Mengen exprimieren. Da 14 Argininreste innerhalb des Propeptids durch die in *E. coli* seltenen Triplets AGA und AGG codiert sind, wurden die zur Expression verwendeten *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen zusätzlich mit dem Plasmid pUBS520 transformiert, welches das Gen *dnaY* für die tRNA dieser Codons enthält [Brinkmann *et al.*, 1989].

Durch Kultivierung der transformierten Zellen auf Hefeextraktmedium und Glycerin im 10l-Bioreaktor konnten für BMP-2 circa 1 kg, für proBMP-2 und das Propeptid je circa 1,5 kg Biomasse (Feuchtgewicht) gewonnen werden (siehe Methoden, S. 30ff). Alle drei Proteine wurden dabei in unlöslicher Form als IBs im Cytosol der Zellen abgelagert. Nach dem Zellaufschluß durch Hochdruckdispersion wurden die IBs mit dem jeweils hoch angereicherten, rekombinanten Protein isoliert. Aus je 1 g Biomasse konnten 70 mg BMP-2-, 90 mg Propeptid- beziehungsweise 100 mg proBMP-2-IBs präpariert werden. Die Analyse der IB-Proteine in der reduzierenden SDS-PAGE ergab lediglich im Fall von proBMP-2 eine Abweichung von circa -2 kDa (43 statt 45 kDa) von der berechneten Molekularmasse für die monomere Spezies (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Ausbeuten an BMP-2, proBMP-2 und BMP-2-Propeptid nach heterologer Expression der cDNAs in *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520. Die Angaben beziehen sich auf die Kultivierung der Zellen in einem 10l-Bioreaktor im *fed-batch*-Verfahren auf Hefeextraktmedium und Glycerin als Kohlenstoffquelle.

Plasmid	Biomasse (kg) [†]	IBs / Protein (mg/g Zellen [†])	M_r (Da) ESI-MS / theoretisch [‡]	N-terminales Methionin
pET-15b- <i>probmp-2</i>	1,5	100 / 25	44902.0 / 44901.7	–
pET-11a- <i>bmp-2</i>	1,0	70 / 35	13036.1 / 13036.0	+
pET-15b- <i>bmp-2-propeptide</i>	1,5	90 / 22,5	32014.1 / 32014.9	–

[†] Die Angaben beziehen sich auf nicht-getrocknete Biomasse nach Zentrifugation und Dekantieren des Mediums (Feuchtgewicht).

[‡] Die theoretischen Molekularmassen für die monomeren Spezies, M_r , wurden mit Hilfe des im Internet verfügbaren Programms Protparam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) berechnet.

Die N-terminalen Sequenzierungen der IB-Präparationen ergaben, daß — im Unterschied zum Propeptid und zu proBMP-2 — der Startmethioninrest von BMP-2 noch vorhanden war. Bei der Überprüfung der Molekularmassen durch ESI-Massenspektrometrie wurde im Fall von proBMP-2 eine Massendifferenz von $+16$ Da festgestellt, welche durch die reversible Oxidation eines Methionins zum Sulfoxid erklärt werden konnte. In der Tat ergab die N-terminale Sequenzierung einer späteren Präparation des His-*Tag*[®]-Propeptids nach Thrombinspaltung, daß Met⁻²⁶⁴, zu circa $\frac{2}{3}$ als Sulfoxid vorlag. Der Anteil des Sulfoxids ließ sich mit Hilfe von Dimethylsulfid deutlich senken (Abschnitt 2.2.3.4, [Shechter, 1986]). Möglicherweise wird die Methioninoxidation durch Peroxide hervorgerufen, die von Triton X-100, einer Komponente des Zellaufschlußpuffers B, gebildet werden können.

Durch SDS-PAGE konnte nachgewiesen werden, daß die jeweiligen IB-Präparationen nur gering mit *E. coli*-Proteinen verunreinigt waren (jeweils Bahn 3 in Abb. 3.2, S. 59, Abb. 3.3, S. 63, und Abb. 3.4, S. 66). Der DNA-Gehalt der IBs, insbesondere der des Propeptids, war relativ hoch, obwohl Benzonase beim Zellaufschluß eingesetzt wurde. Der hohe DNA-Gehalt war sehr wahrscheinlich durch die Art der Kultivierung bedingt, denn IB-Präparationen aus Schüttelkolbenkulturen wiesen einen deutlich geringeren Nukleinsäureanteil auf. Die starke Verunreinigung der Propeptid-IBs mit DNA ist vermutlich auf den hohen isoelektrischen Punkt des Proteins von 9,9 zurückzuführen, der Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat von Nukleinsäuren begünstigen könnte.

Alle drei IB-Proteine konnten in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,5 und 200 mM DTT vollständig solubilisiert werden. Die Proteinkonzentrationen in den dialysierten IB-Solubilisaten wurden nach Bestimmung der UV-Absorption mit Hilfe von Gleichung 2.3 berechnet. Der Proteingehalt der Propeptid- beziehungsweise der proBMP-2-IBs betrug circa 250 mg/g, der der BMP-2-IBs circa 500 mg/g. Damit ergaben sich Ausbeuten von 22,5 mg, 25 mg und 35 mg Protein je Gramm Zellen (Feuchtgewicht), entsprechend 3,4 g, 3,8 g und 3,5 g Protein je Liter Kulturvolumen, für Propeptid, proBMP-2 beziehungsweise BMP-2. Die Ergebnisse der heterologen Genexpression in *E. coli* sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Die Bioreaktorkultivierung der rekombinanten *E. coli*-Zellen auf Basis eines Hefeextrakt-Glycerin-Medium erwies sich als ein relativ unkompliziertes und vor allem schnelles Verfahren zur Gewinnung großer Mengen der drei BMP-Varianten in Form von IBs. Durch die Transformation der Zellen mit dem Plasmids pUBS520 konnten dabei Fehler während der RNA-Translation erfolgreich verhindert werden, wie die hohen Ausbeuten und die korrekten Molekularmassen der IB-Proteine belegen. Allerdings war die Reinheit der IBs, sowohl bezogen auf Kontaminationen durch Wirtszellproteine als auch durch Nucleinsäuren, bei Kultivierungen im Schüttelkolben höher als bei den hefeextraktbasierten Fermentationen. Demgegenüber sind Bioreaktorkultivierungen auf einem definierten Medium sowohl bezogen auf die Reinheit der IBs als bezogen auf die Ausbeute an rekombinantem Protein von Vorteil, erfordern allerdings eine oft langwierige Optimierung der Fermentationsbedingungen. So konnten Vallejo *et al.* [2002] mittels einer optimierten Fermentation rekombinanter *E. coli* TG1-Zellen auf definiertem Medium 8,6 g BMP-2 je Liter Kulturvolumen erhalten.

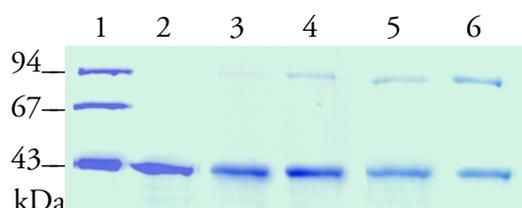
3.2 RENATURIERUNG & REINIGUNG DER BMP-VARIANTEN

3.2.1 Renaturierung & Reinigung von proBMP-2

3.2.1.1 Renaturierung von proBMP-2

Das zur *in vitro*-Renaturierung von proBMP-2 verwendete Protokoll war von mir in meiner Diplomarbeit etabliert worden und ist im Methodenteil beschrieben (Abschnitt 2.2.2, [Hillger, 1999]). Die IBs wurden zunächst in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,5 und 200 mM DTT solubilisiert. Die Renaturierung des Proteins erfolgte durch schnelle Verdünnung des IB-Solubilisats in Renaturierungspuffer (1,0 M L-Arginin-HCl, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH, pH 8,0). Da in ersten Renaturierungsversuchen häufig ein proteolytischer Abbau von proBMP-2 beobachtet werden konnte, wurde später dem IB-Solubilisierungspuffer und dem Renaturierungspuffer ein Proteaseinhibitorgemisch zugesetzt (Complete™-Tabletten). Renaturiert wurde bei Proteinkonzentrationen von 3–3,5 μM über einen Zeitraum von fünf bis zehn Tagen bei 10 °C. Da diese Bedingungen für die Faltung der BMP-Domäne von proBMP-2 ausgelegt waren, wurde zunächst nur die Bildung der disulfidverbrückten, dimeren Spezies zur Beurteilung der Ausbeute herangezogen. Die Struktur der Propeptidomäne blieb dabei unberücksichtigt.

Abbildung 3.1: Oxidative Dimerisierung von proBMP-2 in Abhängigkeit von der Stöchiometrie des Redox-Systems. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Angaben von GSH:GSSG in mM. Bahn 1: LMW-Marker, Bahn 2: Probe bei Renaturierungsstart, Bahn 3 und 4: GSH:GSSG=5:1 nach 3 d und 6 d, Bahn 5 und 6: GSH:GSSG=1:5 nach 3 d und 6 d. Die Renaturierung erfolgte in 1 M L-Arginin, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0 bei 10 °C. Die Proteinkonzentration betrug 3 μM .



Bei Einsatz eines GSH-GSSG-Redox-Systems lassen sich disulfidhaltige Proteine meist mit einem Überschuß an GSH optimal renaturieren, so auch im Fall der Cystin-Knoten-Proteine *platelet-derived growth factor* (PDGF) und β -*nerve growth factor* (β -NGF) [Müller & Rinas, 1999; Rattenholl *et al.*, 2001b; Rudolph *et al.*, 1997]. Das war bei proBMP-2 jedoch nicht der Fall. In Abbildung 3.1 ist ein Vergleich der kovalenten Dimerisierung von proBMP-2 bei unterschiedlichen GSH-GSSG-Verhältnissen in 1 M L-Arginin, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0 bei 10 °C nach drei und sechs Tagen dargestellt. Bei GSSG-Überschuß (1 mM GSH

und 5 mM GSSG) lagen nach sechs Tagen circa 40 % des zur Renaturierung eingesetzten denaturierten, monomeren proBMP-2 als Dimer vor, bei GSH-Überschuß (5 mM GSH und 1 mM GSSG) dagegen nur circa 20 %. Im Unterschied zu dem ursprünglichen Protokoll wurde proBMP-2 daher bei GSSG-Überschuß renaturiert. Nach sieben bis zehn Tagen lagen so mehr als 50 % des zur Renaturierung eingesetzten IB-Proteins in disulfidverbrückter, dimerer Form vor.

Wurde 24 Stunden nach Beginn der Renaturierung die GSSG-Konzentration von 5 mM auf 50 mM erhöht, betrug die kovalente Dimerisierung des Proteins bereits nach 48 Stunden 50 %. Die Faltung der Monomere ist also vermutlich innerhalb von 24 Stunden bereits abgeschlossen. Die Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücke jedoch erfordert offensichtlich stärker oxidierende Bedingungen als die des Cystin-Knotens.

3.2.1.2 Reinigung von proBMP-2

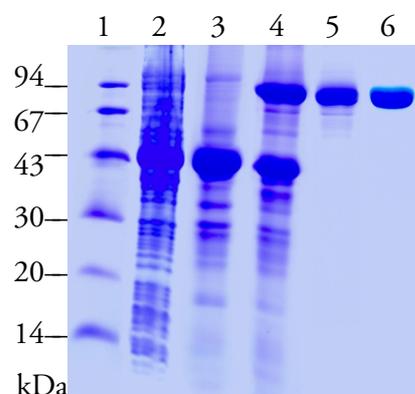
Heparin-Affinitätschromatographie Im Anschluß an die oxidative Renaturierung von proBMP-2 wurde die dimere Form des Proteins durch Heparin-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Renaturierungsansätze wurden dazu vorher durch *cross-flow*-Ultrafiltration auf 4–5 % des Ausgangsvolumens konzentriert. Dabei konnte in den zunächst klaren Lösungen in geringem Ausmaß Proteinaggregation beobachtet werden. Der pH wurde anschließend mit Essigsäure auf 5–6 eingestellt, wodurch ein weiteres *oxido-shuffling* und damit eine Entfaltung bereits nativ disulfidverbrückter Moleküle weitgehend unterbunden wurde. Die Konzentrate wurden gegen 0,1 M Tris, 75 mM Essigsäure, 0,2 M KH_2PO_4 , 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff, pH 6,1 dialysiert. Durch den hohen Harnstoffgehalt des Dialysepuffers lösten sich die Aggregate vollständig auf.

Die etablierten Verfahren zur Reinigung von BMPs durch Heparin-Affinitätschromatographie beinhalten die Verwendung von harnstoffhaltigen Puffersystemen bei pH 7–8 [Groppe *et al.*, 1998; Hauschka *et al.*, 1986; Vallejo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1988, 1990]. Bei einem pH über 7,0 bildet sich jedoch aus Harnstoff verstärkt Cyanat; damit besteht die Gefahr der chemische Modifikation des Proteins [Hagel *et al.*, 1971; Stark, 1965]. Daher wurde zur Reinigung von proBMP-2 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA und 6 M Harnstoff, pH 5,9 mit 1 M NaCl im Eluenten als Puffersystem eingesetzt. Zur Herstellung des Puffers wurde ausschließlich Harnstoff in der höchsten verfügbaren Reinheit verwendet und erst nach Zugabe der Essigsäure gelöst.

Die Reinigung wurde bei 5–7 °C auf einer 5 ml-HiTrap™ Heparin-Sepharose HP-Säule durchgeführt (siehe auch Abschnitt 2.2.4.2). Durch die relativ hohe Leitfähigkeit des zum Probenauftrag verwendeten Puffers ($\kappa = 18\text{--}19\text{ mS/cm}$) konnte der größte Teil des monomeren proBMP-2, zusammen mit der DNA und den Proteinverunreinigungen, bereits im Durchlauf erhalten werden. An die Säule gebundene Monomere wurden mit 580 mM NaCl quantitativ abgetrennt. Dimeres proBMP-2 eluierte in einem linearen NaCl-Gradienten von 580 mM bis 780 mM über fünf Säulenvolumina in einem einzelnen, symmetrischen Peak. Die SDS-PAGE-Analyse des Eluats ergab keine Hinweise auf Verunreinigungen durch monomeres proBMP-2 oder andere Proteine (Abb. 3.2, 59, Bahn 5).

Abbildung 3.2: Rekombinante Herstellung von proBMP-2.

Heterologe Expression in *E. coli*, IB-Präparation, Renaturierung und Reinigung. Analyse durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Bahn 1: LMW-Marker, Bahn 2: Gesamtzellprotein nach Induktion (reduziert mit β -ME), Bahn 3: IB-Präparation (reduziert mit β -ME), Bahn 4: Probe nach sieben Tagen Renaturierung (nicht reduziert), Bahn 5: proBMP-2-Dimer nach Heparin-Affinitätschromatographie (nicht reduziert), Bahn 6: proBMP-2-Dimer nach Hydroxyapatit-Chromatographie (nicht reduziert).



Die Dialyse des gereinigten proBMP-2-Dimers gegen 0,1 M Tris-, Phosphat- beziehungsweise HEPES-Puffer, pH 7,0 führte zur Aggregation des Proteins. Zunächst wurde daher, analog zu den für BMP-2 beschriebenen Reinigungsverfahren, gegen einen sauren Puffer, 10 mM Kalium- oder Ammoniumacetat, pH 4–5, dialysiert [Ruppert *et al.*, 1996; Vallejo *et al.*, 2002; Vallejo & Rinas, 2004]. Eine Aggregation des Proteins konnte dadurch verhindert werden. Anschließend wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Die Ausbeute an proBMP-2 betrug nach diesem Schritt 40–50 %, bezogen auf das zur Renaturierung eingesetzte IB-Protein.

RP-HPLC RP-HPLC wurde als Alternative zur Heparin-Affinitätschromatographie für die Trennung von proBMP-2-Mono- und Dimeren nach der Renaturierung eingesetzt. Jedoch wirkte die Propeptiddomäne störend bei der Reinigung. Bedingt durch die hohen ACN-Konzentrationen und die hohe Temperatur lag sie wahrscheinlich denaturiert vor, so daß die Unterschiede in der Hydrophobizität zwischen monomerer und dimerer Spezies im Fall von proBMP-2 geringer als bei BMP-2 waren. Aufgrund des hohen isoelektrischen Punktes des

Propeptids wurde erst durch Verwendung von Perfluorbuttersäure (HFBA) als Ionenpaar-Reagenz eine optimale Trennung erreicht. Das proBMP-2-Dimer eluierte bei höheren ACN-Konzentrationen (42,4 %, 31,5 min) als das Monomer (41,2 %, 28,0 min; Säule: 150×4 mm YMC Protein-RP; Laufmittel: 100 % H₂O (A), 100 % ACN (B) mit je 0,1 % HFBA; Fluß: 0,5 ml/min; Gradient: 38–48 % ACN in 30 min; Temperatur: 40 °C). Die, verglichen mit dem Monomer, höhere Hydrophobizität des nativen Dimers ist auch charakteristisch für BMP-2, weil sich viele polare Aminosäurereste des Proteins im Kontaktbereich zwischen den Monomeren befinden. Dagegen sind zahlreiche hydrophobe Gruppen, wie beispielsweise Trp²⁸, Trp³¹, Ile⁶², Leu⁶⁶, Tyr¹⁰³ und Met¹⁰⁶, zumindest partiell lösungsmittlexponiert [Scheufler *et al.*, 1999].

Hydroxyapatit-Chromatographie Die unterschiedlichen spektralen Eigenschaften des isolierten Propeptids bei pH 4,7 und pH 7,0 ließen vermuten, daß auch die Propeptiddomäne von proBMP-2 — nach Renaturierung und Reinigung mittels Heparin-Affinitätschromatographie — unter pH 5 nicht in nativer Form vorlag (Abschnitt 3.3.3.3). Daher wurde ein zweiter, im folgenden beschriebener Reinigungsschritt etabliert, der die Gewinnung von nativem proBMP-2 bei pH 7,0 ermöglichte (siehe auch Abschnitt 2.2.4.3).

Zunächst wurde in 10 mM Kaliumacetat pH 4,5 gelöstes proBMP-2 im Verhältnis 1:2 mit 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 gemischt und für etwa zwölf Stunden auf Eis inkubiert; die Proteinkonzentration betrug dabei 1 mg/ml. Das Protein wurde danach auf eine mit 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 äquilibrierte Macro-Prep-CHT-I-Säule aufgetragen (3–3,5 mg Protein je Gramm Säulenmaterial). Nach dem Waschen der Säule mit 0,1 M beziehungsweise 0,2 M Kaliumphosphat in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 über jeweils vier Säulenvolumina, eluierte das Protein in einem Gradienten von 0,2 M bis 0,4 M Kaliumphosphat über zwei Säulenvolumina und zwei weiteren Säulenvolumina mit konstant 0,4 M Kaliumphosphat. Das Eluat wurde gegen 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 dialysiert und auf 1–5 mg/ml konzentriert. Die Ausbeute betrug bei diesem Reinigungsschritt 25 % und somit die Gesamtausbeute nach Renaturierung und Reinigung 8–12 %. Dies entspricht durchschnittlich 25 mg proBMP-2 je Gramm IBs beziehungsweise 2,5 mg je Gramm induzierter Zellen.

Der kritische Schritt bei dieser Reinigung war das Umpuffern des unter sauren Bedingungen solubilisierten proBMP-2 auf pH 7,0 durch Verdünnung in HEPES-Puffer. Hier

nicht gezeigte Vorversuche (SDS-PAGE, Streulichtmessungen) hatten ergeben, daß bei Verdünnung in 0,1–1 M Tris-, Phosphat-, MES- beziehungsweise Arginin-HCl-Puffer der größte Teil des Proteins aggregierte. Dagegen lagen die Verluste durch Aggregation bei Verwendung von 50 mM bis 1,0 M Kalium- beziehungsweise Natrium-HEPES, pH 7,0 unter 20 %. Lediglich 0,1 M Kalium-MOPS, pH 7,0 zeigte ein ähnlich hohes Potential, proBMP-2 in Lösung zu halten. Entscheidend für die Ausbeuten bei der Reinigung mittels Hydroxyapatit-Chromatographie war auch die mehrstündige Inkubationszeit nach dem Umpuffern auf pH 7,0. Bei kürzeren Inkubationszeiten (<1 h) konnten nur geringe Mengen des Proteins erhalten werden. Der größte Teil ($\gg 90\%$) eluierte erst unter denaturierenden Bedingungen (1 M KOH). Die Ausbeuten ließen sich durch längere Inkubationszeiten (<12 h) nicht weiter erhöhen. Die Kinetik wurde hierfür jedoch nicht untersucht. Hervorzuheben ist, daß proBMP-2 bei der Hydroxyapatit-Chromatographie mit einer Puffersubstanz eluiert wurde, die zuvor noch zur nahezu quantitativen Aggregation des Proteins bei pH 7,0 geführt hatte. Kristallisationsversuche hatten zudem gezeigt, daß proBMP-2 nach dieser Reinigung auch in Tris- und Phosphatpuffern (0,1 M bis 1 M) und selbst bei Konzentrationen von bis zu 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ löslich war. Die stark veränderten Löslichkeitseigenschaften des Proteins nach der Reinigung und die in Abschnitt 3.3.3.1 beschriebene spektroskopische Charakterisierung ließen auf eine relativ langsame, pH-induzierte Strukturänderung der Propeptidomäne schließen.

Daß speziell HEPES und MOPS¹ die Löslichkeit von proBMP-2 bei pH 7,0 vermitteln, läßt vermutlich auf die Struktur dieser Puffersubstanzen zurückführen. Beide enthalten einen heterocyclischen Grundkörper mit aliphatischen Substituenten und Sulfonsäure als funktioneller Gruppe. Diese Strukturen sind den Grundbausteinen von Mucopolysacchariden, speziell den sulfatierten Pyranosen ähnlich, wie sie auch in Heparin zu finden sind ((D-Glucuronat-2-sulfat- $\alpha(1\rightarrow4)$ -N-Sulfo-D-glucosamin-6-sulfat)_n). Von BMP-2 ist bekannt, daß sich die Löslichkeit des Proteins durch Heparin erhöhen läßt [Ruppert *et al.*, 1996]. Zudem konnte gezeigt werden, daß sich BMP-2 mit Hilfe von derivatisierten Heterocyclen, wie Nicotinsäure, PPS, PSS und besonders CHES¹, effektiv renaturieren läßt [Vallejo *et al.*, 2002; Vallejo & Rinas, 2004].

¹ CHES = 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure, HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl]-ethansulfonsäure, MOPS = 3-Morpholinopropan-sulfonsäure, PPS = 3-(1-Pyridino)-1-propan-sulfonat, PSS = Pyridin-3-sulfonsäure

3.2.2 Renaturierung & Reinigung von BMP-2

3.2.2.1 Renaturierung von BMP-2

BMP-2 wurde nach dem Protokoll für die Rückfaltung von proBMP-2 renaturiert (Abschnitt 2.2.2). Dazu wurden die IBs in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,5 und 200 mM DTT solubilisiert, und das IB-Solubilisat unter Rühren in Renaturierungspuffer (1,0 M L-Arginin-HCl, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH, pH 8,0) verdünnt. Die Proteinkonzentration betrug 3–3,5 μM . Renaturiert wurde bei 10 °C für fünf bis zehn Tage. Wie auch für proBMP-2 konnten unter diesen Bedingungen etwa 50 % disulfidverbrücktes BMP-2-Dimer erhalten werden (Abb. 3.3, Bahn 4). Die Versuche zur limitierten Proteolyse von proBMP-2 und BMP-2 ließen den Schluß zu, daß es sich bei der dimeren Spezies um nativ gefaltetes BMP-2 handelte (Abschnitt 3.2.4).

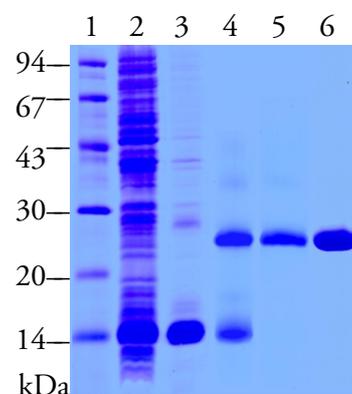
3.2.2.2 Reinigung von BMP-2

Heparin-Affinitätschromatographie Vor der Reinigung von BMP-2 wurde der entsprechende Renaturierungsansatz mittels *cross-flow*-Ultrafiltration auf circa 5 % des Ausgangsvolumens konzentriert. Wie auch im Fall von proBMP-2 konnte dabei in geringem Ausmaß Proteinaggregation beobachtet werden. Anschließend wurde mit Essigsäure ein pH von 5–6 eingestellt, um weiteres *oxido-shuffling* und damit eine Entfaltung bereits nativ disulfidverbrückter Moleküle zu unterbinden. Das Konzentrat wurde gegen 0,1 M Tris, 125 mM Essigsäure, 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff, pH 5,9 dialysiert. Der hohe Harnstoffgehalt des Dialysepuffers bewirkte die vollständige Auflösung der Proteinaggregate.

Die Reinigung wurde bei 5–7 °C auf einer 5 ml-HiTrap™ Heparin-Sepharose HP-Säule durchgeführt (Abschnitt 2.2.4.2). Im Unterschied zu proBMP-2 bestand das Hauptproblem bei der Reinigung von BMP-2 nicht in der Abtrennung der monomeren, sondern der disulfidverbrückten, oligomeren Spezies, obwohl diese nur gering populiert waren. Mit einem zweistufigen NaCl-Gradienten (350 mM und 500 mM) in 4 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 konnten zwar die BMP-2-Monomere abgetrennt werden [Vallejo *et al.*, 2002], die Trennung von BMP-2-Dimeren und -Oligomeren gelang so jedoch nicht. Eine bessere Abtrennung der Oligomere wurden mit dem Puffersystem 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA und 6 M Harnstoff, pH 5,9 mit 1 M NaCl im Eluenten erzielt. BMP-2-Monomere eluierten hier bei 300 mM NaCl und die oligomeren Spezies bei 550 mM NaCl. Jedoch

eluierte bei 550 mM NaCl bereits auch circa die Hälfte der Dimere. Fast ausschließlich dimeres BMP-2 wurde in einem sich anschließenden Stufengradienten von 550 mM auf 700 mM NaCl erhalten. Aufgrund der Verluste bei der Abtrennung der Oligomere betrug die Ausbeute an dimeren BMP-2 nach Renaturierung und Heparin-Affinitätschromatographie maximal 25 % (Abb. 3.3, Bahn 5). Das entspricht 125 mg Protein je Gramm IBs beziehungsweise 9 mg je Gramm induzierter Zellen. Die Reinheit des Proteins lag bei etwa 95 %. Da die Herstellung von BMP-2 lediglich für Referenzzwecke nötig war, wurde die Reinigung des Proteins mittels Heparin-Affinitätschromatographie nicht weiter optimiert. Stattdessen wurde RP-HPLC zur Nachreinigung eingesetzt.

Abbildung 3.3: Rekombinante Herstellung von BMP-2. Heterologe Expression in *E. coli*, IB-Präparation, Renaturierung und Reinigung. Analyse durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Bahn 1: LMW-Marker, Bahn 2: Gesamtzellprotein nach Induktion (reduziert mit β -ME), Bahn 3: IB-Präparation (reduziert mit β -ME), Bahn 4: Probe nach sieben Tagen Renaturierung (nicht reduziert), Bahn 5: BMP-2-Dimer nach Heparin-Affinitätschromatographie (nicht reduziert), Bahn 6: BMP-2-Dimer nach RP-HPLC (nicht reduziert).



RP-HPLC Die Nachreinigung von BMP-2-Fractionen der Heparin-Affinitätschromatographie erfolgte mittels RP-HPLC (Säule: 250×10 mm Nucleosil 500-5 C3 PPN; Laufmittel: 100 % H₂O (A), 100 % ACN (B) mit je 0,05 % TFA; Fluß: 2,5 ml/min; Temperatur: 20 °C). BMP-2-Dimere eluierten in einem Gradienten von 29 % bis 45 % ACN in 40 min bei 34,5 % ACN (39,77 min) in einem einzelnen, symmetrischen Peak, die oligomeren Spezies erst bei höheren ACN-Konzentrationen. BMP-2 konnte so in einer Reinheit von 99 % gewonnen werden (Abb. 3.3, Bahn 6). Die Verluste betragen bei dieser Methode weniger als 10 %.

3.2.3 Renaturierung & Reinigung des Propeptids

3.2.3.1 Renaturierung des Propeptids

Zunächst wurde versucht, das Propeptid unter den gleichen Bedingungen wie proBMP-2 und BMP-2 zu renaturieren. Dazu wurden die IBs in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,5 ohne DTT solubilisiert und in 1,0 M L-Arginin, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0

auf 3–4 μM Protein verdünnt und nach sieben Tagen Renaturierung bei 10 °C mittels *cross-flow*-Ultrafiltration auf 4–5 % des Ausgangsvolumens konzentriert. Nach der anschließende Dialyse gegen 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 konnten nur circa 20 % des Proteins in löslicher Form erhalten werden. Wurde Tris- anstelle des Phosphatpuffers verwendet, betrug die Ausbeute 30 %. Bei der Dialyse des Renaturierungsansatzes gegen 50 mM Natriumacetat, pH 5,0 blieben sogar 45 % des Proteins in Lösung. Die im Anschluß durchgeführte spektroskopische Charakterisierung ergab jedoch, daß das Propeptid bei pH 5,0 nicht in „nativer“ Form vorlag (Abschnitt 3.3.3.3). Es wurde daher eine Methode etabliert, bei der ein höherer Anteil des Proteins in löslicher, „nativer“ Form bei pH 7,0 erhalten werden konnte. Diese beinhaltete eine andere Solubilisierung der IBs, eine Vorreinigung des IB-Solubilisats und eine Renaturierung durch Dialyse.

Für die Solubilisierung der Propeptid-IBs wurde Harnstoff anstelle von GdmCl eingesetzt. Durch den verwendeten Puffer, 6 M Harnstoff, 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA, pH 5,9, wurden zwar nur circa 10 % des Proteins aus den IBs extrahiert (25 mg/g), allerdings blieb der Großteil der zellulären Proteinverunreinigungen in der unlöslichen Fraktion zurück. Um die stark mit dem basischem Protein wechselwirkende DNA- und die gelösten Proteinverunreinigungen zu entfernen, wurde das IB-Solubilisat über Heparin-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung wurde bei 20 °C auf einer 5 ml-HiTrap™ Heparin-Sepharose HP-Säule durchgeführt (Abschnitt 2.2.4.2). Das Puffersystem bestand aus 0,1 M Tris, 0,125 M Essigsäure, 5 mM EDTA und 6 M Harnstoff, pH 5,9 mit 1 M NaCl im Eluenten. Die Säule wurde mit 40–45 mg solubiliertem IB-Protein beladen und bei 200 mM NaCl gewaschen. Das Propeptid eluierte in einem linearen Gradienten von 200 mM bis 700 mM NaCl über 20 Säulenvolumina in einem einzelnen symmetrischen Peak (Maximum bei 400–450 mM NaCl, $\kappa = 27 \text{ mS/cm}$). Proteinverunreinigungen und DNA konnten dadurch sehr effizient abgetrennt werden (Abb. 3.4, Bahn 4).

Die homogenen Fraktionen wurden vereinigt und mit dem gleichen Volumen eines Puffers aus 2 M L-Arginin, 2 M Tris/HCl, pH 8,0 gemischt. Die hochmolar vorliegenden Pufferbestandteile wurden durch Dialysen gegen 1 M Tris/HCl, pH 8,0 und 25 mM Kalium-HEPES, pH 7,0 entfernt. Während Harnstoff relativ schnell durch die Dialysemembran diffundiert, haben Dialyseexperimente mit L-Arginin gezeigt, daß diese Aminosäure nur sehr langsam dialysiert. Dadurch waren bei der Dialyse des Propeptids vorübergehend Bedingungen gegeben, unter denen das Protein falten konnte, ohne zu aggregieren. Zwar stellte die Mischung mit

dem Arginin/Tris-Puffer auch eine Verdünnung dar, jedoch ließen die im Anschluß durchgeführten Untersuchungen zur Stabilität des Proteins den Schluß zu, daß das Propeptid unter diesen Bedingungen noch immer denaturiert vorlag (Abschnitt 3.4). Die Renaturierung muß also während der nachfolgenden Dialyse stattgefunden haben, bei der weniger als 35 % des Proteins aggregierten. Somit konnten mehr als 65 % Protein durch Dialyse in eine lösliche Form überführt werden. Die Reinigung des renaturierten Propeptids erfolgte über Hydroxyapatit-Chromatographie (Abschnitt 3.2.3.2).

Die hohe Tris-Konzentration in dem zur Mischung mit dem gereinigten IB-Solubilisat verwendeten Puffer wurde vor allem deshalb gewählt, weil dadurch die Carbamoylierung der Aminogruppen von Proteinen durch Isocyanat effektiv unterbunden werden kann [Imoto & Yamada, 1997]. Diese Gefahr besteht vor allem bei längerer Inkubation in alkalischen Harnstofflösungen [Hagel *et al.*, 1971]. Zudem wird Tris auch als Additiv bei der Renaturierung von Proteinen eingesetzt [Müller *et al.*, 2003]. Neben den in Abschnitt 2.2.2 erwähnten Maßnahmen bei der Pufferherstellung wurde sichergestellt, daß die Verweilzeit des Propeptids in den Harnstofflösungen bis zur Zugabe des Arginin/Tris-Puffers weniger als 24 h betrug. Die im Anschluß durchgeführte Überprüfung durch ESI-Massenspektrometrie ergab daher auch keine Hinweise auf chemische Modifikationen des Proteins.

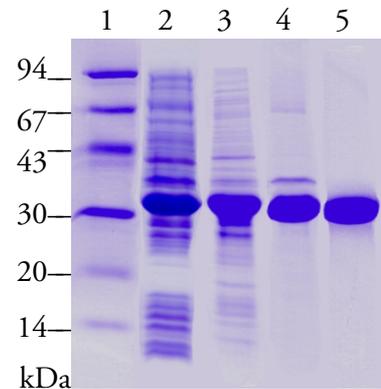
3.2.3.2 Reinigung des Propeptids

Analog zu proBMP-2 wurde auch das Propeptid nach der Renaturierung mittels Hydroxyapatit-Chromatographie gereinigt. Das Protein wurde auf eine mit 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 äquilibrierte Macro-Prep-CHT-I-Säule aufgetragen (5 mg Protein je Gramm Säulenmaterial). Als Eluent diente 0,1 M Kalium-HEPES, 1 M Kaliumphosphat, pH 7,0. Die Säule wurde mit zwei beziehungsweise drei Säulenvolumina ohne und mit 70 mM Kaliumphosphat gewaschen. Im Anschluß an einen Gradienten von 70 mM bis 250 mM Kaliumphosphat über zwei Säulenvolumina erfolgte die Elution über drei bis vier Säulenvolumina mit 250 mM Kaliumphosphat ($\kappa = 31 \text{ mS/cm}$). Die homogenen Fraktionen wurden vereinigt, in PEG 35000 auf 50 % des ursprünglichen Volumens konzentriert und gegen 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 dialysiert.

Das Propeptid konnte so in hoher Reinheit gewonnen werden (Abb. 3.4, Bahn 5). Die Ausbeute betrug etwa 80 %. Die verbleibenden 20 % des Proteins, bei denen es sich wahrscheinlich um falsch gefaltete, aggregierte Spezies handelte, konnten nur mit 1 M KOH von

der Säule desorbiert werden. Bezogen auf das zur Renaturierung eingesetzte IB-Protein wurde insgesamt eine Ausbeute von 52 % erzielt. Das entspricht 130 mg Propeptid je Gramm IBs beziehungsweise 12 mg je Gramm Zellen.

Abbildung 3.4: Rekombinante Herstellung des BMP-2-Propeptids. Heterologe Expression in *E. coli*, IB-Präparation, Renaturierung und Reinigung. Analyse durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Bahn 1: LMW-Marker, Bahn 2: Gesamtzellprotein nach Induktion, Bahn 3: IB-Präparation, Bahn 4: über Heparin-Sepharose gereinigtes IB-Protein, Bahn 5: BMP-2-Propeptid nach Renaturierung und Reinigung mittels Hydroxyapatit-Chromatographie.

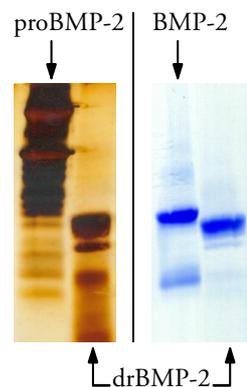


3.2.4 Gewinnung von drBMP-2

Um die biologische Aktivität und damit die native Struktur der BMP-Domäne von renaturiertem proBMP-2 zweifelsfrei nachzuweisen, war es notwendig, das Propeptid durch limitierte Proteolyse abzuspalten. ProBMPs werden in eukaryontischen Organismen im Golgi-Apparat durch eine oder mehrere Subtilisin-ähnliche Proprotein-Konvertasen (SPCs), wie Furin (SPC1) prozessiert, welche relativ spezifisch Peptidbindungen nach einem dibasischen Sequenzmotiv (–Arg–X–Arg/Lys–Arg–) spalten [Cui *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 1992].

Zwar wurde Furin im analytischen Maßstab auch schon für die *in-vitro*-Prozessierung von proBMP4 eingesetzt [Cui *et al.*, 1998, 2001], für die präparative Prozessierung von *in vitro* renaturiertem proBMP-2 wurde jedoch Trypsin verwendet, welches ebenfalls, allerdings erheblich unspezifischer, Peptidbindungen nach basischen Aminosäureresten spaltet. Dafür wurde das Protein – unmittelbar nach der Konzentrierung des Renaturierungsansatzes – in zwei Dialyseschritten auf 4 M Harnstoff, 1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 umgepuffert (Abschnitt 2.2.3.7). Die Verluste durch Aggregation betragen dabei weniger als 10 %. Bei Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 mg/ml und 3 mg/ml wurde anschließend mit Trypsin im Verhältnis 1:100 (w/w) zwölf Stunden auf Eis verdaut. Die Proteolyse wurde durch Zugabe eines mindestens achtfachen molaren Überschusses Trypsin-Inhibitor gestoppt.

Abbildung 3.5: Prozessierung von proBMP-2 und BMP-2 zu drBMP-2 mittels Trypsin. Analyse durch nicht-reduzierende SDS-PAGE und Silberfärbung (proBMP-2, links) bzw. Coomassie-Färbung (BMP-2, rechts). Jeweils linke Bahn vor und rechte Bahn nach Proteolyse. (Versuchsbedingungen im Text.)



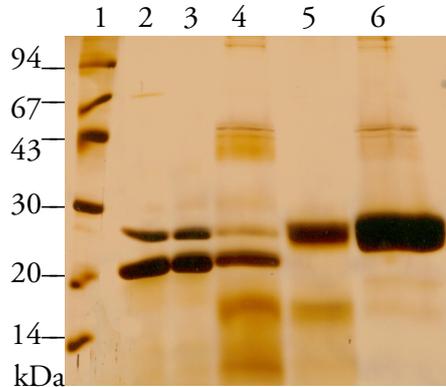
Bei der Analyse durch SDS-PAGE wurde festgestellt, daß die Propeptidomäne vollständig von der BMP-Domäne durch Trypsin abgespalten worden war. Der Kontrollversuch mit BMP-2 ergab zudem, daß neben den falsch gefalteten monomeren auch die oligome-

ren BMP-Spezies vollständig abgebaut wurden, während die native, dimere Spezies resistent gegen die Proteolyse mit Trypsin war (Abb. 3.5). Die Trypsin-Resistenz von BMPs ist bekannt und wurde daher als Hinweis auf die native Struktur von renaturiertem proBMP-2 beziehungsweise BMP-2 gewertet [Groppe *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 1994]. Erwartungsgemäß ergab die N-terminale Sequenzierung die Abpaltung der Heparinbindestelle der BMP-Domäne, wobei ein Verhältnis der Proteolyseprodukte von etwa 3:2:1, bezogen auf die Spaltung nach den Aminosäureresten Arg⁹, Arg⁷ beziehungsweise Lys⁸, ermittelt wurde. Diese Werte ergaben sich aus der chromatographischen Analyse des Edman-Abbaus. BMP-2 ohne Heparinbindestelle wird als *digit removed* BMP-2 (drBMP-2) bezeichnet [Koenig *et al.*, 1994].

Die Reinigung von drBMP-2 erfolgte durch HIC und ist in Abschnitt 2.2.4.5 detailliert beschrieben (siehe auch Rudolph *et al.* [2002]). Trypsin und Trypsin-Inhibitor wurden dabei im Durchlauf aufgefangen beziehungsweise durch Waschen der Säule mit Dialysepuffer und 4 M Harnstoff, pH 5 erhalten (Abb. 3.6, Bahn 2–4). Mittels einer hier nicht dargestellten Analyse durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei der Bande im Bereich von 25 kDa in den Bahnen 2 und 3 in Abbildung 3.6 nicht um drBMP-2 handelte, sondern um Trypsin ($M_r = 23,3$ kDa), welches in der drBMP-2-Elutionsfraktion nicht mehr nachweisbar war. Beim Waschen mit Harnstoff und mit L-Arginin-HCl wurden die Abbaufragmente und ein geringer Teil drBMP-2 eluiert (Abb. 3.6, Bahn 4 und 5). Die Hauptfraktion drBMP-2 wurde durch Elution mit 6 M GdmCl, 0,2 M Essigsäure erhalten (Abb. 3.6, Bahn 6). Bezogen auf die theoretisch mögliche Menge betrug die Ausbeute an drBMP-2 nach Prozessierung und Reinigung etwa 90 %. Damit ließen sich — bezogen auf eine Renaturierungsausbeute von 50 % — 30 mg drBMP-2 je Gramm IBs

beziehungsweise 3 mg je Gramm induzierter Zellen aus proBMP-2 gewinnen und aus BMP-2 sogar 205 mg je Gramm IBs beziehungsweise 14 mg je Gramm induzierter Zellen.

Abbildung 3.6: Reinigung von drBMP-2 durch HIC (Fractogel[®]EMD Phenyl (S)). Analyse durch nicht-reduzierende SDS-PAGE und Silberfärbung. Bahn 1: LMW-Marker, Bahn 2: Durchlauf, Bahn 3–5: Waschfraktionen (50 mM Tris, pH 7,5; 4 M Harnstoff, pH 5; 1 M L-Arginin-HCl, pH 5), Bahn 6: drBMP-2-Elutionsfraktion (6 M GdmCl, 0,2 M Essigsäure). Die breite drBMP-2-Bande in Bahn 6 ist das Resultat des inhomogenen NH₂-Terminus des Proteins.



3.2.5 Die Herstellung der BMP-2-Varianten im Vergleich

In Tabelle 3.2 sind die Ausbeuten für die drei BMP-Varianten nach Renaturierung und Reinigung noch einmal zusammengefaßt.

Tabelle 3.2: Ausbeuten an BMP-2, proBMP-2 und BMP-2-Propeptid nach Renaturierung und Reinigung (im Fall von drBMP-2 einschließlich Prozessierung). Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die zur Renaturierung eingesetzte Proteinmenge, die anderen auf die in Abschnitt 3.1 beschriebene Expression der cDNAs in *E. coli* (siehe auch Tab. 3.1).

Variante	%	mg/g IBs	mg/g Zellen	mg/l Kulturvolumen
proBMP-2	10	25	2,5	375
BMP-2	25	125	9	900
Propeptid	52	130	12	1800
drBMP-2 aus proBMP-2	45	30	3	450
drBMP-2 aus BMP-2	45	205	14	1400

Die Renaturierung von BMP-2 und proBMP-2 unter identischen Bedingungen hatte keinen signifikanten Einfluß der Propeptiddomäne auf die Faltung der BMP-Domäne gezeigt. In beiden Fällen konnten circa 50 % natives BMP-2 beziehungsweise proBMP-2 erhalten werden. Daß die dimeren Formen die nativen, biologischen aktiven sind, zeigen die in Abschnitt 3.3.1 vorgestellten Ergebnisse. Im Unterschied dazu konnte Rattenholl für proNGF eine Erhöhung der Faltungsausbeute um den Faktor 70 gegenüber NGF unter Bedingungen, die fast

identisch mit den für proBMP-2 gewählten waren, zeigen [Rattenholl, 2001; Rattenholl *et al.*, 2001a,b]. Außerdem faltete proNGF deutlich schneller als NGF. Während also das NGF-Propeptid auf die Faltung des Cystin-Knoten-Proteins NGF *in vitro* einen katalytischen Einfluß hat, scheint das bei BMP-2 nicht der Fall zu sein. Rückschlüsse auf die *in vivo*-Faltung des Proteins erlauben die Ergebnisse jedoch nicht. Daß das Propeptid für die *in vitro*-Faltung von BMP-2 nicht erforderlich ist, konnte auch von Vallejo *et al.* gezeigt werden. Die Autoren hatten eine Methode zur Herstellung von BMP-2 entwickelt, die ebenfalls Faltungsausbeuten von über 50 % ermöglicht und auf der Renaturierung des Proteins in hochkonzentrierten CHES-Puffern basiert [Vallejo *et al.*, 2002; Vallejo & Rinas, 2004].²

Besonders hohe Ausbeuten lieferte das Verfahren zur Gewinnung von drBMP-2. Das lag vor allem daran, daß die falsch gefalteten (pro)BMP-2-Spezies proteolytisch abgebaut wurden, was die Reinigung des nativen, dimeren drBMP-2 erleichterte. Die dabei zur Elution des Proteins von dem hydrophoben Säulenmaterial verwendeten denaturierenden Bedingungen hatten offenbar keinen Einfluß auf dessen biologische Aktivität (Abschnitt 3.3.1). Ähnlich drastische Bedingungen fanden bereits bei der BMP-Gewinnung aus Knochen erfolgreichen Einsatz [z.B.: Sampath *et al.*, 1987; Urist *et al.*, 1973, 1982; Wang *et al.*, 1988]. Diese Verfahren hatten gezeigt, daß BMPs auch nach Extraktion mit Salzsäure und mehrwöchiger Behandlung mit hohen Konzentrationen GdmCl und Harnstoff noch immer biologisch aktiv waren [Wozney, 2002].

Die hier vorgestellten Experimente sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt die einzigen veröffentlichten zur *in vitro*-Renaturierung eines Propeptids der BMP-Familie beziehungsweise eines BMP-Proteins [Rudolph *et al.*, 2002]. Zwar konnten proBMPs schon aus Zellkulturüberständen isoliert werden [z.B.: Cui *et al.*, 1998], für die biophysikalische Charakterisierung sind die auf diese Weise erhältlichen Proteinmengen jedoch nicht ausreichend und die Proteine selbst zu heterogen. Die verglichen mit BMP-2 geringeren Ausbeuten an proBMP-2 nach der Reinigung sind darauf zurückzuführen, daß die beiden „Domänen“ des Proteins in zwei separaten Schritten renaturiert wurden. Das Verfahren kann daher als nicht ideal betrachtet werden. Die Ausbeuten und die Reinheit des Proteins waren allerdings hoch genug, um die in den folgenden Abschnitten präsentierten Untersuchungen zu ermöglichen.

² Siehe auch Anmerkungen auf S. 60.

3.3 CHARAKTERISIERUNG DER BMP-VARIANTEN

3.3.1 Biologische Aktivität von BMP-2, drBMP-2 & proBMP-2

3.3.1.1 Aktivität von drBMP-2 und proBMP-2 im Tiermodell

Die biologische Aktivität von drBMP-2 wurde zunächst im Tiermodell nachgewiesen. Der Tierversuch und die histologische Untersuchung wurde von Dr. Gerhard Herr (*Advanced Tissue Regeneration GmbH*, Wetzlar) durchgeführt und ist im Methodenteil beschrieben (Abschnitt 2.2.8). Es wurde sowohl drBMP-2 als auch proBMP-2 auf die Induktion ektoptischer Knochenneubildung *in vivo* untersucht. Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen (50 % ACN in H₂O (v/v)) in äquimolaren Mengen auf Trägermaterial aus poröser Keramik eingetrocknet und die so behandelten Keramikwürfel in die Bauchmuskulatur acht ausgewachsener Ratten implantiert. Jedes Tier erhielt vier Implantate; zwei davon waren mit proBMP-2, eines mit drBMP-2 und das vierte lediglich mit dem Lösungsmittel behandelt worden. Nach 30 Tagen Liegedauer wurden die Implantate mit dem umgebendem Gewebe entnommen und makroskopisch und histologisch auf Knochenneubildung untersucht.

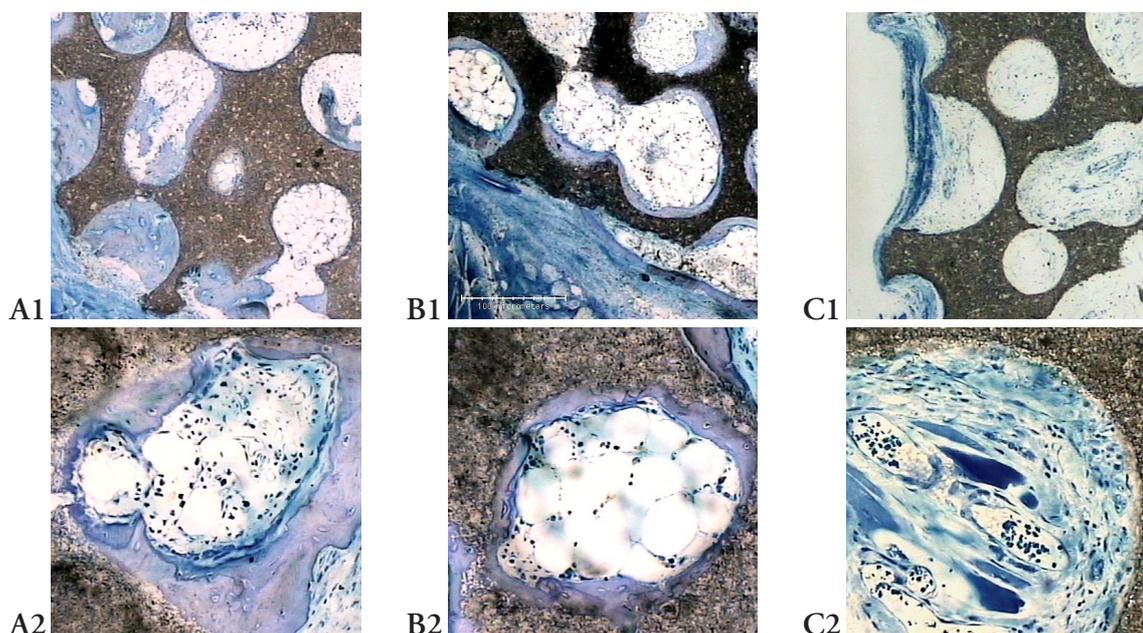
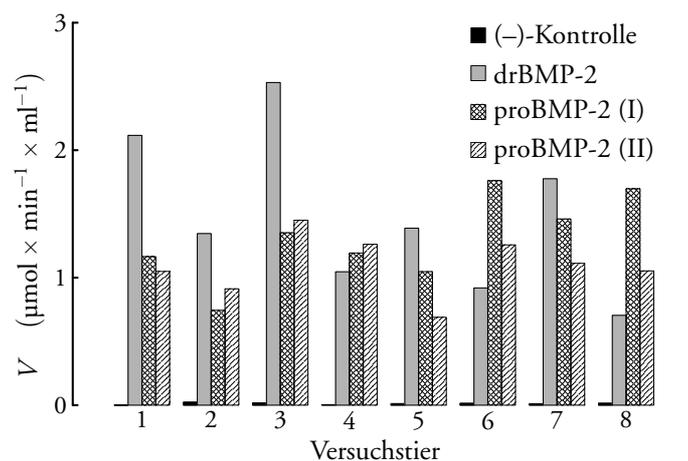


Abbildung 3.7: Aktivität von drBMP-2 und proBMP-2 im Tiermodell. Beschichtete und unbeschichtete Keramikimplantate nach 30 Tagen Liegedauer in der Bauchmuskulatur von Ratten (Färbung mit Toluidin O). (1) Übersichtsaufnahmen. (2) Detailaufnahmen. (A) drBMP-Implantat. (B) proBMP-Implantat. (C) Kontroll-Implantat ohne Protein. (Tierversuch, Präparate und Aufnahmen: Dr. Gerhard Herr (*Advanced Tissue Regeneration GmbH*, Wetzlar).)

Die Abbildungen 3.7 A/B zeigen deutlich Knochensubstanz, erkennbar an der violetten Anfärbung, und das für Knochenmark charakteristische hämatopoietische Gewebe mit weißen Fettzellen in den Poren der grauen bis schwarzen Keramikmatrix. Die in den Abbildungen 3.7 A2/B2 im Übergang vom Knochenmark zur Knochensubstanz sichtbaren länglichen, blau angefärbten Zellen sind Osteoblasten. Bei allen drBMP- (8/8) und proBMP-Implantaten (16/16) konnte histologisch eindeutig Knochenneubildung nachgewiesen werden. Die osteoinduktive Aktivität betrug also für beide BMP-Varianten 100 %. Dagegen waren die Kontrollimplantate ohne Protein ausschließlich bindegewebig eingescheidet. Hier ließ sich in keinem Fall (0/8) Knochenbildung nachweisen (Abb. 3.7 C1/2).

Die histologischen Ergebnisse konnten im Anschluß durch Quantifizierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Implantaten bestätigt werden. In Abbildung 3.8 sind die ermittelten Enzymaktivitäten für die Implantate der acht Versuchstiere in einem Säulendiagramm veranschaulicht.

Abbildung 3.8: Aktivität von drBMP-2 und proBMP-2 im Tiermodell. Alkalische Phosphatase-Aktivität in den Implantaten der acht Versuchstiere.



Dem Blockdesign des Tierversuchs entsprechend wurden die AP-Aktivitäten in den einzelnen Implantaten mittels Rangvarianzanalyse für mehrere verbundene Stichproben ausgewertet [Sachs, 1992]. Für den FRIEDMAN-Test wurden mittlere Ränge für die zwei proBMP-2-Implantate je Versuchstier vergeben. In diesem Fall war $\hat{\chi}_R^2 = 0,75$ und damit kleiner als $\chi_{R,2,7;0,05}^2 = 6,25$. Deshalb konnte die Hypothese, daß sich drBMP-2 und proBMP-2 in ihren Aktivitäten nicht unterscheiden, auf dem 5 %-Niveau nicht abgelehnt werden. Für den paarweisen Vergleich nach WILCOXON & WILCOX wurden keine mittleren Ränge vergeben. Die Differenz zwischen der drBMP-2-Rangsumme und jeweils einer proBMP-2-Rangsumme

betrug maximal 7 und war damit kleiner als der kritische Wert für $\alpha = 0,05$ von 9,4. Die beobachteten Differenzen waren damit als zufällig einzustufen.

Der Nachweis der Induktion ektopischer Knochenneubildung durch drBMP-2 ist gleichzeitig ein Beweis für die korrekte Faltung des Proteins. Die bei der Renaturierung gebildeten proBMP-2-Dimere enthalten also sehr wahrscheinlich die BMP-Domäne in der nativen, biologisch aktiven Struktur. Ein andere Erklärung wäre, daß die disulfidverbrückte und trypsinresistente BMP-Domäne erst nach Abspaltung der Propeptidomäne und unter physiologischen Bedingungen spontan in die biologisch aktive Konformation falten kann.

ProBMPs sind jedoch — bezogen auf die durch Bindung an die BMP-Rezeptoren ausgelösten Effekte — als biologisch inaktiv beschrieben worden; allerdings wird eine regulatorische Funktion der BMP-Propeptide seit einigen Jahren intensiv erforscht [zum Beispiel: Beck *et al.*, 2002; Constam & Robertson, 1999; Cui *et al.*, 1998, 2001; Kessler & Melton, 1995]. Daß auch proBMP-2 in diesem Versuch biologische Aktivität zeigt, läßt sich durch proteolytischen Abbau des Propeptids *in vivo* erklären. Wirksam ist also auch hier sehr wahrscheinlich nur die BMP-Domäne. Die Möglichkeit der extrazellulären Prozessierung von proBMPs durch Furin ist bereits nachgewiesen worden [Beck *et al.*, 2002]. Da zudem operative Eingriffe, wie der hier durchgeführte, auch entzündungsähnliche Reaktionen hervorrufen, ist die Anwesenheit von anderen Proteasen im Bereich des Implantats sehr wahrscheinlich. Die Empfindlichkeit des Propeptids gegenüber Proteolyse konnte auch bei der Renaturierung und Reinigung von proBMP-2 und dem Propeptid beobachtet werden (Abschnitte 3.2.1.1 & 3.2.3.1).

Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß proBMP-2 — möglicherweise vermittelt über eine andere Signalkaskade — ebenfalls biologisch aktiv ist und einen Einfluß auf die Knochenneubildung hat. Für eine biologische Relevanz von proBMP-2 (und auch proBMP-6) sprechen die Untersuchungen von Lories *et al.* zur Expression von *bmp-2/6* in von rheumatoider Arthritis befallenen Geweben [Lories *et al.*, 2003].

3.3.1.2 Aktivität von drBMP-2 und BMP-2 in Zellkultur

Der Nachweis der biologischen Aktivität von drBMP-2 und BMP-2 in Zellkultur wurde im Rahmen einer Diplomarbeit am *Institut für Biotechnologie* der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erbracht [Krause, 2003]. Die von Krause ermittelte Abhängigkeit der induzierten alkalischen Phosphatase-Aktivität von der drBMP-2-Konzentration im Kulturüberstand von C2C12-Zellen ist in Abbildung 3.9 A dargestellt; Abbildung 3.9 B zeigt die Auswertung

der Vergleichsmessung mit BMP-2. Krause berechnete die halbsättigenden Konzentrationen für drBMP-2 zu $EC_{50} = 18,8 \pm 3,1$ nM und für BMP-2 zu $EC_{50} = 18,3 \pm 3,5$ nM. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem von Kirsch *et al.* [2000a] publizierten EC_{50} -Wert von 20 ± 10 nM überein. In diesem Test konnte keine biologische Aktivität von proBMP-2 nachgewiesen werden. Diese Tatsache wurde als Hinweis auf die native Struktur des renaturierten proBMP-2 gewertet. Die Latenz von Proproteinen der TGF- β -Familie ist außer für TGF- β 1, - β 2 und - β 3 beispielsweise auch für *Nodal*, Vg1 und BMP-4 gezeigt worden [Beck *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 1990; Cui *et al.*, 1998; Kessler & Melton, 1995; Lioubin *et al.*, 1991].

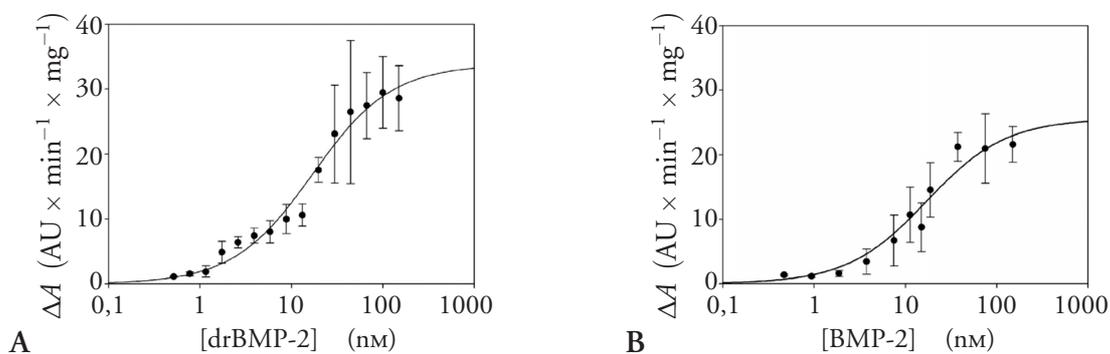


Abbildung 3.9: Abbildung nach Krause [2003]. Induktion der alkalischen Phosphatase in C2C12-Zellen durch drBMP-2 (A, $EC_{50} = 18,8 \pm 3,1$ nM) bzw. BMP-2 (B, $EC_{50} = 18,3 \pm 3,5$ nM). Mittelwerte von Vierfachbestimmungen \pm Standardabweichung. Die unterschiedlichen Aktivitäten resultierten aus unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Die biologische Aktivität von drBMP-2 war also im Zellkulturtest mit der von BMP-2 vergleichbar. Unter Zellkulturbedingungen waren große Unterschiede in der biologischen Aktivität zwischen diesen beiden BMP-Varianten auch nicht zu erwarten, da die bei drBMP-2 fehlende Heparin-Bindestelle nicht an der Wechselwirkung von BMP-2 mit dem Rezeptor IA beteiligt ist [Kirsch *et al.*, 2000b]. Dagegen hat die Fähigkeit zur Heparinbindung, also zur Interaktion mit der extrazellulären Matrix, *in vivo* Einfluß auf die lokale Konzentration und Verfügbarkeit, sowie die Diffusion des Proteins. Die Modifizierung der biologischen Aktivität von BMP-2 durch Entfernung beziehungsweise Veränderung der Heparinbindestelle konnte durch Koenig *et al.* [1994] und Ruppert *et al.* [1996] gezeigt werden. Die biologische Bedeutung der Wechselwirkung von Mucopolysacchariden (als Bestandteil von Proteoglycanen) mit BMPs beziehungsweise mit BMP-Antagonisten wird erst seit kurzem untersucht [Fujise *et al.*, 2003; Paine-Saunders *et al.*, 2002; Viviano *et al.*, 2004] (siehe auch Einleitung, S. 8ff).

3.3.2 Oligomerisierung von proBMP-2 & des Propeptids

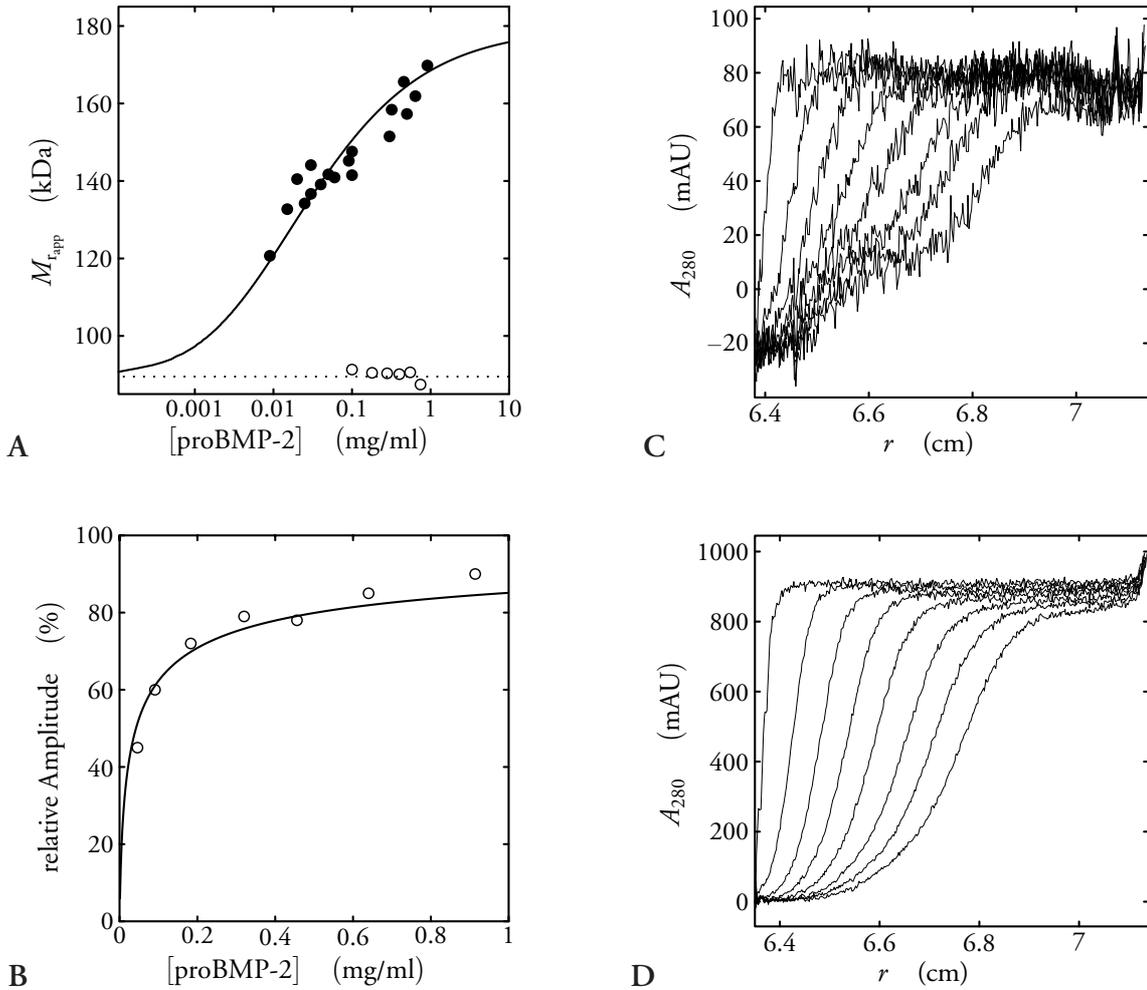


Abbildung 3.10: Analytische Ultrazentrifugation von proBMP-2. (A) Aus Gleichgewichtsläufen ermittelte apparente Molekularmassen in 0,1 M Kalium-HEPES, 0,3 M Kaliumphosphat, pH 7,0 (●) und in 0,1 M Kalium-HEPES, 0,7 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 (○) bei 10 °C beziehungsweise 20 °C. Auswertung nach Gleichung 2.28 (durchgehende Linie) bzw. mittlerer Wert für $M_{r,app}$ (gepunktete Linie). Die Proben wurden bei 10000 rpm für 116 h äquilibriert. (B,C,D) Sedimentationslauf in 0,1 M Kalium-HEPES, 0,3 M Kaliumphosphat, pH 7,0. Die Proben wurden bei 10 °C und 40000 rpm sedimentiert. Abhängigkeit der Absorption bei $\lambda = 280$ nm vom Abstand zur Rotationsachse gemessen in Intervallen von 20 min bei einer Proteinkonzentration von (C) 91 µg/ml bzw. (D) 910 µg/ml. (B) Die relative Amplitude der schnell sedimentierenden Spezies (○) sowie die Auswertung nach Gleichung 2.32 (durchgehende Linie).

Oligomerisierung von proBMP-2 Die Oligomerisierung von proBMP-2 wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß renaturiertes, kovalent dimerisiertes proBMP-2 gemäß $2(\text{proBMP})_2 \rightleftharpoons ((\text{proBMP})_2)_2$ in Lösung zu Tetrameren assoziiert.

Die in der Gleichgewichtssedimentation ermittelte Abhängigkeit der apparenten Molekularmasse von der Proteinkonzentration ist in Abbildung 3.10 A dargestellt. Aus dieser Abhängigkeit ließ sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 1,03 \times 10^{-7} \pm 0,12 \times 10^{-7} \text{ M}$ berechnen. Außerdem wurde die Oligomerisierung von proBMP-2 in Gegenwart von 0,7 M L-Arginin untersucht, da dieses Additiv zur Unterdrückung der Proteinaggregation bei der chemisch induzierten Denaturierung eingesetzt wurde (Abschnitt 3.4). Hierbei konnte keine Assoziation zu Tetrameren festgestellt werden.

In dem Experiment zur Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit ließ sich die tetramere von der dimeren proBMP-2-Spezies trennen. In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration wurden so verschiedene Sedimentationsprofile erhalten (Abb. 3.10 C/D). Die Gleichgewichtseinstellung mußte demzufolge deutlich länger dauern, als das Sedimentationsexperiment. Die Dissoziationsgeschwindigkeit der Tetramere mußte demzufolge sehr gering sein. Die Auswertung der relativen Amplituden der langsam sedimentierenden, dimeren und der schneller sedimentierenden, tetrameren Spezies des Proteins ergab — in guter Übereinstimmung mit dem Gleichgewichtslauf — eine Dissoziationskonstante von $K_D = 1,56 \times 10^{-7} \pm 0,21 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Abb. 3.10 B).

Oligomerisierung des Propeptids Der Gleichgewichtssedimentation ließ auf eine Dimerisierung des Propeptids schließen. Die Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit des apparenten Molekulargewichts ergab eine Dissoziationskonstante des Dimers von $9,19 \times 10^{-6} \pm 1,50 \times 10^{-6} \text{ M}$ (in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 bei 20 °C; Abb. 3.11 A). Die Datenmenge des Sedimentationslaufes war für eine Auswertung nach Gleichung 2.27 nicht ausreichend. Daß die apparenten s -Werte dennoch einer nicht-kovalenten Dimerisierung des Propeptids entsprachen, konnte durch das Einsetzen des aus dem Gleichgewichtslauf erhaltenen K_D in Gleichung 2.27 gezeigt werden (Abb. 3.11 B). Die Parameteranpassung ergab apparente s -Werte für die monomere und dimere Spezies des Propeptids, s_M und s_D , von $1,16 \pm 0,19 \text{ S}$ beziehungsweise $4,34 \pm 0,22 \text{ S}$. Allerdings war der Wert von s_M für eine Molekularmasse von 32 kDa zu gering. Die unzureichende Datenmenge ist darauf zurückzuführen,

daß das Propeptid bei niedrigen Konzentrationen zur Aggregation beziehungsweise Adsorption an die Oberflächen der Meßzellen neigte. Das wiederum spricht für die Instabilität der monomeren Spezies. Wie auch im Fall von proBMP-2 wurde die Assoziation des Propeptids durch 0,7 M L-Arginin-HCl vollständig unterdrückt.

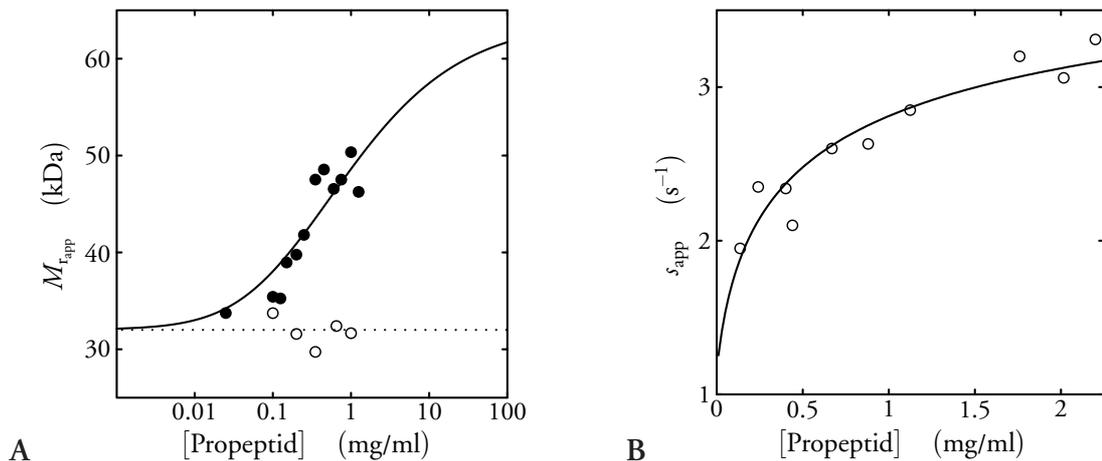


Abbildung 3.11: Analytische Ultrazentrifugation des BMP-2-Propeptids. (A) Gleichgewichtsläufe bei 20 °C in 0,1 M K-HEPES, pH 7,0 (●) bzw. in 0,1 M K-HEPES, 0,7 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 (○). Die Proben wurden bei 20000 rpm für 95 h äquilibriert. (B) Sedimentationslauf in 0,1 M K-HEPES, pH 7,0 bei 20 °C und 40000 rpm (Anhängigkeit des apparenten s -Wertes von der Proteinkonzentration). Die für die Auswertung verwendeten Gleichungen finden sich im Methodenteil (Abschnitt 2.2.7).

Die für das Propeptiddimer und das proBMP-2-Tetramer ermittelten Dissoziationskonstanten sind so hoch, daß es fraglich ist, ob die Oligomerisierungen der beiden Proteine physiologisch relevant ist. Zwar konnte eine Dimerisierung auch für das Propeptid von TGF- β 1, β 1-LAP, gezeigt werden, allerdings sind die β 1-LAP-Monomere über zwei Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft [Brunner *et al.*, 1989].

Da bislang keine Hinweise auf eine Assoziation von BMP-Dimeren vorliegen, ist es sehr wahrscheinlich, daß die für proBMP-2 gezeigte Oligomerisierung auf Wechselwirkungen der zwei Propeptidomänen in jedem proBMP-2-Dimer mit den beiden Propeptidomänen des jeweils anderen zurückzuführen ist. Die Tatsache, daß in jedem proBMP-2-Dimer die doppelte Anzahl von Interaktionspartnern vorhanden ist, erklärt auch die im Vergleich zu Propeptid deutlich kleinere Dissoziationskonstante.

3.3.3 Spektroskopische Charakterisierung der BMP-Varianten

3.3.3.1 Spektroskopische Charakterisierung von proBMP-2

UV-Absorption In Abbildung 3.12 sind die UV-Spektren (A) und die dazugehörigen UV-Differenzspektren (B) von proBMP-2 vor und nach der Renaturierung und Reinigung dargestellt. Deutlich zu erkennen ist eine Batho- und Hypochromie des Absorptionsspektrums von renaturiertem und gereinigtem proBMP-2 in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 gegenüber dem Spektrum von denaturiertem proBMP-2. Die veränderten Absorptionseigenschaften des renaturierten Proteins — insbesondere die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums (Bathochromie) — sind ein Hinweis auf eine im Vergleich mit dem denaturierten Protein hydrophobere Umgebung der aromatischen Aminosäurereste — ein typisches Strukturmerkmal globulärer löslicher Proteine. Die zwei Maxima bei 287 und 292 nm in dem entsprechenden Differenzspektrum lassen sich Tyrosin- beziehungsweise Tryptophanresten von proBMP-2 zuordnen [Donovan *et al.*, 1958; Laskowski Jr. *et al.*, 1956; Scheraga, 1957; Schmid, 1997; Yanari & Bovey, 1960]. Allerdings wies auch das Absorptionsspektrum von renaturiertem proBMP-2 in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 gegenüber dem in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 eine Batho- und Hypochromie auf, wobei die Bathochromie im Vergleich zu der gegenüber dem denaturierten Protein geringer ausgeprägt war. Das entsprechende Differenzspektrum zeigt zwei Maxima bei 287 und 295 nm. Wie bereits vermutet, lag also renaturiertes proBMP-2 bei niedrigem pH partiell denaturiert vor.

Beim Vergleich der Differenzspektren von proBMP-2 mit denen von BMP-2 (Abb. 3.16, S. 83) und des Propeptids (Abb. 3.19, S. 87) fallen die unterschiedlichen relativen Intensitäten und die Lage der Tryptophan- und Tyrosinmaxima, sowie die Ausprägung des dazwischen liegenden Minimums auf. Das Differenzspektrum zwischen renaturiertem proBMP-2 bei pH 4,7 und denaturiertem proBMP-2 ähnelt diesbezüglich dem zwischen renaturiertem und denaturiertem BMP-2. Das Differenzspektrum zwischen renaturiertem proBMP-2 bei pH 7,0 und pH 4,7 ist dagegen dem zwischen renaturiertem Propeptid bei pH 7,0 und pH 4,7 ähnlich. Die Lage der Tryptophanmaxima in den Differenzspektren zwischen renaturiertem und denaturiertem BMP-2, $\lambda_{\max\text{Trp}}^{\Delta\epsilon} = 293 \text{ nm}$, sowie zwischen renaturiertem proBMP-2 bei pH 4,7 und denaturiertem proBMP-2, $\lambda_{\max\text{Trp}}^{\Delta\epsilon} = 292 \text{ nm}$, können mit der partiellen Lösungsmittelexposition von Trp²⁸ im gefalteten BMP-2 erklärt werden [Scheufler *et al.*, 1999].³ Im

³ Zu den Tryptophanresten von BMP-2 siehe auch Abschnitt 3.3.3.2, S. 82f.

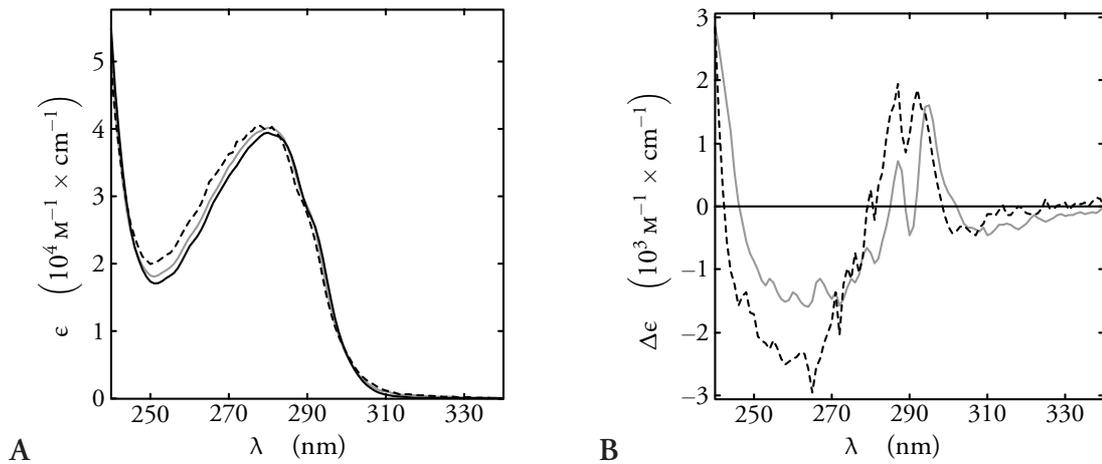


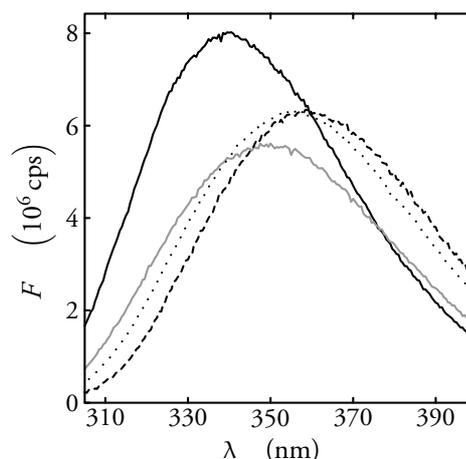
Abbildung 3.12: (A) UV-Spektren von in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 denaturiertem proBMP-2 (unterbrochene Linie), von proBMP-2 nach Renaturierung und Reinigung in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 (graue Linie) beziehungsweise in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (schwarze Linie) aufgenommen bei 20 °C mit einem Beckman DU 7400 Diodenarray-Spektrophotometer mit 1 nm Auflösung in einer 1 cm Quarzglas-Küvette. (B) Die berechneten UV-Differenzspektren zwischen renaturiertem proBMP-2 in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 und denaturierten proBMP-2 (unterbrochene Linie) bzw. zwischen renaturiertem proBMP-2 in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 und in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 (graue Linie).

Vergleich dazu ist das Tryptophanmaximum in den Differenzspektren zwischen renaturiertem Propeptid bei 7,0 und 4,7 beziehungsweise zwischen renaturiertem proBMP-2 bei 7,0 und 4,7 mit $\lambda_{\text{maxTyr}}^{\Delta\epsilon} = 295 \text{ nm}$ deutlich bathochrom verschoben. Dies wurde als ein Hinweis auf eine partielle Entfaltung der Propeptiddomäne von proBMP-2 beim Übergang von pH 7,0 auf pH 4,7 gewertet. Die unterschiedlichen relativen Intensitäten der Tryptophan- und Tyrosinmaxima spiegeln dabei zugleich das unterschiedliche Verhältnis dieser Aminosäurereste im Propeptid ($n_{\text{Trp}} : n_{\text{Tyr}} = 3 : 3$) und in BMP-2 ($n_{\text{Trp}} : n_{\text{Tyr}} = 2 : 5$) wider.

Fluoreszenz Abbildung 3.13 zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren von proBMP-2 bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm unter verschiedenen Pufferbedingungen. Die Wellenlängen der Emissionsmaxima, λ_{max}^F , und die Bandbreiten der Spektren, $\Delta\lambda_{\text{max}/2}^F$, sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

Die Fluoreszenzmessungen bestätigten, die geringere Polarität der Umgebungen der Tryptophanreste von proBMP-2 in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 ($\lambda_{\text{max}}^F = 339,5 \text{ nm}$) im Vergleich zu 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 ($\lambda_{\text{max}}^F = 349,0 \text{ nm}$). Zudem war bei pH 4,7 die Fluoreszenzintensität gegenüber pH 7,0 verringert. Auch für das Propeptid wurde eine Differenz

Abbildung 3.13: Fluoreszenzemissionsspektren von proBMP-2 in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (durchgehende schwarze Linie), in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 (durchgehende graue Linie), 5,25 M Harnstoff, 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (gepunktete schwarze Linie) und in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 (unterbrochene schwarze Linie) aufgenommen bei 20 °C mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer und einer 0,4×1 cm Küvette. Die Proteinkonzentration betrug 36 µg/ml (0,4 µM) und die Anregungswellenlänge 295 nm.



zwischen den Emissionsmaxima der Fluoreszenzspektren des Proteins von etwa 10 nm, sowie eine verringerte Fluoreszenzintensität bei einer pH-Änderung von 7,0 auf 4,7 festgestellt (Abb. 3.20, S. 88). Dagegen war die Denaturierung von BMP-2 mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität verbunden (Abb. 3.17, S. 84). Es spricht also auch der Vergleich der Fluoreszenzspektren von proBMP-2 mit denen des Propeptids und von BMP-2 für eine partielle Entfaltung der Propeptiddomäne von proBMP-2 unter sauren Bedingungen.

Tabelle 3.3: Fluoreszenzeigenschaften von proBMP-2 unter verschiedenen Pufferbedingungen.

Puffer	λ_{\max}^F (nm)	$\Delta\lambda_{\max/2}^F$ (nm)
0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0	339,5	60,5
10 mM Kaliumacetat, pH 4,7	349,0	66,5
5,25 M Harnstoff, 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0	355,5	66,5
6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0	359,0	65,0

Anders als beim Propeptid waren 5,25 M Harnstoff nicht ausreichend um proBMP-2 vollständig zu denaturieren. Die Differenz zwischen λ_{\max}^F von proBMP-2 in 5,25 M Harnstoff und 6 M GdmCl von 3,5 nm entspricht in etwa der für BMP-2 ermittelten von 4,0 nm. Die in 5,25 M Harnstoff noch vorhandenen Strukturen mit teilweise vom Lösungsmittel abgeschirmten Tryptophanresten befinden sich vermutlich in der BMP-Domäne von proBMP-2, während die Tertiärstruktur der Propeptiddomäne unter diesen Bedingungen wahrscheinlich bereits vollständig verloren gegangen ist.

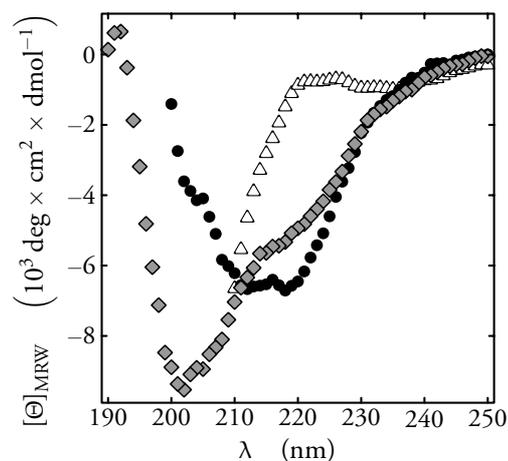
Eine eindeutige Klassifizierung der proBMP-2-Fluoreszenzspektren nach dem von Burstein vorgeschlagenen System war nicht möglich [Burstein *et al.*, 1973, 1977].⁴ Zum einen blieb die spektrale Korrekturfunktion des Fluoreszenzdetektors unberücksichtigt, wodurch sich die ermittelten Werte für λ_{\max}^F nicht mit den Literaturdaten vergleichen ließen, und zum anderen ist die Zuordnung nur bei einem Tryptophanrest in der Polypeptidkette eindeutig; bei mehreren Tryptophanresten stellt das gemessene Spektrum eine Überlagerung der einzelnen Tryptophanspektren dar. So entspricht zwar die Differenz zwischen den Emissionsmaxima von proBMP-2 in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 und in 6 M GdmCl, pH 7,0 von 20 nm der zwischen Klasse I und III nach Burstein. Die Bandbreite des Spektrums von proBMP-2 bei 7,0 in Abwesenheit eines Denaturierungsmittels von circa 60 nm deutet dagegen auf Tryptophanreste mit unterschiedlich polarer Umgebung.

Fern-UV-CD Die UV- und fluoreszenzspektroskopischen Analysen von proBMP-2 hatten ergeben, daß das Protein nach Renaturierung in einer Struktur mit zumindest stark, wenn auch möglicherweise nicht vollständig vom Lösungsmittel abgeschirmten aromatischen Aminosäureresten vorliegt, wie sie für lösliche globuläre Proteine typisch ist. Gleichzeitig lieferten diese Messungen jedoch Hinweise darauf, daß die im ersten Reinigungsschritt, der Heparin-Affinitätschromatographie, verwendeten sauren Pufferbedingungen zur partiellen Denaturierung von proBMP-2 führen. Die in Abbildung 3.14 dargestellten Fern-UV-CD-Spektren von proBMP-2 zeigen deutlich, daß die verringerte Abschirmung der aromatischen Aminosäurereste vom Lösungsmittel unter sauren Bedingungen auch mit einem Verlust an Sekundärstruktur verbunden war. Während die UV- und Fluoreszenzdaten eher auf eine Strukturänderung in der Propeptidomäne bei niedrigem pH hinweisen, kann anhand der CD-Spektren auch eine veränderte Struktur der BMP-Domäne unter diesen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden. Es ist zudem möglich, daß die Tetramerisierung einen Einfluß auf die spektroskopischen Eigenschaften von proBMP-2 hatte.

Das Spektrum von proBMP-2 bei pH 7,0 spricht mit zwei Minima bei 212 und 218 nm, sowie einer niedrigen Signalintensität bei 200 nm für einen hohen β -Faltblatt- und einen geringen α -Helix-Gehalt der Proteinstruktur. Im Vergleich dazu war bei pH 4,7 das CD-Signal zwischen 212 und 225 nm schwächer, bei 200 nm dagegen erheblich stärker, was auf einen deutlich erhöhten *random coil*-Anteil hinweist. Unter Berücksichtigung der spektroskopischen

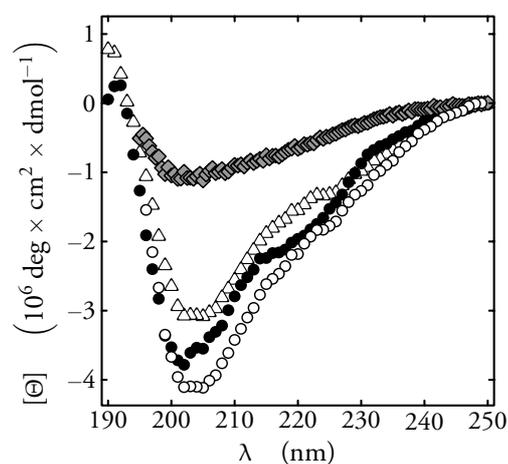
⁴ Siehe auch Methoden, Abschnitt 2.2.5.2, S. 42ff.

Abbildung 3.14: Fern-UV-CD-Spektren von proBMP-2 in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (●), in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 (◆) und in 6 M GdmCl, 50 mM Natriumacetat, pH 4,0 (△) aufgenommen bei 20 °C mit einem Jasco J710-CD-Spektrometer und einer 0,01 cm Küvette. Die Proteinkonzentration betrug 1,28 mg/ml (14,3 µM), 1,40 mg/ml (15,6 µM) und 0,54 mg/ml (6,0 µM) in HEPES, Acetat bzw. GdmCl. Die Bandbreite betrug 1 nm, die Auflösung 1 nm und die Zeitkonstante 2 s.



Charakterisierung des isolierten Propeptids lassen die bei pH 4,7 noch immer vorhandenen Sekundärstrukturen und die starke Erhöhung der Polarität der Umgebung der Tryptophanreste unter diesen Bedingungen eine *Molten Globule*-ähnliche Struktur der Propeptiddomäne von proBMP-2 vermuten. Ein nahezu vollständiger Verlust an Sekundärstruktur trat erst in 6 M GdmCl auf. Bei Wellenlängen von mehr als 215 nm war hier das CD-Signal nur noch sehr schwach. Daß aber noch ein Signal vorhanden war, lag sehr wahrscheinlich an dem Cystin-Knoten der BMP-Domäne, wie der Vergleich der CD-Spektren von reduzierend und nicht-reduzierend denaturiertem BMP-2 zeigten (Abb. 3.18, S. 85).

Abbildung 3.15: Fern-UV-CD-Spektren — molare Elliptizitäten! — von proBMP-2 (●), BMP-2 (◆) und Propeptid (△) in 10 mM Kaliumacetat (proBMP, Propeptid) bzw. 50 mM Natriumacetat (BMP), pH 4,7 aufgenommen bei 20 °C, sowie das durch Addition der molaren Elliptizität von BMP und Propeptid erhaltene Spektrum (○). Geräteeinstellungen und Proteinkonzentrationen in den Abbildungslegenden 3.14, 3.18 und 3.22, S. 81, 85 bzw. 89.



Die Messungen erlaubten keine Rückschlüsse darauf, ob der gegenüber den sauren Bedingungen veränderte Sekundärstrukturgehalt von proBMP-2 bei pH 7,0 auf Strukturänderungen in der Propeptiddomäne oder der BMP-Domäne zurückzuführen war. Es ist daher denkbar, daß bei pH 7,0 Interaktionen zwischen Propeptid- und BMP-Domäne vorhanden waren, die

Veränderungen in der Sekundärstruktur jeweils einer oder aber beider „Domänen“ zur Folge hatten. Bei pH 4,7 waren diese Wechselwirkungen nicht mehr vorhanden oder nur noch so schwach, daß diese Sekundärstrukturänderungen größtenteils verloren gingen. Das läßt sich auch aus der Tatsache schließen, daß die Summe der Fern-UV-CD-Spektren von BMP-2 und dem Propeptid bei pH 4,7 dem Spektrum von proBMP-2 unter diesen Bedingungen zwar nicht gleich, aber doch sehr ähnlich war (Abb. 3.15). Die Möglichkeit der intramolekularen Dissoziation von Propeptid- und BMP-Domäne scheint auch aufgrund der von Lawrence *et al.* [1985] & Lyons *et al.* [1990] nachgewiesenen pH-induzierten Dissoziation des TGF- β 1- β 1-LAP-Komplexes wahrscheinlich.

Die einzigen Daten, die zum Vergleich mit den hier gezeigten Messungen in der Literatur gegenwärtig vorhanden sind, stammen von McMahan *et al.* und beziehen sich auf die Assoziation von TGF- β 1 mit β 1-LAP, dem dimeren Propeptid dieses Cytokins [McMahan *et al.*, 1996]. Die Autoren hatten Fern-UV-CD-Spektren von TGF- β 1, β 1-LAP und dem Komplex aus beiden Proteinen bei pH 7,5 verglichen und dabei relativ große Strukturänderungen nach der Assoziation der beiden Proteine gezeigt. Das stützt die Vermutung, daß bei pH 7,0 jeweils eine Propeptiddomäne mit einer BMP-Domäne intramolekular assoziiert, und das dies mit relativ starken Änderungen der Sekundärstruktur verbunden ist.

3.3.3.2 Spektroskopische Charakterisierung von BMP-2

UV-Absorption Abbildung 3.16 zeigt die UV-Spektren (A) und das dazugehörige UV-Differenzspektrum (B) von BMP-2 nach Renaturierung und Reinigung sowie nach Denaturierung in 6 M GdmCl. Deutlich zu erkennen ist die für globuläre lösliche Proteine typische Bathochromie des Absorptionsspektrums der nativen gegenüber dem der denaturierten Form. Auffällig ist zugleich das Tryptophanmaximum im Differenzspektrum, das mit 293 nm um 2 nm niedriger liegt als das des Propeptids (Abb. 3.19, S. 87) beziehungsweise von proBMP-2 (Abb. 3.12, S. 78). Dies spricht für eine vergleichsweise geringe Änderung der Polarität der Umgebung mindestens eines der beiden Tryptophanreste bei der Faltung von BMP-2. Aus der von Scheufler *et al.* [1999] aufgeklärten Kristallstruktur von BMP-2 geht ebenfalls eine partielle Lösungsmittlexposition von Trp²⁸ (und zum Teil auch Trp³¹) deutlich hervor. Die Lagen des Tyrosin- und des Tryptophanmaximums bei 286 nm beziehungsweise 293 nm im Differenzspektrum von BMP-2 sind zudem vergleichbar mit den Maxima bei 285 nm beziehungsweise 293 nm in dem entsprechenden Differenzspektrum des BMP-2-Homologen aus

Drosophila, DPP [Groppe *et al.*, 1998]. Das wurde als Indiz für eine vergleichbare Umgebung der Tryptophanreste in den beiden Proteinen und damit für die native Struktur von renaturiertem BMP-2 interpretiert.

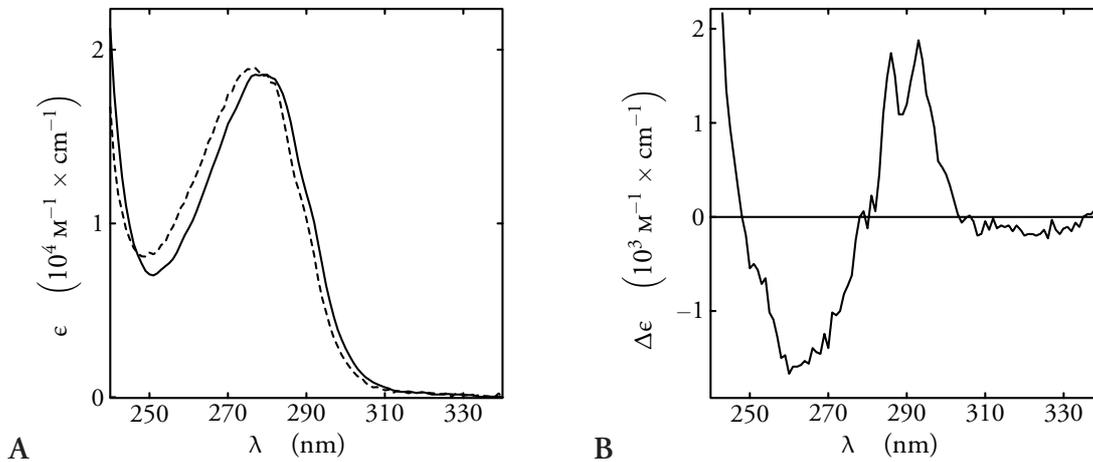


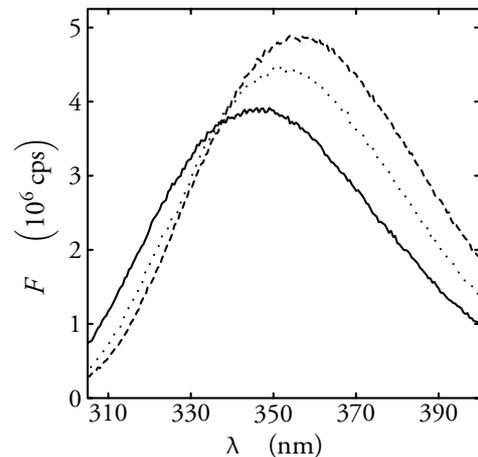
Abbildung 3.16: (A) UV-Spektren von in 6 M GdmCl denaturiertem BMP-2 (unterbrochene Linie) und von BMP-2 nach Renaturierung und Reinigung in 50 mM Natriumacetat, pH 4,7 (durchgehende Linie) aufgenommen bei 20 °C mit einem Beckman DU 7400 Diodenarray-Spektrophotometer mit 1 nm Auflösung in einer 1 cm Quarzglas-Küvette. (B) Das berechnete UV-Differenzspektrum zwischen renaturiertem BMP-2 in 50 mM Natriumacetat, pH 4,7 und in 6 M GdmCl denaturiertem BMP-2.

Die zwei Tryptophanreste in der „Zeigefingerspitze“ der TGF- β -Proteine — Trp²⁸ und Trp³¹ im Fall von BMP-2 — sind innerhalb dieser Proteinfamilie hochkonserviert [Innis *et al.*, 2000; Scheufler *et al.*, 1999]. Allerdings ist die Orientierung des zweiten Tryptophanrestes in den bisher publizierten Kristallstrukturen von BMPs mit und ohne Liganden unterschiedlich. Innis *et al.* [2000] vermuten daher eine relativ hohe Flexibilität dieses Tryptophanrestes bei ungebundenen TGF- β -Proteinen in Lösung. Die für BMP-2 gezeigten UV-Absorptions- und im nächsten Abschnitt beschriebenen Fluoreszenzeigenschaften stützen diese Vermutung.

Fluoreszenz Die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften von BMP-2 bestätigte die aus den Absorptionseigenschaften abgeleitete Vermutung, daß zumindest einer der beiden Tryptophanreste des Proteins nicht vollständig vom Lösungsmittel abgeschirmt war, denn bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm wies renaturiertes BMP-2 mit 346 nm ein Emissionsmaximum bei einer relativ hohen Wellenlänge auf (Abb. 3.17). Eine Klassifizierung der BMP-2-Fluoreszenzspektren nach Burstein *et al.* [1977] war — ebenso wie bei proBMP-2 und dem Propeptid (Abschnitte 3.3.3.1 und 3.3.3.3) — nicht eindeutig möglich (Abb. 3.17,

Tab. 3.4). Die Bandbreite des BMP-2-Spektrums in Abwesenheit von Denaturierungsmittel ist aber mit 65,5 nm ein Hinweis auf unterschiedlich polare Umgebungen der beiden Tryptophanreste.

Abbildung 3.17: Fluoreszenzemissionsspektren von BMP-2 in 50 mM Natriumacetat, pH 4,7 (durchgehende Linie) und in dem gleichen Puffer mit 5,25 M Harnstoff (gepunktete Linie) bzw. 6 M GdmCl (unterbrochene Linie), aufgenommen bei 20 °C mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer und einer 0,4×1 cm Küvette. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml (1,9 µM) und die Anregungswellenlänge 295 nm.



Anders als beim Propeptid waren 5,25 M Harnstoff nicht ausreichend, um BMP-2 vollständig zu denaturieren ($\lambda_{\max}^F = 352 \text{ nm}$). Auch die Emissionsmaxima bei 356 nm und 358 nm von mittels 6 M GdmCl beziehungsweise 4,5 M GdmSCN (nicht gezeigt) denaturiertem BMP-2 lagen niedriger als das des Propeptids bei 360 nm (Abb. 3.20, S. 88). Die Tryptophanreste von BMP-2 waren also unter diesen Bedingungen noch nicht vollständig lösungsmittel exponiert. Sehr wahrscheinlich verhinderte der Cystin-Knoten des Proteins eine vollständige Entfaltung der Polypeptidkette.

Tabelle 3.4: Fluoreszenzeigenschaften von BMP-2 unter verschiedenen Pufferbedingungen.

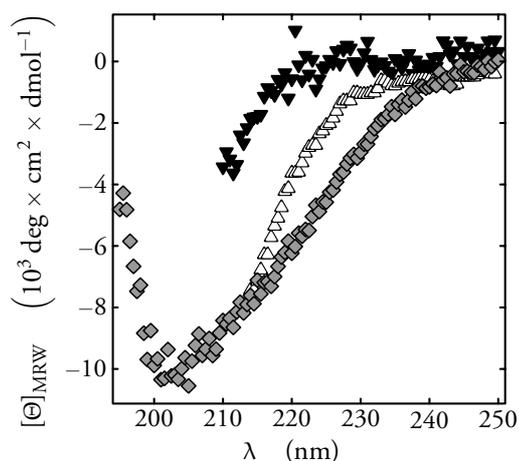
Puffer	λ_{\max}^F (nm)	$\Delta\lambda_{\max/2}^F$ (nm)
50 mM Natriumacetat, pH 4,7	346,0	65,5
5,25 M Harnstoff, 50 mM Natriumacetat, pH 4,7	352,0	64,5
6 M GdmCl, 50 mM Natriumacetat, pH 4,7	356,0	66,0

Zudem machen die Spektren deutlich, daß die Denaturierung des Proteins mit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität verbunden war, also die Tryptophanfluoreszenz im nativen Zustand des Proteins gequencht wurde. Als intramolekulare Quencher kommen die Carbonylgruppen von Peptidbindungen, Amino- und Carboxylgruppen, sowie Histidinreste und

Disulfidbrücken in Frage [Demchenko, 1986]. Letztere scheiden im Fall von BMP-2 aufgrund des zu großen Abstands zu den Tryptophanresten des Proteins in der nativen Konformation aus. Ein potentieller Quencher ist das Carbonylsauerstoffatom der Peptidbindung Val²⁶–Gly²⁷, das sich in VAN-DER-WAALS-Abstand zum Indolring von Trp²⁸ befindet, ebenso wie das Carbonylsauerstoffatom der Peptidbindung Trp²⁸–Asn²⁹, das VAN-DER-WAALS-Kontakt zum Indolring von Trp³¹ hat (BMP-2-Kristallstruktur [Scheufler *et al.*, 1999]).

Fern-UV-CD Ein wichtiges Indiz für die native Struktur von renaturiertem BMP-2 ist die starke Ähnlichkeit des in Abbildung 3.18 dargestellten Fern-UV-CD-Spektrums des Proteins in 50 mM Natriumacetat, pH 4,7 (◆) mit den Fern-UV-CD-Spektren von β -NGF und TGF- β 1, zwei Cystin-Knoten-Proteinen mit ähnlichen Sekundärstrukturanteilen [McMahon *et al.*, 1996; Rattenholl *et al.*, 2001a]. Die verglichen mit den Spektren der beiden Proteine etwas höhere Signalintensität des BMP-2-CD-Spektrums zwischen 200 nm und 210 nm lässt sich mit einem erhöhten *random coil*-Anteil unter sauren Bedingungen erklären.⁵

Abbildung 3.18: Fern-UV-CD-Spektren von BMP-2 in 50 mM Natriumacetat, pH 4,7 (◆), und in 6 M GdmCl, 50 mM Natriumacetat, pH 4,7 (nicht-reduziert Δ , reduziert \blacktriangledown) aufgenommen bei 20 °C mit einem AVIV 62A DS CD-Spektrometer und einer 0,02 cm Küvette. Die Proteinkonzentrationen betragen 0,65 mg/ml (24,9 μ M), 0,7 mg/ml (26,8 μ M) und 0,63 mg/ml (48,3 μ M) in Acetat, nicht-reduziert bzw. reduziert in GdmCl. Die Bandbreite betrug 1 nm, die Auflösung 0,5 nm und die Zeitkonstante 3 s.



Bei der Denaturierung von BMP-2 in 6 M GdmCl nahm die Signalintensität zwischen 220 und 230 nm stark ab. Möglicherweise wurde hier die α -Helix des Proteins zerstört (Asn⁵⁹–Val⁷⁰ [Scheufler *et al.*, 1999]), sofern sie unter sauren Bedingungen in Abwesenheit eines Denaturierungsmittels tatsächlich ausgebildet war. Die starken Unterschiede zwischen den Spektren des denaturierten Proteins unter reduzierenden und unter nicht-reduzierenden Bedingungen machen die Bedeutung des Cystin-Knotens für die Stabilität der BMP-Struktur

⁵ BMP-2 wurde zwar bei pH 5,4 kristallisiert, der dafür verwendete Puffer enthielt aber zudem Lithiumsulfat und *tertiär*-Butanol, die BMP-2 bei diesem pH möglicherweise stabilisieren [Scheufler *et al.*, 1999].

deutlich. Wie zu erwarten war, und auch schon aus dem entsprechenden Fluoreszenzspektrum hervorging, waren 6 M GdmCl allein nicht ausreichend, um BMP-2 vollständig zu denaturieren.

3.3.3.3 Spektroskopische Charakterisierung des Propeptids

UV-Absorption Die in Abbildung 3.19 dargestellten UV-Spektren (A) und UV-Differenzspektren (B) des Propeptids zeigen, daß sich dessen Tryptophan- und Tyrosinreste nach der Renaturierung in einer weitgehend unpolaren Umgebung befanden. Die bathochrome Verschiebung des Spektrums des Proteins in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 gegenüber dem Spektrum des denaturierten Proteins spricht für eine Tertiärstruktur der Polypeptidkette mit vom Lösungsmittel abgeschirmten hydrophoben Bereichen. Die Maxima in dem entsprechenden Differenzspektrum liegen bei 287 und 295 nm und lassen sich den Tyrosin- beziehungsweise Tryptophanresten des Propeptids zuordnen [Donovan *et al.*, 1958; Laskowski Jr. *et al.*, 1956; Scheraga, 1957; Schmid, 1997; Yanari & Bovey, 1960]. Das Tryptophanmaximum, $\lambda_{\max\text{Tp}}^{\Delta\epsilon}$, des Propeptids liegt 2 nm bathochrom zu dem von BMP-2 (Abb. 3.16, S. 83). Die Tryptophanreste des gefalteten Propeptids scheinen also deutlich besser vom Lösungsmittel abgeschirmt gewesen zu sein als das bei BMP-2 der Fall war. Zugleich fällt auf, daß das UV-Spektrum des Propeptids in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 sich kaum von dem in GdmCl unterscheidet. Entsprechend ähnlich ist auch das dazugehörige Differenzspektrum. Der niedrige pH führte also scheinbar zum fast völligen Zusammenbruch der Tertiärstruktur des Propeptids.

Fluoreszenz In Abbildung 3.20 sind Fluoreszenzemissionsspektren des Propeptids unter verschiedenen Pufferbedingungen dargestellt und deren λ_{\max}^F - und $\Delta\lambda_{\max/2}^F$ -Werte in Tabelle 3.5 zusammengefaßt. Anders als bei BMP-2 wurde beim Propeptid die Tryptophanfluoreszenz im gefalteten Zustand nicht gequencht. Zudem waren bereits circa 5 M Harnstoff ausreichend, um das Propeptid nahezu vollständig zu denaturieren. Das Maximum der Fluoreszenzemission lag in 5,25 M Harnstoff, 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 bei 359,0 nm. Das Emissionsmaximum der Tryptophanfluoreszenz des gefalteten Propeptids in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 lag bei 340,5 nm, war also gegenüber dem Spektrum des denaturierten Proteins um circa 20 nm hypsochrom verschoben. Dies entspricht der Differenz zwischen einem Spektrum der Klasse III und einem der Klasse I nach Burstein *et al.* [1977] (siehe auch

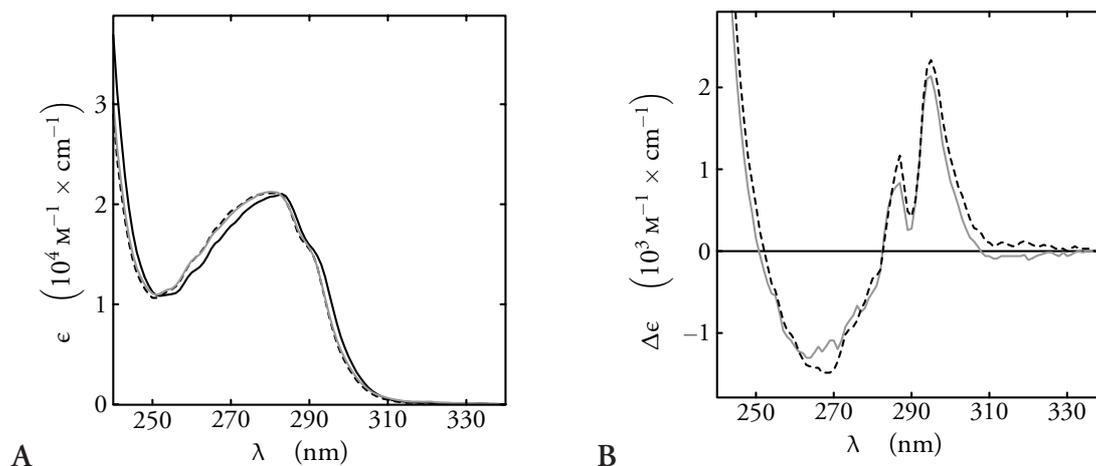


Abbildung 3.19: (A) UV-Spektren des BMP-2-Propeptids in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (schwarze Linie), in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 (graue Linie) und in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 (unterbrochene Linie) aufgenommen bei 20 °C mit einem Beckman DU 7400 Diodenarray-Spektrophotometer mit 1 nm Auflösung in einer 1 cm Quarzglas-Küvette. (B) Die berechneten UV-Differenzspektren zwischen dem Propeptid in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 und in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 beziehungsweise zwischen dem Propeptid in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 und in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 (unterbrochene Linie).

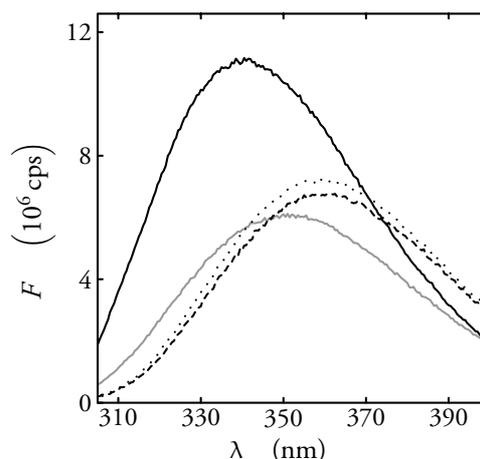
Methoden, S. 42ff). Die hohe Bandbreite des Spektrums des renaturierten Propeptids von 61,0 nm ist — wie auch bei proBMP-2 — ein Hinweis auf die Überlagerung von Spektren unterschiedlicher Klassen, also auf unterschiedlich polare Umgebungen der Tryptophanreste des Proteins.

Tabelle 3.5: Fluoreszenzeigenschaften des Propeptids unter verschiedenen Pufferbedingungen.

Puffer	λ_{\max}^F (nm)	$\Delta\lambda_{\max/2}^F$ (nm)
0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0	340,5	61,0
10 mM Kaliumacetat, pH 4,7	351,0	66,0
5,25 M Harnstoff, 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0	359,0	65,0
6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0	360,0	65,0

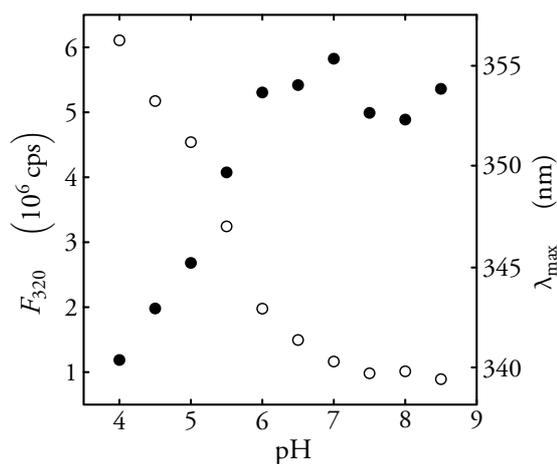
Die bereits aus den UV-Spektren ersichtliche Strukturänderung des Propeptids bei pH 4,7 spiegelte sich auch in dessen Fluoreszenzeigenschaften wider. Das Emissionsmaximum des Proteins in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 lag bei 351,0 nm, dagegen in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 bei 340,5 nm und in 6 M GdmCl bei 360,0 nm. Eine gewisse Abschirmung der

Abbildung 3.20: Fluoreszenzemissionsspektren des BMP-2-Propeptids in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (durchgehende schwarze Linie), in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 (durchgehende graue Linie), in 5,25 M Harnstoff, 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (gepunktete schwarze Linie) und in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 (unterbrochene schwarze Linie) aufgenommen bei 20 °C mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer und einer 0,4×1 cm Küvette. Die Proteinkonzentration betrug 41,4 µg/ml (1,3 µM) und die Anregungswellenlänge 295 nm.



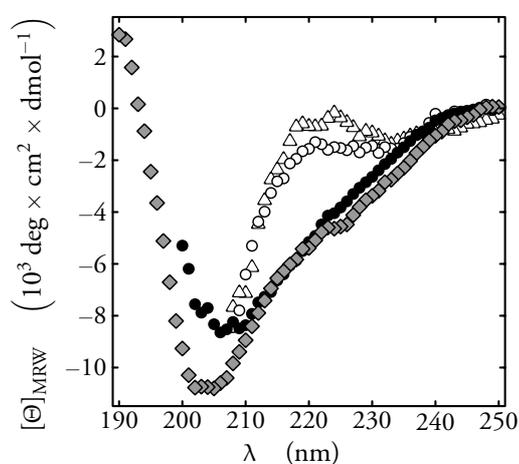
Tryptophanreste des Propeptids vom Lösungsmittel war also auch bei pH 4,7 noch vorhanden. Daß die Ursache der pH-induzierten Änderung der Tryptophanfluoreszenz tatsächlich strukturbedingt war, läßt sich aus [Abbildung 3.21](#) erkennen, die die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzemission bei 320 nm und die Lage des Emissionsmaximums zeigt. Zwar wurde mit diesem Experiment nur ein relativ geringer pH-Bereich erfaßt, deutlich wird jedoch, daß die Signalintensität zwischen pH 6,0 und 8,5 nahezu konstant war, während sie unter pH 6 systematisch abnahm. Das Maximum der Fluoreszenzemission war schon ab pH 6,5 geringfügig zu höheren Wellenlängen verschoben, sehr deutlich dagegen auch erst unter pH 6,0. Der in diesem Fall offensichtlich kritische pH-Bereich zwischen 6,0 und 7,0 spricht für eine Schlüsselrolle eines oder mehrerer Histidinreste bei der Stabilisierung der Propeptidstruktur.

Abbildung 3.21: pH-Abhängigkeit der Propeptid-Fluoreszenz (Fluoreszenzintensität bei 320 nm (●), linke Ordinatenachse, und Lage des Maximums (○), rechte Ordinatenachse) in 50 mM Kalium-HEPES/Acetat aufgenommen bei 20 °C mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer und einer 0,4×1 cm Küvette. Die Proteinkonzentration betrug 30,0 µg/ml (0,94 µM) und die Anregungswellenlänge 295 nm.



Fern-UV-CD Das in Abbildung 3.22 dargestellte Fern-UV-CD-Spektrum des Propeptids bei pH 7,0 (●) läßt auf eine Struktur mit hohem β -Faltblatt-Anteil schließen. Das Spektrum gleicht dem von β 1-LAP, dem Propeptid von TGF- β 1, sowohl die Form, als auch die Lage und Intensität des Minimums zwischen 206 und 209 nm betreffend; lediglich die „Schulter“ bei 220 nm ist im CD-Spektrum von β 1-LAP geringfügig stärker ausgeprägt [McMahon *et al.*, 1996]. Das ist — neben der Dimerisierung und der pH-abhängigen Strukturänderung — der wohl stärkste Hinweis auf die native Struktur des *in vitro* renaturierten BMP-2-Propeptids.

Abbildung 3.22: Fern-UV-CD-Spektren des BMP-2-Propeptids in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (●), in 10 mM Kaliumacetat, pH 4,7 (◆), in 5,25 M Harnstoff, 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (○) und in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 (△) aufgenommen bei 20 °C mit einem Jasco J710-CD-Spektrometer und einer 0,01 cm Küvette. Die Proteinkonzentration betrug 1,06 mg/ml (33,0 μ M) in HEPES-, Harnstoff- bzw. GdmCl-Puffer, sowie 0,97 mg/ml (30,3 μ M) in Acetatpuffer. Die Bandbreite betrug 1 nm, die Auflösung 1 nm und die Zeitkonstante 2 s.



Die Fern-UV-CD-Spektren bestätigten zudem die aufgrund der veränderten UV- und Fluoreszenzeigenschaften vermutete, fast völlige Denaturierung des Propeptids in 5,25 M Harnstoff auch in Bezug auf den Sekundärstrukturgehalt des Proteins. Die Spektren des mittels GdmCl beziehungsweise Harnstoff denaturierten Propeptids unterscheiden sich nur geringfügig.

Allerdings machen die Spektren des Propeptids bei pH 7,0 und bei pH 4,7 deutlich, daß die anhand der UV-Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften gezogenen Schlußfolgerungen relativiert werden müssen. Zwar nimmt bei pH 4,7 die Intensität des CD-Signals zwischen 200 und 210 nm etwas zu, jedoch sind sich die Spektren ansonsten sehr ähnlich. Dies kann auf einen geringfügig erhöhten *random coil*-Anteil bei pH 4,7 zurückgeführt werden. Bezogen auf die Umgebung der Tryptophanreste, also die Tertiärstruktur des Propeptids, wurden durch UV-Absorptions- und Fluoreszenzmessungen bei niedrigem pH gravierende Änderungen festgestellt, wohingegen der CD-spektroskopisch bestimmte Sekundärstrukturgehalt weitgehend unverändert blieb, was auf eine *Molten Globule*-ähnliche Struktur hinweist [Creighton, 1993;

Fersht, 1999]. Dagegen wurden im Fall proBMP-2 gravierende Unterschiede zwischen pH 7,0 und 4,7, sowohl die Sekundär-, als auch die Tertiärstruktur betreffend, nachgewiesen. Als Ursache hierfür wurden starke Wechselwirkungen zwischen Propeptid- und BMP-Domäne vermutet, die eine Änderung der Sekundärstrukturanteile in einer oder auch in beiden „Domänen“ von proBMP-2 zur Folge hatten. (Abschnitt 3.3.3.1, S. 77ff). Allerdings ist es möglich, daß die CD-Spektren des Propeptids bei niedrigeren Wellenlängen größere Unterschiede im Sekundärstrukturgehalt aufgedeckt hätten. Dies konnte jedoch aufgrund der hohen, pufferbedingten Absorption der Proben im Fern-UV nicht überprüft werden. Die Unterschiede im Sekundärstrukturgehalt zwischen Propeptid und proBMP-2 bei pH 7,0 könnten zumindest teilweise auch aus der Oligomerisierung der Proteine resultieren, da proBMP-2 deutlich stabiler zu Tetrameren assoziiert, als das Propeptid zu Dimeren (Abschnitt 3.3.2).

3.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT DER BMP-VARIANTEN

3.4.1 Vergleich der thermodynamischen Stabilität der BMP-2-Varianten

Die spektroskopischen Analysen der einzelnen BMP-Varianten unter verschiedenen Pufferbedingungen hatten Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen der Propeptid- und der BMP-Domäne von proBMP-2 ergeben (Abschnitte 3.3.3.1 bis 3.3.3.3). Um einen möglichen Einfluß einer der beiden „Domänen“ auf die Stabilität der jeweils anderen nachzuweisen beziehungsweise auszuschließen, wurde die thermodynamische Stabilität von proBMP-2 im Vergleich zu der des Propeptids und der von BMP-2 untersucht. Dazu mußten Bedingungen gefunden werden, unter denen sich alle drei BMP-Varianten untersuchen ließen.

Eine Analyse in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 war nicht möglich, da BMP-2 unter diesen Bedingungen nicht ausreichend löslich ist. Zudem konnte gezeigt werden, daß proBMP-2 beziehungsweise das Propeptid bei pH 7,0 nicht-kovalent assoziieren (Abschnitt 3.3.2). Aufgrund dieses zusätzlichen Gleichgewichts würde die Analyse der Faltung und Entfaltung bei der BMP-Varianten sehr komplex. Es wurde auch beobachtet, daß die chemisch induzierte Entfaltung von proBMP-2 bei pH 7,0 unter Aggregation des Proteins verlief, somit also kein Gleichgewicht vorlag. Das Propeptid war bei chemisch induzierter Entfaltung ebenfalls aggregationsanfällig. Bei pH 4,7 wiederum — also unter Bedingungen bei denen BMP-2 gut löslich ist — liegen sowohl das isolierte Propeptid als auch die Propeptiddomäne von proBMP-2 nicht in ihrer nativen Konformation vor (Abschnitt 3.3.3). Deshalb wurde zur Analyse L-Arginin-

HCl als lösungsvermittelndes Additiv eingesetzt. Dadurch konnte die Aggregation der Proteine während der chemisch induzierten Entfaltung bei pH 7,0 unterdrückt werden, wie auch die nicht-kovalente Assoziation des Propeptids beziehungsweise von proBMP-2. Die Analyse blieb jedoch auf die chemisch induzierte Entfaltung beschränkt, da thermische Denaturierung auch in Gegenwart von L-Arginin-HCl zur Aggregation der drei BMP-Varianten führte.

Als Puffer wurde 0,1 M Kalium-HEPES, 1 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 verwendet. Als Denaturierungsmittel diente GdmCl beziehungsweise Harnstoff. Analysiert wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität der Proteine in Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration. Sowohl die Inkubation der Proben und als auch die Messungen erfolgten bei 20 °C. Im Folgenden wird zunächst die GdmCl-induzierte Entfaltung von BMP-2 mit der der BMP-Domäne von proBMP-2 verglichen. Anschließend wird auf die harnstoffinduzierte Denaturierung der Propeptiddomäne im Vergleich zu der des isolierten Propeptids eingegangen.

BMP-Domäne vs. BMP-2 In Abbildung 3.23 sind die normierten Übergänge der GdmCl-induzierten Entfaltung von proBMP-2 und BMP-2 in 0,1 M Kalium-HEPES, 1 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 im Gleichgewicht bei 20 °C dargestellt. Aufgrund des Quenchings der Tryptophanfluoreszenz in gefaltetem BMP-2 war es möglich, die Faltung beziehungsweise Entfaltung der Propeptid- und der BMP-Domäne von proBMP-2 bei 320 nm beziehungsweise 360 nm unabhängig voneinander zu verfolgen. Die nach Gleichung 2.14 durch nicht-lineare Regression ermittelten thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.6 zusammengefaßt.

Aus den Übergängen wird zum einen deutlich, daß beide „Domänen“ in proBMP-2 kooperativ entfalten, und zum anderen, daß die Propeptiddomäne wesentlich instabiler ist als die BMP-Domäne. Die im Vergleich mit der Propeptiddomäne hohe freie Enthalpie der Denaturierung der BMP-Domäne und von BMP-2 hatte unter den nicht-reduzierenden Versuchsbedingungen ihre Ursache sehr wahrscheinlich in der starken entropischen Destabilisierung des denaturierten Zustandes durch den Cystin-Knoten (siehe unten). In Anbetracht der Standardabweichungen der Parameteranpassungen können die für BMP-2 und die BMP-Domäne berechneten $\Delta G_{n \rightarrow d}^{1\text{ M Arg}}$ -Werte als identisch betrachtet werden. Die (denaturierte) Propeptiddomäne hat also scheinbar keinen Einfluß auf die Stabilität der BMP-Domäne. Die Übergangsmittelpunkte, $[D_{1/2}]$, wurden für BMP-2 mit 3,2 M, sowie für die Propeptiddomäne und die BMP-Domäne von proBMP-2 mit 0,8 M beziehungsweise 3,3 M GdmCl bestimmt.

Abbildung 3.23: GdmCl-induzierte Entfaltung von proBMP-2 (◆,●) und BMP-2 (□) im Gleichgewicht bei 20 °C in 0,1 M Kalium-HEPES, 1 M L-Arginin-HCl, pH 7,0. Die Proteinkonzentration betrug 0,45 μM (40,4 μg/ml proBMP-2 bzw. 11,7 μg/ml BMP-2). Die Proben wurden für 24 h bei 20 °C inkubiert und die Messungen mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer und einer 0,4×1 cm Küvette durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm und die Bandbreite für den Anregungs- und Emissionsstrahlengang 2 nm bzw. 5 nm. Es wurden Spektren von 305 bis 400 nm im S/R-Modus mit einer Integrationszeit von 0,1 s aufgenommen. Für den Übergang der Propeptiddomäne (◆) wurde das Signal bei 320 nm und für den der BMP-Domäne (●) bzw. BMP-2 (□) bei 360 nm ausgewertet. Dargestellt sind die normierten Daten und die jeweils beste Anpassung an ein Zweizustandsmodell nach Gleichung 2.14. Die durch nicht-lineare Regression ermittelten thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Die Entfaltungen waren reversibel. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind lediglich die Entfaltungskurven dargestellt.

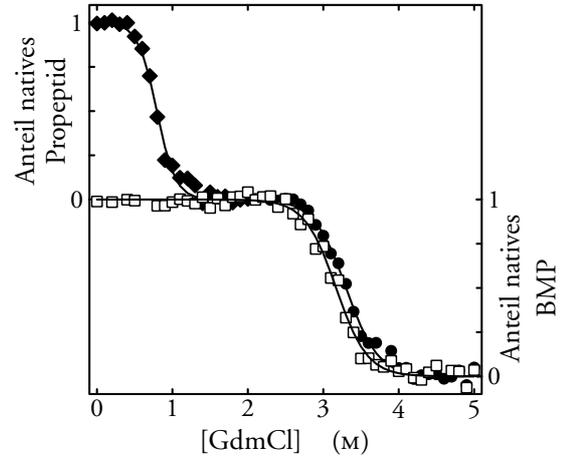


Tabelle 3.6: Thermodynamische Parameter der GdmCl-induzierten Entfaltung von proBMP-2 und BMP-2 im Gleichgewicht bei 20 °C in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0, 1 M L-Arginin-HCl. Die Anpassung der Parameter erfolgte nach einem Zweizustandsmodell (Gleichung 2.14).

Domäne / Protein	$\Delta G_{n \rightarrow d}^{1 \text{ M Arg}}$ (kJ \times mol $^{-1}$)	$m_{n \rightarrow d}$ (kJ \times mol $^{-1} \times$ M $^{-1}$)
Propeptiddomäne von proBMP-2	15,69 \pm 1,15	19,76 \pm 1,43
BMP-Domäne von proBMP-2	38,15 \pm 2,48	11,55 \pm 0,75
BMP-2	37,39 \pm 2,15	11,80 \pm 0,68

Das Gleichgewicht der Denaturierung war bei den beiden BMP-Varianten bereits nach 24 h erreicht. Die Kontrollmessungen nach fünf Tagen Inkubation ergaben identische Übergangskurven. Für NGF beziehungsweise proNGF existieren dagegen zwei denaturierte Formen. Im Unterschied zu (pro)BMP-2 sind die Dimere von nativem (pro)NGF nicht durch eine intermolekulare Disulfidbrücke stabilisiert. Die zwei denaturierten (pro)NGF-Spezies liegen daher als Monomere, M1 beziehungsweise M2, vor. Nach der schnellen Entfaltung von (pro)NGF

zur M1-Form durch GdmCl erfolgt ein sehr langsamer Übergang zur M2-Form. Eine mögliche Erklärung für diesen Vorgang liefert die *Loop-Threading*-Hypothese von [de Young et al. \[1996\]](#). Sie besagt, daß der N-Terminus von NGF bei längerer Inkubation unter denaturierenden Bedingungen durch den Ring des Cystin-Knotens „fädelt“. Dieser Ring besteht im Fall von NGF aus 14 Aminosäureresten und enthält zwei Prolinreste. Ein Einfluß von Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen auf den Übergang von M1 zu M2 wurde daher in der Literatur diskutiert, konnte aber bisher weder bestätigt noch widerlegt werden [[de Young et al., 1996](#); [Rattenholl, 2001](#)]. Es lassen sich zumindest drei Gründe dafür anführen, daß ein ähnliches Phänomen bei (pro)BMP-2 nicht beobachtet werden konnte. Erstens, die (pro)BMP-2-Dimere sind disulfidverbrückt. Unter Einfluß von GdmCl dissoziieren sie nicht. Zweitens, der Ring des Cystin-Knotens von (pro)BMP-2 besteht lediglich aus acht Aminosäureresten, ist also vergleichsweise „eng“. Sollte *Loop-Threading* die Ursache der Bildung einer M2-Spezies bei der Denaturierung von (pro)NGF sein, so ist wahrscheinlich im Fall von (pro)BMP-2 die Aktivierungsenergie für einen solchen Prozeß zu hoch. Die gewählten Denaturierungsbedingungen waren also möglicherweise nicht drastisch genug. (Daß nicht-reduziertes BMP-2 in 6 M GdmCl noch nicht vollständig denaturiert vorliegt, wurde bereits im Rahmen der spektroskopischen Charakterisierung des Proteins in Abschnitt [3.3.3.2](#) diskutiert.) Drittens, sollten Prolylisomerisierungen die langsame Bildung der M2-Spezies von (pro)NGF verursachen, würde das Fehlen von Prolinresten im Ring des Cystin-Knotens von (pro)BMP-2 erklären, warum ein M1→M2-Übergang bei den beiden BMP-Varianten nicht beobachtet werden konnte.

Die hohe thermodynamische Stabilität von BMPs bei chemisch induzierter Denaturierung und vor allem die Reversibilität der Entfaltung auch nach zum Teil monatelanger Behandlung mit Salzsäure, GdmCl und Harnstoff ermöglichte überhaupt erst ihre Isolierung aus Knochenmaterial und gewährleistet die Lagerfähigkeit von BMPs in lyophilisierter Form über Jahre [[Wozney, 2002](#)]. Ursache dafür ist sehr wahrscheinlich der Cystin-Knoten, der im Falle der BMPs besonders „eng“ geknüpft ist (siehe auch Einleitung, S. [6f](#)). Eine Untersuchung von [Muller et al.](#) zur Stabilität von Cysteinmutanten des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ergab, daß der Cystin-Knoten entropisch zur Stabilisierung des nativen Proteins gegenüber dem denaturierten beiträgt [[Muller et al., 2002](#)]. Diese läßt sich aus der entropischen Destabilisierung des denaturierten Zustandes eines disulfidhaltigen Proteins auch theoretisch herleiten [[Creighton, 1997](#)].

Propeptiddomäne vs. Propeptid Die Stabilität des Propeptids im Vergleich zur Propeptiddomäne von proBMP-2 wurde mittels harnstoffinduzierter Entfaltung bei drei verschiedenen Konzentrationen von L-Arginin-HCl untersucht. Das Maximum der Fluoreszenz des Propeptids war in Gegenwart von 1 M L-Arginin-HCl zu größeren Wellenlängen verschoben. Dies spricht dafür, daß bereits ein signifikanter Anteil des Proteins unter diesen Bedingungen in nicht-nativer Form vorlag; dagegen war λ_{\max}^F von proBMP-2 unverändert (Abb. 3.24). Für die Auswertung der Propeptidentfaltung wurde daher angenommen, daß die Änderung der Fluoreszenz der nativen Spezies identisch mit der von nativem proBMP-2 beim Übergang der Propeptiddomäne war. Dies schien aufgrund der nahezu identischen Fluoreszenzeigenschaften der beiden Proteine in Abwesenheit von L-Arginin-HCl gerechtfertigt (Abb. 3.13, S. 79, & Abb. 3.20, S. 88). Die normierten Übergänge sind in Abbildung 3.25 dargestellt und die mit Hilfe von Gleichung 2.14 bestimmten thermodynamischen Parameter in Tabelle 3.7 zusammengefaßt.

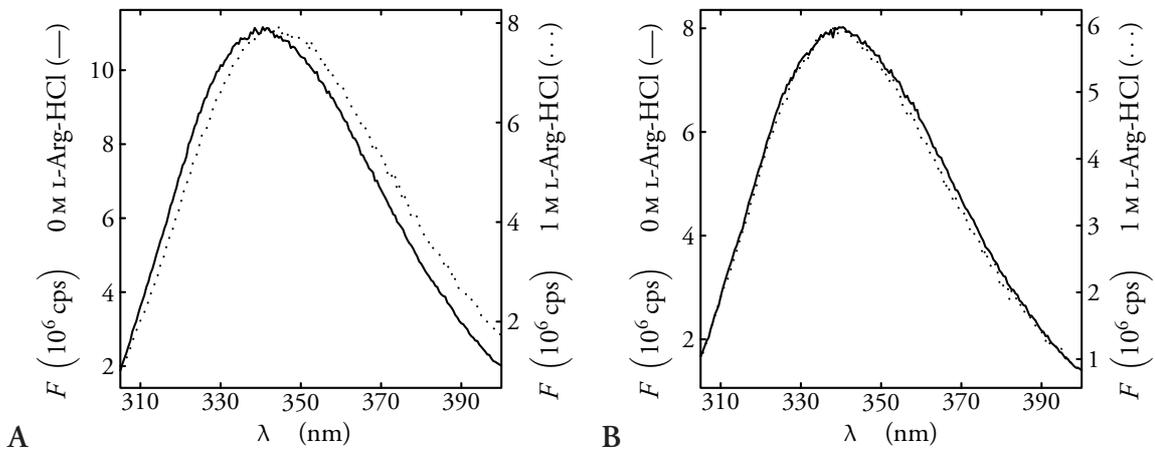


Abbildung 3.24: Fluoreszenzemissionsspektren des Propeptids (A) & von proBMP-2 (B) in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 (durchgehende Linie) und in 0,1 M Kalium-HEPES, 1 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 (gepunktete Linie) aufgenommen bei 20 °C mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer und einer $0,4 \times 1$ cm Küvette. Die Proteinkonzentrationen betragen $41,4 \mu\text{g/ml}$ ($1,29 \mu\text{M}$) und $34,0 \mu\text{g/ml}$ ($1,06 \mu\text{M}$) Propeptid, sowie $36,8 \mu\text{g/ml}$ ($0,41 \mu\text{M}$) und $40,0 \mu\text{g/ml}$ ($0,45 \mu\text{M}$) proBMP-2 im Puffer mit bzw. ohne L-Arginin-HCl. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm, die Bandbreite für den Anregungs- und Emissionsstrahlengang 2 nm bzw. 5 nm und die Auflösung 0,5 nm. Gemessen wurde im S/R-Modus mit einer Integrationszeit von 0,1 s.

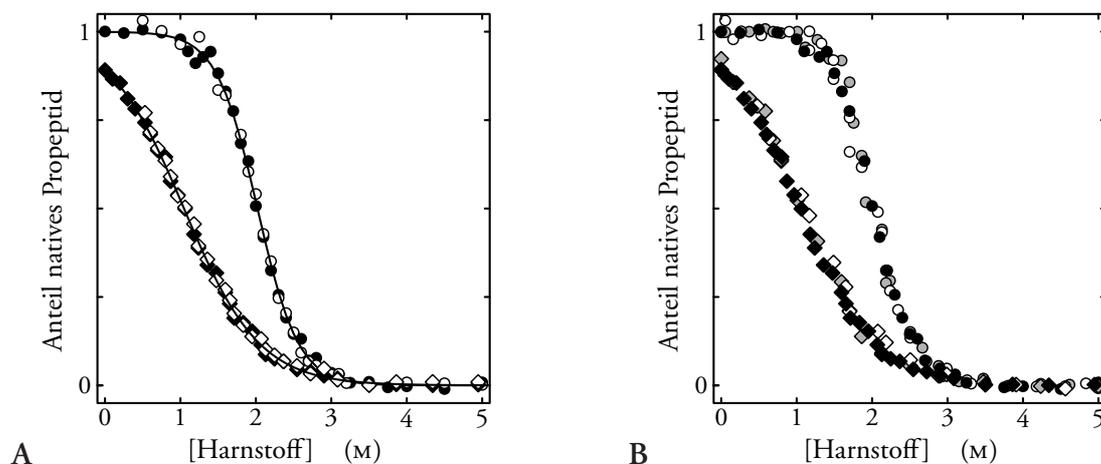


Abbildung 3.25: Harnstoffinduzierte Entfaltung des Propeptids und der Propeptiddomäne von proBMP-2 im Gleichgewicht bei 20 °C. (A) Entfaltung (\blacklozenge, \bullet) und Rückfaltung (\diamond, \circ) des Propeptids (\blacklozenge, \diamond) und der Propeptiddomäne von proBMP-2 (\bullet, \circ) in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0, 1 M L-Arginin-HCl. (B) Entfaltung des Propeptids und der Propeptiddomäne in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 und 0,7 M (\diamond, \circ), 1,0 M (\blacklozenge, \bullet) bzw. 1,3 M (\diamond, \circ) L-Arginin-HCl. Die Proteinkonzentration betrug 30,0 $\mu\text{g/ml}$ (0,94 μM) Propeptid bzw. 40,4 $\mu\text{g/ml}$ (0,45 μM) proBMP-2. Die Proben wurden für 24 h bei 20 °C inkubiert und die Messungen mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer und einer $0,4 \times 1$ cm Küvette durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm und die Bandbreite für den Anregungs- und Emissionsstrahlengang 2 nm bzw. 5 nm. Es wurden Spektren von 305 bis 400 nm im S/R-Modus mit einer Integrationszeit von 0,1 s aufgenommen. Ausgewertet wurde die Signaländerung bei 320 nm. Dargestellt sind die normierten Daten und in A die jeweils beste Anpassung an ein Zweizustandsmodell nach Gleichung 2.14. Die durch nicht-lineare Regression ermittelten thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Thermodynamische Parameter der harnstoffinduzierten Entfaltung des Propeptids und der Propeptiddomäne von proBMP-2 im Gleichgewicht bei 20 °C in 0,1 M Kalium-HEPES, pH 7,0 und den angegebenen Konzentrationen L-Arginin-HCl. Die Parameteranpassung erfolgte nach einem Zweizustandsmodell (Gleichung 2.14).

Domäne / Protein	[L-Arginin-HCl] (M)	$\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{Arg}}$ (kJ \times mol $^{-1}$)	$m_{n \rightarrow d}$ (kJ \times mol $^{-1} \times$ M $^{-1}$)
Propeptiddomäne von proBMP-2	0,7	$20,55 \pm 1,06$	$10,16 \pm 0,53$
	1,0	$18,64 \pm 0,35$	$9,21 \pm 0,17$
	1,3	$18,13 \pm 0,82$	$9,03 \pm 0,40$
Propeptid	0,7	$5,56 \pm 0,15$	$5,12 \pm 0,13$
	1,0	$5,13 \pm 0,06$	$4,90 \pm 0,05$
	1,3	$5,15 \pm 0,12$	$4,60 \pm 0,09$

Aus den Ergebnissen dieses Versuches geht hervor, daß das Propeptid als „Domäne“ von proBMP-2 wesentlich stabiler als in isolierter Form ist. Interessant ist dabei vor allem die höhere Kooperativität der Entfaltung der Propeptiddomäne gegenüber dem Propeptid. Da man annehmen kann, daß die lösungsmittlexponierte Oberfläche des denaturierten Propeptids und der denaturierten Propeptiddomäne in etwa gleich sind, sprechen die im Fall der Propeptiddomäne in etwa doppelt so großen $m_{n \rightarrow d}$ -Werte für eine — verglichen mit dem Propeptid — nur halb so große lösungsmittelzugängliche Oberfläche der Propeptiddomäne im nativen Zustand. Das läßt auf große Kontaktflächen zur BMP-Domäne und/oder zwischen den zwei Propeptiddomänen schließen beziehungsweise auf eine kompaktere Struktur der Propeptiddomäne im Vergleich zum isolierten Propeptid. Eine veränderte Struktur der Propeptiddomäne könnte allerdings auch nur durch intramolekulare Kontakte zwischen den „Domänen“ von proBMP-2 erklärt werden. Für starke Wechselwirkungen zwischen der Propeptid- und der BMP-Domäne, die eine veränderte Struktur der Propeptiddomäne zur Folge haben, sprechen auch der Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren von proBMP-2 und dem Propeptid unter verschiedenen Bedingungen (S. 80ff), sowie die Untersuchungen zur Assoziation von TGF- β 1 mit β 1-LAP von [McMahon *et al.* \[1996\]](#) (siehe auch Einleitung, S. 10ff).

Betrachtet man die Abhängigkeit der erhaltenen thermodynamischen Parameter von der L-Arginin-HCl-Konzentration, so wird deutlich, daß sowohl die thermodynamische Stabilität beider Propeptidvarianten als auch die relative Stabilisierung der Propeptiddomäne gegenüber dem isolierten Propeptid ($\Delta\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{Arg}}$) mit steigender L-Arginin-HCl-Konzentration abnahm.⁶ Beide Effekte könnten — ebenso wie die Tatsache, daß das Propeptid in 1 M L-Arginin-HCl lediglich zu etwa 90 % in nativer Form vorlag — auf die Ionenstärke der Puffer zurückzuführen sein. Ein Einfluß von L-Arginin kann aber nicht ausgeschlossen werden. Eine Extrapolation der $\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{Arg}}$ -Werte auf 0 M L-Arginin-HCl wäre allerdings auch bei einer größeren Zahl von Versuchen schwierig, da die durch Arginin hervorgerufenen Effekte nicht linear von der Konzentration der Aminosäure abhängen. Zum einen resultiert aus der Erhöhung der Oberflächenspannung des Wassers durch diese Aminosäure eine präferentielle Hydratation und damit eine Stabilisierung der nativen Spezies des Proteins. Gleichzeitig jedoch wirkt Arginin, aufgrund der Wechselwirkung seiner Guanidinogruppe mit dem Peptidrückgrat und negativ geladenen Seitenketten des Proteins, also durch präferentielle Bindung, stabilisierend auf

⁶ Die Änderungen der freien Enthalpien der Denaturierung der Propeptiddomäne und des Propeptids unterscheiden sich um $\Delta\Delta G_{n \rightarrow d}^{\text{Arg}}$ -Werte von $14,99 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$, $13,51 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ und $12,98 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ in Gegenwart von 0,7 M, 1,0 M beziehungsweise 1,3 M L-Arginin-HCl.

(partiell) entfaltete Proteinmoleküle. Abhängig von der Oberflächenladung und Hydrophobizität der nativen beziehungsweise den nicht-nativen Spezies können beide Effekte unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Oft überwiegt eine leichte Nettodestabilisierung des nativen Zustandes, da Arginin auch mit diesem interagiert und so unter Umständen den Effekt der Oberflächenspannung überkompensiert [Kita *et al.*, 1994; Lin & Timasheff, 1996]. Letzteres ist aber aufgrund der positiven Nettoladung des Propeptids unter den Versuchsbedingungen nicht sehr wahrscheinlich. Durch Verwendung anderer Argininsalze, wie L-Arginin-SO₄, beziehungsweise durch Ausgleich der Ionenstärke mittels NaCl ließe sich klären, ob die festgestellte Destabilisierung des Propeptids beziehungsweise der Propeptiddomäne bei Erhöhung der L-Arginin-HCl-Konzentration auf die Aminosäure oder die Chloridionen zurückzuführen ist.

3.4.2 Kinetik der Propeptidfaltung & -entfaltung

Die Gleichgewichtsmessungen zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter der chemisch induzierten Denaturierung von BMP-2, dem Propeptid, sowie der Propeptid- und BMP-Domäne von proBMP-2 konnten jeweils nach einem Zweizustandsmodell ausgewertet werden. Daraus folgt aber nicht, daß diese Proteine beziehungsweise „Domänen“ tatsächlich sogenannte *two-state folder* sind. Die Bildung von Intermediaten während des Faltungs- beziehungsweise Entfaltungsprozesses kann meist erst durch kinetische Messungen festgestellt werden. Im Anschluß an die Untersuchung der thermodynamischen Stabilität der BMP-2-Varianten sollte daher die Analyse der Kinetik der Faltung und Entfaltung erste Erkenntnisse zur Strukturbildung des Propeptids und zu möglichen Mechanismen der Interaktion der Propeptiddomäne mit der BMP-Domäne von proBMP-2 liefern.

Ausgehend von den Untersuchungen im Gleichgewicht wurden Faltung und Entfaltung des Propeptids im Vergleich mit der Propeptiddomäne kinetisch untersucht. Stammlösungen des denaturierten beziehungsweise nativen Proteins wurden dazu bei 20 °C in 0,1 M Kalium-HEPES, 1,0 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen verdünnt und die Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (siehe auch Abschnitte 2.2.5.2 und 2.2.6.2). Ein Teil der Faltungs- und Entfaltungskurven des Propeptids und der Propeptiddomäne, die durch manuell gestartete Messungen erhalten wurden, sind in Abbildung 3.26 dargestellt. Außerdem wurden *stopped-flow*-Messungen zur

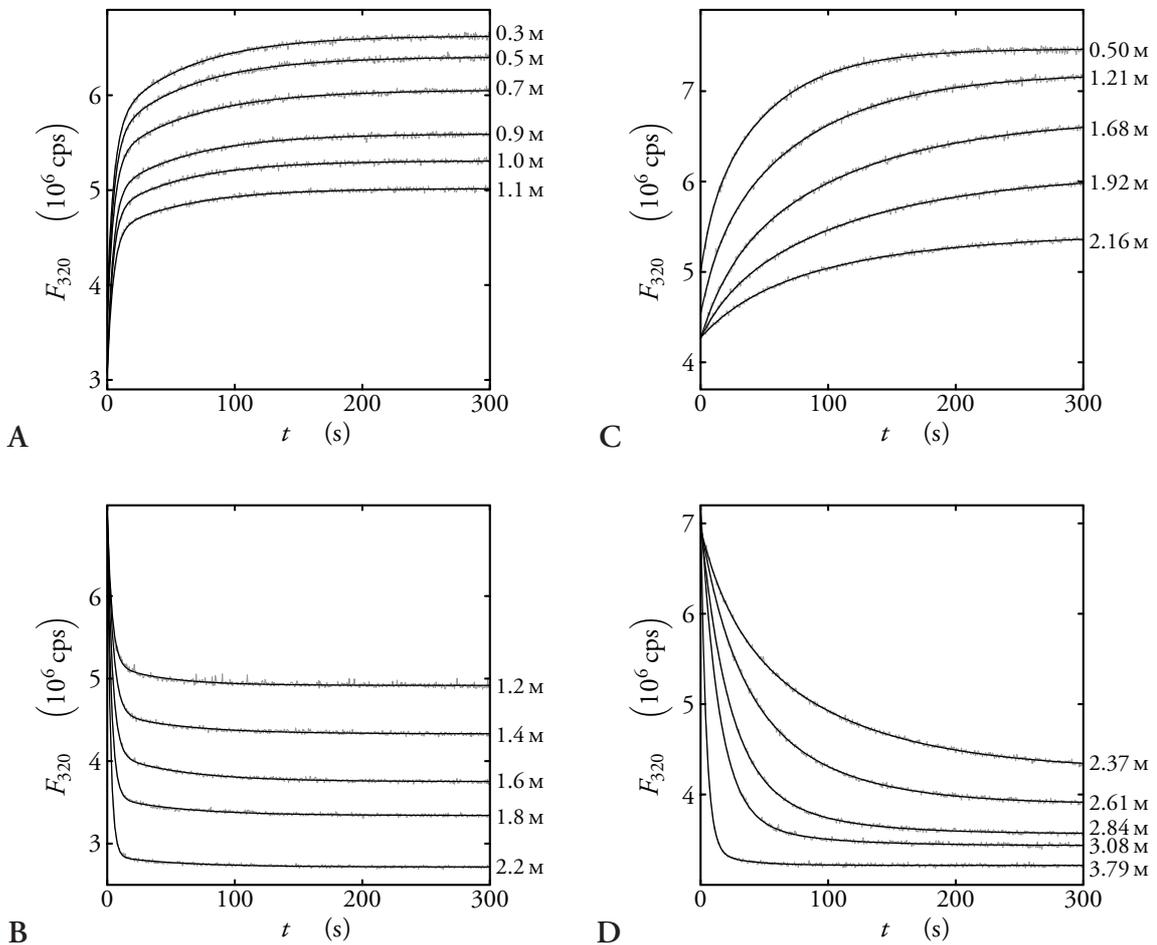
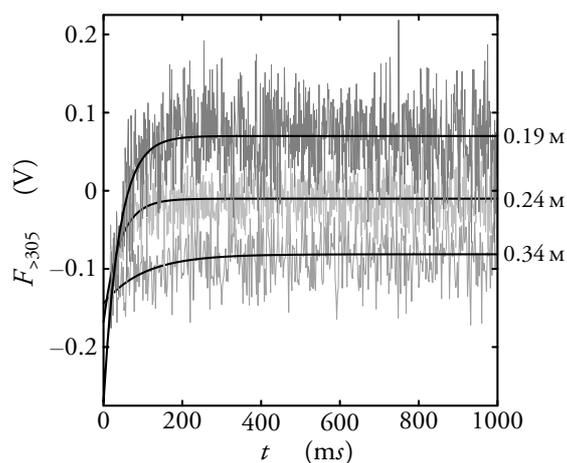


Abbildung 3.26: Faltungs- & Entfaltungskinetiken des Propeptids (A, B) und der Propeptiddomäne von proBMP-2 (C, D) bei 20 °C in 0,1 M Kalium-HEPES, 1,0 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 und den jeweils rechts neben den Kurven angegebenen Harnstoffkonzentrationen. Die Messungen wurden mit einem FluoroMax-3-Fluoreszenzspektrometer und einer rührbaren 1×1 cm Küvette durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm und die Bandbreite für den Anregungs- und Emissionsstrahlengang 2 nm bzw. 5 nm. Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde bei 320 nm in Intervallen von 0,5 s mit 0,37 s Integrationszeit aufgenommen. Die Proteinstammlösungen wurden mit 0,1 M Kalium-HEPES, 1,0 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 hergestellt. Die Stamm- lösung für die Renaturierung enthielt zusätzlich 5 M Harnstoff. Die Verdünnungen betru- gen jeweils 1:10 und 1:20 für proBMP-2 bzw. das Propeptid, sowie die Proteinkonzentrationen in der Küvette 40 µg/ml (0,45 µM) bzw. 34 µg/ml (1,06 µM). Die Auswertung der Meßdaten (graue Linien) erfolgte mit Hilfe doppelt exponentieller Funktionen 1. Ordnung (Gleichungen 2.18 (Faltung) und 2.17 (Entfaltung)). Die besten Anpassungen sind durch die schwarzen Linien repräsentiert.

Vervollständigung der Datensätze und zur Kontrolle durchgeführt. Allerdings war es mit dieser Methode nicht möglich, auch die langsamen Phasen zu erfassen. Exemplarisch hierfür sind drei für die dritte, sehr schnelle Faltungsphase des Propeptids erhaltenen Kurven in [Abbildung 3.27](#) gezeigt.

Abbildung 3.27: Faltungskinetiken des Propeptids bei 20 °C in 0,1 M Kalium-HEPES, 1,0 M L-Arginin-HCl, pH 7,0 und den jeweils rechts neben den Kurven angegebenen Harnstoffkonzentrationen. Die Messungen wurden mit einem *Applied Photophysics SX.18MV stopped-flow*-Instrument mit Fluoreszenzdetektor durchgeführt. Die Anregungs- und die *cut-off*-Wellenlänge betragen 280 nm bzw. 305 nm. Es wurden 650 V Verstärkerspannung angelegt. Verdünnung 1:26, Proteinkonzentration 26 µg/ml (0,8 µM); weitere Angaben in [Abschnitt 2.2.5.2](#).



Um Aussagen über die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der Harnstoffkonzentration machen zu können, wurden die Daten mit Hilfe von CHEVRON-Plots ausgewertet ([Abb. 3.28 A & C](#)). Die nach [Gleichung 2.22](#) berechneten kinetischen Parameter für die bei beiden Varianten beobachtete schnelle Phase sind in [Tabelle 3.8](#) zusammengefaßt. Außerdem wurden für die Auswertung die relativen Amplituden der Phasen berücksichtigt ([Abb. 3.28 B & D](#); [Abb. 3.29](#)). Da hierfür nur die biphasischen Kurvenverläufe der manuell gestarteten Messungen verwendet werden konnten, wurde, sofern erforderlich, der dabei nicht erfaßte Anteil an der Gesamtamplitude einer dritten Phase zugeordnet.

Das Propeptid und die Propeptiddomäne zeigten biphasische Faltungs- und — außerhalb des Übergangsbereiches — monophasische Entfaltungskinetiken. Für das Propeptid konnte bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen sogar eine dritte, sehr schnelle Faltungsphase detektiert werden. Auch bei der Faltung der Propeptiddomäne trat wahrscheinlich bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen eine dritte, sehr schnelle Phase auf. Das ließ sich aus der mit den manuell gestarteten Messungen nicht erfaßten Amplitude schließen. Im Unterschied zum isolierten Propeptid konnte diese Phase aber nicht mittels der *stopped-flow*-Technik nachgewiesen werden. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür war die Verwendung eines *cut-off*-Filters anstatt eines Monochromators im Emissionsstrahlengang des Meßinstruments.

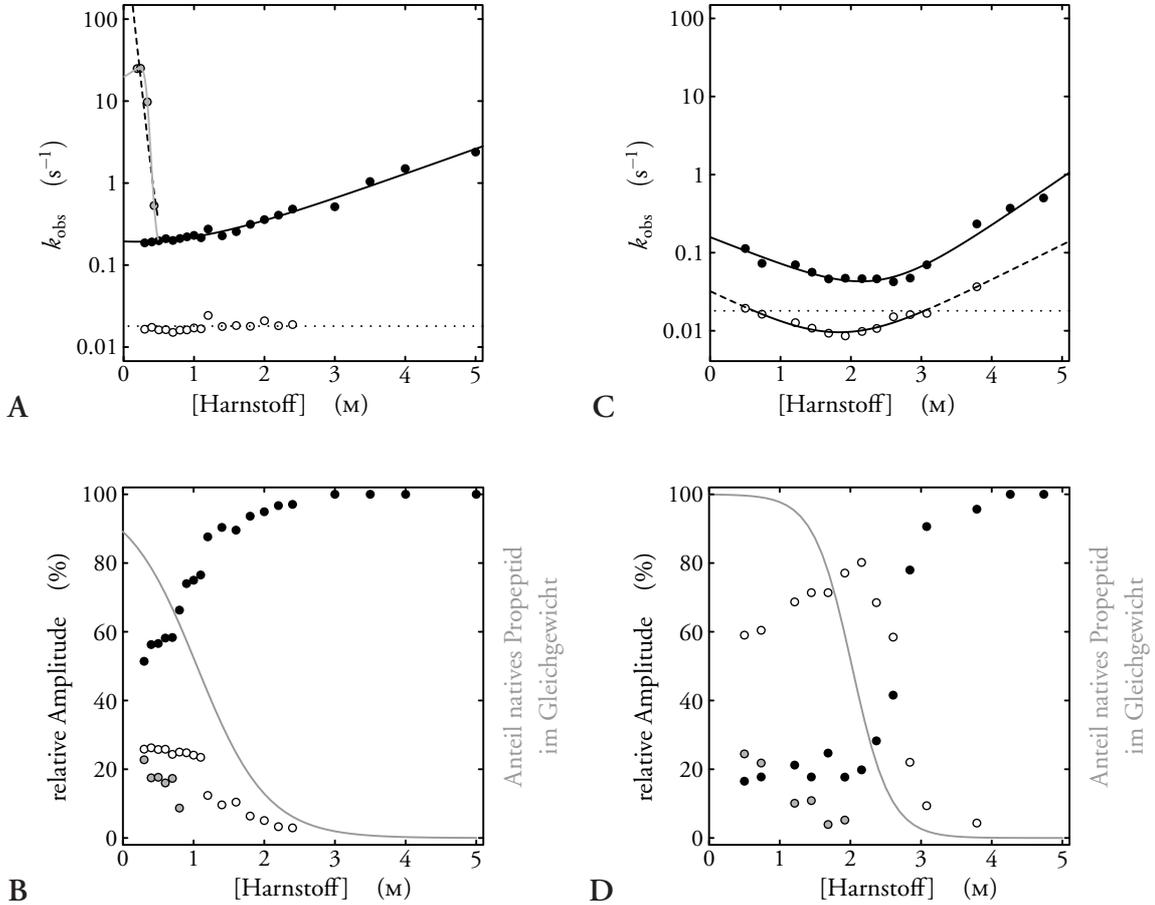


Abbildung 3.28: CHEVRON-Plots und relative Amplituden der Phasen der Faltungs- und Entfaltungskinetiken des Propeptids (**A, B**) und der Propeptiddomäne von proBMP-2 (**C, D**) bei 20 °C in 0,1 M Kalium-HEPES, 1,0 M L-Arginin-HCl, pH 7,0. Beobachtete Geschwindigkeitskonstanten (**A, C**) und die relativen Amplituden (**B, D**) der schnellen (●) und langsamen Phase (○), sowie der für das Propeptid durch *stopped-flow*-Messungen ermittelten sehr schnellen Phase (⦿ in **A**). Bei den manuell gestarteten Messungen konnte für die Rückfaltung beider Proteine ein Teil der absoluten Amplitude nicht erfasst werden. Die Differenz der Summe der relativen Amplituden der beiden aufgelösten Phasen zu 100 % ist in **B** und **D** mit ● dargestellt. Beste Parameteranpassungen für k_{obs} nach Gleichung 2.22 (schwarze Linien) bzw. 2.24 (graue Linie) in **A** und **C**, im Fall der Propeptidfaltung unter Berücksichtigung der durch *stopped-flow*-Messungen ermittelten Werte (⦿). Die unterbrochenen Linien stellen jeweils unsichere Extrapolationen dar. Die gepunktete Linie in **A** und **C** entspricht dem k_{obs} -Mittelwert der langsamen Phase der Propeptidfaltung. In **B** und **D** sind zusätzlich die Übergangskurven der entsprechenden Gleichgewichtsdenaturierungen eingezeichnet (durchgehende graue Linien; vgl. Abb. 3.25).

Tabelle 3.8: Kinetische Parameter der schnellen Phase der Faltung und Entfaltung des Propeptids bzw. der Propeptiddomäne von proBMP-2 (Abb. 3.28A/C; Parameteranpassung nach Gleichung 2.22; apparente k -Werte für 0 M Harnstoff).

Parameter*	$k_{d \rightarrow n}^{1 \text{ M Arg}}$	$k_{n \rightarrow d}^{1 \text{ M Arg}}$	$m_{d \rightarrow \ddagger}$	$m_{n \rightarrow \ddagger}$
Propeptid	$0,1178 \pm 0,0221$	$0,0765 \pm 0,0238$	$1,42 \pm 1,53$	$1,72 \pm 0,18$
Propeptiddomäne	$0,1575 \pm 0,0325$	$0,0008 \pm 0,0005$	$2,00 \pm 0,45$	$3,46 \pm 0,37$

* Einheiten: $[k] = s^{-1}$, $[m] = k] \times \text{mol}^{-1} \times \text{M}^{-1}$

Sowohl Faltung als auch Entfaltung liefen bei der Propeptiddomäne im Übergangsbereich deutlich langsamer ab als beim isolierten Propeptid (Abb. 3.28). Die sich rechnerisch aus einem Zweizustandsmodell (Gleichung 2.22) ergebenden, extrapolierten apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung waren — bezogen auf die schnelle Phase — für das Propeptid und die Propeptiddomäne in etwa gleich ($0,12 \text{ s}^{-1}$ beziehungsweise $0,16 \text{ s}^{-1}$), die der Entfaltung war jedoch für das Propeptid circa 100-mal größer als für die Propeptiddomäne ($76,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ beziehungsweise $0,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Aus den CHEVRON-Plots geht außerdem eine für die beiden Propeptidvarianten unterschiedliche Abhängigkeit von k_{obs} von der Harnstoffkonzentration hervor. Insbesondere $m_{n \rightarrow \ddagger}$ war für die Propeptiddomäne deutlich größer. Mit den $m_{n \rightarrow d}$ -Werten aus den Gleichgewichtsmessungen ergaben sich ähnliche Tanford β -Werte der Entfaltung, $\beta_T = \frac{m_{n \rightarrow \ddagger}}{m_{n \rightarrow d}}$ [Fersht, 1999], von 0,35 für das Propeptid beziehungsweise 0,375 für die Propeptiddomäne. Diese Werte sprechen für einen bei der Denaturierung durchlaufenen Übergangszustand, der — bezogen auf seine lösungsmittelzugängliche Oberfläche — zwischen dem jeweiligen nativen und dem denaturierten Zustand einzuordnen ist. Da der Vergleich von $m_{n \rightarrow d}$ beider Varianten jedoch auf eine bedeutend geringere Oberfläche der gefalteten Propeptiddomäne schließen läßt, ist vermutlich auch der Übergangszustand bei der Denaturierung der Propeptiddomäne weniger lösungsmittel exponiert als beim Propeptid.

Die dritte, sehr schnelle Faltungsphase des Propeptids zeigte eine nicht-lineare Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Aufgrund der wenigen Datenpunkte war die Auswertung stark fehlerbehaftet. Daher sind die für diese Phase nach Gleichung 2.22 beziehungsweise 2.24 angepaßten Parameter hier nicht aufgeführt. Die für die Faltung besonders interessanten, sehr niedrigen Harnstoffkonzentrationen konnten meßtechnisch nicht erfaßt werden, da die extrem hohe Viskosität der Argininpuffer eine vollständige und schnelle Durchmischung bei den erforderlichen Verdünnungsverhältnissen verhinderte.

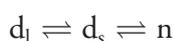
Zwar konnte die vermutete dritte, sehr schnelle Faltungsphase für die Propeptidomäne nicht nachgewiesen werden, die sich für sie rechnerisch ergebene relative Amplitude jedoch entsprach der dieser Phase für das Propeptid (20–30 %). Da die andere, für beide Propeptidvarianten nachweisbare schnelle Faltungsphase — wie oben festgestellt — auf ähnliche apparente Geschwindigkeitskonstanten zurückgeführt werden konnte, besteht Grund zur Annahme, daß auch die sehr schnelle Faltungsphase für beide Varianten ähnliche Werte aufweist. Das Vorhandensein einer dritten Phase spricht jedoch für die Bildung eines Intermediates bei der Faltung, ebenso wie die Auswertung der relativen Amplituden und die Tatsache, daß bei beiden Varianten die Summe der kinetischen m -Werte nicht gleich dem m -Wert der jeweiligen Gleichgewichtsdenaturierung ist ($m_{d \rightarrow \ddagger} + m_{n \rightarrow \ddagger} \neq m_{n \rightarrow d}$).

Für beide Propeptidvarianten wurde jedoch auch eine langsame Faltungsphase nachgewiesen. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der langsamen Phase der Propeptidfaltung war unabhängig von der Harnstoffkonzentration. Zusammen mit dem k_{obs} -Wert von $0,018 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ spricht diese Tatsache deutlich für eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung, nachfolgend als Prolylisomerisierung bezeichnet. Die relative Amplitude der langsamen Phase lag unter 30 %; das deutet auf eine *cis*-Konformation der betreffenden Prolylpeptidbindung im denaturierten Protein hin [z.B.: Goto & Hamaguchi, 1982; Kiefhaber *et al.*, 1990; Nall *et al.*, 1978]. Das denaturierte Propeptid kann also nur falten, wenn die betroffene Prolylpeptidbindung in der nativen *trans*-Konformation vorliegt. Bei stichprobenweise durchgeführten *double-jump*-Experimenten konnte die langsame Phase nahezu vollständig eliminiert werden, was ebenfalls für eine Prolylisomerisierung im denaturierten Propeptid spricht (nicht gezeigt).

Die k_{obs} -Werte der langsamen Faltungsphase der Propeptidomäne zeigten dagegen eine geringe Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Die gemessenen Werte lagen hier aber ebenfalls in der Größenordnung von Prolylisomerisierungen [Grathwohl & Wüthrich, 1981; Reimer *et al.*, 1998]. Die wahrscheinlichste Erklärung für die im Vergleich zum Propeptid größere Amplitude der langsamen Faltungsphase wäre, daß zusätzlich zu der für die Propeptidfaltung gezeigten Prolylisomerisierung eine zweite limitierend für die Faltung der Propeptidomäne ist, wie beispielsweise His⁻⁹–Pro⁻⁸, die sich im „Gelenkbereich“ zwischen Propeptid- und BMP-Domäne befindet. Die Abhängigkeit von k_{obs} der langsamen Phase von der Harnstoffkonzentration könnte auf den noch vorhandenen strukturierten Proteinbestandteil, die

BMP-Domäne zurückzuführen sein. Allerdings kann die Geschwindigkeit der Prolylisomerisierung auch ohne Reststrukturen im Protein von der Denaturierungsmittelkonzentration anhängig sein, wie für Barstar, ein Protein mit einer *cis*-Prolylpeptidbindung, gezeigt werden konnte [Shastry *et al.*, 1994].

Für beide Propeptidvarianten existieren also mindestens zwei denaturierte Spezies, die langsam beziehungsweise schnell in die jeweils native Konformation falten. Das einfachste kinetische Modell, das zur Beschreibung der Faltung der beiden Varianten verwendet werden kann, ist ein sequentielles Dreizustandsmodell, bei dem die langsam faltende Spezies (d_l) zunächst in die schnell faltende (d_s) übergeht (langsame Phase), die dann zur nativen Struktur (n) faltet (schnelle Phase):



Es wird angenommen, daß d_l und d_s sich nicht in ihren spektroskopischen Eigenschaften unterscheiden. Die Abhängigkeit der relativen Amplitude der schnellen Phase von der Harnstoffkonzentration spiegelt dabei das Gleichgewicht $d_s \rightleftharpoons n$ wider.

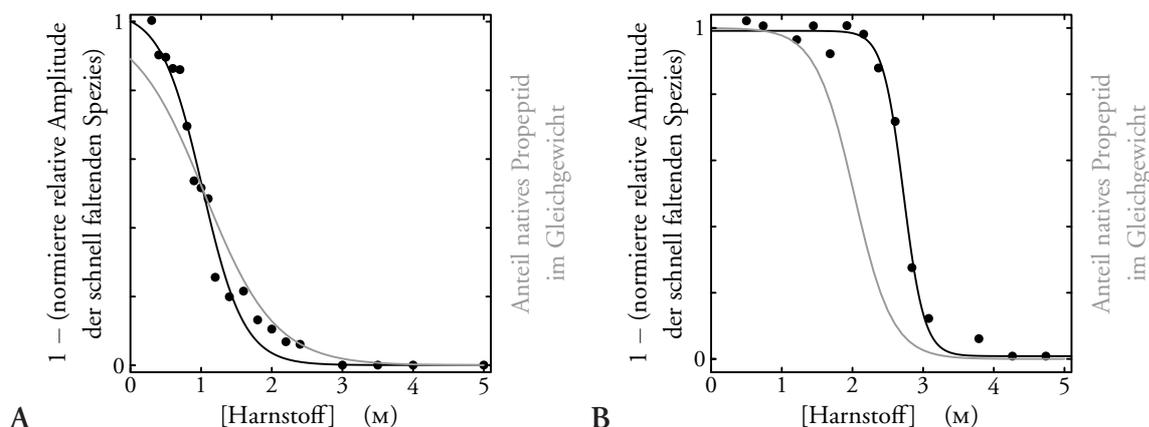


Abbildung 3.29: Vergleich der normierten Amplituden der schnellen Phase der (Ent)Faltungskinetik (●, schwarze Linie entspricht Auswertung nach Gleichung 2.14) mit der Gleichgewichtsdenaturierung (graue Linie) des Propeptids (A) bzw. der Propeptiddomäne von proBMP-2 (B). Für die Normierung wurde angenommen, daß die relative Amplitude der schnellen Phase bei 0 M Harnstoff für das Propeptid 52 % und für die Propeptiddomäne 19 % betrug.

In Abbildung 3.29 sind die normierten Amplituden der schnellen Phase zusammen mit den Übergangskurven der Gleichgewichtsdenaturierungen der beiden Propeptidvarianten dargestellt. Hier wird deutlich, daß der jeweils native Zustand thermodynamisch instabiler ist, als kinetisch. Die Energieiedifferenz resultiert aus der Heterogenität des denaturierten Zustands

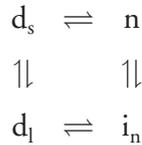
und entspricht dem Gleichgewicht $d_i \rightleftharpoons d_s$. Die nach Gleichung 2.14 berechneten thermodynamischen Parameter sind für die thermodynamische und die kinetische Analyse in Tabelle 3.9 gegenübergestellt. Das sequentielle Dreizustandsmodell erklärt allerdings nicht das Auftreten der dritten Faltungsphase für das Propeptid bei sehr niedrigen Harnstoffkonzentrationen.

Tabelle 3.9: Stabilität der nativen Spezies des Propeptids bzw. von proBMP-2 gegenüber der schnell faltenden denaturierten Spezies und im Gleichgewicht mit allen denaturierten Spezies. Auswertung der normierten relativen Amplituden der schnellen Faltungsphase und der Gleichgewichtsdenaturierung (Parameteranpassung nach Gleichung 2.14). Vergleiche auch Abbildungen 3.25 und 3.29, sowie Tabelle 3.7.

Parameter*	$\Delta G_{n \rightarrow d}^{1 \text{ M Arg}}$	$\Delta G_{n \rightarrow d_s}^{1 \text{ M Arg}}$	$m_{n \rightarrow d}$	$m_{n \rightarrow d_s}$
	Gleichgewicht	kin. Amplitude	Gleichgewicht	kin. Amplitude
Propeptid	5,1	8,5	4,9	8,3
Propeptiddomäne	18,6	45,2	9,2	16,5

* Einheiten: $[\Delta G] = \text{kJ} \times \text{mol}^{-1}$, $[m] = \text{kJ} \times \text{mol}^{-1} \times \text{M}^{-1}$

Ein weiteres mögliches kinetisches Modell, das diese dritte Phase erklären würde, ist ein paralleles Vierzustandsmodell:



Die dritte, sehr schnelle Faltungsphase könnte auf einen hohen m -Wert für $k_{d_i \rightarrow i_n}$ zurückgeführt werden. Die Existenz von i_n müsste allerdings erst durch Doppelsprungexperimente (denaturierend \rightarrow nativ \rightarrow denaturierend) nachgewiesen werden.

Beide Modelle sind jedoch in ihrer vorgestellten, einfachen Form nicht ausreichend, um die Faltungskinetik des BMP-2-Propeptids und der Propeptiddomäne auf molekularer Ebene zu beschreiben, da das Propeptid 17 Prolinreste enthält. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß es mehr als nur vier kinetisch populierte Zustände für beide Propeptidvarianten gibt. Daher wurde auf die Berechnung von mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten auf Basis der vorhandenen Datensätze verzichtet.

3.5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals ein BMP-Protein sowie ein BMP-Propeptid durch *in vitro*-Renaturierung aus *E. coli inclusion bodies* hergestellt. Entgegen den Erwartungen ergab der Vergleich mit der Renaturierung von BMP-2 keinen Einfluß der Propeptidomäne auf die Faltungsausbeute der BMP-Domäne in proBMP-2. Die erzielten Ausbeuten erlaubten eine umfassende Charakterisierung der Varianten, einschließlich zahlreicher Kristallisationsexperimente, die bislang allerdings nicht erfolgreich waren (nicht gezeigt). Die durch das Verfahren gegebene Möglichkeit zur Herstellung von großen Mengen proBMP-2 sollte langfristig die Strukturaufklärung ermöglichen und zu einem besseren Verständnis der Funktionen der Propeptide der BMP-Familie beitragen.

Die biologische Aktivität von BMP-2 und drBMP-2, daß durch limitierte Proteolyse aus proBMP-2 gewonnen wurde, konnte im Tiermodell und in Zellkultur gezeigt werden [Krause, 2003, Diplomarbeit]. Die limitierte Proteolyse von renaturiertem (pro)BMP-2 erleichterte die Reinigung von nativ gefaltetem, biologisch aktivem drBMP-2, da die falsch gefalteten monomeren und disulfidverbrückten oligomeren Spezies abgebaut wurden. Dieses Verfahren zählt zu den effizientesten, bislang bekannten für die Gewinnung biologisch aktiven BMPs.

Die Untersuchung der Quartärstruktur von proBMP-2 ergab, daß das über eine Disulfidbrücke bereits kovalent dimerisierte Protein in Lösung Tetramere bildet. Das ist vermutlich eine Folge der Assoziation der je zwei Propeptidomänen eines proBMP-2-Dimers, da auch für das Propeptid eine nicht-kovalente Assoziation zu Dimeren gezeigt werden konnte. Aufgrund der relativ hohen Dissoziationskonstanten des proBMP-2-Tetramers beziehungsweise des Propeptiddimers ist jedoch eine biologische Relevanz der Oligomerisierung eher unwahrscheinlich. Chemische Quervernetzung kombiniert mit limitierter Proteolyse und Massenspektrometrie sollte eine Identifikation der miteinander wechselwirkenden Bereiche der Untereinheiten erlauben.

Die spektroskopische Charakterisierung der BMP-Varianten ergab, daß die zur Trennung der dimeren und monomeren proBMP-2-Spezies verwendeten Reinigungsbedingungen die Denaturierung der Propeptidomäne bewirkten. Außerdem wurde deutlich, daß die in nativ gefaltetem BMP-2 partiell exponierten Tryptophanreste in proBMP-2 besser vom Lösungsmittel abgeschirmt sind. Dies spricht für eine Interaktion der BMP- und der Propeptidomäne in proBMP-2 und könnte auch die unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften von

BMP-2 und proBMP-2 erklären. Zudem wird dadurch sehr wahrscheinlich auch die Bindung der BMP-Domäne an BMP-Rezeptoren vom Typ I verhindert.

Die CD-spektroskopischen Analysen lieferten den stärksten Hinweis auf die native Struktur des renaturierten Propeptids. Die Messungen weisen zudem auf Strukturänderungen der Propeptiddomäne und/oder der BMP-Domäne in proBMP-2 hin, die wahrscheinlich durch Wechselwirkungen der beiden „Domänen“ untereinander hervorgerufen werden.

Die aufgrund der unterschiedlichen spektroskopischen Eigenschaften der drei Varianten vermutete Interaktion zwischen Propeptid- und BMP-Domäne wurde durch Gleichgewichtsdenaturierungen und Untersuchung der Faltungs- und Entfaltungskinetiken näher charakterisiert. Dabei wurde eine starke Stabilisierung der Propeptiddomäne in proBMP-2 gegenüber dem isolierten Propeptid festgestellt, die wahrscheinlich auf eine große Kontaktfläche zwischen beiden „Domänen“ zurückzuführen ist. Die kinetischen Daten lassen sich zu folgender Arbeitshypothese für weitergehende Untersuchungen zusammenfassen. Beide Propeptidvarianten weisen eine vergleichbare Faltungskinetik auf, die nicht mit einem Zweizustandsmodell beschrieben werden kann. Die höhere Stabilität der Propeptiddomäne von proBMP-2 gegenüber dem isolierten Propeptid manifestiert sich in einer langsameren Entfaltungskinetik, die auf deren zusätzliche Kontakte mit der BMP-Domäne zurückgeführt werden kann. Geschwindigkeitsbestimmend für die Entfaltung der Propeptiddomäne könnte also die intramolekulare Dissoziation von der BMP-Domäne sein. Bei beiden Propeptidvarianten konnte eine langsame Faltungsphase beobachtet werden, deren apparente Geschwindigkeitskonstante und Amplitude auf eine oder mehrere Prolylisomerisierungen in den jeweiligen denaturierten Spezies hinweist. Für die Ausbildung der Kontakte zwischen Propeptid- und BMP-Domäne ist wahrscheinlich die korrekte Konformation einer weiteren Prolylpeptidbindung im „Gelenkbereich“ zwischen Propeptid- und BMP-Domäne notwendig. Durch Doppelsprungexperimente sollte sich klären lassen, inwieweit Prolylisomerisierungen die Faltung des Propeptids und der Propeptiddomäne limitieren und welches Modell zur Beschreibung der Strukturbildung am besten geeignet ist. Mittels NMR-Spektroskopie und kinetischen Messungen bei niedrigem pH könnte die vermutete Beteiligung der Isomerisierung der His⁻⁹-Pro⁻⁸-Bindung an der Ausbildung der Wechselwirkungen zwischen Propeptid- und BMP-Domäne belegt werden.

ANHANG

ABKÜRZUNGEN

A	Absorption	HFBA	Heptafluorobuttersäure
ACN	Acetonitril	HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
Amp	Ampicillin	His-Tag	Histidin-Tag
AP	alkalische Phosphatase	h	Stunde(n)
APS	Ammonium-peroxo- <i>di</i> -sulfat	IB	<i>inclusion bodies</i> (Einschlußkörper)
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	IMAC	immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie
BMPR	BMP-Rezeptor	IPA	Isopropylalkohol (2-Propanol)
bp	Basenpaare	IPTG	β -D-Isopropyl-thiogalactopyranosid
BPB	Bromphenolblau	Kan	Kanamycin
BSA	Rinderserumalbumin	kb	Kilobasenpaare
CD	Circulardichroismus	kDa	Kilodalton
cDNA	<i>complementary DNA</i>	LAP	<i>latency-associated peptide</i>
CHAPS	CHAPS 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonsäure	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure	LMW	<i>low molecular weight</i>
CTAB	(N-Cetyl-N,N,N-trimethyl)-ammoniumbromid	MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
DAB	Deutsches Arzneibuch	β -ME	2-Mercapto-ethanol
Da	Dalton	MeOH	Methanol
deg	<i>degree</i>	MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
DMS	Dimethylsulfid	MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	M_r	molare Masse
DNA	Desoxyribonucleinsäure	(m)M	(milli)molar
DNase	Desoxyribonuclease	MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat	NaDoc	Natrium-desoxycholat
DPP	<i>Decapentaplegic</i>	NGF	<i>nerve growth factor</i>
drBMP	<i>digit removed BMP</i>	Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tetraacetat
dsDNA	doppelsträngige DNA	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
DTT	Dithiothreitol	p.a.	<i>pro analysis</i>
EC ₅₀	halb-maximale effektive Konzentration	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat	PCR	Polymerasekettenreaktion
ESI	<i>electro-spray ionization</i>	PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
EtOH	Ethanol	<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
GDF	<i>growth and differentiation factor</i>	pI	isoelektrischer Punkt
GdmCl	Guanidiniumchlorid	PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat	PPG	Polypropylenglycol
GSH	Glutathion, reduziert	PPS	3-(1-Pyridino)-1-propansulfonat
GSSG	Glutathion, oxidiert	proBMP	BMP mit N-terminalem Propeptid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl]-ethansulfonsäure	PSS	Pyridin-3-sulfonsäure
		PTFE	Poly-(tetrafluor-ethylen)

- RNA Ribonucleinsäure
RNase Ribonuclease
RP-HPLC *reversed phase – high performance liquid chromatography*
rpm *revolutions per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT Raumtemperatur
SBTI Sojabohnen-Trypsininhibitor
SDS Natrium-dodecylsulfat
S/R-Modus Signal/Referenz-Modus
Taq *Thermus aquaticus*
TCA Trichloressigsäure
TEMED
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGF *transforming growth factor*
Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100
t-Octyl-phenoxy-polyethoxyethanol
U *unit* (Einheit der Enzymaktivität)
UV ultraviolett
v/v Volumen pro Volumen
w/v Gewicht pro Volumen

TABELLENVERZEICHNIS

1.1	Nomenklatur homodimerer BMPs und GDFs	2
2.1	Chemikalien	15
2.2	Enzyme & Proteine	17
2.3	Geräte, Kits, Standards & Zubehör	23
2.4	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen [Nesterenko <i>et al.</i> , 1995]	35
2.5	Molare Absorptionskoeffizienten	42
3.1	Ausbeuten nach heterologer Expression der cDNAs in <i>E. coli</i>	55
3.2	Ausbeuten nach Renaturierung und Reinigung	68
3.3	Fluoreszenzeigenschaften von proBMP-2	79
3.4	Fluoreszenzeigenschaften von BMP-2	84
3.5	Fluoreszenzeigenschaften des Propeptids	87
3.6	Thermodynamische Parameter der Entfaltung von proBMP-2 und BMP-2	92
3.7	Thermodynamische Parameter der Entfaltung des Propeptids	95
3.8	Kinetische Parameter der Propeptidfaltung & -entfaltung	101
3.9	Amplituden der schnellen Phase und Gleichgewichtsdenaturierung	104

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	BMP-2-Dimer – Kristallstruktur	7
1.2	BMP-7 im Komplex BMPR-IA (ECD) und ActR-II (ECD)	9
1.3	Aminosäuresequenz von proBMP-2	14
2.1	Plasmide pcDNA3- <i>preprobmp-2</i> & pET-15b- <i>probmp-2</i>	22
2.2	Plasmide pET-11a- <i>bmp-2</i> & pET-15b- <i>bmp-2-propeptide</i>	30
3.1	Oxidative Dimerisierung von proBMP-2	57
3.2	Rekombinante Herstellung von proBMP-2. SDS-PAGE.	59
3.3	Rekombinante Herstellung von BMP-2. SDS-PAGE.	63
3.4	Rekombinante Herstellung des BMP-2-Propeptids. SDS-PAGE	66
3.5	Prozessierung von (pro)BMP-2	67
3.6	Reinigung von drBMP-2	68
3.7	Aktivität von drBMP-2 und proBMP-2 im Tiermodell (Histologie)	70
3.8	Aktivität von drBMP-2 und proBMP-2 im Tiermodell (AP-Aktivität)	71
3.9	Aktivität von drBMP-2 und BMP-2 in Zellkultur (AP-Aktivität)	73
3.10	Analytische Ultrazentrifugation von proBMP-2	74
3.11	Analytische Ultrazentrifugation des BMP-2-Propeptids	76
3.12	UV- und Differenzspektren von proBMP-2	78

3.13	Fluoreszenzemissionsspektren von proBMP-2	79
3.14	Fern-UV-CD-Spektren von proBMP-2	81
3.15	Fern-UV-CD-Spektren von proBMP-2, BMP-2 und Propeptid	81
3.16	UV- und Differenzspektren von BMP-2	83
3.17	Fluoreszenzemissionsspektren von BMP-2	84
3.18	Fern-UV-CD-Spektren von BMP-2	85
3.19	UV- und Differenzspektren des BMP-2-Propeptids	87
3.20	Fluoreszenzemissionsspektren des BMP-2-Propeptids	88
3.21	pH-Abhängigkeit der Propeptid-Fluoreszenz	88
3.22	Fern-UV-CD-Spektren des BMP-2-Propeptids	89
3.23	GdmCl-induzierte Entfaltung von proBMP-2 und BMP-2	92
3.24	Fluoreszenzemissionsspektren des Propeptids & von proBMP-2	94
3.25	Harnstoffinduzierte Entfaltung des Propeptids	95
3.26	Faltungs- & Entfaltungskinetiken des Propeptids und der Propeptidomäne	98
3.27	Faltungskinetiken des Propeptids	99
3.28	CHEVRON-Plots	100
3.29	Amplituden der schnellen Phasen	103

LITERATURVERZEICHNIS

- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**:223–230.
- Arnold, U., & Ulbrich-Hofmann, R. (1999). Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal. Biochem.*, **271**:197–199.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., & Smith, J. A. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Bd. 2. Green Publishing Associates & John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Bahamonde, M. E., & Lyons, K. M. (2001). BMP3: To be or not to be a BMP. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **83-A Suppl. 1**:S56–62.
- Baker, D., Sohl, J. L., & Agard, D. A. (1992). A protein-folding reaction under kinetic control. *Nature*, **356**:263–265.
- Balemans, W., & van Hul, W. (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: A cocktail of modulators. *Dev. Biol.*, **250**:231–250.
- Bauskin, A. R., Zhang, H. P., Fairlie, W. D., He, X. Y., Russell, P. K., Moore, A. G., Brown, D. A., Stanley, K. K., & Breit, S. N. (2000). The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF- β superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J.*, **19**:2212–2220.
- Beck, S., Good, J. A. L., Guzman, M., Haim, N. B., Roy, K., Beermann, F., & Constam, D. B. (2002). Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat. Cell Biol.*, **4**:981–985.
- Beissinger, M., & Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.*, **379**:245–259.
- Bonewald, L. F., Wakefield, L., Oreffo, R. O., Escobedo, A., Twardzik, D. R., & Mundy, G. R. (1991). Latent forms of transforming growth factor β (TGF- β) derived from bone cultures: Identification of a naturally occurring 100-kDa complex with similarity to recombinant latent TGF- β . *Mol. Endocrinol.*, **5**:741–751.
- Bostrom, M. P. (1998). Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin. Orthop.*, **355 Suppl.**:116–123.

- Brandts, J. F., Halvorson, H. R., & Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to *cis-trans* isomerism of proline residues. *Biochemistry*, **14**:4953–4963.
- Brinkmann, U., Mattes, R. E., & 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.
- Brown, P. D., Wakefield, L. M., Levinson, A. D., & Sporn, M. B. (1990). Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor- β 's 1, 2, and 3. *Growth Factors*, **3**:35–43.
- Brunner, A. M., Marquardt, H., Malacko, A. R., Lioubin, M. N., & Purchio, A. F. (1989). Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor β 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J. Biol. Chem.*, **264**:13660–13664.
- von Bubnoff, A., & Cho, K. W. (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: Pathway or network? *Dev. Biol.*, **239**:1–14.
- Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., & Ivkova, M. N. (1973). Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.*, **18**:263–279.
- Burstein, E. A., Permyakov, E. A., Yashin, V. A., Burkhanov, S. A., & Finazz-Argo, A. (1977). The fine structure of luminescence spectra of azurin. *Biochim. Biophys. Acta*, **491**:155–159.
- Canalis, E., Economides, A. N., & Gazzerro, E. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr. Rev.*, **24**:218–235.
- Cantor, C. R., & Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Celeste, A. J., & Murray, B. L. (2001). Bone morphogenetic protein-16 (BMP-16) compositions. United States Patent No. **6 331 612**.
- Celeste, A. J., & Murray, B. L. (2002). Bone morphogenetic protein (BMP)-17 and BMP-18 compositions. United States Patent No. **6 492 493**.
- Cerletti, N., McMaster, G. K., Cox, D., Schmitz, A., & Meyhack, B. (1997). Process for refolding recombinantly produced TGF- β -like proteins. United States Patent No. **5 650 494**.
- Chaloux, E., Lopez Rovira, T., Rosa, J. L., Bartrons, R., & Ventura, F. (1998). JunB is involved in the inhibition of myogenic differentiation by bone morphogenetic protein-2. *J. Biol. Chem.*, **273**:537–543.

- Chen, D., Zhao, M., Harris, S. E., & Mi, Z. (2004). Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front. Biosci.*, **9**:349–358.
- Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F. M., Haydon, R. C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H. H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J. P., Park, J. Y., & He, T. C. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. Bone Joint Surg. Am.*, **85-A**:1544–1552.
- Constam, D. B., & Robertson, E. J. (1999). Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J. Cell Biol.*, **144**:139–149.
- Creighton, T. E. (1991). Molecular chaperones. Unfolding protein folding. *Nature*, **352**:17–18.
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company, New York, 2. Aufl.
- Creighton, T. E. (1997). Protein folding coupled to disulphide bond formation. *Biochemistry*, **37**:731–744.
- Creighton, T. E., Bagley, C. J., Cooper, L., Darby, N. J., Freedman, R. B., Kemmink, J., & Sheikh, A. (1993). On the biosynthesis of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). Structure, processing, folding and disulphide bond formation of the precursor *in vitro* and in microsomes. *J. Mol. Biol.*, **232**:1176–1196.
- Cui, Y., Jean, F., Thomas, G., & Christian, J. L. (1998). BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J.*, **17**:4735–4743.
- Cui, Y., Hackenmiller, R., Berg, L., Jean, F., Nakayama, T., Thomas, G., & Christian, J. L. (2001). The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev.*, **15**:2797–2802.
- Dale, L., Matthews, G., & Colman, A. (1993). Secretion and mesoderm-inducing activity of the TGF- β -related domain of *Xenopus* Vg1. *EMBO J.*, **12**:4471–4480.
- Daluisi, A., Engstrand, T., Bahamonde, M. E., Gamer, L. W., Agius, E., Stevenson, S. L., Cox, K., Rosen, V., & Lyons, K. M. (2001). Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat. Genet.*, **27**:84–88.
- Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y., & Davis, D. R. (1992). Crystal structure of transforming growth factor- β 2: An unusual fold for the superfamily. *Science*, **257**:369–373.
- Demchenko, A. P. (1986). *Ultraviolet Spectroscopy of Proteins*. Springer-Verlag, Berlin. Erweiterte u. überarbeitete Übersetzung der russischen Ausgabe (Naukova Dumka, Kiew, 1981).

- ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T. K., Reddi, A. H., Estevez, M., Riddle, D. L., Ichijo, H., Heldin, C. H., & Miyazono, K. (1994). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.*, **269**:16985–16988.
- Donovan, J. W., Laskowski Jr., M., & Scheraga, H. A. (1958). Influence of ionization of carboxyl groups on the ultraviolet absorption spectrum of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **29**:455–456.
- Dower, W. J. (1990). Electroporation of prokaryotic cells. United States Patent No. 4 910 140.
- Ducy, P., & Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.*, **57**:2207–2214.
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**:1948–1954.
- Eder, J., Rheinnecker, M., & Fersht, A. R. (1993). Folding of subtilisin BPN': Characterization of a folding intermediate. *Biochemistry*, **32**:18–26.
- Edman, P., & Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, **1**:80–91.
- Eftink, M. R. (1994). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys. J.*, **66**:482–501.
- Eldar, A., Dorfman, R., Weiss, D., Ashe, H., Shilo, B. Z., & Barkai, N. (2002). Robustness of the BMP morphogen gradient in *Drosophila* embryonic patterning. *Nature*, **419**:304–308.
- Fairbanks, G., Steck, T. L., & Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**:2606–2617.
- Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Fischer, G., Tradler, T., & Zarnt, T. (1998). The mode of action of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases *in vivo*: Binding vs. catalysis. *FEBS Lett.*, **426**:17–20.
- Fox, T., de Miguel, E., Mort, J. S., & Storer, A. C. (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry*, **31**:12571–12576.
- Freedman, R. B., Hirst, T. R., & Tuite, M. F. (1994). Protein disulphide isomerase: Building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.*, **19**:331–336.
- Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S., & Nakato, H. (2003). Dally regulates DPP morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development*, **130**:1515–1522.

- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y. I., & Knaus, P. (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: A new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol. Biol. Cell*, **11**:1023–1035.
- Gill, S. C., & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**:319–326.
- Goldhaber, P. (1961). Osteogenic induction across millipore filters *in vivo*. *Science*, **133**:2065–2067.
- Gothel, S. F., & Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**:423–436.
- Goto, Y., & Hamaguchi, K. (1982). Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Mol. Biol.*, **156**:891–910.
- Grathwohl, C., & Wüthrich, K. (1981). NMR studies of the rates of proline *cis/trans* isomerisation in oligopeptides. *Biopolymers*, **15**:2623–2633.
- Gray, A. M., & Mason, A. J. (1990). Requirement for activin A and transforming growth factor- β 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science*, **247**:1328–1330.
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., & Choe, S. (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol. Cell*, **11**:605–617.
- Griffith, D. L., Keck, P. C., Sampath, T. K., Rueger, D. C., & Carlson, W. D. (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**:878–883.
- Groppe, J., Rumpel, K., Economides, A. N., Stahl, N., Sebald, W., & Affolter, M. (1998). Biochemical and biophysical characterization of refolded *Drosophila* DPP, a homolog of bone morphogenetic proteins 2 and 4. *J. Biol. Chem.*, **273**:29052–29065.
- Hagel, P., Gerding, J. J., Fieggen, W., & Bloemendal, H. (1971). Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta*, **243**:366–373.
- Harding, S. E. (1997). Hydrodynamic properties of proteins. In *Protein Structure: A Practical Approach* (Hg. T. E. Creighton), A Practical Approach Series, Kap. 9, S. 219–251. Oxford University Press Inc., New York, 2. Aufl.
- Hauschka, P. V., Mavrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E., & Klagsbrun, M. (1986). Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J. Biol. Chem.*, **261**:12665–12674.

- Haÿ, E., Lemonnier, J., Fromigué, O., & Marie, P. J. (2001). Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**:29028–29036.
- von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.*, **14**:4683–4690.
- Hillger, F. (1999). Humanes proBMP-2: Rekombinante Expression und Rückfaltung aus Einschlußkörpern. **Diplomarbeit**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland.
- Hino, J., Nishimatsu, S., Nagai, T., Matsuo, H., Kangawa, K., & Nohno, T. (2003). Coordination of BMP-3b and cerberus is required for head formation of *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.*, **260**:138–157.
- Hino, J., Kangawa, K., Matsuo, H., Nohno, T., & Nishimatsu, S. (2004). Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions. *Front. Biosci.*, **9**:1520–1529.
- Hofbauer, L. C., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L., & Khosla, S. (1998). Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**:776–781.
- Hogan, B. L. (1996). Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.*, **10**:1580–1594.
- Ikemura, H., Takagi, H., & Inouye, M. (1987). Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **262**:7859–7864.
- Imoto, T., & Yamada, H. (1997). Chemical modification. In *Protein Function: A Practical Approach* (Hg. T. E. Creighton), A Practical Approach Series, Kap. 10, S. 279–316. Oxford University Press Inc., New York, 2. Aufl.
- Innis, C. A., Shi, J., & Blundell, T. L. (2000). Evolutionary trace analysis of TGF- β and related growth factors: Implications for site-directed mutagenesis. *Protein Eng.*, **13**:839–847.
- Inouye, M. (1991). Intramolecular chaperone: The role of the pro-peptide in protein folding. *Enzyme*, **45**:314–321.
- Israel, D. I., Nove, J., Kerns, K. M., Moutsatsos, I. K., & Kaufman, R. J. (1992). Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors*, **7**:139–150.
- Izumi, M., Fujio, Y., Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Funamoto, M., Osugi, T., Oshima, Y., Nakaoka, Y., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K., & Hirota, H. (2001). Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**:31133–31141.

- Keller, S., Nickel, J., Zhang, J. L., Sebald, W., & Mueller, T. D. (2004). Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**:481–488.
- Kessler, D. S., & Melton, D. A. (1995). Induction of dorsal mesoderm by soluble, mature Vg1 protein. *Development*, **121**:2155–2164.
- Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., & Greenspan, D. S. (1996). Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase. *Science*, **271**:360–362.
- Khorasanizadeh, S., Peters, I. D., & Roder, H. (1996). Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nat. Struct. Biol.*, **3**:193–205.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U., & Schmid, F. X. (1990). Folding of ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry*, **29**:3053–3061.
- Kirsch, T., Nickel, J., & Sebald, W. (2000a). BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J.*, **19**:3314–3324.
- Kirsch, T., Sebald, W., & Dreyer, M. K. (2000b). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat. Struct. Biol.*, **7**:492–496.
- Kita, Y., Arakawa, T., Lin, T. Y., & Timasheff, S. N. (1994). Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions. *Biochemistry*, **33**:15178–15189.
- Koenig, B. B., Cook, J. S., Wolsing, D. H., Ting, J., Tiesman, J. P., Correa, P. E., Olson, C. A., Pecquet, A. L., Ventura, F., Grant, R. A., Chen, G.-X., Wrana, J. L., Massagué, J., & Rosenbaum, J. S. (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.*, **14**:5961–5974.
- Kolodziej, P. A., & Young, R. A. (1991). Epitope tagging and protein surveillance. *Methods Enzymol.*, **194**:508–519.
- Kopetzki, E., Schumacher, G., & Buckel, P. (1989). Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol. Gen. Genet.*, **216**:149–155.
- Krause, M. (2003). Untersuchungen zur Rolle des Propeptids von BMP-2. **Diplomarbeit**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland.
- Krishnan, B. R., Kersulyte, D., Brikun, I., Berg, C. M., & Berg, D. E. (1991). Direct and crossover PCR amplification to facilitate Tn5supF-based sequencing of λ phage clones. *Nucleic Acids Res.*, **19**:6177–6182.

- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**:203–209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680–685.
- Laskowski Jr., M., Widom, J. M., McFadden, M. L., & Scheraga, H. A. (1956). Differential ultraviolet spectra of insulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**:581–582.
- Lawrence, D. A., Pircher, R., & Jullien, P. (1985). Conversion of a high molecular weight latent β -TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active β -TGF under acidic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**:1026–1034.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, **294**:1945–1948.
- Li, S. W., Sieron, A. L., Fertala, A., Hojima, Y., Arnold, W. V., & Prockop, D. J. (1996). The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenetic protein-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**:5127–5130.
- Liao, W. X., Moore, R. K., Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2003). Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of *bmp-15* mutant sheep. *J. Biol. Chem.*, **278**:3713–3719.
- Lin, T. Y., & Timasheff, S. N. (1996). On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci.*, **5**:372–381.
- Lioubin, M. N., Madisen, L., Marquardt, H., Roth, R., Kovacina, K. S., & Purchio, A. F. (1991). Characterization of latent recombinant TGF- β 2 produced by Chinese hamster ovary cells. *J. Cell. Biochem.*, **45**:112–121.
- Lisse, T. (2001). Untersuchungen zur Rolle von Mdj1p aus *Saccharomyces cerevisiae* bei der mitochondrialen Biogenese. **Dissertation**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland.
- Lories, R. J., Derese, I., Ceuppens, J. L., & Luyten, F. P. (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**:2807–2818.
- Lyons, R. M., Gentry, L. E., Purchio, A. F., & Moses, H. L. (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. *J. Cell Biol.*, **110**:1361–1367.

- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA.
- Marqués, G., Musacchio, M., Shimell, M. J., Wünnenberg-Stapleton, K., Cho, K. W., & O'Connor, M. B. (1997). Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell*, **91**:417–426.
- McDonald, N. Q., & Hendrickson, W. A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, **73**:421–424.
- McGeoch, D. J. (1985). On the predictive recognition of signal peptide sequences. *Virus Res.*, **3**:271–286.
- McKay, B., & Sandhu, H. S. (2002). Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spinal fusion applications. *Spine*, **27**:S66–85.
- McMahon, G. A., Dignam, J. D., & Gentry, L. E. (1996). Structural characterization of the latent complex between transforming growth factor β 1 and β 1-latency-associated peptide. *Biochem. J.*, **313** (Pt. 1):343–351.
- Miller, D. M., Ogawa, Y., Iwata, K. K., ten Dijke, P., Purchio, A. F., Soloff, M. S., & Gentry, L. E. (1992). Characterization of the binding of transforming growth factor- β 1, - β 2, and - β 3 to recombinant β 1-latency-associated peptide. *Mol. Endocrinol.*, **6**:694–702.
- Miyazawa, K., Kawai, T., & Urist, M. R. (1996). Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone in osteopetrosis. *Clin. Orthop.*, **324**:259–268.
- Moss, M. L. (1960). In *Calcification in Biological Systems* (Hg. R. F. Sognaes), S. 323–328. AAAS, Washington, D.C.
- Müller, C., & Rinas, U. (1999). Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *Escherichia coli* using size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*, **855**:203–213.
- Müller, C., Richter, S., & Rinas, U. (2003). Kinetics control preferential heterodimer formation of platelet-derived growth factor from unfolded A- and B-chains. *J. Biol. Chem.*, **278**:18330–18335.
- Muller, Y. A., Heiring, C., Misselwitz, R., Welfle, K., & Welfle, H. (2002). The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **277**:43410–43416.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51** (Pt. 1):263–273.

- Nakai, K., & Kanehisa, M. (1991). Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins*, **11**:95–110.
- Nakai, K., & Kanehisa, M. (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*, **14**:897–911.
- Nall, B. T., Garel, J. R., & Baldwin, R. L. (1978). Test of the extended two-state model for the kinetic intermediates observed in the folding transition of ribonuclease A. *J. Mol. Biol.*, **118**:317–330.
- Namiki, M., Akiyama, S., Katagiri, T., Suzuki, A., Ueno, N., Yamaji, N., Rosen, V., Wozney, J. M., & Suda, T. (1997). A kinase domain-truncated type I receptor blocks bone morphogenetic protein-2-induced signal transduction in C2C12 myoblasts. *J. Biol. Chem.*, **272**:22046–22052.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M., & Upton, S. J. (1995). A metallo-dependent cysteine proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. *Microbios*, **83**:77–88.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I., & Knaus, P. (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **277**:5330–5338.
- Nozaki, Y. (1972). The preparation of guanidine hydrochloride. *Methods Enzymol.*, **26** (Pt. C):43–50.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Klie-mannell, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., Hempstead, B. L., & Petersen, C. M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, **427**:843–838.
- Oefner, C., D'Arcy, A., Winkler, F. K., Eggimann, B., & Hosang, M. (1992). Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *EMBO J.*, **11**:3921–3926.
- Oelgeschläger, M., Larrain, J., Geissert, D., & de Robertis, E. M. (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature*, **405**:757–763.
- Ohta, Y., Hojo, H., Aimoto, S., Kobayashi, T., Zhu, X., Jordan, F., & Inouye, M. (1991). Pro-peptide as an intramolecular chaperone: Renaturation of denatured subtilisin E with a synthetic pro-peptide. *Mol. Microbiol.*, **5**:1507–1510.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagu'e, J., & Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, **401**:480–485.
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.*, **131**:266–280.

- Paine-Saunders, S., Viviano, B. L., Economides, A. N., & Saunders, S. (2002). Heparan sulfate proteoglycans retain noggin at the cell surface. A potential mechanism for shaping bone morphogenetic protein gradients. *J. Biol. Chem.*, **277**:2089–2096.
- Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J., & Norton, R. S. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded β -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.*, **3**:1833–1839.
- Price-Carter, M., Gray, W. R., & Goldenberg, D. P. (1996). Folding of ω -conotoxins. 1. Efficient disulfide-coupled folding of mature sequences *in vitro*. *Biochemistry*, **35**:15537–15546.
- Raftery, L. A., & Sutherland, D. J. (1999). TGF- β family signal transduction in *Drosophila* development: From Mad to Smads. *Dev. Biol.*, **210**:251–268.
- Rattenholl, A. (2001). Untersuchungen zur Pro-Sequenz-vermittelten Faltung von rekombinantem, humanen Nervenwachstumsfaktor. **Dissertation**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland.
- Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E., & Rudolph, R. (2001a). The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.*, **268**:3296–3303.
- Rattenholl, A., Ruoppolo, M., Flagiello, A., Monti, M., Vinci, F., Marino, G., Lilie, H., Schwarz, E., & Rudolph, R. (2001b). Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor β . *J. Mol. Biol.*, **305**:523–533.
- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M., & Fischer, G. (1998). Side-chain effects on peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerisation. *J. Mol. Biol.*, **279**:449–460.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J., & Studier, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**:125–135.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., & Jaenicke, R. (1997). Folding proteins. In *Protein Function: A Practical Approach* (Hg. T. E. Creighton), A Practical Approach Series, Kap. 3, S. 57–99. Oxford University Press Inc., New York, 2. Aufl.
- Rudolph, R., Schwarz, E., Herr, G., & Hillger, F. (2002). Production of recombinant BMP-2. International Patent Application No. **WO 02/44203**.
- Ruppert, R., Hoffmann, E., & Sebald, W. (1996). Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem.*, **237**:295–302.
- Sachs, L. (1992). *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, Berlin, 7. Aufl.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**:487–491.
- Sampath, T. K., & Reddi, A. H. (1981). Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**:7599–7503.
- Sampath, T. K., Muthukumaran, N., & Reddi, A. H. (1987). Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**:7109–7113.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**:5463–5467.
- Savage, C. P., Finelli, A. L., Townsend, S. R., Run, C.-Y., Baird, S., & Padgett, R. W. (1996). *Cænorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**:790–794.
- Saxen, L., & Taivonen, S. (1962). *Primary Embryonic Induction*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Schäffner, J. (2000). Einfluß niedermolekularer Medienzusätze und sezernierter, ATP-unabhängiger Chaperone auf die Ausbeute therapeutischer Proteine im Periplasma von *Escherichia coli*. **Dissertation**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland.
- Schellman, J. A. (1994). The thermodynamics of solvent exchange. *Biopolymers*, **34**:1015–1026.
- Scheraga, H. A. (1957). Tyrosyl-carboxylate ion hydrogen bonding in ribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**:196–197.
- Scheufler, C., Sebald, W., & Hülsmeier, M. (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **287**:103–115.
- Schmid, F. X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: A Practical Approach* (Hg. T. E. Creighton), A Practical Approach Series, Kap. 11, S. 261–297. Oxford University Press Inc., New York, 2. Aufl.
- Schmid, F. X., & Baldwin, R. L. (1979). Detection of an early intermediate in the folding of ribonuclease A by protection of amide protons against exchange. *J. Mol. Biol.*, **135**:199–215.

- Schwarz, E., Lilie, H., & Rudolph, R. (1996). The effect of molecular chaperones on *in vivo* and *in vitro* folding processes. *Biol. Chem.*, **377**:411–416.
- Schwarzinger, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Chung, J., Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2001). Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**:2970–2978.
- Scott, I. C., Imamura, Y., Pappano, W. N., Troedel, J. M., Recklies, A. D., Roughley, P. J., & Greenspan, D. S. (2000). Bone morphogenetic protein-1 processes probiglycan. *J. Biol. Chem.*, **275**:30504–30511.
- Sebald, W., & Mueller, T. D. (2003). The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly. *Trends Biochem. Sci.*, **28**:518–521.
- Seeherman, H., Wozney, J., & Li, R. (2002). Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine*, **27**:S16–23.
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H., & Gelbart, W. M. (1995). Genetic characterization and cloning of *Mothers against dpp*, a gene required for *decapentaplegic* function in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**:1393–1397.
- Sha, X., Yang, L., & Gentry, L. E. (1991). Identification and analysis of discrete functional domains in the pro region of pre-pro-transforming growth factor β 1. *J. Cell Biol.*, **114**:827–839.
- Shastry, M. C. R., Agashe, V. R., & Udgaonkar, J. B. (1994). Quantitative analysis of the kinetics of denaturation and renaturation of barstar in the folding transition zone. *Protein Sci.*, **3**:1409–1417.
- Shechter, Y. (1986). Selective oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide. *J. Biol. Chem.*, **261**:66–70.
- Siggelkow, H., & Hufner, M. (1999). Modulation der Osteoblastengnese: Auswirkungen auf die Pathophysiologie von Osteoporose. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **124**:1–2.
- Silen, J. L., & Agard, D. A. (1989). The α -lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*. *Nature*, **341**:462–464.
- Song, Q., Mehler, M. F., & Kessler, J. A. (1998). Bone morphogenetic proteins induce apoptosis and growth factor dependence of cultured sympathoadrenal progenitor cells. *Dev. Biol.*, **196**:119–127.
- Stark, G. R. (1965). Reactions of cyanate with functional groups of proteins. III. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, **4**:1030–1036.

- Steiner, D. F., Smeekens, S. P., Ohagi, S., & Chan, S. J. (1992). The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J. Biol. Chem.*, **267**:23435–23438.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**:113–130.
- Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **23**:121–282.
- Tanford, C. (1970). Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **24**:1–95.
- Teixeira, J. O., & Urist, M. R. (1998). Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.*, **117**:27–34.
- Thomsen, G. H., & Melton, D. A. (1993). Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell*, **74**:433–441.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979/1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. (1st publ. 1979). *Biotechnology*, **24**:145–149.
- Urist, M. R. (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science*, **150**:893–899.
- Urist, M. R., & Mikulski, A. J. (1979). A soluble bone morphogenetic protein extracted from bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **162**:48–53.
- Urist, M. R., Iwata, H., Ceccotti, P. L., Dorfman, R. L., Boyd, S. D., McDowell, R. M., & Chien, C. (1973). Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**:3511–3515.
- Urist, M. R., Lietze, A., Mizutani, H., Takagi, K., Triffit, J. T., Amstutz, J., de Lange, R., Termine, J., & Finerman, G. A. M. (1982). A bovine low molecular mass bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin. Orthop.*, **162**:212–232.
- Urist, M. R., Sato, K., Brownell, A. G., Malinin, T. I., Lietze, A., Huo, Y. K., Prolo, D. J., Oklund, S., Finerman, G. A., & DeLange, R. J. (1983). Human bone morphogenetic protein (hBMP). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **173**:194–199.
- Urist, M. R., Huo, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M., & DeLange, R. J. (1984). Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**:371–375.
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnol. Bioeng.*, **85**:601–609.

- Vallejo, L. F., Brokelmann, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera-Crespo, J., Hoffmann, A., Gross, G., Weich, H. A., & Rinas, U. (2002). Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, **94**:185–194.
- Viviano, B. L., Paine-Saunders, S., Gasiunas, N., Gallagher, J., & Saunders, S. (2004). Domain-specific modification of heparan sulfate by qsulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist noggin. *J. Biol. Chem.*, **279**:5604–5611.
- Wang, E. A. (1993). Bone morphogenetic proteins (BMPs): Therapeutic potential in healing bony defects. *Trends Biotechnol.*, **11**:379–383.
- Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, M. J., Luxenberg, D. P., Sibley, B. S., & Wozney, J. M. (1988). Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**:9484–9488.
- Wang, E. A., Rosen, V., D'Alessandro, J. S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D. I., Hewick, R. M., Kerns, K. M., & LaPan, P. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**:2220–2224.
- Warburg, O., & Christian, W. (1941). Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, **310**:384–421.
- Warren, J. R., & Gordon, J. A. (1966). On the refractive indices of aqueous solutions of urea. *J. Phys. Chem.*, **70**:297–300.
- Wentzel, A., Christmann, A., Kratzner, R., & Kolmar, H. (1999). Sequence requirements of the GPNG β -turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J. Biol. Chem.*, **274**:21037–21043.
- Wetlaufer, D. B. (1962). Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Adv. Protein Chem.*, **17**:303–390.
- Winther, J. R., & Sørensen, P. (1991). Propeptide of carboxypeptidase Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**:9330–9334.
- Wozney, J. M. (2002). Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, **27**:S2–8.
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., & Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*, **242**:1528–1534.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., & Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, **370**:341–347.

- Yanari, S., & Bovey, F. A. (1960). Interpretation of the ultraviolet spectral changes of proteins. *J. Biol. Chem.*, **235**:2818–2826.
- de Young, L. R., Burton, L. E., Liu, J., Powell, M. F., Schmelzer, C. H., & Skelton, N. J. (1996). RhNGF slow unfolding is not due to proline isomerization: Possibility of a cystine knot loop-threading mechanism. *Protein Sci.*, **5**:1554–1566.
- Zhang, H., & Bradley, A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*, **122**:2977–2986.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Zuname Frank Hillger
geboren am 27. 12. 1973
 in Dessau, Sachsen-Anhalt
Familienstand ledig

UNIVERSITÄTSAUSBILDUNG

Promotion	Zeitraum	November 1999 — (September 2004)
	Einrichtung	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	Dissertation	„Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von proBMP-2, BMP-2 und dem BMP-2-Propeptid“
Studium der Biochemie	Zeitraum	Oktober 1993 — September 1999
	Einrichtung	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	Praktika	Boehringer Mannheim GmbH, Penzberg, November 1996 — Juni 1997 Medizinisches Zentrallaboratorium Dr. Kramer, Geesthacht, August 1997 — September 1997
	Diplomarbeit	„Humanes proBMP-2: Rekombinante Expression und Rückfaltung aus Einschlußkörpern“

SCHULBILDUNG

Abitur	Zeitraum	September 1990 — Juni 1992
	Einrichtung	Gymnasium „Philanthropinum“, Dessau
Zehnklassige Oberschule	Zeitraum	September 1980 — Juli 1990
	Einrichtung	Polytechnische Oberschule „A.S. Makarenko“, Dessau

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Ich habe mich mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangungen eines akademischen Grades beworben.

Halle, 6. Oktober 2004

Frank Hillger

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von November 1999 bis Mai 2004 am Institut für Biotechnologie des Fachbereichs Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Herrn Prof. Rainer Rudolph danke ich für die Möglichkeit, meine Experimente in seinem modern ausgestatteten Institut durchzuführen, sein nicht nachlassendes Interesse an meiner Arbeit und seine zahlreichen, wertvollen Anregungen.

Frau PD Dr. Elisabeth Schwarz danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Arbeit in ihrer Gruppe anzufertigen, sowie für die Betreuung und ihre konstruktive Kritik an meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Ralph Golbik, für seine Unterstützung bei den kinetischen Analysen und deren Interpretation. Seine buchstäblich unermüdliche Diskussionsbereitschaft — auch in einer äußerst streßgeladenen Phase seiner eigenen Arbeit — hat mir sehr geholfen. Ebenso danken möchte ich PD Dr. Hauke Lilie, für die vielen kleinen Tips, die konstruktiven Besprechungen und die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation.

Dr. Gerhard Herr und Matthias Krause danke ich für die Analysen zur biologischen Aktivität der BMP-Varianten. Dr. Daniel Rauh und Prof. Milton Subbs danke ich für ihre Ratschläge bei den zahllosen Kristallisationsversuchen, auch wenn diese bislang leider nicht erfolgreich waren. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Peter Rücknagel und Frau Dr. Angelika Schierhorn für die Durchführung der Proteinsequenzierung und der massenspektrometrischen Analyse. Dr. Bernd Mathiszik danke ich für seine Hilfe bei mathematischen „Problemen“. Der Firma Roche Diagnostics, Penzberg, danke ich für die Überlassung des Plasmidvektors pcDNA3-preprobmp-2. Der Firma Scil Proteins danke ich für die Anmeldung des Patents.

Danken möchte ich allen Mitgliedern AG Proteintechnologie von Prof. Rudolph für eine tolle Zeit in Halle, die ich trotz mancher Frustration in guter Erinnerung behalten werde.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, wie auch meinen Freunden, Steffen Lühr, Thomas Pick, Martin Kleinschmidt und Olaf Klietsch, und ganz besonders meiner Freundin Karoline Anacker für ihre Unterstützung.