

Die Pro-Form des Knochenwachstumsfaktors BMP-2:
Charakterisierung der Rezeptorbindung
und Identifizierung einer Subdomäne

Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Anja Hauburger

geb. am 27.03.1982 in Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Gutachter

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

Halle (Saale), 06.05.2010 (Datum der Verteidigung)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Bone morphogenetic proteins</i>	1
1.2. Strukturmerkmale von BMP-2.....	2
1.3. BMP-Rezeptoren und ihre Rolle bei der Regulation der biologischen Funktion von BMPs.....	6
1.4. Die Funktion der Propeptide bei Wachstumsfaktoren.....	10
1.5. Therapeutische Bedeutung von BMP-2.....	14
1.6. Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Material.....	19
2.1.1. Chemikalien.....	19
2.1.2. Standards und <i>Kits</i>	21
2.1.3. Enzyme und Proteine	21
2.1.4. Antikörper	22
2.1.5. Säulen und Säulenmaterialien	23
2.1.6. Oligonukleotide.....	23
2.1.7. Vektoren und Plasmide.....	23
2.1.8. Bakterienstämme.....	24
2.1.9. Zellmasse.....	24
2.1.10. Sonstiges Material.....	24
2.1.11. Geräte.....	25
2.1.12. Lösungen, Medien, Antibiotika, Puffer.....	27
2.2. Methoden.....	30
2.2.1. Gentechnische Methoden.....	30
2.2.1.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	30
2.2.1.2. Transformation durch Elektroporation.....	31
2.2.1.3. Plasmid-Isolierung.....	31
2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA.....	31
2.2.1.5. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
2.2.1.6. Agarosegelelektrophorese von DNA.....	33
2.2.1.7. Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.1.8. <i>Blunt-End</i> -Klonierung von PCR-Fragmenten.....	33
2.2.1.9. Schnelles <i>Screening</i> nach rekombinanten Plasmiden mittels PCR.....	33
2.2.1.10. Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden.....	34
2.2.1.11. Dephosphorylierung geschnittener Vektoren durch <i>Fast AP</i> [®]	34
2.2.1.12. Ligierung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase.....	35
2.2.2. Proteinchemische Methoden.....	35
2.2.2.1. Allgemeine proteinchemische Methoden.....	35
2.2.2.1.1. Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen.....	35

2.2.2.1.2. <i>Inclusion body</i> (IB)-Präparation.....	36
2.2.2.1.3. IB-Solubilisierung.....	36
2.2.2.1.4. Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	37
2.2.2.1.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
2.2.2.1.6. Silberfärbung.....	38
2.2.2.1.7. <i>Western Blot</i>	38
2.2.2.1.8. Biotinylierung von Proteinen.....	39
2.2.2.2. Renaturierung und Reinigung von BMP-2, proBMP-2 und dem Propeptid...39	
2.2.2.2.1. Renaturierung von BMP-2 und proBMP-2.....	39
2.2.2.2.2. Reinigung von BMP-2 und proBMP-2.....	40
2.2.2.2.3. Renaturierung und Reinigung des BMP-2-Propeptids.....	40
2.2.2.3. Renaturierung und Reinigung der BMPR-IA-ECD.....	41
2.2.2.3.1. Renaturierung und Reinigung von His-BMPR-IA-ECD.....	41
2.2.2.3.2. Renaturierung und Reinigung von BMPR-IA-ECD-MBP	42
2.2.2.3.3. Proteolytische Spaltung von BMPR-IA-ECD-MBP mit Thrombin und weitere Reinigung.....	43
2.2.2.4. Renaturierung und Reinigung der BMPR-II-ECD.....	43
2.2.2.4.1. Renaturierung der BMPR-II-ECD.....	43
2.2.2.4.2. Reinigung der BMPR-II-ECD nach der Renaturierung.....	44
2.2.3. Spektroskopische Methoden.....	45
2.2.3.1. Circular dichroismus.....	45
2.2.3.2. UV-Spektroskopie.....	45
2.2.4. Methoden zur Untersuchung von Proteininteraktionen.....	46
2.2.4.1. Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore).....	46
2.2.4.2. ELISA.....	48
2.2.4.3. Gelfiltration.....	48
2.2.4.4. Co-Elution von Ni-NTA bzw. Heparin-Sepharose.....	48
2.2.4.5. Native Gelelektrophorese zum Nachweis von Komplexen.....	49
2.2.4.6. <i>Far Western Blot</i>	49
2.2.4.7. <i>In vitro</i> -Crosslinking.....	49
2.2.5. Zellkultur und <i>in vivo</i> -Bindungsassays.....	50
2.2.5.1. Kultivierung von Säugerzellen.....	50
2.2.5.1.1. Passagierung von adhärenenten Zellen.....	50
2.2.5.1.2. Anlegen und Auftauen von Kryokulturen.....	51
2.2.5.2. Transfektion von COS-7-Zellen.....	52
2.2.5.3. Crosslinking von BMP-2 bzw. proBMP-2 mit Rezeptoren auf der Oberfläche von transfizierten COS-7-Zellen.....	52
2.2.5.4. Immunpräzipitation.....	53
2.2.5.5. Test auf Phosphorylierung von p38 und Smad 1/5/8 in C2C12- und b/c3t3- Zellen.....	53
2.2.5.6. Migrationstest.....	53
2.2.6. Untersuchungen zur Struktur des BMP-2-Propeptids.....	54
2.2.6.1. Limitierte Proteolyse.....	54
2.2.6.2. Massenspektrometrie.....	54

3. Ergebnisse.....	56
3.1. Rekombinante Herstellung der extrazellulären Domäne von BMPR-IA.....	56
3.2. Charakterisierung der Bindung von proBMP-2 und BMP-2 an die extrazelluläre Ligandenbindedomäne des BMPR-IA <i>in vitro</i>	60
3.2.1. Nachweis der Bindung von BMP-2 an BMPR-IA durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese.....	60
3.2.2. Analyse der Interaktion von proBMP-2 mit BMPR-IA durch Oberflächenplasmonresonanz (BIACORE).....	61
3.2.3. Nachweis der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA durch Größenausschluß- Chromatographie.....	64
3.2.4. Nachweis der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA durch chemische Quervernetzung <i>in vitro</i>	67
3.2.5. Nachweis der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA durch Coelution der Bindungspartner.....	70
3.2.6. Nachweis der proBMP-2-BMPR-IA-Bindung durch <i>Western Blot</i>	73
3.2.7. Nachweis der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA durch ELISA.....	74
3.3. Nachweis der Bindung von proBMP-2 und BMP-2 an BMPR-IA auf der Zelloberfläche durch <i>Crosslinking</i>	77
3.4. Charakterisierung der Bindung von proBMP-2 und BMP-2 an die extrazelluläre Domäne des BMPR-II <i>in vitro</i>	80
3.4.1. Rekombinante Herstellung der BMPR-II-ECD.....	80
3.4.2. Untersuchung der Bindung von proBMP-2 an BMPR-II durch ELISA.....	83
3.4.3. Untersuchung der Bindung von proBMP-2 an BMPR-II durch Oberflächenplasmonresonanz.....	84
3.5. Aktivierung von zellulären Signalwegen durch proBMP-2.....	87
3.5.1. Induktion der Alkalischen Phosphatase in C2C12-Zellen durch BMP-2/proBMP-2 .	87
3.5.2. Aktivierung von Signalwegen in C2C12-Zellen.....	88
3.5.3. Stimulation der Migration von b/c3t3-Zellen durch BMP-2 bzw. proBMP-2.....	90
3.5.4. Aktivierung von Signalwegen in b/c3t3-Zellen.....	92
3.6. Nicht -kovalente Interaktion des BMP-2-Propeptids mit BMP-2.....	94
3.6.1. Nachweis der BMP-2-Propeptid-Interaktion durch Quervernetzung <i>in vitro</i>	94
3.6.2. Nachweis der nicht-kovalenten Interaktion des Propeptids mit reifem BMP-2 durch Oberflächenplasmonresonanz.....	95
3.7. Identifizierung einer Subdomäne im BMP-2-Propetid.....	97
4. Diskussion.....	102
4.1. Einfluss des BMP-2-Propeptids auf die Bindung von BMP-2 an BMPR-IA und BMPR-II. .	102

4.2. Aktivierung von zellulären Signalwegen durch proBMP-2.....	104
4.2.1. Aktivierung von zellulären Signalwegen durch proBMP-2 in C2C12-Zellen.....	104
4.2.2. Aktivierung von zellulären Signalwegen durch proBMP-2 in b/c3t3-Zellen.....	107
4.3. Interaktion des BMP-2-Propeptids mit dem reifen Teil.....	109
4.4. Identifizierung einer vor Proteolyse geschützten Subdomäne des BMP-2-Propeptids.....	110
4.5. Zusammenfassung.....	112
Literaturverzeichnis.....	114
Abkürzungen.....	131
Anhang.....	135

1. Einleitung

1.1. *Bone morphogenetic proteins*

Bone morphogenetic proteins (BMPs) wurden bereits 1965 aufgrund ihrer Fähigkeit, die ektope Knochen- und Knorpelbildung zu induzieren, entdeckt (Urist 1965). Später konnten dann einzelne BMPs isoliert und identifiziert werden und standen somit für Sequenzierung und Klonierung zur Verfügung (Wozney 1992; Wozney et al. 1988; Luyten et al. 1989).

Alle BMPs außer BMP-1 (eine Metalloproteinase) sind aufgrund ihrer Sequenzhomologie Mitglieder der TGF- β -Superfamilie multifunktionaler Cytokine. Als auto- und parakrin wirkende, lokale Signalproteine beeinflussen sie Wachstum, Entwicklung und Überleben einer Reihe verschiedener Zelltypen. Innerhalb der BMP-Familie, die aus mehr als 15 Proteinen besteht, können weitere Unterscheidungen hinsichtlich Ähnlichkeit in Sequenz und Funktion getroffen werden: z.B. die BMP-2-Subfamilie, zu der außer BMP-2 auch noch BMP-4 gehört und die wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung übernimmt. Weitere Subfamilien sind die BMP-5-Subfamilie (BMP-5, -6, -7, -8), die ebenfalls an der Entwicklung beinahe aller Organe beteiligt ist und auch beim Nervenwachstum eine Rolle spielt, sowie die GDF-5-Subfamilie (GDF-5, -6, -7; auch als BMP-14, BMP-13 und BMP-12 bezeichnet), die die Knochenbildung während der Extremitätenentwicklung steuert (Massagué 1998)

BMP-2-Effekte sind nicht nur während der frühen Embryonalentwicklung bei der Skelett- und Extremitätenentstehung, der Regulation der dorso-ventralen Musterbildung und der Mesoderm-Induktion von Bedeutung (Wozney 1992; Graff 1997; Hall & Miyake 2000; Yoon & Lyons 2004). Auch im adulten Organismus ist BMP-2 am Knochenumbau und an der Regeneration von Knochen nach Schädigungen beteiligt, wobei es die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Chondro- und Osteoblasten stimuliert (Bostrom et al. 1995; Bostrom 1998).

Neben BMP-7 besitzt BMP-2 die stärkste osteoinduktive Wirkung, wie bei Versuchen mit Mäusen, denen die rekombinant hergestellten Proteine subkutan implantiert wurden, festgestellt werden konnte (Sampath et al. 1992). Dabei wurde eine Vielzahl zellulärer Prozesse beobachtet, die durch BMPs ausgelöst wurden: mesenchymale Zellinfiltration,

Knorpelbildung, Vaskularisierung und Knochenbildung (Wozney 2002; Yoon & Lyons 2004).

Weiterhin deuten viele neue Erkenntnisse auf einen Einfluss von BMP-2 auf die Entstehung von Tumoren hin, wobei jedoch sowohl tumorfördernde als auch tumorunterdrückende Wirkungen beobachtet wurden (Blanco Calvo et al. 2009). Erhöhte BMP-2-Produktion geht z.B. mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Mundhöhlenkrebs einher, während bei Darmkrebs und Brustkrebs BMP-2 als Tumorsuppressor wirkt (Jin et al. 2001; Hsu et al. 2005).

BMP-Signale spielen auch bei der Entstehung der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) eine Rolle (Morrell 2006; de Jesus Perez et al. 2009). Dies ist eine Gefässerkrankung, die von einer Verengung der Lungenarterien begleitet wird und zum Herzversagen führen kann. Die Gefäßverengung bei PAH wird durch eine abnorme Proliferation von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen sowie durch ein Absterben kleiner Blutgefäße hervorgerufen. Bei vielen PAH-Patienten wurden Mutationen im Gen für einen der BMP-Rezeptoren gefunden (Machado et al. 2006), s.a. 1.3.). Die reduzierte Expression bzw. eingeschränkte Funktion des mutierten Rezeptors führt zu abnormalen Reaktionen auf BMP- und TGF- β -Signale, wie z.B. zur unkontrollierten Proliferation glatter Muskelzellen und zur Apoptose von Endothelzellen (Morrell et al. 2009).

BMPs sind somit an vielen Prozessen nicht nur in der Osteogenese beteiligt, wobei sich je nach Zelltyp, verbunden mit der Verfügbarkeit einer Vielzahl von regulierenden Faktoren wie z.B. Rezeptoren, Inhibitoren und Signalproteinen, die biologische Wirkung erheblich unterscheiden kann.

1.2. Strukturmerkmale von BMP-2 als Mitglied der Familie der Cystin-knotenproteine

BMPs werden als Prä-Pro-Proteine synthetisiert. Die aus 396 Aminosäuren bestehende Primärsequenz von BMP-2 kann daher in drei Teile gegliedert werden:

- ein 23 Aminosäuren langes N-terminales Signalpeptid, das bei der Translokation ins Endoplasmatische Retikulum abgespalten wird
- das Pro-Peptid von 259 Aminosäuren, dessen Funktion bislang unklar ist

- der C-terminale reife Teil mit 114 Aminosäuren (siehe Abb. 1.2.1.).

```

      10           20           30           40           50           60
MVAGTRCLLA LLLPQVLLGG AAGLVPELGR RKFAAASSGR PSSQPSDEVL SEFELRLLSM
      70           80           90           100          110          120
FGLKQRPTPS RDAVVPPYML DLYRRHSGQP GSPAPDHRLE RAASRANTVR SFHHEESLEE
      130          140          150          160          170          180
LPETSGKTTR RFFFNLSIP TEEFITSDEL QVFREQMDA LGNSSFHHR INIYEIIPKA
      190          200          210          220          230          240
TANSKFPVTR LLDTRLVNQN ASRWESFDVT PAVMRWTAQG HANHGFFVEV AHLEEKQGVV
      250          260          270          280          290          300
KRHVRISRSL HQDEHSWSQI RPLLVTFGHD GKGHPLHKRE KRQAKHKQRK RLKSSCKRHP
      310          320          330          340          350          360
LYVDFSDVGW NDWIVAPPGY HAFYCHGECF FPLADHLNST NHAIVQTLVN SVNSKIPKAC
      370          380          390
CVPTELSAIS MLYLDENEKV VLKNIQDMVV EGCRCR

```

Abb. 1.2.1. Aminosäuresequenz von Prä-Pro-BMP-2. Die Schnittstelle für die Proprotein-Konvertasen ist gelb markiert. Das Signalpeptid ist hellblau, das Propeptid grau und der reife Teil von BMP-2 grün hinterlegt.

Im reifen Teil sind sieben Cysteine vorhanden. Sechs davon bilden intramolekulare Disulfidbrücken aus (Abb. 1.2.2.). Durch die Disulfidbrücken zwischen Cys325 und Cys393 sowie Cys329 und Cys395 wird ein aus acht Aminosäureresten bestehender Ring gebildet, durch den die dritte Disulfidbrücke, gebildet von Cys296 und Cys361, hindurchfädelt. Diese Anordnung der Disulfidbrücken wird als Cystin-Knoten bezeichnet und findet sich bei allen Proteinen der TGF- β -Familie. Die Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie gehören daher neben den Neurotrophinen, der PDGF (*Platelet derived growth factor*)-Familie und den Glykoprotein-hormonen zur übergeordneten Familie der Cystin-Knoten-Proteine (McDonald & Hendrickson 1993; Sun & Davies 1995). Obwohl Proteine dieser Familie, abgesehen von den Cysteinresten, eine geringe Sequenzhomologie aufweisen, zeigen sie eine große strukturelle Ähnlichkeit, sowohl in der Anordnung der Disulfidbrücken zum Cystinknoten als auch in einer konservierten Region aus vier antiparallelen β -Strängen, die eine β -Faltblattstruktur nahe dem Cystin-Knoten bilden (Abb. 1.2.2.). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich der N-terminale Bereich sowie die Regionen zwischen den β -Strängen sehr stark voneinander. Diese Proteinbereiche definieren wahrscheinlich die unterschiedlichen biologischen Funktionen der verschiedenen Wachstumsfaktoren. Auf der Ebene der Quartärstruktur ist die Bildung von Dimeren als biologisch aktive Einheiten wieder allen

Cystin-Knoten-Proteinen gemeinsam (Sun & Davies 1995). Allerdings wurden in Ausnahmefällen, wie z.B. bei GDF-5, auch biologisch aktive Monomere gefunden (Sieber et al. 2006).

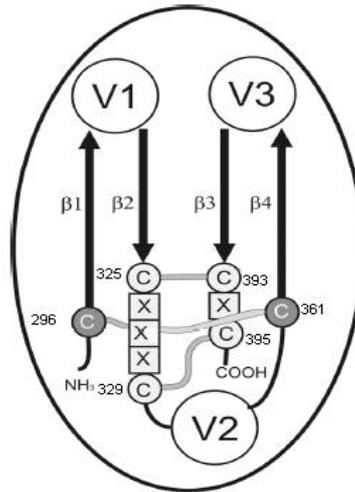


Abb. 1.2.2. Schematische Darstellung des Aufbaus des Cystin-Knotens in den Proteinen der Cystin-Knoten-Familie (McDonald & Hendrickson 1993).

So bildet auch BMP-2 ein Homodimer, dessen Untereinheiten durch eine vierte, intermolekulare Disulfidbrücke der Cysteine an Position 360 miteinander verbunden sind (Abb. 1.2.3.). Die BMP-2-Struktur ist außerdem durch zwei antiparallele β -Faltblattstrukturen und eine senkrecht dazu stehende α -Helix geprägt (Abb. 1.2.3.).

Die Cystin-Knoten-Struktur ist für die Stabilität des Gesamtproteins essentiell, da den Monomeren ein definierter hydrophober Kern fehlt. Auch die Dimerisierung trägt entscheidend zur Stabilisierung bei, da hydrophobe Reste zwischen den Monomeren vom Lösungsmittel abgeschlossen werden. Die hydrophobe Wechselwirkung der Reste an der Kontaktfläche der Monomere wird als wesentlich für die Stabilität der Proteinstruktur angesehen (Sun & Davies 1995; Scheufler et al. 1999). Da die Lage der hydrophoben Reste, die bei der Dimerisierung interagieren, bei den verschiedenen Cystin-Knoten-Proteinen unterschiedlich ist, gibt es verschiedene Arten der Dimerisierung. Die Monomere können parallel angeordnet sein wie bei NGF (*nerve growth factor*), einem Neurotrophin. Dabei wird die Fläche der β -Faltblattstrukturen zur Interaktion genutzt. Oder sie befinden sich, wie bei PDGF (*platelet derived growth factor*), parallel und Seite an Seite. Hier findet die Interaktion zwischen den beiden Monomeren an den Seiten der β -Faltblätter statt. Bei BMP-2 und den anderen Proteinen der TGF- β -Familie sind hingegen die Monomere in der „*face-to-face*“-Position, jedoch antiparallel, so dass die Helix α 3 des einen Monomers mit dem β -

Faltblatt des anderen Monomers interagiert (siehe Abb. 1.2.3.). Hinzu kommt, dass die Monomere nicht linear, sondern in einem Winkel von 40° zueinander angeordnet sind, so dass ein Dimer mit einer konvexen und einer konkaven Seite entsteht. Die BMP-2-Struktur wird oft mit einer Hand verglichen, wobei die Helix $\alpha 3$ im Bereich des Handgelenks liegt und die antiparallelen β -Faltblätter zwei Finger darstellen. An den Enden der „Finger“ befinden sich die Bindestellen für die BMP-Rezeptoren (s.a. 1.3.1.). Innen, also auf der konkaven Seite sind die Bindestellen für die Typ-I-Rezeptoren und aussen, also an den Fingerknöcheln, auf der konvexen Seite die Epitope der Typ-II-Rezeptoren (Scheufler et al. 1999; Lin et al. 2006). An der hochaffinen Bindestelle für Typ-I-Rezeptoren sind Seitenketten beider Monomere beteiligt, während die weniger affine Bindestelle für Typ-II-Rezeptoren durch Reste von nur einem Monomer gebildet wird (Kirsch et al. 2000; Kirsch et al. 2000b).



Abb. 1.2.3. Schema der BMP-2-Strukturelemente und 3D-Strukturmodell des BMP-2-Dimers, grün: Disulfidbrücken (Scheufler et al. 1999).

Nach der Ausbildung der Disulfidbrücken und der Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum wird das Vorläuferprotein an einer konservierten Schnittstelle proteolytisch gespalten. Im Propeptid befinden sich drei potentielle Stellen zur N-Glykosylierung, im reifen Teil eine. Das Propeptid enthält komplexe, Asparagin-gebundene Oligosaccharide, während der reife Teil einen hohen Mannosegehalt aufweist (Israel et al. 1992). Die Abspaltung des Propeptids erfolgt C-terminal einer konservierten dibasischen Erkennungssequenz RXKR ($_{279}\text{REKR}_{282}$) durch die Proprotein-Konvertasen Furin und PACE4 (Molloy et al. 1992; Creemers et al. 1993; Constan & Robertson 1999). Nach der Spaltung werden die biologisch aktiven, reifen Dimere in den Extrazellulärraum sezerniert, wo sie ihre Wirkung ausüben

können. Dabei spielt die Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Heparin, zu dem BMP-2 eine hohe Affinität aufweist, eine entscheidende Rolle. Die Sequenz N-terminal des ersten Cysteins des reifen Teils (Cys296) vermittelt die Bindung an Heparin (Koenig et al. 1994; Ruppert et al. 1996).

1.3. BMP-Rezeptoren und ihre Rolle bei der Regulation der biologischen Funktion von BMPs

Die zelluläre Signalwirkung von BMP-2 wird von Zelloberflächenrezeptoren vermittelt, die nach Ligandenbindung Signalkaskaden im Zellinneren auslösen und damit die Expression von Transkriptionsfaktoren und letztendlich Zielgenen beeinflussen.

Die BMP-Rezeptoren sind Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren. Die Hauptrezeptoren für BMP-2 sind BMPR-IA, oft auch als ALK-3 bezeichnet und BMPR-IB (ALK-6), sowie BMPR-II und Activin-Rezeptor-II (Shimasaki et al. 2004). Der erste Rezeptor für Proteine der TGF- β -Familie, der identifiziert werden konnte, war ein Activin-Rezeptor (Mathews & Vale 1991). Deshalb wurden alle später identifizierten Rezeptoren derselben Familie zunächst als *activin receptor-like kinases* (ALK-1 - 6) bezeichnet (ten Dijke et al. 1993). Später wurden dann ALK-3 und ALK-6 als BMP-Typ-I-Rezeptoren identifiziert und erhielten deshalb die Namen BMPR-IA und BMPR-IB (Koenig et al. 1994). Zur Komplexität der BMP-Liganden-Rezeptor-Interaktion trägt eine hohe Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen BMP-Liganden und Typ-I-Rezeptoren bei (Shimasaki et al. 2004). Hinzu kommt, dass ein bestimmter BMP-Ligand verschiedene Typ-I- bzw. -II-Rezeptoren in unterschiedlichen Zelltypen binden kann (Ebisawa et al. 1999; Yu et al. 2005).

Die Rezeptoren bestehen jeweils aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne (ECD), einem Transmembranteil und einer intrazellulären Kinasedomäne. Der BMPR-II ist mit 112 kDa größer als der BMPR-IA mit 57 kDa (nicht glykosyliert). Während die extrazellulären Domänen, die durch fünf Disulfidbrücken stabilisiert werden, und die Transmembrandomänen eine ähnliche Größe haben, ist der intrazelluläre Teil des BMPR-II wesentlich größer. Die größere intrazelluläre C-terminale Domäne der Typ-II-Rezeptoren hat wahrscheinlich eine eigenständige Signalfunktion. So wurden beim Menschen Mutationen im BMPR-II-Gen gefunden, die zur Expression von C-terminal verkürzten Varianten des BMPR-

II führen. Diese Mutationen sind mit der Krankheit PAH assoziiert, die bereits unter 1.1. erwähnt wurde. Offenbar führt die Verkürzung des Rezeptors zwar nicht zu einem Funktionsverlust im Kontext mit BMP-2, aber doch zu einer deutlich eingeschränkten Aktivität (Nishihara et al. 2002). In diesem Zusammenhang wurden bereits intrazelluläre Signalproteine, wie die c-Src-Tyrosinkinase und die LIM-Kinase 1 (LIMK1), identifiziert, die mit dem C-terminalen Teil des BMPR-II interagieren und wahrscheinlich eigenständige Signale dieser Domäne regulieren (Foletta et al. 2003; Wong et al. 2005).

Die 3D-Struktur eines dimeren BMP-Liganden mit den ECDs je eines Typ-I- und eines Typ-II-Rezeptor-Dimers wurde für BMP-2 aufgeklärt und ist in Abb. 1.3.1. dargestellt (Allendorph et al. 2006). Für eine erfolgreiche Signaltransduktion muss ein heterooligomerer Komplex aus dem dimeren BMP-Liganden und je zwei Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren gebildet werden. Die Affinität von BMP-2 zum isolierten Typ-II-Rezeptor ist im Vergleich zum Typ-I-Rezeptor schwach, erhöht sich jedoch in Anwesenheit des Typ-I-Rezeptors (Liu et al. 1995; Knaus & Sebald 2001).

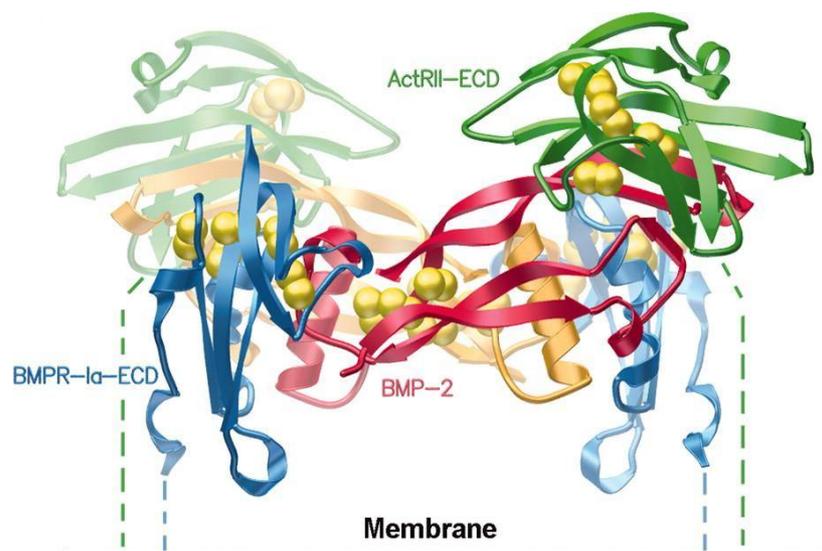


Abbildung 1.3.1. Ternärer Komplex aus einem BMP-Dimer (rot/gelb) mit zwei Typ-I-Rezeptor-ECDs (blau) und zwei Typ-II-Rezeptor-ECDs (grün) nach (Allendorph et al. 2006).

Die Ausbildung des heterooligomeren Liganden-Rezeptorkomplexes führt zur Phosphorylierung der GS-Domäne des Typ-I-Rezeptors durch die intrazelluläre Kinsedomäne des Typ-II-Rezeptors. Die GS-Domäne befindet sich N-terminal von der Kinsedomäne und ist ein hochkonservierter Glycin- und Serin-reicher, etwa 30 AS langer Bereich, in dem sich die Typ-I-Rezeptoren und die Typ-II-Rezeptoren voneinander unterscheiden. Der Typ-II-Rezeptor besitzt eine konstitutiv aktive Kinsedomäne, während

die Kinaseaktivität des Typ-I-Rezeptors erst nach BMP-Bindung durch den Typ-II-Rezeptor angeschaltet wird (Wrana et al. 1994; Wieser et al. 1995; Attisano & Wrana 1996). Die aktive Kinase des Typ-I-Rezeptors phosphoryliert dann ihrerseits Smad-Proteine bzw. Proteinkinasen, die das Signal weitergeben (Derynck & Zhang 2003).

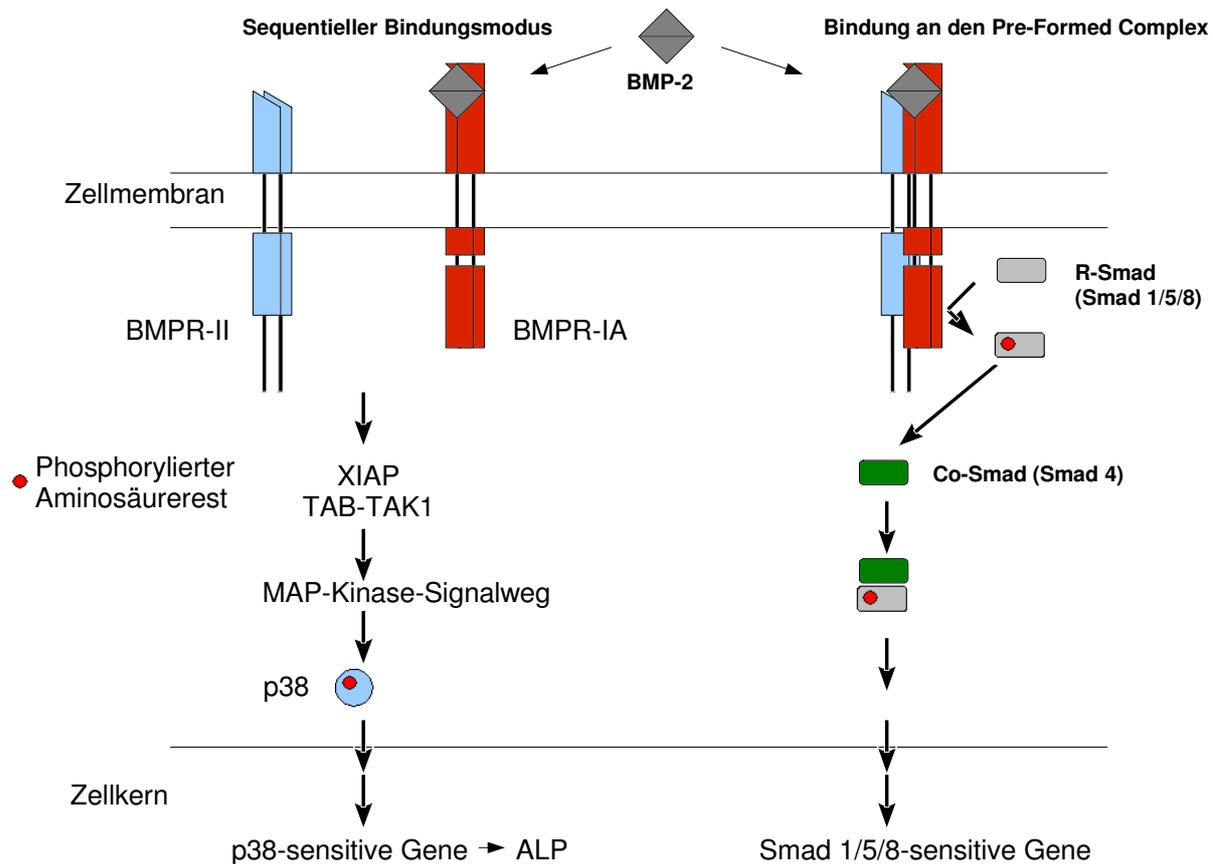


Abb. 1.3.2. Schematische Darstellung der BMP-2-Rezeptorbindung und Signalwege.

Für die Bindung von BMP-2 an die Rezeptoren existieren zwei verschiedene Bindungsmodi, die mit dem Auslösen unterschiedlicher Signalwege assoziiert sind. Im sequentiellen Bindungsmodus werden zunächst zwei Typ-I-Rezeptoren gebunden und danach zwei Typ-II-Rezeptoren in den Ligand-Typ-I-Rezeptor-Komplex rekrutiert. Dieser Modus löst die Aktivierung des „p38-MAPK-Signalweges“ aus. Der zweite Modus erfordert die Bindung des Liganden an bereits bestehende Rezeptorkomplexe (*preformed complex*, PFC) aus zwei Typ-I- und zwei Typ-II-Rezeptoren. Dadurch kommt es zur Aktivierung des „Smad-Signalweges“ (Abb. 1.3.2.) (Gilboa et al. 2000; Nohe et al. 2002, 2003)

Im Fall des p38-MAPK-Signalweges wird am Rezeptorkomplex zunächst das Protein XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) aktiviert, das dann als Adaptor für die Signalübertragung über das Protein TAB1 (*TGF- β -activated binding protein*) auf die MAPKKK TAK-1 (*TGF- β -activated kinase 1*) dient (Yamaguchi et al. 1999). Dadurch wird eine MAP-Kinase-Kaskade aktiviert, die über die Phosphorylierung von p38 und den Transkriptionsfaktor JUN die Expression von typischen Knochenmatrixproteinen wie Typ-I-Kollagen, Fibronectin, Osteopontin, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase induziert (Lai & Cheng 2002).

In Vertebraten werden BMP-2-Signale außerdem über die Smad-Proteine 1, 5 und 8 weitergegeben. Diese Smad-Proteine werden als R-Smads bezeichnet (rezeptor-phosphorylierte Smads)(Massagué 2000). Smad-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, deren Bezeichnung von den ersten beiden identifizierten Mitgliedern dieser Proteinfamilie abgeleitet wurde: dem MAD-Protein (*mothers against decapentaplegic*) aus *Drosophila melanogaster* und dem SMA-Protein (*small body size*) aus *Caenorhabditis Elegans*. Phosphorylierte R-Smads assoziieren mit Smad 4, einem Co-Smad, und werden im Komplex in den Zellkern transportiert, wo sie mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Runx2 in Osteoblasten, interagieren und die Genexpression beeinflussen (Chen et al. 2004).

BMP-2-Signale werden auf verschiedenen Ebenen reguliert:

Die BMP-2-Rezeptor-Bindung wird durch extrazelluläre Antagonisten reguliert, wie z.B. Noggin, Chordin, Cerberus, Gremlin und DAN, die BMP-2 mit hoher Affinität binden und die Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche verhindern (Hsu et al. 1998; Devlin et al. 2003; Wu et al. 2003; Yanagita 2009; Tsiologiannis et al. 2009). Auch Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Heparin, zu denen BMP-2 eine hohe Affinität aufweist, beeinflussen die BMP-Rezeptorbindung (Ruppert et al. 1996; Takada et al. 2003; Zhao et al. 2006; Kanzaki et al. 2008).

Außerdem findet eine intrazelluläre Regulation von BMP-Signalen statt, wie durch Smad 6, das als inhibitorisches Smad mit Typ-I-BMP-Rezeptoren interagiert und die Smad 1/5/8-Phosphorylierung verhindert. Diese Regulation erfolgt nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung, indem bei hohem BMP-2-Spiegel die Smad 6-Produktion ansteigt (Yoshida et al. 2000). Andere regulatorische Proteine wie Tob, das BMP-Signale durch die Bindung an aktivierte R-Smads inhibiert, und Smurf1, das sowohl mit Runx2, als auch mit Smad1/5/8 und Smad 6 interagiert, beeinflussen ebenfalls BMP-Signale (Chen et al. 2004). Auch über die Kontrolle der Proteinestabilität der R-Smads findet eine Regulation statt. So ubiquitinyliert die

E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 R-Smads und markiert sie so für den Abbau durch das Proteasom (Zhu et al. 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation von BMP-Signalen ergibt sich durch die Vernetzung der intrazellulären BMP-Signalwege mit anderen Signalwegen, wie z.B. den Wnt-, dem JAK-STAT- oder MAPK-Signalwegen (von Bubnoff & Cho 2001; Derynck & Zhang 2003; Yoon & Lyons 2004; Herpin & Cunningham 2007a). Hinzu kommt, dass der aktivierte Rezeptorkomplex außer den beiden, bereits erwähnten, Signalwegen (p38- und Smad-Signalweg) weitere Signale induzieren kann, z.B. den JNK- und den Erk-MAPK-Signalweg (Derynck & Zhang 2003) oder Rho-GTPase-Signalwege (Gamell et al. 2008; Kardassis et al. 2009).

BMP-Wirkungen werden somit, abhängig vom Zelltyp und dessen Ausstattung an Rezeptor- und Signalproteinen, durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und reguliert, die in ein komplexes Signalnetzwerk integriert sind. So können räumlich und zeitlich Signale koordiniert werden, die eine akkurate Steuerung der Differenzierung bzw. Gewebemöostase erlauben.

1.4. Die Funktion der Propeptide bei Wachstumsfaktoren

BMP-2 verfügt, wie alle BMPs, in seiner Vorläuferform über ein langes Propeptid, das mehr als zwei Drittel des Proteins ausmacht (1.2.). Auch viele andere extrazelluläre Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie Proteasen besitzen als Vorläuferproteine ein Propeptid. Die Propeptide können vielfältige Funktionen ausüben; meist sind sie für die korrekte Regulation der biologischen Aktivität von entscheidender Bedeutung. Im Folgenden sollen zunächst Funktionen von Propeptiden im Allgemeinen erläutert werden, um dann besonders auf die Eigenschaften von Propeptiden bei Proteinen der TGF- β -Familie einzugehen.

Eines der bekanntesten Vorläuferproteine mit Propeptid ist das Proinsulin. Es besteht aus der A- und der B-Kette, die durch das C-Peptid miteinander verbunden sind. A- und B-Kette sind im gefalteten Protein durch zwei Disulfidbrücken verbunden, die A-Kette enthält eine weitere intramolekulare Disulfidbrücke. Bei der Faltung sorgt das C-Peptid für die räumliche Nähe der beiden Ketten, die für die Ausbildung der Disulfidbrücken notwendig ist. Nach der oxidativen Faltung wird das C-Peptid durch Proproteinkonvertasen aus der Sequenz herausgespalten und das reife Insulin sekretiert (Steiner & Clark 1968). Neue Erkenntnisse weisen daraufhin, dass das C-Peptid nicht nur bei der Faltung von Proinsulin eine Rolle spielt,

sondern darüber hinaus eine eigene biologische Funktion besitzt, da es in der Lage ist, verschiedene Signalwege in unterschiedlichen Zelltypen auszulösen (Hills & Brunskill 2009).

Häufig kommt Propeptiden eine Funktion als sogenanntes intramolekulares *Chaperone* zu (Inouye 1991; Eder & Fersht 1995). D.h. sie sind für die Faltung des meist C-terminal gelegenen reifen Teils des Proteins essentiell. Wie am Beispiel des Pro-Subtilisins, einer Serinprotease, erforscht wurde, kann das Propeptid als Katalysator wirken, indem es durch die Interaktion mit dem reifen Teil des Proteins die Aktivierungsenergie für die Faltung herabsetzt (Eder et al. 1993; Bryan 2002). Im Gegensatz zu anderen „freien“ Chaperones sind sie jedoch nur in stöchiometrischen Mengen wirksam und weisen eine sehr hohe Substratspezifität für den jeweils zugehörigen reifen Teil auf (Ikemura et al. 1987). Es wurde diskutiert, dass bei disulfidverbrückten Proteinen, wie z.B. *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI) das Cystein-enthaltende Propeptid während der Faltung Disulfidintermediate mit den Cysteinen des reifen Teils ausbildet und dadurch die Faltung fördert (Weissman & Kim 1992; Creighton et al. 1993).

Auch bei den Neurotrophinen, die als Cystinknotenproteine den BMPs verwandt sind, hat das Propeptid die oben genannte Funktion eines intramolekularen *Chaperone* (Rattenholl et al. 2001 a,b). Ohne das Pro-Peptid ist die Faltungsausbeute des reifen Teils aus dem denaturierten Zustand nur sehr gering und die Faltungskinetik langsam. Hinzu kommt, dass bei den Neurotrophinen auch die Pro-Formen sezerniert werden (Lee et al. 2001). ProNGF ruft jedoch eine andere zelluläre Antwort hervor als reifer NGF: durch die Bindung an spezifische Rezeptoren löst proNGF Apoptose aus (Nykjaer et al. 2004), während reifer NGF bevorzugt mit anderen Rezeptoren interagiert und das Überleben von Nervenzellen stimuliert (Ibáñez 2002).

Innerhalb der TGF- β -Proteinfamilie wurden unterschiedliche Propeptid-Funktionen gefunden. Im Fall von TGF- β selbst ist das Propeptid an der Regulation der Funktion des reifen TGF- β beteiligt. Bei der Proteolyse des TGF- β -Vorläuferproteins durch die Proproteinkonvertasen entstehen zwei Produkte: ein Propeptid-Dimer und ein Dimer aus zwei reifen TGF- β (Lawrence 1996, 2001). Die Besonderheit liegt darin, dass das Propeptid-Dimer, das auch als *latency-associated peptide* (LAP) bezeichnet wird, nach der Spaltung nicht-kovalent mit dem reifen Teil assoziiert bleibt (Gentry & Nash 1990). Der dadurch entstehende TGF- β -Komplex wird als L-TGF- β (*latent* TGF- β) bezeichnet und ist biologisch inaktiv. L-TGF- β bindet *latent TGF- β binding proteins* (LTBP), die die schnelle Sekretion des Proteins über den Golgi-Apparat erleichtern und die Bindung von L-TGF- β an die extrazelluläre Matrix fördern, wo es

als Reservoir für reifes TGF- β dient (Kanzaki et al. 1990; Morén et al. 1994; Yin et al. 1995). Die Aktivierung von L-TGF- β kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen: Plasmin, eine Serinprotease, entfernt LAP aus dem Komplex. Das Glykoprotein Thrombospondin-1 interagiert mit LAP und löst vermutlich eine Konformationsänderung aus, durch die die Rezeptorbindestelle in TGF- β zugänglich wird. Reaktive Sauerstoffspezies beeinflussen wahrscheinlich Reste im LAP, die empfindlich gegenüber Oxidation sind, also Cysteine und Methionine, und schwächen so die Bindung zwischen LAP und TGF- β (Munger et al. 1997; Khalil 1999). Darüberhinaus scheint das TGF- β -Propeptid auch intrazellulär, vor seiner Spaltung vom reifen Teil, eine Rolle bei der Dimerisierung zu spielen. Bei Expression des reifen Teils ohne das Propeptid konnte beobachtet werden, dass eine Sekretion von aktivem, dimerem TGF- β nicht möglich war (Gray & Mason 1990). Auch bei anderen Mitgliedern der TGF- β -Familie wie Activin A und Inhibin α wurde festgestellt, dass die Anwesenheit des Propeptids für die Dimerisierung unerlässlich ist (Gray & Mason 1990; Walton et al. 2009).

Für GDF-8, das auch als Myostatin bezeichnet wird und ebenfalls zur TGF- β -Familie gehört, wurde ein ähnliches Verhalten des Propeptids beobachtet. Propeptid und reifes GDF-8 wurden rekombinant hergestellt und assoziierten nicht-kovalent. Mit diesem Komplex konnte gezeigt werden, dass der Propeptid-GDF-8-Komplex keine biologische Aktivität besitzt und das Propeptid die Bindung von GDF-8 an Rezeptoren auf Myoblasten inhibiert (Thies et al. 2001; Lee & McPherron 2001; Hill et al. 2002). Da GDF-8 ein negativer Regulator für das Muskelwachstum ist und bei Verlust der GDF-8-Funktion z.B. durch Mutationen, ein merklicher Anstieg der Muskelmasse zu verzeichnen ist, wird die Anwendung des GDF-8-Propeptids in der Therapie von Muskeldystrophien diskutiert. Durch die Blockade der, das Muskelwachstum inhibierenden, GDF-8-Funktion durch das Propeptid soll die bei diesen Erkrankungen auftretende Muskelschwäche kompensiert werden (Bogdanovich et al. 2005; Qiao et al. 2008).

Auch bei BMP-4 bleibt das Propeptid mit dem reifen Teil nach der Spaltung assoziiert. Das BMP-4-Propeptid besitzt jedoch eine zweite, N-terminal gelegene Erkennungssequenz für Proproteinkonvertasen, die nur ein minimales Furin-Consensus-Motiv: RXXR enthält. Wenn der Komplex im weiteren Verlauf Kompartimente des *Post-Trans-Golgi*-Netzwerks erreicht, wird diese zweite Schnittstelle durch die saurere Umgebung leichter für die Proproteinkonvertasen Furin und PC6 zugänglich (Cui et al. 1998). Die Spaltung an dieser zweiten Stelle führt gleichzeitig zur Dissoziation des Propeptid-BMP-4-Komplexes, so dass reifes BMP-4 sezerniert werden kann. Wenn die zweite Schnittstelle nicht gespalten wird, wird der Propeptid-BMP-4-Komplex im Lysosom abgebaut. Die Spaltung an dieser Schnittstelle

bestimmt daher, wie viel aktiver Ligand für die Signalwirkung zur Verfügung steht. Außerdem wird das Propeptid auch für die korrekte Faltung des reifen Teils benötigt (Cui et al. 2001; Degnin et al. 2004; Sopory et al. 2006). Aufgrund der großen Sequenzidentität (73 %) von BMP-2 und BMP-4 und der Konservierung der zweiten Schnittstelle im Propeptid (AS 245-248, RISR, siehe Abb. 1.2.1) wären ähnliche Funktionen auch für das BMP-2-Propeptid denkbar.

Die korrekte Prozessierung des Vorläuferproteins spielt auch bei GDF-5 eine Rolle. Eine Mutation in der Erkennungsstelle für die Proproteinkonvertasen (RRKR -> RRKQ) ist hier mit Brachydactylie, einer Missbildung der Finger und Zehen, assoziiert. Die Mutation führt offenbar dazu, dass das GDF-5-Vorläuferprotein nicht prozessiert werden kann. Das nicht-prozessierte proGDF-5 ist biologisch inaktiv (Plöger et al. 2008).

Wie bei BMP-4 und TGF- β bleibt auch bei BMP-7 das Propeptid nach der Spaltung mit dem reifen Teil assoziiert und wird im Komplex mit reifem BMP-7 sezerniert (Jones et al. 1994). Später wurde gefunden, dass das Propeptid in diesem stabilen Komplex an Fibrillin-1, ein den LTBP homologes Protein, bindet. Diese Interaktion ermöglicht die Positionierung und Konzentration des Wachstumsfaktors an Fibrillinmikrofibrillen der extrazellulären Matrix (Gregory et al. 2005). Der stabile Propeptid-BMP-7-Komplex ist im Gegensatz zu L-TGF- β jedoch nicht latent, sondern zeigt *in vitro* ähnliche Bioaktivität wie reifes BMP-7. Weiterhin greift das Propeptid auch in die Rezeptorbindung ein. Dichtegradientenzentrifugationsexperimente mit Propeptid-BMP-7-Komplex und BMPR-II-ECD in Lösung zeigten, dass BMPR-II das BMP-7-Propeptid bei der Bindung verdrängt, während eine Bindung an BMPR-IA auch ohne eine Verdrängung des Propeptids möglich ist. Bei einer Immobilisierung des Propeptid-BMP-7-Komplexes konnte jedoch keine Verdrängung beobachtet werden, sondern eine Inhibierung der BMPR-II-Bindung. Dieses unterschiedliche Rezeptorbindungsverhalten wurde im Zusammenhang mit der Funktion von BMP-7 in den ersten Stadien der Embryonalentwicklung diskutiert, in denen der Embryo noch hauptsächlich zellulär ist. In diesem Stadium könnte der Propeptid-BMP-7-Komplex die Diffusion erleichtern und für den Aufbau stabiler Gradienten sorgen, um dann bei Kontakt mit Zelloberflächenrezeptoren direkt aktiviert zu werden, indem BMPR-II das Propeptid kompetitiv verdrängt und Bindung und damit Signalwirkung ermöglicht. In späteren Entwicklungsstadien und im adulten Organismus mit stärker entwickelter extrazellulärer Matrix könnte dann die Fibrillin-bindende Funktion des Propeptids in den Vordergrund treten, um den Komplex an die extrazelluläre Matrix zu binden und dort ein Reservoir von latentem BMP-7, auf das im Bedarfsfall zurückgegriffen werden kann, aufzubauen (Sengle et al. 2008).

b).

Ein weiterer Wachstumsfaktor, der ebenfalls im Komplex mit seinem Propeptid sezerniert wird, ist BMP-9. Dabei wurden von einem BMP-9-Dimer zwei Propeptide gebunden. Wie auch bei BMP-7 war der BMP-9-Propeptid-Komplex biologisch aktiv. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass das Propeptid in diesem Komplex die Rezeptorbindung von BMP-9 nicht behindert (Brown et al. 2005).

Für BMP-2 fehlen bis heute noch Informationen über den Reifungsprozess und die Rolle des Propeptids. Bei Überexpression des BMP-2-Vorläuferproteins in CHO-Zellen wurden im Medium neben dem reifen BMP-2 auch ein geringer Anteil an unprozessiertem proBMP-2 gefunden sowie ein überproportional großer Anteil an Propeptid. Es wurde etwa fünfmal mehr Propeptid als reifes BMP-2 detektiert, was mit der vergleichsweise starken Bindung von reifem BMP-2 an die Zelloberfläche und an Komponenten der extrazellulären Matrix begründet wurde. Dies würde die Menge des frei im Medium vorliegenden und damit detektierbaren BMP-2 im Vergleich zum Propeptid sinken lassen (Israel et al. 1992). Nichtsdestotrotz deutet die gleichzeitige Sekretion von Propeptid und reifem Teil zumindest darauf hin, dass das Propeptid während der Reifung und Sekretion von BMP-2 eine Rolle spielt und auch nach der Sekretion im extrazellulären Raum eine biologische Funktion besitzt.

1.5. Therapeutische Bedeutung von BMP-2

Aufgrund des starken osteoinduktiven Potentials sind besonders BMP-2 und BMP-7 von großem Interesse für die Therapie und Prophylaxe von Knochendefekten. Da die rekombinante Herstellung der Proteine in *E. coli* mittlerweile gut etabliert ist (Ruppert et al. 1996; Vallejo et al. 2002; Vallejo & Rinas 2004; Hillger et al. 2005; Rudolph et al. 2008), steht rekombinantes humanes BMP-2 in ausreichender Menge für die therapeutische Nutzung zur Verfügung.

In Tierversuchen wurde beobachtet, dass BMP-2 den Heilungsprozess von Frakturen erheblich beschleunigen kann (Teixeira & Urist 1998). Da sich diese Beobachtung auch in klinischen Studien bestätigen ließ (Govender et al. 2002), ist BMP-2 seit 2002 in Europa für die Behandlung von offenen Schienbeinfrakturen zugelassen (Kain & Einhorn 2005). Es wird unter dem Namen *InductOSTM* (Wyeth Pharmaceuticals, USA) in Verbindung mit einem Collagenschwamm, der als Träger fungiert, eingesetzt. Seit 2005 ist *InductOSTM* auch für die

Fusion von Lendenwirbeln bei degenerativen Bandscheibenschäden zugelassen und stellt eine Alternative zur Verwendung von körpereigenen Knochentransplantaten dar (Carlisle & Fischgrund 2005; Robinson et al. 2008).

Bei vielen Anwendungen kommt der Dosierung und Freisetzung des BMP-2 am Wirkort eine besondere Bedeutung zu. Durch Verwendung eines Trägermaterials mit optimierten Freisetzungseigenschaften wird weniger BMP-2 für die gleiche Wirkung benötigt und Nebenwirkungen werden reduziert. Während des Knochenheilungsprozesses sorgt das Trägermaterial für eine räumlich und zeitlich optimierte Freisetzung des Wachstumsfaktors. Ein Träger mit langsamer und nachhaltiger BMP-2-Freisetzung zeigt oft bessere Wirkung als eine hohe Einzeldosis oder mehrere Dosen (Issa et al. 2008). Die Trägermaterialien für die Verabreichung von BMP-2 werden in drei Gruppen eingeteilt:

- 1) Natürliche Polymere wie z.B. Kollagen, Hyaluronan, Fibrin, Chitosan, Alginat, Agarose sind meist Komponenten der extrazellulären Matrix und nutzen die natürliche Eigenschaft von BMP-2 mit ECM-Komponenten zu assoziieren. Sie sind in verschiedenen Formulierungen verfügbar und bioresorbierbar (Yudell & Block 2000; Takita et al. 2004).
- 2) Anorganische Materialien wie Calciumorthophosphate fördern an sich schon die Knochenbildung auf ihrer Oberfläche.
- 3) Synthetische Polymere wie Polymilchsäuren (PLA) und Polylactid-co-Glycolid (PLGA), deren Vorteile in der Flexibilität bei der Formgebung z.B. in Blöcken, Fasern, Platten und Mikrosphären und der Formulierung liegen. Außerdem ist die Übertragung von Krankheiten ausgeschlossen. Nachteil bei einigen synthetischen Polymeren ist jedoch der mitunter schnelle Abbau, einhergehend mit der Entstehung toxischer Abbauprodukte.

Weiterhin werden auch Verbundstoffe der oben genannten Materialien eingesetzt (Issa et al. 2008; Bessa et al. 2008).

Neben Anwendungen in der Frakturheilung und Wirbelfusion wird die Anwendung von BMP-2 in der Therapie vieler anderer Erkrankungen diskutiert. In der kraniofazialen Chirurgie könnten z.B. bei angeborenen Schädelfehlbildungen oder krebsbedingter Knochenresektion großflächige Knochendefekte mit Hilfe von BMP-2 therapiert werden (Smith et al. 2008). In der Zahnmedizin könnte durch BMP-2-induzierte Knochenbildung eine stabile Basis für den Einsatz von Implantaten geschaffen werden. Hier werden bereits erste

klinische Studien durchgeführt (Wikesjö et al. 2007; Tonetti & Hämmerle 2008). In der Osteoporosetherapie ist eine Applikation von BMP-2 angedacht, um die Knochenmasse zu erhöhen. Bis vor kurzem waren nur Medikamente verfügbar, die einen weiteren Verlust an Knochenmasse im Verlauf der Erkrankung verhindern sollten, jedoch keine neue Knochenbildung induzieren können. Das erste zugelassene Medikament mit dieser Fähigkeit, war PTH (*Parathyroid Hormone*), das in Europa jedoch nur 18 Monate lang oral verabreicht werden darf aufgrund der Gefahr der Entwicklung von Osteosarkomen (Vahle et al. 2002; Khosla et al. 2008). BMP-2 und BMP-7 könnten in der Zukunft eine Rolle bei der Verwendung von anabolen Substanzen zum Knochenaufbau spielen, jedoch ist dafür ein zukünftiges tiefergehendes Verständnis der komplexen zellulären Interaktionen und des kontrollierenden Signalnetzwerks notwendig (Khosla et al. 2008).

Die therapeutische Anwendung von BMP-2 ist jedoch nicht unproblematisch. Bei verschiedenen „*Off-label*“-Anwendungen in der Wirbelsäulen Chirurgie und insbesondere mit höheren Konzentrationen von BMP-2 wurden verstärkte Komplikationen, wie z.B. Knochenabbau, Schwellungen, Ödeme, Hämatome und starke Schluck- und Atembeschwerden beobachtet (Shields et al. 2006; Benglis et al. 2008). Da besonders bei großflächigen Knochendefekten (z.B. angeborenen Schädeldefekten) eine entsprechend hohe BMP-2-Konzentration eingesetzt werden muss, sind hier weitere Studien notwendig, um Schäden durch Überdosierung zu vermeiden.

Weiterhin fällt die relativ geringe Empfindlichkeit des Menschen gegenüber BMP-2 im Vergleich mit kleineren Säugetieren auf. Die effektiven Dosen im Menschen sind daher sehr hoch. In der klinischen Anwendung werden Dosen zwischen 2 und 30 mg eingesetzt, das entspricht in etwa dem Doppelten der Menge an BMP-2, die im gesamten menschlichen Skelett enthalten ist (Bishop & Einhorn 2007). Der Grund für diese Tatsache ist noch wenig verstanden. Möglicherweise werden BMP-Signale in kleinen Säugetieren und im Menschen unterschiedlich reguliert (Diefenderfer et al. 2003). Eine Rolle könnte auch die schnelle „*Clearance*“, also die kurze Verweildauer des Wachstumsfaktors im lokalen Gewebe bzw. eine kurze biologische Halbwertszeit und eine geringe Zahl für BMP-Signale empfindlicher Zellen spielen. Die Effizienz von BMPs könnte jedoch zukünftig mit der Entwicklung verbesserter Trägermaterialien, die einen anhaltende Freisetzung der Proteine gewährleisten, gesteigert werden.

Fortschritte in der Gentransfer-Technologie könnten es in der Zukunft ermöglichen, die für die BMPs codierenden DNA-Abschnitte in Zellen einzubringen, um eine dauerhafte,

effiziente Präsenz der Wachstumsfaktoren lokal im Gewebe zu erreichen (Bishop & Einhorn 2007). Entsprechende Versuche sind bereits mit Ratten erfolgreich durchgeführt worden (Betz et al. 2006). Hierbei wurde die Heilung eines Knochendefektes kritischer Größe durch den Einsatz eines adenoviralen Vektors, der die cDNA von humanem BMP-2 trug, beschleunigt. Eine andere Möglichkeit, BMPs gezielt über einen längeren Zeitraum freizusetzen, besteht im Einsatz von genetisch veränderten Osteoprogenitorzellen oder mesenchymalen Stammzellen, die BMPs exprimieren und freisetzen. Diese könnten in Kombination mit entsprechenden Trägermaterialien für die Heilung von Knochendefekten verwendet werden (Lieberman et al. 1998; Lieberman et al. 1999; Meinel et al. 2006). Der Vorteil beider Methoden besteht in der korrekten posttranslationalen Modifikation des BMPs und einer Freisetzung, die der natürlichen, zellbasierten weitgehend ähnelt.

Möglicherweise wird zukünftig mit dem tieferen Verständnis der Expression und Regulation von BMPs auch die Entwicklung von Substanzen möglich sein, die die endogene BMP-Expression erhöhen können, um Osteoporose oder andere Stoffwechselkrankheiten, die mit einem Verlust an Knochenmasse einhergehen, zu bekämpfen (Li 2008).

1.6. Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

Wie schon in Kapitel 1.4 erläutert, kommt den Propeptiden bei der Regulation der biologischen Aktivität der BMPs häufig eine entscheidende Rolle zu. Für viele BMP-Propeptide wurden bereits entsprechende Entdeckungen gemacht. Bei BMP-2 ist jedoch nur wenig über die Struktur und Funktion des Propeptids, die auch im Hinblick auf eine breite Anwendung des Proteins in der Therapie von Bedeutung wäre, bekannt. Aufgrund der oben beschriebenen Probleme bei der Anwendung von BMP-2 (1.5.) bietet der Einsatz von proBMP-2 möglicherweise Vorteile. Insbesondere als Latenzform, die eine Freisetzung von reifem BMP-2 über einen längeren Zeitraum ermöglicht, könnte proBMP-2 eventuell therapeutisch genutzt werden (Rudolph et al. 2008). Als Grundlage für potentielle Anwendungen sind jedoch zunächst grundlegende Fragestellungen zur Funktion und Wirkungsweise des Propeptids bzw. der Proform von BMP-2 zu klären.

Anders als bei den Neurotrophinen (siehe 1.4.) ist das Propeptid bei BMP-2 offenbar nicht für die Faltung des reifen Teils essentiell, wie *in vitro* gezeigt werden konnte (Hillger et al. 2005). Es besitzt eine hauptsächlich durch β -Faltblätter geprägte Sekundärstruktur. Wie bei NGF stabilisiert auch bei BMP-2 der reife Teil die Struktur des Propeptids (Kliemann et al. 2004;

Hillger et al. 2005). Die biologische Aktivität von proBMP-2 wurde im Tiermodell untersucht. Dazu wurden BMP-2 bzw. proBMP-2 auf Keramikträgern in die Bauchmuskulatur von Ratten implantiert. Nach 30 Tagen wurden Implantate und das umliegende Gewebe auf Knochenneubildung untersucht. Es wurde festgestellt, dass sowohl BMP-2 als auch proBMP-2 die ektopische Knochenbildung induziert hatten. Wahrscheinlich wurde das Propeptid extrazellulär durch Proteasen abgebaut, so dass der reife Teil freigesetzt wurde. Der Abbau von BMP-Propeptiden durch extrazelluläres Furin wurde bereits beschrieben (Beck et al. 2002). Auch die Anwesenheit anderer Proteasen im Umfeld der Implantate ist möglich, da durch den Implantationsvorgang entzündliche Reaktionen hervorgerufen werden können.

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse sollten nun in der vorliegenden Arbeit strukturelle und funktionale Aspekte des Propeptids insbesondere im Hinblick auf seinen Einfluss auf die biologische Funktion von BMP-2 untersucht werden.

Dazu gehörte zunächst die Charakterisierung der Bindung von proBMP-2 an die bekannten BMP-2-Rezeptoren. Für Untersuchungen *in vitro* sollten die extrazellulären Domänen eines Typ-I- und eines Typ-II-Rezeptors rekombinant in *E. coli* hergestellt werden, um sie nach Reinigung und Rückfaltung im nativen Zustand zur Quantifizierung der Ligandenbindung testen zu können. Die ECDs sind für die Charakterisierung der Rezeptorbindung ausreichend (Kirsch et al. 2000a). Ebenfalls sollte nach transienter Expression in COS-7-Zellen die Bindung von proBMP-2 an die rekombinant exprimierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche untersucht werden. Ein weiteres Ziel bestand darin, Aufschluss über die von proBMP-2 induzierten Signalwege in unterschiedlichen Zelltypen zu gewinnen. In einem weiteren Arbeitspaket sollte die Interaktion des BMP-2-Propeptids mit dem reifen Teil analysiert sowie stabil gefaltete Subdomänen im Propeptid identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acryl-/Bisacrylamid-Lösung (<i>Rotiphorese</i> ; 30 % (w/v))	Roth (Karlsruhe)
Agarose	ICN (Eschwege)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem (Darmstadt)
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Arginin	AppliChem (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS ³)	PIERCE (Rockford, IL, USA)
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth (Karlsruhe)
DNA-Probenpuffer (6x)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
Disuccinimidylsuberat (DSS)	PIERCE (Rockford, IL, USA)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamin-tetraessigsäure, purum (EDTA)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Glutathion (oxidiert)	AppliChem (Darmstadt)
Glutathion (reduziert)	AppliChem (Darmstadt)
Guanidinium Hydrochlorid, <i>ultra pure</i> (GdmCl)	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	AppliChem (Darmstadt)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	AppliChem (Darmstadt)
Kanamycinsulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)

Kodak GBX™ Fixierer	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Kodak GBX™ Entwickler	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Fluka (Buchs, Schweiz)
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumdodecylsulfat (SDS, <i>ultra pure</i>)	Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Roth (Karlsruhe)
Proteaseinhibitormix (<i>complete, EDTA-free</i>)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Roti®-fect (Transfektionsreagenz)	Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese™ Acrylamid/Bisacrylamid 30%	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Sucrose	Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Triton™ X-100	AppliChem (Darmstadt)
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, <i>ultra pure</i>	ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA)
Trypton	Difco/Becton (Sparks, MD, USA)
Tween-20	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien stammten von den Firmen AppliChem oder Roth. Zur Herstellung aller Puffer wurde deionisiertes Wasser (Pure Lab Plus, USF Seral) verwendet.

2.1.2. Standards und Kits

<i>peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I</i>	Peqlab (Erlangen)
<i>NucleoSpin® Extract II</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>NucleoBond® Xtra Midi Kit</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>PCR-Script® Amp Cloning Kit</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Zero Blunt® PCR Cloning Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>PeqGOLD® Proteinmarker</i>	Peqlab (Erlangen)
<i>Gene Ruler® 1 kb DNA-Ladder</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Biotin Protein Labeling Kit</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>PCR-Mycoplasma Test Kit</i>	Applichem (Darmstadt)

2.1.3. Enzyme und Proteine

<i>FastAP® Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Nde I (aus Neisseria dentrificans)</i>	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
<i>XhoI (aus Xanthomonas holcicola)</i>	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
<i>SAWADY™ Pwo-DNA-Polymerase</i>	Peqlab (Erlangen)
<i>Lysozym (aus Hühnereiweiß)</i>	AppliChem (Darmstadt)
<i>Benzonase® Reinheitsgrad II</i>	Merck (Darmstadt)
<i>T4-DNA-Ligase</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Taq-DNA-Polymerase</i>	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
<i>Trypsin aus Rinderpankreas</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Thrombin aus Rind</i>	Sigma (St. Louis, MO, USA)
<i>BSA, Fraktion V (pH 7,0) Blotting grade</i>	AppliChem (Darmstadt)
<i>BMPR-II/Fc-Chimäre bzw.</i>	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
<i>BMPR-IA/Fc-Chimäre</i>	

2.1.4. Antikörper

In Klammern sind die jeweiligen Katalognummern angegeben.		Eingesetzte Konzentration/ Verdünnung für Western Blots
Anti-BMP-2 aus Kaninchen (CYT-26591)	Dianova (Hamburg)	0,2 µg/ml
Anti-BMPR-IA aus Ziege (E-16)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	Nur für ELISA
Anti-BMPR-II (T-18 und G-17) aus Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	0,4 µg/ml
Anti-BMPR-IA (C180) aus Kaninchen	Abgent (San Diego, CA, USA)	0,5 µg/ml
Anti-Actin (PA1-16889) aus Kaninchen	Dianova (Hamburg)	0,04 µg/ml
Anti-Smad-1/5/8	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	1 : 1000
Anti-phospho-Smad 1/5/8	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	1 : 1000
Anti-p38-MAPK	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	1 : 1000
Anti-phospho-p38-MAPK	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	1 : 1000
Anti-BMP-2-Propeptid aus Huhn	Davids Biotechnologie (Regensburg)	1 : 1000
Anti-BMPR-IA aus Huhn	Davids Biotechnologie (Regensburg)	1 : 1000
Anti-BMPR-II aus Huhn	Davids Biotechnologie (Regensburg)	1 : 1000
Anti-HA-Tag aus Maus (HA.11)	Covance (Emeryville, CA, USA)	1 µg/ml
Anti-Kaninchen, POD-konjugiert	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)	0,08 µg/ml
Anti-Ziege, POD-konjugiert aus Kaninchen	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)	0,08 µg/ml
Anti-Huhn, POD-konjugiert	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)	0,08 µg/ml
Anti-Maus, POD-konjugiert aus Ziege	Dianova (Hamburg)	0,08 µg/ml

2.1.5. Säulen und Säulenmaterialien

<i>HiTrap Heparin HP (5 ml-Säule)</i>	GE Healthcare (München)
<i>CHT[®] Hydroxyapatit Ceramic Type I, 40 µm</i>	Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
<i>SOURCE 15 Q</i>	GE Healthcare (München)
HPLC-Säule 214TP510 Protein C4	Grace Vydac (Deerfield, USA)
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare (München)
Superdex 75 <i>prep grade</i> , 100 ml Säulenvolumen	GE Healthcare (München)
Q-Sepharose <i>High Performance</i>	GE Healthcare (München)
MonoP 5/50 GL	GE Healthcare (München)
Protein A Sepharose 4 <i>Fast Flow</i>	GE Healthcare (München)

2.1.6. Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen.

BMPR-II forward - Primer

5'-TTT TTC CGC ATA TGG CAC TAT GTG CGT TTA AAG ATC C-3'

BMPR-II reverse - Primer

5'-TCA CTC GAG TTA AAA ATT CTC AGT AAA GTT GAC-3'

2.1.7. Vektoren und Plasmide

Das Expressionskonstrukt pcDNA 3.1 ~BMPR-IA-HA für die Expression des BMPR-IA in Säugerzellen wurde von Prof. Petra Knaus (FU Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die codierende Sequenz für den gesamten Typ-II-Rezeptor (pBS-SK::BMPR-II) wurde von Dr. Herbert Neuhaus (MLU Halle) erhalten.

Das Expressionskonstrukt für die ECD des BMPR-IA (pET 15 b::BMPR-IA-ECD) mit *His-Tag* wurde von Antje Gotsch hergestellt (Antje Gotsch 2004).

weitere Vektoren/Plasmide:

pCMV <i>Sport β-gal</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Klonierungsvektor pCR <i>Blunt™II</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
pUBS 520	Brinkmann <i>et al.</i> , 1989
Expressionsvektor pET 21a	Novagen (Bad Soden)
Expressionsvektor pMalAlk3	Peter Hortschansky (HKI, Jena)

2.1.8. Bakterienstämme

E. coli TOP 10 (Invitrogen (Karlsruhe))

Genotyp: F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15ΔlacX74 deoR
recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

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

Genotyp: F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻m_B⁻) galλ(DE3) endA Hte

2.1.9. Zellmasse

Für die Herstellung von gereinigtem, nativem BMP-2, proBMP-2 und BMP-2-Propeptid wurde *E. coli*-Zellmasse verwendet, die von Frank Hillger hergestellt worden war (Hillger, 2004).

2.1.10. Sonstiges Material

Rundfilter (0,025 μm, für Tropfendialysen)	Millipore (Bedford, MA, USA)
Rundfilter (0,45 μm, zur Puffer-Filtration)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Sterilfilter (0,2 und 0,45 μm)	Renner (Dannstadt)
Dialyseschläuche (Ausschlussgröße 6 – 8 kDa)	SpectraPor (Rancho Dominguez, USA)
<i>Nitrocellulose Blotting</i> Membran (0,45 μm)	Peqlab (Erlangen)
<i>Lumi-Film Chemiluminescent Detection</i> Film	Roche Diagnostics (Mannheim)

BIACORE-Sensorchips SA und CM-5	Biacore AB (Uppsala, Schweden)
<i>NuPAGE</i> [®] Novex 4 – 12 % Bis-Tris-Gele, 4 – 12 % Tris-Glycin-Gele, 10 – 20 % Tris-Glycin-Gele	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>LDS-Loadingbuffer</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.11. Geräte

96-well-Plattenreader: <i>VERSAmax tunable microplate reader</i> mit <i>SoftMaxPro 4.3.1 LS</i>	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Absorptionsspektrophotometer DU-7400	Beckman Coulter (Fullerton, USA)
Abkühlcontainer 5100 Cryo 1 °C „Mr. Frosty“	Nalgene (Roskilde, Dänemark)
Agarose-Gelelektrophoresekammern	Peqlab (Erlangen)
Autoklaven <i>Varioklav</i>	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
<i>ÄKTA</i> [™] <i>Explorer</i> mit Pumpe <i>P-900</i> , UV-Monitor <i>UV-900</i> , Fraktionskollektor <i>Frac-900</i> , pH und Leitfähigkeitsmonitor <i>pH/C-900</i> ; Steuer- und Auswertungssoftware: „ <i>Unicorn</i> “ Version 3.10.11	GE Healthcare (München)
<i>BIACORE X</i> mit Auswertesoftware <i>BIAevaluation</i> Version 3.0	Biacore AB (Uppsala, Schweden)
Western Blot Apparatur: <i>Hoefer SemiPhor</i>	GE Healthcare (München)
Brutschrank	Memmert (Schwabach)
Brutschrank <i>Hera Cell</i>	Heraeus (Hanau)
CD-Spektropolarimeter J810	Jasco-Systems (Groß-Umstadt)
Eismaschine <i>AF20</i>	Scotsman (Vernon Hills, IL, USA)
Elektroporationsgeräte <i>Gene Pulser II</i> oder <i>Electroporator 2510</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA) Eppendorf (Hamburg)

Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 0,2 cm)	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Filtrationskassette <i>Vivaflow 200</i> (10 000 MWCO, PES)	Sartorius Stedim Biotech (Göttingen)
Zellhomogenisator: <i>GAULIN MICRON LAB 40</i>	APV Homogeniser GmbH (Lübeck)
Küvetten	Hellma (Müllheim)
<i>NanoPhotometer</i>	Implen (München)
Ultraschallgerät UP 200s Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher GmbH (Teltow)
Mikroskop <i>Telaval 3</i>	Carl Zeiss (Jena)
Mixer <i>Vortex Genie 2</i>	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
P1-Pumpe	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Peristaltische Pumpe FE 411	B. Braun GmbH (Melsungen)
pH-Meter WTW 526	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim)
Pipetten <i>Research 10, 200, 1000 und 5000 µl</i>	Eppendorf (Hamburg)
Refraktometer	Carl Zeiss (Jena)
Schüttler SM-30 und VKS-75 <i>Control</i>	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Spannungsgeräte: EPS 600 und EPS 3500	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Sterilbank <i>Hera Safe</i>	Heraeus (Hanau)
Gelelektrophoresekammern: <i>Hoefer Mighty Small E250/E260</i>	Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA)
<i>Novex Mini Cell mit XCell II® Blot Module</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Thermocycler <i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf (Hamburg)
<i>Thermomixer compact, comfort und 5436</i>	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlschrank	GFL (Burgwedel)

Ultraturrex: T25	Janke & Kunkel (Staufen)
UV-Transilluminator	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
<i>Laboport</i> [®] -Membran-Vakuumpumpe	Roth (Karlsruhe)
Waage <i>Analytical Standard A560</i>	Ohaus (Gießen)
Waage FA-1500-1	Faust (Köln)
Zentrifugen: <i>Avanti</i> J-20 und J-25; Rotoren: JLA-8.1000, JA-10, JA-20, JA-12, JA-30.50	Beckman Coulter (Fullerton, USA)
<i>Biofuge fresco</i> und <i>pico</i>	Hereaus (Hanau)

2.1.12. Lösungen, Medien, Antibiotika, Puffer

Agarosegelelektrophorese

Agarosegele	0,8 % oder 1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/HCl; 1 M Eisessig; 100 mM EDTA; pH 8,5

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-PAGE-Trenngel: (14 %)	7 ml Rotiphorese [™] Acrylamid / Bisacrylamid 4 ml Wasser bidest 4 ml Trenngelpuffer (s.u.) 50 µl TEMED 100 µl 10 % APS
SDS-PAGE-Sammelgel: (6 %)	1,2 ml Rotiphorese [™] Acrylamid / Bisacrylamid 3,5 ml Wasser bidest 1,6 µl Sammelgelpuffer (s.u.) 30 µl TEMED 60 µl 10 % APS
4x SDS-PAGE-Trenngelpuffer	3 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS

4x SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 8,3; 1,87 M Glycerin; 1 % (w/v) SDS
5x SDS-PAGE-Probenpuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 4,8 % (w/v) SDS; 16 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Färbelösung für SDS-PAGE	40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 1 g/l Coomassie R250
Entfärbelösung für SDS-PAGE	40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure
NuPAGE™-MOPS-SDS-Laufpuffer	50 mM MOPS, 50 mM Tris, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA pH 7,7
Tris-Glycin-Nativ-Probenpuffer	100 mM Tris, 10 % Glycerol, 0,0025 % Bromphenolblau, pH 8,6
Tris-Glycin-Nativ-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3

Medien

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

SOC-Medium	98 ml SOB-Medium; 1 ml Magnesium-Stammlösung (1 M MgCl ₂ ; 1 M MgSO ₄) 1 ml 40 % (w/v) Glucose
------------	---

Zellkulturmedien und -lösungen

DMEM <i>high glucose</i>	4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin, mit Na-Pyruvat (E15-843) von PAA (Pasching, Österreich)
Trypsin-EDTA (1x)	PAA (Pasching, Österreich)

Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml
Kanamycin-Stammlösung	50 mg/ml

weitere Puffer für die Analytik

BIACORE-Regenerationspuffer	10 mM Glycin, pH 2.0
COS-7-Lysispuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7; 125 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X-100
Puffer D	10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,25 M Sucrose, 1 mM EDTA
ELISA-Blockierungspuffer	TBS, pH 7,6; 0,05 % Tween-20, 5 % BSA
ELISA-Coatingpuffer	50 mM Na ₂ CO ₃ , pH 8
HBS-EP (BIACORE-Laufpuffer)	10 mM HEPES/KOH, pH 7.0; 500 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,005 % Tween-20
KRH-Puffer	50 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 128 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgSO ₄ , 1,2 mM CaCl ₂
NuPAGE™-Transferpuffer	25 mM Bicin/HCl, pH 7,2; 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA

PBS	8 g NaCl, 0,2g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l
TBST	20 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20
Trypsin/EDTA (PAA)	0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml Na-EDTA in PBS
Western Blot-Detektionslösung 1	2,5 mM Luminol, 396 µM Cumarinsäure in 100 mM Tris/HCl, pH 8,5
Western Blot-Detektionslösung 2	0,019 % H ₂ O ₂ in 100 mM Tris/HCl, pH 8,5
Western-Transferpuffer	20 mM Tris, pH 8,5; 150 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,05 % SDS
X-gal-Lösung	0,2 % X-Gal, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ x 3 H ₂ O, 5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ in PBS

2.2. Methoden

2.2.1. Gentechnische Methoden

2.2.1.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen

20 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde je 200 ml einer Hauptkultur angeimpft. Nach Inkubation unter Schütteln bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8, wurde das Zellwachstum durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Auch alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation (5000 rpm in Beckman JA-10, 4 °C) geerntet. Dann wurden die Zellpellets mehrmals mit 10 %-iger wässriger Glycerinlösung gewaschen um Ladungsträger zu entfernen. Dabei wurde das Volumen der zum Waschen verwendeten Glycerinlösung in mehreren Schritten von 100 % auf 10 % des Kulturvolumens gesenkt. Zuletzt wurde das Zellpellet in einem Volumen von 0,1 % des Kulturvolumens resuspendiert, die Suspension zu je 40 µl in sterile, eisgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert und sofort bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.2. Transformation durch Elektroporation

Zunächst wurde die zu transformierende Plasmid-DNA mindestens 30 min gegen 10 %ige, wässrige Glycerinlösung dialysiert. Dann wurde ein Aliquot (40 µl) der elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 - 4 µl der Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Am Elektroporationsgerät wurden folgende Einstellungen gewählt: Kapazität = 25 µF; Widerstand = 400 kΩ; Spannung = 2,5 kV. Nach dem Auslösen des Elektropulses wurden die Zellen in der Elektroporationsküvette sofort mit 1 ml, zuvor auf 37 °C temperiertem SOC-Medium versetzt und für 30 – 60 min bei 37 °C geschüttelt. Zuletzt wurde auf Antibiotika-enthaltende LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3. Plasmid-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen für Transformationen, Verdaus mit Restriktionsendonukleasen, der Suche nach rekombinanten Plasmiden oder DNA-Sequenzierungen wurden das *peqGOLD® Plasmid Miniprep Kit I* und das *NucleoBond® Xtra Midi* - Kit verwendet. Die diesen Kits zugrundeliegenden Methoden beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und anschließenden Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silikatmatrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Für die *Miniprep*-Methode wurden eine 6 ml-Übernachtskultur verwendet, für die *Midiprep*-Methode eine 200 ml-Übernachtskultur. Die *Midiprep*-Methode wurde zur Gewinnung größerer Plasmidmengen eingesetzt.

2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine Absorption bei 260 nm von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von ca. 50 µg/ml. Um eine Verunreinigung durch Proteine auszuschließen, wurde auch die Absorption bei 280 nm bestimmt. Für reine doppelsträngige DNA sollte das Absorptionsverhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.2.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde für die Erzeugung des Expressionskonstruktes für die extrazelluläre Domäne des BMPR-II eingesetzt. Bei der Durchführung der PCR wurde die Arbeitsanleitung für die SAWADY® *Pwo*-DNA-Polymerase befolgt.

Für jede PCR-Reaktion wurden zwei Gemische folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Mix 1:

- 1 µl *Template*-DNA (pBS-SK::BMPR-II)
- 0,5 µl (50 pmol) BMPR-II-*forward*-Primer
- 0,5 µl (50 pmol) BMPR-II-*reverse*-Primer
- 23 µl steriles Wasser

Mix 2:

- 5 µl Reaktionpuffer inkomplett für SAWADY®-*Pwo*-DNA-Polymerase
- 2,5 µl (2,5 Units) *Pwo*-DNA-Polymerase
- 2 µl MgSO₄ (Endkonzentration: 1 mM MgSO₄)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 14,5 µl steriles Wasser

Mix 1 wurde 5 min lang bei 95 °C erhitzt, dann wurde Mix 2 zugegeben, kurz gemischt und folgendes PCR-Programm (nach Optimierung) durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	94 °C	20 s
2. Hybridisierung	51 °C	30 s
3. Synthese	72 °C	45 s
4. 9 Wiederholungen von 1.-3.		
5. Denaturierung	94 °C	20 s
6. Hybridisierung	60,5 °C	30 s
7. Synthese	72 °C	45 s
8. 20 Wiederholungen von 5.-7.		

2.2.1.6. Agarosegelelektrophorese von DNA

Agarosegele dienen zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Für die Auftrennung der Produkte von PCR-Reaktionen wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Für die Auftrennung größerer DNA-Fragmente wie z.B. linearisierter Vektoren wurden 0,8 %ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde 1,5 bzw. 0,8 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und in den Gelrahmen gegossen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V für ca. 45 bis 60 min durchgeführt. Die DNA wurde dann ca. 15 min mit einer Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) gefärbt.

2.2.1.7. Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Nachdem DNA-Fragmente im präparativen Gel aufgetrennt worden waren, wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem *NucleoSpin® Extract II* Kit aus dem Gel isoliert. Grundlage dieser Extraktion ist ebenfalls die Adsorption von DNA an Silikate, wie bereits beschrieben.

2.2.1.8. Blunt-End-Klonierung von PCR-Fragmenten

Um *blunt end*-PCR-Produkte direkt in einen Vektor zu integrieren, wurde das *Zero Blunt® PCR Cloning* Kit eingesetzt. Für den Reaktionsansatz wurden 4 µl (23 ng) PCR-Produkt, 1 µl 10 x Ligasepuffer, 1 µl *T4*-Ligase und 1 µl (25 ng) pCR®-*Blunt*-Vektor gemischt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz 30 min gegen 10 % Glycerin dialysiert und zum Schluß in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert.

2.2.1.9. Schnelles Screening nach rekombinanten Plasmiden mittels PCR

Diese Methode wurde verwendet um positive Klone, d.h. Transformanten, die Plasmide mit Insert enthielten, zu identifizieren. Dazu wurde zunächst von den LB-Agar-Platten, auf denen sich Kolonien der zu testenden Transformanten befanden, Koloniematerial abgenommen und in einem PCR-Reaktionsgefäß in 2 µl Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde 2 min bei 95 °C inkubiert. Dann wurde folgender Ansatz hergestellt:

Ansatz für 10 zu testende Klone:

34 µl steriles Wasser

1 µl *forward*-Primer (spezifisch für das zu identifizierende Insert)

1 µl *reverse*-Primer

1 µl dNTP-Mix (10 mM)

5 µl Puffer für *Taq*-DNA-Polymerase

1 µl *Taq*-DNA-Polymerase

Je 4 µl des Ansatzes wurden in die PCR-Reaktionsgefäße mit den Zellsuspensionen gegeben und gemischt. Dann wurde das PCR-Programm durchgeführt, das bereits vorher zur Amplifizierung des jeweiligen Inserts eingesetzt worden war. Nach Ende der Reaktion wurden die Ansätze in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt und positive Klone durch Anwesenheit des spezifischen Amplifikationsproduktes identifiziert.

2.2.1.10. Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden

Durch die PCR-Primer wurden Schnittstellen an den Enden der zu klonierenden Fragmente eingeführt. Diese Schnittstellen sind in den Zielvektoren in der *multiple cloning site* vorhanden. Die Restriktionsansätze (Gesamtvolumen: 200 µl) enthielten 25 bis 35 µl Plasmid-DNA aus Mini-Präparationen, 20 µl 10x Puffer (NEB-Puffer 3 für *XhoI/BamHI* bzw. NEB-Puffer 4 für *XhoI/NdeI*), sowie je 3 µl (60 Units) von beiden Restriktionsenzymen. Es wurde 1 – 2 h bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde der Ansatz mit dem *NucleoSpin® Extract II* Kit aufgereinigt, um die Restriktionsenzyme aus den Ansätzen zu entfernen. Durch Auftrennung der DNA in einem Agarosegel wurde kontrolliert, ob der enzymatische Verdau erfolgreich war. Zuletzt wurde die DNA aus dem Gel extrahiert.

2.2.1.11. Dephosphorylierung geschnittener Vektoren durch *FastAP®*

Durch Behandlung der geschnittenen Vektoren mit Alkalischer Phosphatase werden die 5'-Phosphatgruppen hydrolysiert, dadurch wird eine intramolekulare Ligierung unterdrückt, und die Einführung heterologer DNA-Fragmente erleichtert. Für die Dephosphorylierung wurde die aus dem Gel extrahierte Vektor-DNA mit 1/10 Volumen *FastAP® -Buffer* und 1 µl

FastAP[®] / μ g DNA bei 37 °C 15 min inkubiert. Die Inaktivierung der *FastAP*[®] erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation bei 75°C. Die dephosphorylierte Vektor-DNA konnte anschließend direkt zur Ligation eingesetzt werden.

2.2.1.12. Ligierung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase

Durch die *T4*-Ligase wird die ATP-abhängige Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen und der 5'-Phosphatgruppe eines zweiten DNA-Moleküls katalysiert. Diese Reaktion wurde genutzt um die codierende Sequenz für BMPR-II in den Vektor pET21a einzuführen. Sowohl Vektor- als auch Insert-DNA müssen vorher mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten sein, um definierte, ligierbare 3'- und 5'-Enden zu erzeugen. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes war 25 μ l und enthielt 2,5 μ l 10x Ligasepuffer (mit ATP) und 1,25 μ l *T4*-DNA-Ligase (6,25 Weiss-Units), sowie 40 ng Vektor-DNA. Vektor- und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Ligationsreaktion fand über Nacht bei 15°C statt. Danach wurde die Reaktion durch Inkubation des Ligationsansatzes für 10 min bei 65 °C abgestoppt. Vor der Transformation wurde 1 h gegen 10 % Glycerin dialysiert.

2.2.2. Proteinchemische Methoden

2.2.2.1. Allgemeine proteinchemische Methoden

2.2.2.1.1. Anzucht von *E. coli*-Zellen

Für die rekombinante Proteinproduktion wurden *E. coli*-Zellen (*E. coli*-Stämme: BL21(DE3) pUBS 520 bzw. BL21(DE3)) in 4 x 1,5 l LB-Medium kultiviert. Dazu wurde das Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und im Verhältnis 1:50 bis 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,8 wurde die rekombinante Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. 4 h nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min bei 5000 rpm im Beckman JLA-8.100-Rotor) geerntet und die Zellfeuchtmasse bestimmt.

2.2.2.1.2. Inclusion body (IB)-Präparation (Rudolph et al. 1997)

IB-Aufschlusspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 7,0; 1 mM Na-EDTA
IB-Tritonpuffer	60 mM Na-EDTA; 6 % (v/v) Triton X-100; 1,5 M NaCl
IB-Waschpuffer	100 mM Tris/HCl, pH 7,0; 20 mM Na-EDTA

Die IB-Präparation wurde zur Gewinnung von *Inclusion bodies* von proBMP-2, BMP-2, dem BMP-2-Propeptid und den extrazellulären Domänen von BMPR-IA und BMPR-II eingesetzt.

Die Zellpellets wurden in je 25 ml IB-Aufschlusspuffer je Gramm Zellfeuchtmasse resuspendiert. Dann wurden 1,5 mg Lysozym je Gramm Zellpellet zugegeben, 30 min bei 4°C inkubiert und die Zellen anschließend viermal durch Hochdruckdispersion (Druck: 500 - 900 bar) aufgeschlossen. Danach wurden 3 mM MgCl₂ und 10 µg/ml *Benzonase*[®] zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert um die bakterielle DNA abzubauen. Anschließend wurden 0,5 Volumen IB-Tritonpuffer zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert um Membranbestandteile aufzulösen. Die IBs wurden 10 min bei 20 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Beckman JA-20-Rotor) und dann noch viermal mit je 40 ml IB-Waschpuffer gewaschen.

2.2.2.1.3. IB-Solubilisierung (Rudolph et al. 1997)

IB-Dialysepuffer	6 M GdmCl, pH 4,0; 10 mM Na-EDTA
IB-Solubilisierungspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 6 M GdmCl; 5 mM Na-EDTA; 200 mM DTT
IB-Solubilisierungspuffer für das Propeptid	100 mM Tris/HCl, pH 5,9; 6 M Urea, 100 mM NaCl, 5 mM Na-EDTA, 1 Complete [®] Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche)/50 ml

400 mg feuchtes IB-Pellet wurden in 2 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert und 2 h bei RT inkubiert. Der pH-Wert wurde dann mit Essigsäure auf 3 bis 4 gesenkt, um eine Oxidation der Cysteine zu Disulfidbrücken unter denaturierenden Bedingungen zu unterdrücken. Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend in der Tischzentrifuge 30 min bei 13 000

rpm und 4°C abzentrifugiert. Danach wurde das DTT, das Bestandteil des IB-Solubilisierungspuffers war und noch im IB-Solubilisat enthalten war, durch dreimalige Dialyse gegen je 500 ml IB-Dialysepuffer für 2 h bei RT und anschließend ein drittes Mal bei 7°C über Nacht (ca. 16 h) entfernt. Das IB-Solubilisat wurde entweder sofort für die Renaturierung eingesetzt oder bei -70 °C eingefroren.

2.2.2.1.4. Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden auf zwei verschiedene Arten aufkonzentriert: Renaturierungsansätze wurden nach Abschluss der Renaturierung mit einer *Cross-Flow*-Filtrationsanlage (*Vivaflow 200*) auf ein Volumen von etwa 200 ml aufkonzentriert. Bereits vollständig oder teilweise gereinigte Proteine wurden mit Hilfe von *Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices* (Ausschlussgröße: 10 kD) maximal 5-fach aufkonzentriert.

2.2.2.1.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli wurden die Proteinproben mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert um eine vollständige Denaturierung, Homogenisierung und Reduktion der Proben zu erreichen. Für die Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde SDS-PAGE-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol verwendet, hier erfolgte keine Inkubation bei 95 °C. Die Proben wurden durch Elektrophorese bei 170 V für ca. 1 h in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, dann in Färbelösung für ca. 1h oder über Nacht gefärbt und anschließend entfärbt.

Die „native PAGE“ wurde wie die SDS-PAGE durchgeführt, jedoch wurde bei allen Puffern das SDS sowie das β -Mercaptoethanol weggelassen.

Für die Analyse von großen Proteinkomplexen, wie beispielsweise der nach chemischer Quervernetzung erzeugten Ligand-Rezeptorkomplexe, wurden kommerziell erhältliche Fertiggele (*NuPAGE®* Novex 4 – 12 % Bis-Tris-Gele oder 4 – 12 % Tris-Glycin-Gele) eingesetzt. Für die Bis-Tris-Gele wurde *NuPAGE™*-MOPS-SDS-Laufpuffer und als Probenpuffer der *LDS-Loadingbuffer®* verwendet. Für diese Tris-Glycin-Gele wurden die Standard-SDS-PAGE-Proben- und -Laufpuffer (2.1.12.) eingesetzt.

2.2.2.1.6. Silberfärbung

Entwicklungslösung	0,566 M Na ₂ CO ₃ , 0,6 mM Na ₂ S ₂ O ₃ , 0,027 % Formaldehyd
Färbelösung	11,8 mM AgNO ₃ , 0,027 % Formaldehyd
Vorbereitungslösung	1,2 mM Na ₂ S ₂ O ₃

Im ersten Schritt wurde das Gel 20 min in 20 % Trichloressigsäure fixiert, danach 20 min mit 30 % Ethanol gewaschen und noch einmal 20 min in 2 % Glutaraldehyd fixiert. Nach weiteren zwei Waschschritten für je 10 min wurde das Gel 1 min in der Vorbereitungslösung und nach dreimaligem kurzem Spülen mit Wasser 20 min in der Färbelösung inkubiert. Danach wurde erneut zweimal kurz mit Wasser gespült und in Entwicklungslösung solange inkubiert bis die optimale Bandenintensität erreicht war. Dann wurde die Reaktion mit 10 % Essigsäure abgestoppt und das Gel eingescannt.

2.2.2.1.7. Western Blot

Um Proteine selektiv detektieren zu können wurden nach der SDS-PAGE Western Blots durchgeführt.

Für den Nachweis von Smad- bzw. p38-Varianten wurde ein *Semi-Dry*-Transfer verwendet. Hierfür wurden sechs *Whatman*-Papierblätter und die Nitrocellulose-Transfermembran auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Nach 10-minütiger Inkubation in Western-Transferpuffer wurden Membran und Gel zwischen jeweils drei Papierschichten luftblasenfrei zwischen Anode und Kathode gelegt. Der Transfer erfolgte bei RT für 1,5 h bei 1 mA/cm².

Für den Transfer von Proteinen aus Fertiggelen wurde ein Tank-Transfer-System eingesetzt. Dazu wurde das *Xcell*[®] *Blot Module* entsprechend der Anweisungen des Herstellers verwendet. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4 °C und 15 V.

Nach dem Transfer erfolgte die Absättigung der Membran mit TBST mit 5 % Milchpulver oder 5 % BSA bei 4 °C über Nacht. Dann folgte die Inkubation der Membran mit den spezifischen, primären Antikörper in den unter 2.1.5. angegebenen Konzentrationen in 2,5 % Milchpulver oder BSA in TBST. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur (anti-BMP-2-Antikörper) oder 16 h bei 4 °C (alle anderen Antikörper). Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 5 min wurde die Membran mit dem jeweiligen Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in 2,5 % Milchpulver oder BSA in TBST für 1 h bei RT

inkubiert. Danach folgten erneut drei Waschschriffe. Zur Detektion wurden die Western-Blot-Detektionslösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt (je 1 ml für ein 48 cm² – Gel) und eine Minute lang auf der Membran belassen. Danach wurde ein Film aufgelegt und nach 5 bis 30 min mit den Entwicklungreagenzien entwickelt.

2.2.2.1.8. Biotinylierung von Proteinen

Zur Biotinylierung für die BIACORE-Bindungsstudien wurde das *Biotin Protein Labeling*-Kit verwendet. Es wurden die Anweisungen des Herstellers eingehalten. Für 1 mg Protein (BMPR-IA-ECD) wurden 6 µl einer Biotin-7-NHS Lösung (20 mg/ml in DMSO) eingesetzt. Überschüssiges freies Biotin-7-NHS wurde nach der Reaktion durch Dialyse für 16 h bei 4 °C gegen HBS-EP-Puffer (2.1.12.) entfernt.

2.2.2.2. Renaturierung und Reinigung von BMP-2, proBMP-2 und dem BMP-2-Propeptid (Hillger et al. 2005)

2.2.2.2.1. Renaturierung von BMP-2 und proBMP-2

Renaturierungspuffer	1 M L-Arginin; 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA;
BMP-2/proBMP-2	1 mM GSSG; 5 mM GSH

Nach der IB-Solubilisierung (2.2.2.1.3.) wurde das Solubilisat zum Entfernen des DTT dialysiert. Dann wurde die Proteinkonzentration im IB-Solubilisat bestimmt. Das IB-Solubilisat wurde unter starkem Rühren bis zu einer Endkonzentration von 3,5 µM Protein in den Renaturierungspuffer gegeben. Nach Durchmischen wurde der Rührer ausgeschaltet und zehn Tage inkubiert. Die Rückfaltung wurde in 1 l BMP-2-Renaturierungspuffer bei 4 °C durchgeführt.

2.2.2.2.2. Reinigung von BMP-2 und proBMP-2 mittels Heparin-Affinitätschromatographie

Heparin-Puffer A	100 mM Tris, 200 mM KH ₂ PO ₄ , 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff, pH 6,1 mit Essigsäure
Heparin-Puffer B	100 mM Tris, 200 mM KH ₂ PO ₄ , 5 mM EDTA, 6 M Harnstoff, 1 M NaCl, pH 6,1 mit Essigsäure

Der Renaturierungsansatz (2.2.2.2.1.) wurde von 1 l auf etwa 200 ml aufkonzentriert (2.2.2.1.4.) und anschließend gegen Heparin-Puffer A dialysiert. Nach der Dialyse erfolgte die Auftragung auf eine 5-ml *HiTrap*[®]-Heparin-Sepharose-Säule mit einer P1-Pumpe. Die Säule war vorher mit 30 % Heparin-Puffer B äquilibriert worden. Danach wurde mit 20 CV 58 % Heparin-Puffer B bei einem Fluss von 4 ml/min gewaschen und in einem Gradienten auf 78 % Heparin-Puffer B über 5 CV eluiert. Nach der Elution wurden die Fraktionen, die BMP-2- bzw. proBMP-2-Dimer enthielten, vereinigt und gegen 10 mM Ammoniumacetat, pH 4,8 dialysiert. BMP-2 wurde danach lyophilisiert. ProBMP-2 wurde gegen 100 mM HEPES/KOH, pH 7,0 dialysiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2.3. Renaturierung und Reinigung des BMP-2-Propeptids

Hydroxyapatit-Puffer A	100 mM HEPES/KOH, pH 7
Hydroxyapatit-Puffer B	100 mM HEPES/KOH, pH 7, 1 M Kaliumphosphat

IBs des BMP-2-Propeptids wurden in IB-Solubilisierungspuffer für das Propeptid (2.2.2.1.3.) 4 h bei RT solubilisiert (3,5 g in 50 ml Solubilisierungspuffer). Danach wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (13 000 rpm, 30 min) und der Überstand auf eine 5-ml *HiTrap*[®]-Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Es wurde mit 30 CV 20 % Heparin-Puffer-B gewaschen und in einem Gradienten auf 70 % Puffer B über 20 CV eluiert.

Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit einer Stammlösung von 2 M L-Arginin, 2 M Tris/HCl, pH 8,0 1:1 verdünnt. anschließend wurde dann mittels Dialyse gegen 1 M Tris/HCl pH 8,0 das Arginin langsam wieder entfernt, wodurch die Rückfaltung des Propeptids möglich war. Nach einer weiteren Dialyse gegen 25 mM HEPES/KOH, pH 7,

1 mM CaCl₂ konnte das renaturierte Propeptid zur weiteren Reinigung auf eine Hydroxyapatit-Säule aufgetragen werden. Nach Waschen mit 2 CV Hydroxyapatit-Puffer A und 3 CV 7 % Hydroxyapatit-Puffer B wurde in einem Gradienten über 4 CV auf 25 % Puffer B eluiert.

2.2.2.3. Renaturierung und Reinigung der BMPR-IA-ECD (Sachse et al. 2005)

2.2.2.3.1. Renaturierung und Reinigung von His-BMPR-IA-ECD

BMPR-IA-Solubilisierungspuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris/HCl, pH 8,5; 6 M Harnstoff
Renaturierungspuffer BMPR-IA-ECD	20 mM Tris/HCl, pH 8,5; 250 mM NaCl, 2 mM GSH, 1 mM GSSG
MBP-Aufschlusspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 1 mM PMSF
Ni-NTA-Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Ni-NTA-Waschpuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl
SOURCE15Q-Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
SOURCE15Q-Puffer B	20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl

5 g IBs von His-BMPR-IA-ECD wurden in 25 ml BMPR-IA-Solubilisierungspuffer solubilisiert (2.2.2.1.3.). Das IB-Solubilisat wurde nach dem Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile zunächst über eine Metallchelate-Chromatographie vorgereinigt. 20 ml Ni-NTA-Agarose wurde dazu mit BMPR-IA-Solubilisierungspuffer äquilibriert, danach wurde das Solubilisat aufgetragen. Nach dem Waschen über 6 CV bei einem Fluss von 2 ml/min mit 30 mM Imidazol in Solubilisierungspuffer wurde mit 250 mM Imidazol in Solubilisierungspuffer über 4 CV eluiert. Elutionsfraktionen, die die BMPR-IA-ECD enthielten, wurden vereinigt und mit 100 mM DTT und 1 mM Na-EDTA für 2 h bei RT inkubiert. Nach Absenken des pH auf 4 mit HCl wurde DTT durch dreimalige Dialyse gegen 6 M Harnstoff, 2 mM Na-EDTA, pH 4 entfernt. Das so vorgereinigte IB-Solubilisat wurde in Renaturierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5; 2 mM GSH, 1 mM GSSG, 1 M L-Arginin) zu einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml verdünnt und ca. 72 h bei RT inkubiert. Dann wurde der Ansatz gegen 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 dialysiert und mit 1 ml/min auf eine SOURCE15Q-Säule mit einem Säulenvolumen von 20 ml aufgetragen. Die Elution erfolgte nach dem Waschen der Säule mit

20 mM Tris/HCl, pH 7,5 über 5 CV in einem linearen Gradienten auf 500 mM NaCl in 10 CV. Fraktionen, die BMPR-IA enthielten, wurden vereinigt.

Um nicht korrekt gefaltete Spezies abzutrennen, wurde anschließend eine RP-HPLC durchgeführt. Dazu wurde Acetonitril zu einer Konzentration von 25 % und TFA zu einer Konzentration von 0,1 % zugegeben und die Lösung auf eine C4-Säule (Vydac 214TP54) aufgetragen. Eluiert wurde durch einen Gradienten von 25 auf 45 % Acetonitril, 0,1 % TFA innerhalb von 45 min bei einem Fluss von 1 ml/min.

2.2.2.3.2. Reinigung und Renaturierung des BMPR-IA-ECD-MBP-Fusionsproteins (Sachse et al. 2005)

Renaturierungspuffer BMPR-IA-ECD	20 mM Tris/HCl, pH 8,5; 250 mM NaCl, 2 mM GSH, 1 mM GSSG
MBP-Aufschlusspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 1 mM PMSF
Ni-NTA-Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Ni-NTA-Waschpuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl
SOURCE15Q-Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
SOURCE15Q-Puffer B	20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl

20 g Feuchtzellmasse wurden in 200 ml kaltem MBP-Aufschlusspuffer resuspendiert und in vier Durchgängen durch Hochdruckdispersion (Druck: 500 - 900 bar) aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation für 20 min bei 20 000 rpm und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde dann durch eine 1,2 µm-Membran filtriert und mit 300 ml kaltem MBP-Aufschlusspuffer verdünnt. Das so gewonnene Lysat wurde auf eine mit 50 ml Ni-NTA gepackte Säule bei einem Fluss von 3 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde danach mit 5 CV Ni-NTA-Waschpuffer gewaschen und das Fusionsprotein mit einem Gradienten über 3 CV auf 100 % Ni-NTA-Elutionspuffer eluiert. Nach Kontrolle der Fraktionen durch SDS-PAGE wurden Fusionsprotein-enthaltende Fraktionen vereinigt und mit festem Harnstoff auf eine Konzentration von 6 M eingestellt. Danach wurde diese Lösung 1:6 in frisch hergestellten Renaturierungspuffer verdünnt. Der Renaturierungsansatz wurde ca. 72 h bei 25 °C inkubiert.

2.2.2.3.3. Proteolytische Spaltung des BMPR-IA-ECD-MBP-Fusionsproteins mit Thrombin und weitere Reinigung (Sachse et al. 2005)

Ni-NTA-Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Ni-NTA-Waschpuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl
SOURCE15Q-Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
SOURCE15Q-Puffer B	20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl

Nach der Renaturierung wurde der Ansatz von 2,5- bis 4-fach auf ca. 200 ml aufkonzentriert und durch Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,5 umgepuffert. Dann wurde 1 U Thrombin pro mg Protein zugegeben und 2 h bei 25 °C inkubiert. Danach wurde die Spaltung mit 1 mM Benzamidin gestoppt, und der Spaltansatz zur Abtrennung des MBP auf eine 50-ml-Ni-NTA-Chromatographiesäule aufgetragen. Der Durchlauf dieser Säule enthielt die BMPR-IA-ECD, während MBP aufgrund des *His-Tags* auf der Säule verblieb. Um restliche Verunreinigungen an MBP zu entfernen, wurde die ECD anschließend mit dem zehnfachen Volumen 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 verdünnt und über eine *SOURCE15Q*-Säule gereinigt (siehe 2.2.2.3.1.). Zur weiteren Reinigung wurde eine präparative RP-HPLC durchgeführt. Dazu wurden die Elutionsfraktionen der *SOURCE15Q*-Säule, die die ECD enthielten, vereinigt und gegen 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 dialysiert. Danach wurde Acetonitril zu einer Konzentration von 25 % und TFA zu einer Konzentration von 0,1 % zugegeben, und die Lösung auf eine Vydac C4-Säule (214TP510, 10 x 25 mm) aufgetragen. Eluiert wurde in einem Gradienten auf 45 % Acetonitril, 0,1 % TFA innerhalb von 10 CV bei 1 ml/min. Das im Hauptpeak bei 33 % Acetonitril eluierende Protein wurde in Fraktionen gesammelt.

2.2.2.4. Renaturierung und Reinigung der BMPR-II-ECD (Mace et al. 2007)

2.2.2.4.1. Renaturierung der BMPR-II-ECD

Renaturierungspuffer BMPR-II-ECD	50 mM Tris/HCl, pH 8,3; 0,9 M Arginin-HCl, 0,1 M L-Arginin, 5 mM Cysteamin, 0,5 mM Cystamin, 2 mM Na-EDTA
-------------------------------------	--

Die Renaturierung der BMPR-II-ECD wurde als Pulsrenaturierung in 500 ml BMPR-II-

Renaturierungspuffer bei 4 °C durchgeführt. Es erfolgten fünf Pulse von jeweils 20 mg Protein im Abstand von 10 h (Proteinendkonzentration nach dem letzten Puls: 100 mg/L). Nach dem letzten Puls wurde der Ansatz noch 48 h bei 4 °C weiterinkubiert und danach dreimal gegen je 20 L 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 dialysiert. Anschließend wurde präzipitiertes Material durch Zentrifugation für 60 min bei 12 000 rpm und 4 °C entfernt.

2.2.2.4.2. Reinigung der BMPR-II-ECD nach der Renaturierung

Q-Sepharose-Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 8,0
Q-Sepharose-Puffer B	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 M NaCl
MonoP-Puffer A	50 mM HEPES, pH 7,0
MonoP-Puffer B	50 mM HEPES, pH 7,0; 500 mM NaCl
S75-Laufpuffer	20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl

Die BMPR-II-ECD wurde nach dem Entfernen von während der Dialyse ausgefallenem Protein in einem „batch“-Ansatz an die Q-Sepharosematrix gebunden. Dazu wurde das voräquilibrierte Säulenmaterial zu der Proteinlösung gegeben und 1 h lang bei 4 °C auf einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde die beladene Matrix in eine Säule überführt. Nach Waschen mit 1 CV Puffer A wurde BMPR-II-ECD in einem Gradienten auf 100 % Puffer B innerhalb von 3 CV eluiert. Die Flußgeschwindigkeit betrug 3 ml/min.

Die Fraktionen des ersten Peaks, der von der Q-Sepharose eluierte, wurden vereinigt und auf eine mit S75-Laufpuffer äquilibrierte S75-Gelfiltrationssäule (CV: 100 ml) aufgetragen. BMPR-II-ECD-Protein eluierte bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min nach 81 min, wurde gesammelt und gegen MonoP-Puffer A dialysiert.

Nach dem Auftrag der dialysierten Proteinlösung auf die MonoP-Säule (MonoP 5/50 GL, CV: 1 ml) wurden die verschiedenen Proteinspezies, die durch Q-Sepharose oder Gelfiltration nicht separiert werden konnten, in einem Gradienten auf 100 % MonoP-Puffer B bei einem Fluß von 1 ml/min über 30 min aufgetrennt. Dabei wurden Fraktionen von nur 300 µl jeweils gesammelt, um eine optimale Trennung und Reinheit zu gewährleisten. Die Qualität der Trennung wurde anschließend durch native PAGE überprüft (siehe 2.2.2.1.5.).

2.2.3. Spektroskopische Methoden

2.2.3.1. Circular dichroismus

Mit dem CD-Spektropolarimeter Modell JASCO J-810 wurden Fern-UV-CD-Spektren im Bereich 195 bis 260 nm aufgenommen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 20 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 1 s. Als Puffer wurde 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 verwendet. Die Spektren wurden mindestens siebenmal akkumuliert und gegen den jeweiligen Puffer korrigiert. Die Elliptizitäten, bezogen auf die mittlere molekulare Masse der Aminosäuren im jeweiligen Protein wurden folgendermaßen berechnet:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A}$$

Θ = gemessene Elliptizität in Grad

c = Proteinkonzentration in mg/ml

d = Schichtdicke der Küvette in cm

M_r = Molekulargewicht des Proteins in g/mol

N_A = Anzahl der Aminosäuren im Protein

MRW = durchschnittliches Molekulargewicht einer Aminosäure (*mean residue weight*)

2.2.3.2. UV-Spektroskopie

UV-Spektroskopie wurde eingesetzt um die Proteinkonzentration zu bestimmen. Dazu wurden Absorptionsspektren zwischen 240 und 340 nm gemessen, und die Absorption bei 280 nm untersucht. Mit dem molaren Absorptionskoeffizienten lässt sich dann nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Proteinkonzentration bestimmen:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A = Absorption bei 280 nm

ε = molarer Absorptionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

c = Konzentration [M]

d = Schichtdicke [cm]

Protein	Molekulargewicht (Dalton)	Molarer Absorptionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	
		reduziert	nicht-reduziert
BMP-2	13036	17780	18200
proBMP-2	44902	38690	39110
BMP-2-Propeptid	32015	20910	20910
BMPR-IA-ECD	14186	4470	5095
His-BMPR-IA-ECD	16624	3840	4440
BMPR-II-ECD	11221	16960	17585

Tabelle 2.1: Molekulargewichte und molare Absorptionskoeffizienten der in der Arbeit verwendeten Proteine.

Die Molekulargewichte und molaren Absorptionskoeffizienten wurden mit dem Programm *Protparam* (<http://expasy.ch/tools/protparam.html>) bestimmt.

2.2.4. Methoden zur Untersuchung von Proteininteraktionen

2.2.4.1. Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore)

Proteinwechselwirkungen wurden mit dem BIA2000-System bestimmt. Dazu wurde die biotinylierte BMPR-IA-ECD (Biotinylierung siehe 2.2.2.1.8.) an einen Streptavidin-beschichteten Sensorchip (SA) gebunden (ca. 300 RU). Die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ist so affin und besitzt eine so niedrige Dissoziationsrate, dass sie unter der Detektionsgrenze des Gerätes liegt und für die Messung vernachlässigt werden kann.

Die BMPR-II-ECD wurde mittels Aminkopplung auf einem CM-5TM-Chip immobilisiert. Dazu wurde ein Na-Maleat-Puffer (5 mM) mit pH 4,8 als Laufpuffer verwendet, da die BMPR-II-ECD einen pI von 5,9 hat. Bei einem pH unter dem pI des Proteins kann die elektrostatische Anziehung zwischen der dann negativ geladenen Chipoberfläche und dem positiv geladenen Protein für die Kopplung ausgenutzt werden. Um die Oberfläche des Chips zu aktivieren, wurden zunächst 100 mM NHS und 400 mM EDC in Wasser zu gleichen Teilen gemischt und 35 μl der Mischung bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Danach wurde die BMPR-II-ECD injiziert und anschließend die Chipoberfläche mit 35 μl 1 M Ethanolamin-Hydrochlorid (pH 8,5) deaktiviert. Es konnten 1000 RU BMPR-II-ECD gekoppelt werden.

Die Immobilisierung des BMP-Propeptids erfolgte wie die der BMPR-II-ECD, allerdings

wurde anstelle des Maleatpuffers HBS-EP als Laufpuffer für die Kopplung verwendet.

Als Laufpuffer für die Messungen wurde HBS-EP mit einer Flußrate von 20 µl/min bei 20 °C eingesetzt. Der hohe Salzanteil in HBS-EP verhindert eine unspezifische, elektrostatische Wechselwirkung der Proteine mit Oberflächen im Gerät, die zu einer Veränderung der wirksamen Konzentration führen würde.

Die Analyte (BMP-2, proBMP-2 und BMP-2-Propeptid) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen für jeweils eine Minute injiziert, danach folgte eine zweiminütige Dissoziationsphase. Die Sensorgramme wurden durch Subtraktion der Hintergrundsignale einer Kontroll-Flußzelle ohne den jeweiligen Rezeptor korrigiert. Nach jeder Analytinjektion erfolgte ein Regenerationsschritt durch Injektion von 10 mM Glycin, pH 2 für eine Minute um noch gebundenen Analyt vom Rezeptor zu entfernen.

Die Auswertung der Sensorgramme erfolgte mit Hilfe der BIAevaluation™ Software Version 2.0. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_a) und die Dissoziation (k_d) wurden mit Hilfe eines Fits nach einem Langmuir-Modell für eine 1:1-Interaktion aus sieben Analytkonzentrationen bestimmt. Ein solches Modell wurde bereits früher für die Berechnung relativer Bindungsaffinitäten mit BMP-2 herangezogen (Kirsch *et al.*, 2000). Die apparenten Dissoziationskonstanten K_D wurden aus $K_D = k_d / k_a$ berechnet.

Als weitere, unabhängige Methode zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten wurden Sättigungsmessungen durchgeführt. Dafür wurden die Analyten in verschiedenen Konzentrationen so lange injiziert bis ein Gleichgewicht erreicht war und keine weitere Signaländerung mehr auftrat. Die Gleichgewichtswerte wurden gegen die Analytkonzentration aufgetragen und die Dissoziationskonstante nach der Gleichung für die Langmuir-Bindungsisotherme

$$R = \frac{R_{max} \cdot K_A \cdot A}{1 + K_A \cdot A} \quad \text{und} \quad K_D = \frac{1}{K_A} \quad \text{berechnet.}$$

R_{max} = maximales Signal

A = Analytkonzentration (BMP-2 oder proBMP-2)

R = Signal bei einer bestimmten Analytkonzentration

2.2.4.2. ELISA

ELISA-Tests wurden in 96-well-Platten (*Nunc Maxisorp*[®]) bei RT durchgeführt. Zunächst wurden BMP-2, proBMP-2 oder BMP-2-Propeptid in einer Konzentration von 200 nM in 50 mM Natriumcarbonatpuffer, pH 8 in 100 µl pro well über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Freie Bindungsstellen auf der Oberfläche wurden mit 200 µl Blockierungspuffer pro well für 1 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die ECD des jeweiligen Rezeptors in unterschiedlichen Konzentrationen in 100 µl Blockierungspuffer pro well für 1 h bei RT inkubiert. Negativkontrollen enthielten keine ECD. Nach weiteren drei Waschschrritten wurde der erste Antikörper (spezifisch gegen BMPR-IA, E-16, Santa Cruz bzw. gegen BMPR-II, monoklonaler Antikörper 811, R&D Systems) in einer 1:1000-Verdünnung in Blockierungspuffer zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurde der sekundäre Antikörper (anti-Ziege bzw. anti-Maus, POD-kojugiert, beide von Thermo) in einer 1:2000-Verdünnung in 100 µl Blockierungspuffer zugegeben und 1h bei RT inkubiert. Gebundene Peroxidase wurde dann mit Hilfe von ABTS (Roche) oder TMB (Sigma) nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Gemessen wurden die Signalanstiege bei 405 nm (ABTS) oder 650 nm (TMB) pro Stunde.

2.2.4.3. Gelfiltration

Für die analytische Gelfiltration wurde eine Superdex 200 10/300-Säule mit einem Säulenvolumen von 24 ml verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit Ribonuclease A (13,7 kDa), Albumin (67 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa) und Ovalbumin (43 kDa). Als Laufpuffer wurde 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 700 mM NaCl eingesetzt. Die hohe Salzkonzentration sollte unspezifische Wechselwirkungen der Proteine mit dem Säulenmaterial verhindern und wurde bereits bei Kirsch *et al.*, 2000 erfolgreich eingesetzt. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min.

2.2.4.4. Co-Elution von Ni-NTA-Agarose bzw. Heparin-Sepharose

Da proBMP-2 einen *His-Tag* besitzt, wurde eine Co-Elution von Proteinen, die mit proBMP-2 interagieren, durch IMAC getestet. Wegen der schlechten Löslichkeit des proBMP-2-BMPR-IA-Komplexes wurde zunächst proBMP-2 an das Säulenmaterial gebunden, dann erst wurde BMPR-IA-ECD zugegeben um eine Präzipitation zu vermeiden. Als Laufpuffer wurde 100

mM HEPES/KOH, pH 7 verwendet, der zum Waschen mit 20 mM Imidazol und für die Elution mit 250 mM Imidazol supplementiert war. Es wurden 200 µl Ni-NTA-Agarose in Schwerkraftsäulen mit einem Fassungsvermögen von 2 ml verwendet. Nach der Zugabe von BMPR-IA-ECD wurden fünf Waschfraktionen von 200 µl und vier Elutionsfraktionen von 200 µl gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Vorgehensweise bei der Heparin-Speharose war analog, jedoch erfolgte die Elution mit 1 M NaCl in 100 mM HEPES/KOH, pH 7.

2.2.4.5. Native Gelelektrophorese zum Nachweis von Komplexen

Für die native Gelelektrophorese zum Nachweis von Proteinkomplexen wurde ein fertiges Tris-Glycin-Gel (10 – 20 % von Invitrogen) verwendet. Als Ladepuffer wurde 100 mM Tris/HCl, pH 8,6, 10 % Glycerol, 0,1 % Bromphenolblau eingesetzt. Der Laufpuffer setzte sich aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3 zusammen.

2.2.4.6. Far Western Blot

Um die Bindung von BMP-2, dem BMP-2-Propeptid bzw. proBMP-2 an die BMPR-IA-ECD nachzuweisen, wurden die drei Proteine zunächst in reduziertem oder nicht-reduziertem Zustand durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach der Absättigung, wie unter 2.2.2.1.7. beschrieben, wurde die Membran in TBST, 2,5 % Milchpulver mit BMPR-IA-ECD (240 nM) inkubiert. Nach dem Waschen wurde gebundene BMPR-IA-ECD mit anti-BMPR-IA-Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Detektion erfolgte wie unter 2.2.2.1.7. beschrieben.

2.2.4.7. In vitro-Crosslinking

Um den proBMP-2-BMPR-IA-Komplex *in vitro* nachzuweisen, sollten Ligand und Rezeptor chemisch quervernetzt werden um den Komplex nach SDS-PAGE detektieren zu können. Um die Löslichkeit des proBMP-2-BMPR-IA-Komplexes zu erhöhen und eine Präzipitation zu vermeiden wurden verschiedene Zusätze eingesetzt: Trehalose, Glycerol, Glucose und Sucrose. Die beiden Bindungspartner wurden zunächst zusammen in HEPES-Puffer (100 mM HEPES/KOH, pH 7,0) mit den entsprechenden Zusätzen 30 min bei Raumtemperatur zusammen inkubiert. Um Präzipitation zu minimieren, wurden die Proteine in einer

Konzentration von 1 μM eingesetzt. Das Gesamtreaktionsvolumen war 30 μl . Nach 30 min wurde der *Crosslinker* BS³ zu einer Konzentration von 100 μM zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Die Quervernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 μl 1 M Tris/HCl, pH 8,0 beendet. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch *Western Blot* mit BMP-2-Antikörper auf Komplexe untersucht.

2.2.5. Zellkultur und *in vivo*-Bindungsassays

2.2.5.1. Kultivierung von Säugerzellen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Medium	Besondere Anmerkungen
C2C12	Maus-Myoblasten-Vorläuferzellen	DSMZ	DMEM <i>high glucose</i> mit Glutamat, 10 % FBS, 1% P/S	Splitten nach ca. 3 Tagen bei maximal 80 % Konfluenz
b/c3t3	Embryonale Maus-Fibroblasten	ATCC	DMEM <i>high glucose</i> mit Glutamat und Pyruvat, 10 % FBS, 1% P/S	Splitten bei 80 - 100 % Konfluenz
COS-7	Fibroblasten aus der Niere der Grünen Meerkatze	AG Bransch, Biozentrum Halle	DMEM <i>high glucose</i> mit Glutamat und Pyruvat, 10 % FBS, 1% P/S	Splitten bei 80 - 100 % Konfluenz

Tabelle 2.2: Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zelllinien.

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. In regelmässigen Abständen und insbesondere nach dem Auftauen einer neuen Kryokultur wurde mit Hilfe des *PCR-Mycoplasma Test Kits* ein PCR-Test auf Mycoplasmen durchgeführt um Kontaminationen auszuschließen.

2.2.5.1.1. Passagierung von adhärenenten Zellen

Da das Wachstum adhärenenten Zellen abhängig von der Zelldichte ist und die Proliferation bei zu hoher Dichte aus Nährstoffmangel und wegen toxischen Stoffwechselprodukten eingestellt wird, müssen adhärenente Zellen zur Vermehrung in regelmäßigen Abständen passagiert werden. Bei C2C12-Zellen kommt noch hinzu, dass bei höherer Zelldichte die

Differenzierung beginnt. Daher mussten diese Zellen bereits bei einer Konfluenz von maximal 80 % passagiert werden.

Um die Zellen von der Oberfläche abzulösen wurde die Methode der Trypsinisierung eingesetzt. Dazu wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und eine sterile Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben (1,4 ml pro 20 cm² – Zellkulturflasche). Nach Inkubation bei 37 °C bis zum vollständigen Abrunden, aber noch vor dem Ablösen der Zellen (ca. 2 – 5 min) wurde die Trypsin/EDTA-Lösung abgesaugt und die Kulturflasche auf eine Oberfläche geklopft um das Ablösen mechanisch zu unterstützen. Dann wurden 5 ml frisches Medium zugegeben und die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde dann mit Vollmedium in ein frisches Zellkulturgefäß überführt.

2.2.5.1.2. Anlegen und Auftauen von Kryokulturen

Zum längeren Lagern von Säugerzellen wurden Kryokulturen angelegt. Zellen einer ca. 80 % konfluenten Kultur wurden wie in 2.2.5.1.1. beschrieben, trypsinisiert und in mit 10 % DMSO supplementiertem Vollmedium (s. Tabelle 2.2.) resuspendiert. Danach wurde in Kryoröhrchen zu je 1 ml aliquotiert, und die Röhrchen in einem Abkühlcontainer mit Isopropanol bei -80 °C über Nacht eingefroren. Der Abkühlcontainer stellt die optimale Abkühlrate von 1 °C/min sicher. Nach der Abkühlphase wurden die Kryokonserven sofort in den Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt und dort gelagert.

Zum Wiederauftauen wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen und zunächst die Schraubkappe um eine Vierteldrehung gelockert um eventuellen Überdruck durch in das Röhrchen eingedrungenen Stickstoff abzulassen. Dann wurde das Röhrchen im 37°C-Wasserbad aufgetaut. Der Inhalt wurde anschließend unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen mit vorgelegtem und vorgewärmtem Medium überführt (C2C12- und b/c3t3-Zellen). Bei COS-7-Zellen wurde der Inhalt des Röhrchens zunächst langsam und tropfenweise in 6 ml vorgelegtes Medium in einem Zentrifugenröhrchen verdünnt. Nach Abzentrifugieren bei 500 rpm für 2 min wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen um das Einfriermedium mit dem zytotoxischen DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden nach dem Auftauen über Nacht kultiviert, am nächsten Morgen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.5.2. Transfektion von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden in 6-well-Platten bei einer Konfluenz von ca. 90 % transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit *Roti[®]-fect*-Transfektionsreagenz. Es wurden 2 µg DNA pro *well* eingesetzt. DNA und Transfektionsreagenz wurden zunächst separat in je 100 µl serumfreiem Medium ohne Antibiotika verdünnt und anschließend gemischt. Dann wurde die Mischung 30 min bei RT inkubiert um die Bildung der DNA-Lipidkomplexe zu ermöglichen. Die Zellen wurden dann mit dem DNA-Lipidkomplex in Antibiotika-freiem Medium über Nacht inkubiert. Am nächsten Tage erfolgte ein Medienwechsel. Die Expression wurde 48 h nach der Transfektion mit Hilfe eines *Western Blots* überprüft.

Die Transfektionseffizienz wurde durch Transfektion eines β-gal-Plasmids (pCMV *Sport β-gal*) ermittelt. 48 h nach Transfektion wurden transfizierte Zellen mit Hilfe der X-gal-Färbung nachgewiesen, und die Transfektionseffizienz durch Auszählen bestimmt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach mit 2 ml 1 %iger Glutaraldehydlösung in PBS/*well* für 15 min und anschließend mit 4 % Formaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Die Formaldehydlösung wurde entfernt, und die Zellen danach dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml X-gal-Lösung zugegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die blau-gefärbten (transformierten) Zellen ausgezählt und aus dem Verhältnis zu den farblosen (nicht-transformierten) Zellen wurde die Transformationseffizienz bestimmt.

2.2.5.3. Crosslinking von BMP-2 bzw. proBMP-2 mit Rezeptoren auf der Oberfläche von transfizierten COS-7-Zellen

Die transfizierten COS-7-Zellen wurden zweimal mit eiskaltem KRH-Puffer mit 2 mg/ml BSA gewaschen, dann wurden 20 nM BMP-2 bzw. proBMP-2 in KRH-Puffer zugegeben und bei 4 °C 4 h lang inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen erneut fünfmal mit kaltem KRH-Puffer gewaschen um ungebundenes Protein zu entfernen. Nach dem Waschen wurden 2 ml KRH-Puffer/*well* auf den Zellen belassen. Die chemische Quervernetzung erfolgte dann durch Zugabe von 10 µl einer 27 mM-Stammlösung von DSS in DMSO je *well*. Nach 15 min Inkubation bei 4 °C wurde der DSS-enthaltende Puffer abgesaugt und die *Crosslinking*-Reaktion durch Zugabe von 1 ml Puffer D je *well* gestoppt. Dann wurden die Zellen in Puffer D abgeschabt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm wurden die Zellpellets in COS-7-Lysispuffer resuspendiert und zur Lyse für 40 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert.

Danach wurde unlösliches Zellmaterial durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm entfernt, die Proteinkomplexe im Überstand durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch *Western Blot* analysiert.

2.2.5.4. Immunpräzipitation

Um die Proteinkomplexe, die durch chemische Quervernetzung an COS-7- Zellen erhalten wurden, aufzukonzentrieren, zu reinigen und besser nachweisen zu können, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurde das Zelllysat nach der Zentrifugation mit dem jeweiligen Antikörper (0,5 µg/100 µl Lysat) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine, zuvor in COS-7-Lysispuffer äquilibrierte, Protein-A-Sepharose (ca. 25 µl/200 µl Zelllysat) zugegeben und weitere 3 – 4 h bei 4 °C inkubiert um die Bindung der Immunkomplexe zu ermöglichen. Die Protein-A-Sepharose wurde nach der Bindung der Immunkomplexe dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Dazu wurde die Matrix in PBS resuspendiert und anschließend nach 20 s Zentrifugation bei 12 000 rpm der Puffer im Überstand wieder abgenommen. Nach dem Entfernen des Waschpuffers im letzten Waschschrift wurden 20 – 30 µl SDS-Probenpuffer zugegeben und 3 min bei 95 °C inkubiert, um die Immunkomplexe von der Protein-A-Sepharose zu eluieren. Nach Zentrifugation bei 12 000 rpm für 20 sek zum Entfernen der Matrix wurde der Überstand durch SDS-PAGE aufgetrennt.

2.2.5.5. Test auf Phosphorylierung von p38 und Smad1/5/8 in C2C12- und b/c3t3-Zellen

C2C12- oder b/c3t3-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70 % einem Mediumwechsel unterzogen, wobei das Serum auf 1 % reduziert wurde. Nach 16 h wurden 200 nM BMP-2 bzw. proBMP-2 zugegeben. Danach wurden die Zellen, wie üblich, weiter inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten (zwischen 10 und 240 min) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 µl SDS-PAGE-Probenpuffer/*well* abgeschabt und sofort auf Eis gestellt. Zur Zerkleinerung der DNA durch Scheren und zur Reduktion der Probenviskosität wurden die Proben 15 sec lang Ultraschall ausgesetzt und anschließend 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand nach SDS-PAGE und *Western Blot* mit den entsprechenden Antikörpern auf phosphorylierte Signalproteine untersucht.

2.2.5.6. Migrationstest

Bereits früher wurde beobachtet, dass BMP-2 die Migration von Zellen stimuliert (Sotobori et al. 2006; Gamell et al. 2008). Eine einfache Methode, Zellmigration *in vitro* zu untersuchen ist der *scratch assay*. Für diesen Test wurden b/c3t3-Zellen in 6-well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Daraufhin wurde die Zellschicht mit einer 200 µl-Pipettenspitze in drei parallelen „Kratzwunden“ zerstört. Nach dem Waschen mit PBS, um abgelöste Zellen zu entfernen, wurden die Zellen mit Medium unterschiedlicher Konzentrationen an BMP-2 bzw. proBMP-2 24 h weiterkultiviert. Eine Markierung auf dem Boden der 6-well-Platte wurde als Referenzpunkt genutzt um immer denselben Ausschnitt rund um die „Wunde“ nach unterschiedlichen Zeiten unter fünffacher Vergrößerung zu fotografieren. Zellfreie Areale wurden mit Hilfe des Programms *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>, Java 1.5.0_06) vermessen.

2.2.6. Untersuchungen zur Struktur des BMP-2-Propeptids

2.2.6.1. Limitierte Proteolyse

Für die limitierte Proteolyse wurden Reaktionen mit einem Volumen von 50 µl angesetzt. Die Proteinkonzentration (proBMP-2 oder das BMP-2-Propeptid) war 11 µM in 100 mM K-HEPES, pH 7,0 mit 10 mM CaCl₂. Trypsin wurde in einem molaren Verhältnis von 1:50, 1:500 oder 1:2500 im Überschuss eingesetzt. Die Reaktion wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend zur Analyse entweder in der SDS-PAGE eingesetzt oder auf die Trägerplatte für die Massenanalyse aufgetragen.

2.2.6.2. Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse der bei der limitierten Proteolyse entstandenen Peptide wurde eine Stahlträgerplatte (*MTP 384 target plate ground steel TF* von Bruker Daltonik, Bremen) verwendet. Für die Auftragung auf die Stahlträgerplatte wurden die Ansätze der limitierten Proteolyse 1:1 mit einer gesättigten Lösung von DHB in 50 % Acetonitril, 0,1 % TFA vermischt und dann 1 µl der Mischung auf den Träger aufgetragen (*dried-droplet*-Methode). Der Träger wurde dann zum Auskristallisieren über Nacht bei RT inkubiert, und die Proben am nächsten Tag an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Voyager DE RP Biospectrometry Workstation; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) im Linearmodus vermessen. Zur Kalibrierung wurde ein Massenstandard (Bruker Daltonik,

Bremen) verwendet. Für die Vermessung und Auswertung der Spektren wurden die *Voyager Software* Version 5.1 und die *Data Explorer Software* Version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) eingesetzt.

Der „In Gel“-Trypsin-Verdau und die Analyse der Fragmente mit ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS wurde von Dr. C. Ihling (AG Prof. A. Sinz, Fachbereich Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Hauptziel der Arbeit war es, die Bindung der Pro-Form von BMP-2 an BMP-2-Rezeptoren zu untersuchen. Als Vertreter der Typ-I-Rezeptoren wurde der BMP-Rezeptor-IA (BMPR-IA) und als Vertreter der Typ-II-Rezeptoren der BMP-Rezeptor-II (BMPR-II) ausgewählt, da diese beiden Rezeptoren in vielen Zelltypen die Hauptrezeptoren für BMP-2 sind (Shimasaki et al. 2004). Die Liganden BMP-2, proBMP-2 und das BMP-2-Propeptid wurden nach bereits etablierten Protokollen renaturiert und gereinigt (Hillger et al. 2005).

3.1. Rekombinante Herstellung der extrazellulären Domäne von BMPR-IA

Um die Bindung von BMP-2, proBMP-2 bzw. dem BMP-2-Propeptid an den BMP-Rezeptor-IA *in vitro* untersuchen zu können, war es zunächst notwendig, BMPR-IA herzustellen. Da für die Ligandeninteraktion die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (ECD) des Rezeptors ausreichend ist (Kirsch et al. 2000a), wurde diese Domäne ohne den Transmembran- und intrazellulären Teil des BMPR-IA-Proteins eingesetzt. Die BMPR-IA-ECD umfasst die Aminosäuren 24 bis 152 des Gesamtproteins. Das Signalpeptid (AS 1 – 23) wird nur in Säugerkzellen für die Translokation ins ER benötigt, daher war es für die Expression im Cytosol von *E. coli* überflüssig, und die entsprechende cDNA wurde nicht bei der Expression berücksichtigt.



Abb. 3.1.1. Schematische Darstellung der Proteinkonstrukte, die für die Reinigung und Rückfaltung der BMPR-IA-ECD (AS 24 – 152 des gesamten BMPR-IA-Proteins) eingesetzt wurden. MBP: *maltose binding protein* aus *E. coli*. Der rote Pfeil kennzeichnet die Thrombin-Schnittstelle. Eine genauere Beschreibung der verwendeten Expressionskonstrukte und Vektoren findet sich im Anhang.

Für die Reinigung und Rückfaltung der BMPR-IA-ECD nach Expression in *E. coli* wurden zwei Konstrukte verwendet: Da zu Beginn der Arbeit nur Konstrukt a) (Abb. 3.1.1.) aus der Diplomarbeit von Antje Gotsch zur Verfügung stand (Antje Gotsch 2004), wurde zunächst eine Reinigung mit diesem Konstrukt etabliert.

Bei Konstrukt a) war die cDNA der BMPR-IA-ECD in den pET15b-Vektor inkloniert, so dass die ECD mit einem N-terminalen *His-Tag* in *E. coli* exprimiert werden konnte. Da die His-BMPR-IA-ECD nach Expression und Zellaufschluss vorwiegend in der unlöslichen Fraktion vorlag (Abb. 3.1.2. A), wurde zunächst eine IB-Präparation durchgeführt (2.2.2.1.3.). Nach der Solubilisierung der IBs wurde das Protein aus dem Solubilisat mit Hilfe einer Metallchelatchromatographie vorgereinigt (2.2.2.3.1.), um einen für die Rückfaltung eventuell negativen Einfluss von Verunreinigungen auszuschließen. Vermutlich aufgrund ihres niedrigen isoelektrischen Punktes von 5,8 zeigte die Domäne in der SDS-PAGE ein Laufverhalten von deutlich über 18 kDa, während die berechnete Größe bei 16,6 kDa liegt.

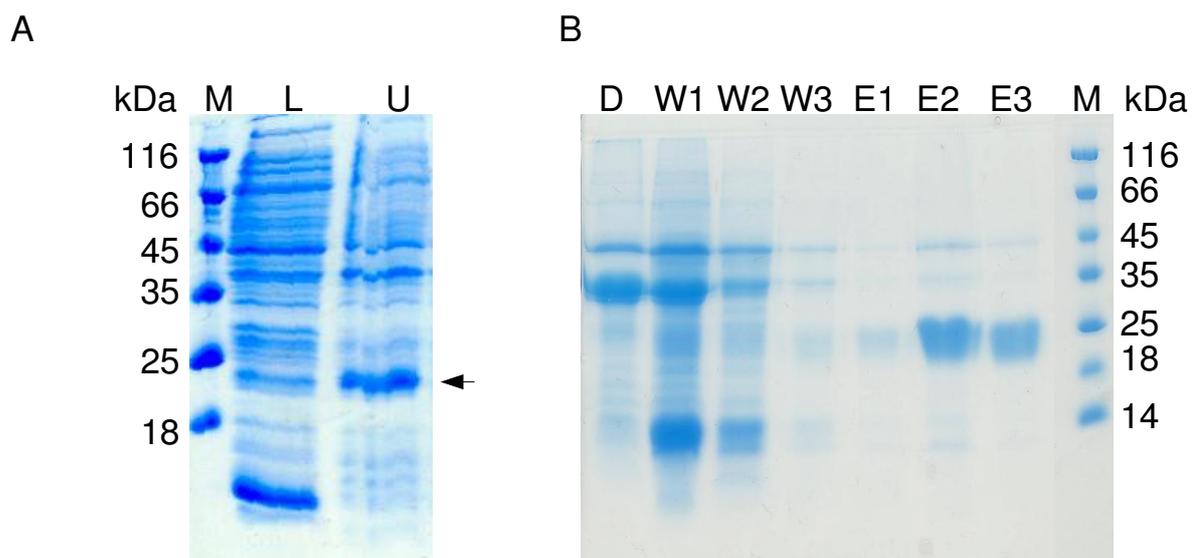


Abb. 3.1.2. SDS-PAGE nach Löslichkeitstest (A) und Metallchelate-Chromatographie (B) von His-BMPR-IA-ECD. L: Lösliche Fraktion; U: Unlösliche Fraktion; D: Durchfluss; W1-3: Waschfraktionen (30 mM Imidazol); E1-3: Elutionsfraktionen (250 mM Imidazol); M: Marker.

An die Metallchelatchromatographie schloss sich die Rückfaltung der BMPR-IA-ECD an. Sie erfolgte durch schnelle Verdünnung in Renaturierungspuffer. Da die BMPR-IA-ECD zehn Cysteinreste besitzt und die native Faltung von der korrekten Ausbildung der fünf Disulfidbrücken abhängt, enthielt der Rückfaltungspuffer ein Redoxsystem aus reduziertem

und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG), das die oxidative Faltung ermöglichen sollte, wie es bereits bei anderen Proteinen mit Disulfidbrücken wie BMP-2 und proBMP-2 erfolgreich zur Renaturierung eingesetzt worden war (Hillger et al. 2005). Der Rückfaltungspuffer beinhaltete außerdem 1 M L-Arginin, das die Löslichkeit des Proteins während der Faltung aufrecht erhalten sollte (2.2.2.3.1.).

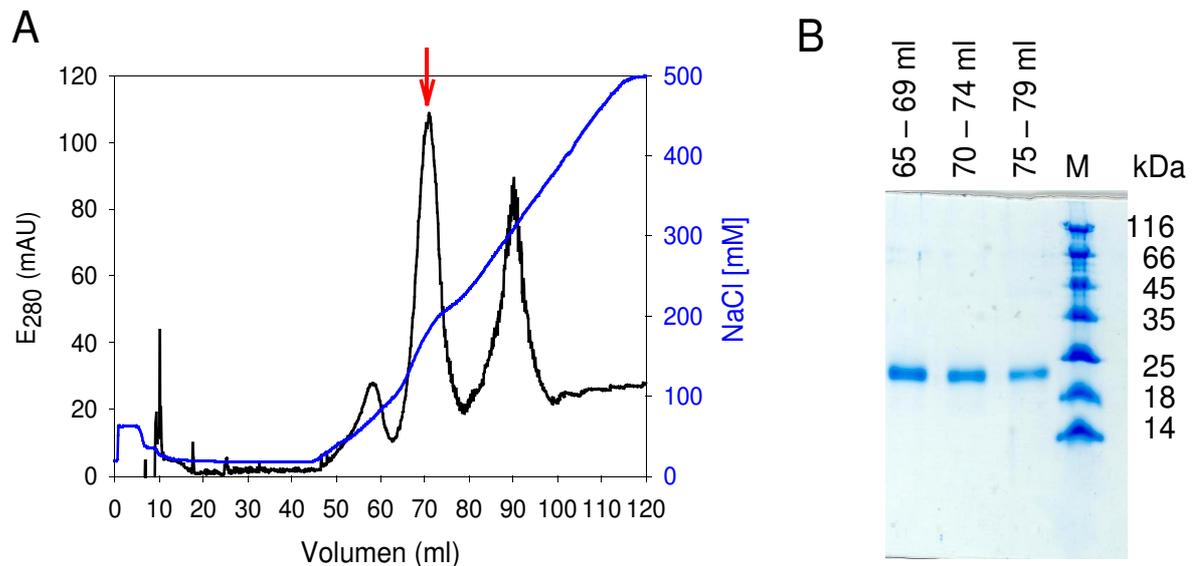


Abb. 3.1.3. Anionenaustausch-Chromatographie der His-BMP-IA-ECD nach der Rückfaltung. Elutionsprofil (A) und SDS-PAGE (B). Der rote Pfeil in (A) bezeichnet den Peak, dessen Fraktionen in der SDS-PAGE analysiert wurden.

Bei der oxidativen Renaturierung kommt es nahezu immer auch zur Bildung von nicht-korrekt gefalteten Spezies. Daher kommt der Abtrennung dieser Spezies bei der weiteren Aufreinigung stets eine besondere Bedeutung zu. Dafür wurde zunächst eine Anionenaustausch-Chromatographie (SOURCE 15Q) eingesetzt, da die BMP-IA-ECD aufgrund ihres niedrigen pI in dem hier verwendeten Laufpuffer mit pH 7,5 negativ geladen ist (2.2.2.3.1.). Wie in Abb. 3.1.3. zu sehen ist, eluierte die ECD im Salzgradienten bei einer Konzentration von 120 bis 200 mM NaCl (zwischen ca. 65 und 75 ml). In der SDS-PAGE zeigte sich das Protein als homogene Spezies ohne Verunreinigungen (Abb. 3.1.3. B). Die Fraktionen, die zwischen 65 und 78 ml eluierten, wurden vereinigt und mittels CD-Spektroskopie untersucht (Abb. 3.1.4. A). Um eventuell vorhandene nicht korrekt gefaltete Proteinspezies abzutrennen, wurde eine weitere Reinigung der BMP-IA-ECD mit einer RP-HPLC durchgeführt (2.2.2.3.1.). Ein nach diesem Reinigungsschritt aufgenommenes CD-

Spektrum zeigte nun eine deutlich größere Signalintensität, die darauf hindeutete, dass durch diesen Reinigungsschritt die nicht-gefalteten Spezies abgetrennt werden konnten (Abb. 3.1.4. B). Außerdem zeigten Bindungstests mit dem HPLC-gereinigten Protein eine ähnliche Affinität bei der Bindung an BMP-2 wie das BMPR-IA-ECD-Referenzprotein, das von Dr. Hortschansky (HKI Jena) gestellt wurde. Die Bindungsaffinität wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore, s.a. 3.2.2.) bestimmt. Die ermittelten Dissoziationskonstanten für die BMP-2-Bindung von His-BMPR-IA-ECD und dem BMPR-IA-ECD-Referenzprotein stimmten überein.

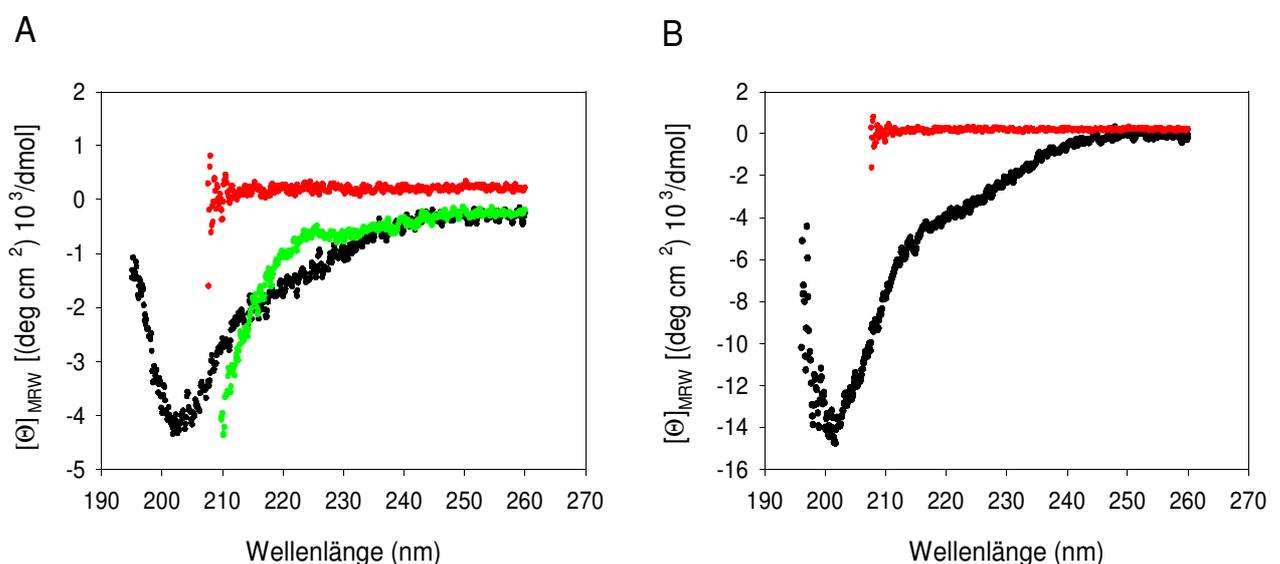


Abb. 3.1.4. Analyse von His-BMPR-IA-ECD mittels CD-Spektroskopie vor (A) und nach (B) der Nachreinigung mit RP-HPLC. Schwarz: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; Grün: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 6 M GdmCl; Rot: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 6 M GdmCl, 100 mM DTT bei 25 °C. Die Proteinkonzentration betrug in (A) unter nativen Bedingungen und mit 6 M GdmCl 20 μ M, mit 6 M GdmCl und 100 mM DTT 44 μ M und in (B) 16 μ M.

Zu einem späteren Zeitpunkt stand auch Konstrukt b) (Abb. 3.1.1.) zur Verfügung, dessen Reinigung nach einem bereits publizierten Protokoll erfolgte (Hortschansky & Schmuck, 2004). Hier wurde die BMPR-IA-ECD in Fusion mit dem cytoplasmatischen *maltose binding protein (MBP)* aus *E. coli* exprimiert. Vermutlich vermittelt MBP die Löslichkeit des Fusionsproteins. Nach der Renaturierung wurde eine Thrombinspaltung durchgeführt, um das MBP zu entfernen. Dabei wurde der *His-Tag* des Konstrukts ebenfalls mit abgespalten, so dass die BMPR-IA-ECD mit diesem Konstrukt ohne *His-Tag* erhalten werden konnte (s.a.

Abb. 3.1.1. und 2.2.2.3.3.).

Die Aktivität der mit den beiden Konstrukten hergestellten BMPR-IA-ECD wurde überprüft, indem die Affinität zu BMP-2 bestimmt wurde. Dazu wurden die unter 3.2.2. (BIACORE) und 3.2.7. (ELISA) beschriebenen Methoden verwendet. Mit beiden Methoden ließ sich kein Unterschied in der Affinität für BMP-2 zwischen den Proteinen, die mit den beiden Konstrukten hergestellt wurden, feststellen. Für die Bindungsstudien, die im Folgenden beschrieben werden (3.2.), wurde die mit Konstrukt b) hergestellte BMPR-IA-ECD verwendet. Diese Variante bot den Vorteil, dass sie dem natürlichen BMPR-IA-Protein aufgrund des Fehlens eines künstlichen *His-Tags* ähnlicher war als das aus Konstrukt a) gewonnene Protein. Darüberhinaus war auch die Ausbeute an nativem, gereinigtem Proteins höher, da das MBP-BMPR-IA-ECD-Fusionsprotein (Konstrukt b)) in höherer Konzentration im Renaturierungsansatz eingesetzt werden konnte. Die Konzentration von Konstrukt a) im Renaturierungsansatz war 50 µg/ml während Konstrukt b) mit 700 µg/ml renaturiert werden konnte. So konnten aus einem 1 L-Renaturierungsansatz mit Konstrukt a) nur 7,5 mg aber mit Konstrukt b) 30 mg gereinigtes Protein hergestellt werden. Die Ausbeuten, bezogen auf die Feuchtzellmasse, betrug bei Konstrukt a) 0,5 mg/g und bei Konstrukt b) 1,5 mg/g.

3.2. Charakterisierung der Bindung von proBMP-2 und BMP-2 an die extrazelluläre Ligandenbindedomäne des BMPR-IA *in vitro*

3.2.1. Nachweis der Bindung von BMP-2 an die extrazelluläre Domäne des BMPR-IA durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Der native Zustand der BMPR-IA-ECD und somit der Erfolg der Rückfaltung und Reinigung wurde durch die Bindung an BMP-2 überprüft. Der BMP-2-BMPR-IA-ECD-Komplex konnte mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese von den Einzelkomponenten abgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht werden (s.a. 2.2.4.5.). Bei der nativen PAGE, anders als bei der SDS-PAGE (in der die Proteine vollständig denaturiert sind und durch angelagertes SDS eine hohe negative Nettoladung aufweisen), sind die intrinsischen Ladungen des Proteins von Bedeutung. Da der Laufpuffer bei dieser Art der PAGE einen pH von 8,3 hat, war die BMPR-IA-ECD mit einem pI von 4,8 negativ geladen und lief im Gel relativ schnell in Richtung Anode. Weiterhin beeinflusst auch die Größe und der hydrodynamische Radius des Proteins das Laufverhalten. So wanderte der größere BMP-2-BMPR-IA-Komplex, der zudem

mit einem pI von 5,5 unter den gegebenen Bedingungen weniger stark negativ geladen war, deutlich langsamer als die BMPR-IA-ECD (Abb. 3.2.1.). BMP-2 lief überhaupt nicht ins Gel, da es, aufgrund des hohen pI von 8,2, unter den gewählten Pufferbedingungen keine ausreichend negative Ladung aufwies.

Daher ist BMP-2 (Spur 6) nicht im Gel vorhanden während bei BMPR-IA-ECD (Spur 4) eine Bande zu sehen ist. Wenn beide Proteine zunächst gemeinsam vorinkubiert werden, um die Komplexbildung zu ermöglichen, und dann aufgetragen werden (Spuren 2 + 3), erscheint neben der BMPR-IA-ECD-Bande eine weitere Bande im Gel, die sehr wahrscheinlich den BMP-2-BMPR-IA-ECD-Komplex repräsentiert. Die Komplexbildung konnte somit nachgewiesen und der native Zustand der hergestellten BMPR-IA-ECD bestätigt werden.

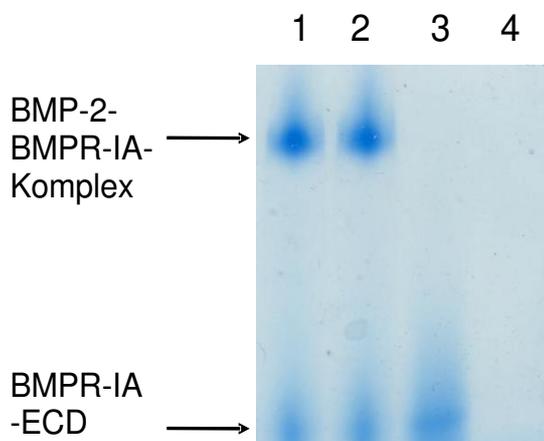


Abb. 3.2.1. Native PAGE zum Nachweis der nativen Faltung der BMPR-IA-ECD. BMPR-IA-ECD und BMP-2 nach Vorinkubation (Spuren 1 + 2); BMPR-IA-ECD (Spur 3); BMP-2 (Spur 4).

3.2.2. Analyse der Interaktion von proBMP-2 mit BMPR-IA durch Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™)

Nachdem der native Zustand der hergestellten BMPR-IA-ECD durch die “Native PAGE” bestätigt worden war, wurde die Bindung von proBMP-2 an die ECD mit Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™) charakterisiert und mit der BMP-2-Bindung verglichen.

Im BIAcore können Bindungskonstanten von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen bestimmt werden. Dazu wird ein Bindungspartner an der Oberfläche eines Sensorchips

immobilisiert, während der andere Bindungspartner in einer Lösung vorliegt, die sich in konstantem Fluß über die Oberfläche befindet. Das Detektionsprinzip des BIACORE basiert auf der Oberflächenplasmonresonanz. Durch die Bindung von Molekülen an die Oberfläche bzw. an Moleküle auf der Oberfläche des Sensorchips ändert sich der Brechungsindex und damit der Resonanzwinkel des reflektierten Lichtes, der als Messsignal genutzt wird.

Für die Untersuchung der Rezeptor-Liganden-Interaktion zwischen BMPR-IA-ECD und BMP-2 bzw. proBMP-2 erfolgte keine direkte Immobilisierung des Rezeptors, sondern es wurde ein bereits mit Streptavidin beschichteter Sensorchip verwendet (SA-Chip). Die BMPR-IA-ECD wurde biotinyliert und dann an den beschichteten Sensorchip gebunden (2.2.2.1.8.). Die Biotin-Streptavidin-Interaktion ist so stark, dass sie gegenüber der Ligandenbindung vernachlässigt werden kann. Die Dissoziation des Streptavidins ist so langsam, dass sie unter der Detektionsgrenze des BIACORE liegt. Diese Art der Immobilisierung ist schonender als die direkte Immobilisierung über z.B. Aminkopplung. Nach der Immobilisierung des Rezeptors über die Biotin-Streptavidin-Interaktion wurde der Ligand (BMP-2 bzw. proBMP-2) sequentiell verdünnt und eine kinetische Messung durchgeführt, indem für jede Ligandenkonzentration ein separates Sensorgramm aufgenommen wurde. Als Negativkontrolle diente das Signal der Kontrollzelle, in der kein Rezeptor an der Oberfläche immobilisiert war. Dieses Signal wurde von dem der Messzelle abgezogen.

Nach Abschluss der Dissoziationsphase erfolgte ein Regenerationsschritt (in Abb. 3.2.2. nicht mehr gezeigt), bei dem durch Absenken des pH die noch an den immobilisierten Rezeptor gebundenen Ligandenmoleküle freigesetzt wurden, um freie Rezeptormoleküle für die nächste Messung zurückzugewinnen und zum Grundsignal zurückzukehren.

Aus den gemessenen Kinetiken konnte dann die Dissoziationskonstante für die Interaktion ermittelt werden. Dazu wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation und die Dissoziation bestimmt, indem die ermittelten Assoziations- und Dissoziations-Kurven nach dem mathematischen Modell von Langmuir angepasst wurden. Aus den Anstiegen wurden die gesuchten Konstanten berechnet (siehe Tabelle 1).

Dem Langmuirschen Bindungsmodell liegt eine 1:1-Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor zugrunde. Es wurde hier verwendet, um die ermittelten Daten mit den aus der Literatur bereits bekannten Werten für BMP-2 vergleichen zu können (Kirsch et al. 2000b). Man geht dabei davon aus, dass die Rezeptormoleküle auf dem Chip so weit voneinander entfernt sind, dass ein Ligandendimer mit nur einem Rezeptormolekül interagieren kann.

Wie aus Abb. 3.2.2. und Tabelle 1 ersichtlich, unterscheiden sich die Bindungskonstanten der BMP-2- und der proBMP-2-BMP-IA-Interaktion nicht wesentlich. Bei proBMP-2 fällt eine etwas langsamere Assoziation auf, die sich in der niedrigeren Assoziationskonstante widerspiegelt, während die Dissoziationsrate beider Proteine nahezu gleich ist. Die Bindungskonstante für BMP-2 von 1 nM stimmt mit dem in der Literatur angegebenen Wert überein (Kirsch et al. 2000b). Durch die langsamere Assoziation ist die Bindungskonstante für proBMP-2 etwa viermal höher, liegt jedoch in derselben Größenordnung. Mit dem BMP-2-Propeptid allein wurde keine BMP-IA-ECD-Bindung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [nM]
BMP-2	$3.1 \pm 1.8 \times 10^5$	$2.8 \pm 1.0 \times 10^{-4}$	0.9 (± 0.8)
proBMP-2	$7.4 \pm 2.9 \times 10^4$	$3.0 \pm 0.2 \times 10^{-4}$	4.1 (± 1.8)

Tabelle 1. Kinetische Daten zur Assoziation und Dissoziation von BMP-2 bzw. proBMP-2 mit BMP-IA-ECD. Die Konstanten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen aller Ligandenkonzentrationen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

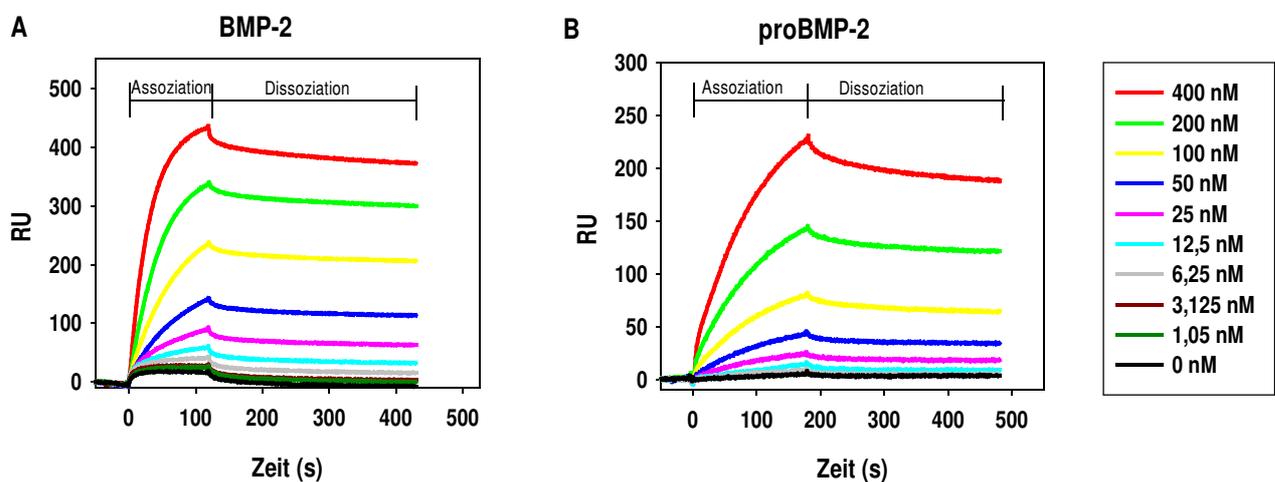


Abb. 3.2.2. Oberflächenplasmonresonanzmessungen (BIACORE) für die Interaktion zwischen BMP-IA-ECD und BMP-2 (A) bzw. proBMP-2 (B).

3.2.3. Nachweis der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA durch Größenausschluß-Chromatographie

Nachdem mit den BIACORE-Experimenten eine Bindung von proBMP-2 an die BMPR-IA-ECD nachgewiesen werden konnte, wurden zur Bestätigung dieses Ergebnisses eine Reihe weiterer Versuche durchgeführt.

Die Größenausschluß-Chromatographie eignet sich für den Nachweis von Proteinkomplexen, da hier die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Somit können, ähnlich wie bei der nativen PAGE, Proteinkomplexe von den Einzelkomponenten getrennt werden. Außerdem bietet sie den Vorteil, dass nach der Elution die Komplexe in reiner Form erhalten werden können und für weitere Experimente wie z.B. Kristallisation zur Verfügung stehen. Ein ähnliches Experiment mit BMP-2 und BMPR-IA-ECD war bereits aus der Literatur bekannt (Kirsch et al. 2000a). Daher wurden die dort verwendeten Bedingungen übernommen (s. a. 2.2.4.3.).

Die Gelfiltrationssäule wurde zunächst mit Proteinen bekannter Größe kalibriert. Indem die für diese Proteine ermittelten Retentionszeiten gegen die Molekulargewichte aufgetragen wurden (Abb. 3.2.3. D), konnte eine Eichgerade erstellt werden, mit deren Hilfe die apparenten Molekulargewichte der untersuchten Proteine ermittelt werden konnten. Zuerst wurden alle Komponenten separat aufgetragen. BMP-2 und proBMP-2 allein zeigten dabei ein stark verzögertes Laufverhalten, wodurch eine Bestimmung des apparenten Molekulargewichts nicht möglich war (Abb. 3.2.3. A + B). Dieses Laufverhalten ist wahrscheinlich auf elektrostatische Wechselwirkungen der Liganden mit der Gelmatrix zurückzuführen und konnte auch durch den Einsatz von 700 mM NaCl im Laufpuffer nicht verhindert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in der Literatur beschrieben (Kirsch et al. 2000a). Starke unspezifische Interaktionen von proBMP-2 bzw. BMP-2 mit den verschiedensten Chromatographiematrices wurden auch im Rahmen dieser Arbeit häufig beobachtet. Die separat aufgetragene BMPR-IA-ECD hingegen eluierte mit einem apparenten Molekulargewicht von 16 kDa, übereinstimmend mit dem theoretischen Molekulargewicht (Abb. 3.2.3. C).

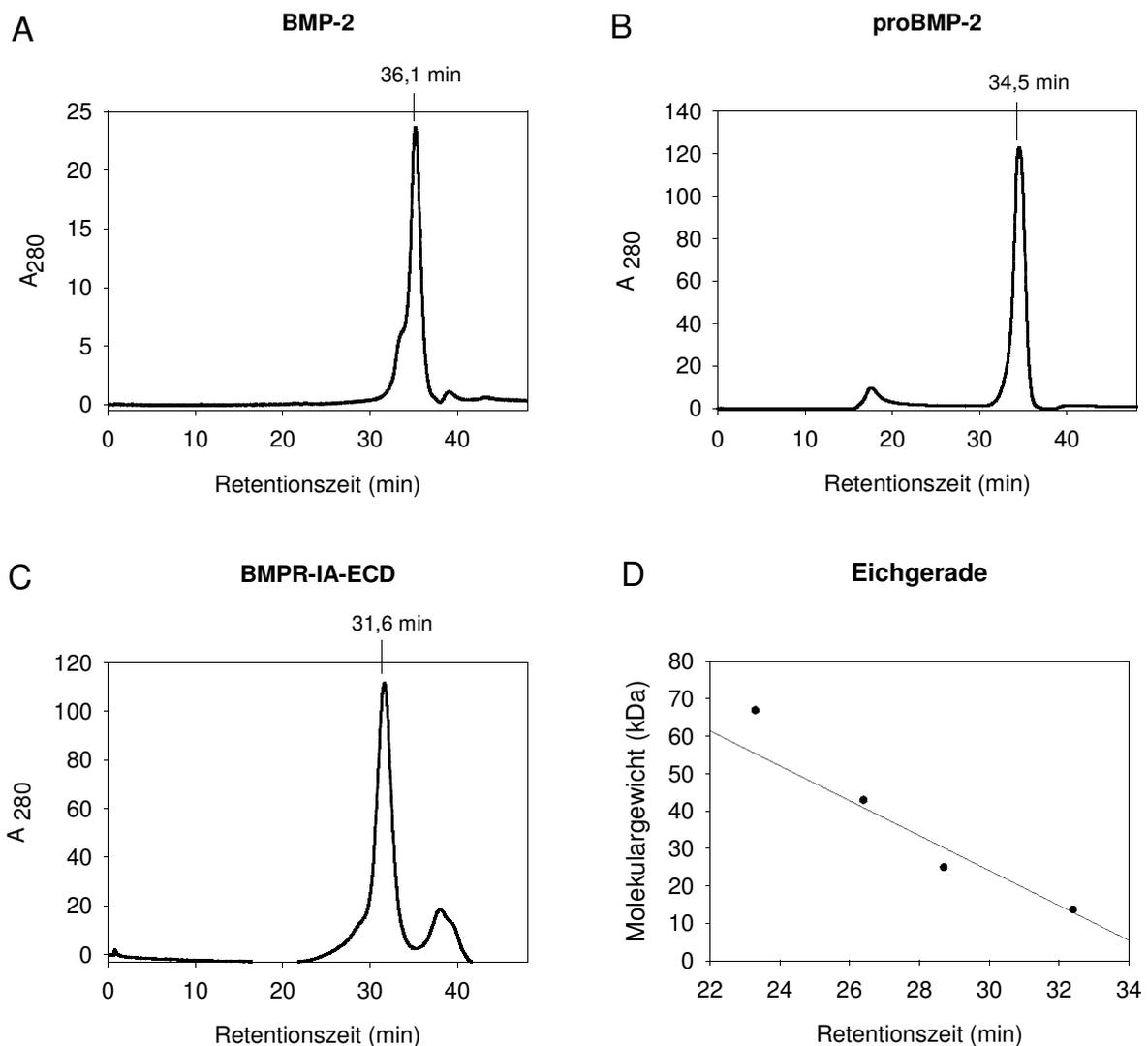


Abb. 3.2.3. Größenausschluß-Chromatographie von BMP-2 (A), proBMP-2 (B) und BMPR-IA-ECD (C). Es wurde eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule mit einem Säulenvolumen von 24 ml verwendet. Der Laufpuffer war aus 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 700 mM NaCl zusammengesetzt. Die Trennung erfolgte bei 25 °C und einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Zur Kalibrierung wurden die Proteine Ribonuclease A (13,7 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Albumin (67 kDa) eingesetzt. Die für diese Proteine ermittelten Retentionszeiten wurden gegen die jeweiligen Molekulargewichte aufgetragen (D), und es wurde eine Eichgerade erstellt.

Nachdem das Laufverhalten der unkomplexierten Proteine im Einzelnen untersucht worden war, wurden nun BMP-2 bzw. proBMP-2 nach Vorinkubation mit der BMPR-IA-ECD aufgetragen, um die Komplexe zu identifizieren. Der Komplex von BMP-2 mit BMPR-IA-ECD zeigt sich als Schulter bei 28,9 min vor dem *Peak* der freien BMPR-IA-ECD bei 31,6 min (Abb. 3.2.4. A). Der *Peak* bei 37 min wird wahrscheinlich durch freies BMP-2 verursacht. Für den *Peak* des BMP-2-BMPR-IA-ECD-Komplexes bei 28,9 min konnte ein

apparentes Molekulargewicht von 28 kDa ermittelt werden. Dies weicht von dem theoretischen Molekulargewicht von 41 kDa für den Komplex aus einem BMP-2-Dimer und einem BMPR-IA-Monomer erheblich ab. Dieser *Peak* wurde jedoch nur nach Inkubation von BMP-2 mit BMPR-IA-ECD reproduzierbar beobachtet. Außerdem stimmte die relative Differenz zwischen der Retentionszeit der BMPR-IA-ECD und der Retentionszeit des Komplexes mit den Daten aus der Literatur überein (Kirsch et al. 2000a). Daher repräsentiert der *Peak* sehr wahrscheinlich den BMP-2-BMPR-IA-ECD-Komplex.

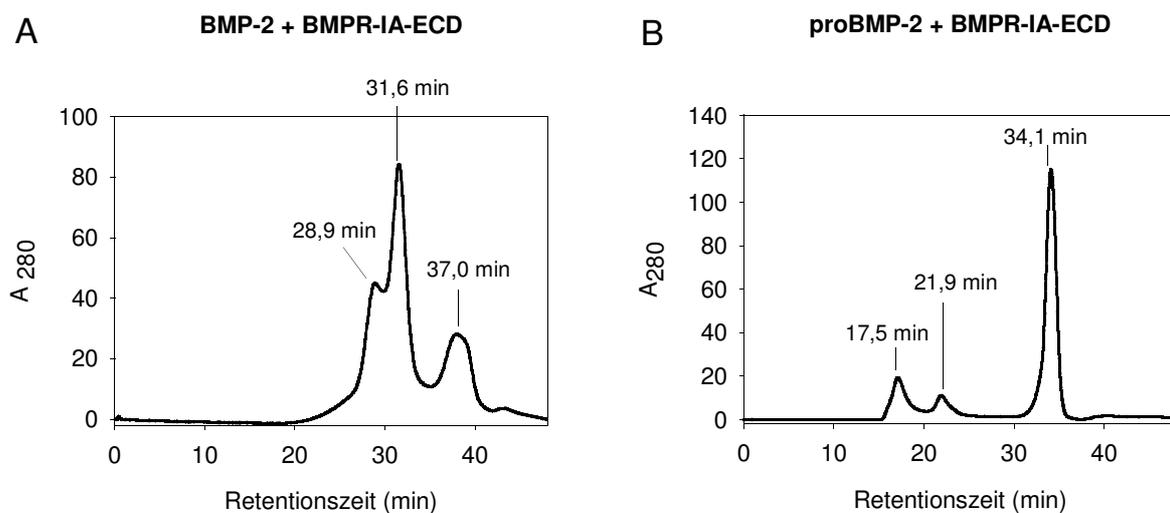


Abb. 3.2.4. Größenausschluß-Chromatographie von BMP-2 (A) und proBMP-2 (B) nach Vorinkubation mit BMPR-IA-ECD. In (A) und (B) wurden die beiden Bindungspartner jeweils in einem molaren Verhältnis von 1 : 1 eingesetzt. Dazu wurden 66 µg (5 nmol) BMP-2 bzw. 212 µg (5 nmol) proBMP-2 mit 57 µg BMPR-IA-ECD in 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 700 mM NaCl 1 h bei 25 °C vorinkubiert und danach auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen.

Da der Nachweis des BMP-2-BMPR-IA-ECD-Komplexes ein positives Ergebnis erbracht hatte, wurde das Experiment analog auch mit proBMP-2 durchgeführt. Hier konnte jedoch nach Vorinkubation mit BMPR-IA-ECD kein *Peak* detektiert werden, der eindeutig dem proBMP-2-BMPR-IA-Komplex zuzuordnen war (Abb. 3.2.4. B). Auch ungebundene BMPR-IA-ECD, wie bei BMP-2, wurde nicht detektiert. Neben einem *Peak* bei 17,5 min, der auch bei proBMP-2 ohne BMPR-IA-ECD auftrat und möglicherweise eine Verunreinigung darstellt, fand sich nach der Vorinkubation von proBMP-2 mit BMPR-IA-ECD nur ein kleiner zusätzlicher *Peak* bei 21,9 min. Diesem *Peak* konnte ein apparentes Molekulargewicht von 61 kDa zugeordnet werden, das mit dem eines Komplexes aus einem proBMP-2-Dimer

und einem BMPR-IA-ECD-Monomer übereinstimmen würde. Allerdings konnte keine Zunahme der Intensität dieses *Peaks* beim Einsatz von BMPR-IA-ECD im zweifachen oder dreifachen molaren Überschuss in der Vorinkubation mit proBMP-2 beobachtet werden. Weiterhin erbrachte auch die SDS-PAGE der Fraktionen dieses *Peaks* keinen Hinweis darauf, dass im *Peak* die BMPR-IA-ECD enthalten war (Daten nicht gezeigt).

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist die schlechte Löslichkeit des proBMP-2-BMPR-IA-Komplexes. Bei einem äquimolaren Verhältnis beider Proteine bildete sich nach dem Mischen der Komponenten ein Präzipitat. Da die Chromatogramme für proBMP-2 nach Vorinkubation mit BMPR-IA außer dem für freies proBMP-2 keine *Peaks* zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass der proBMP-2-BMPR-IA-Komplex unter den gegebenen Bedingungen nicht löslich ist. Deshalb mussten experimentelle Ansätze gefunden werden, die diesen Umstand berücksichtigen, um eine Komplexbildung nachweisen zu können. Es wurden im Folgenden also Experimente gewählt, die eine Verbesserung der Löslichkeit des Komplexes durch die Auswahl eines geeigneten Puffers zum Ziel hatten bzw. bei denen einer der Bindungspartner auf einem festen Träger immobilisiert war, um das Löslichkeitsproblem zu umgehen.

3.2.4. *In vitro*-Nachweis der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA-ECD durch chemische Quervernetzung

Um Proteinkomplexe nachzuweisen, wird häufig die chemische Quervernetzung eingesetzt. Dazu werden Reagenzien benutzt, die die Proteine in einem Komplex kovalent verbinden. Die Quervernetzungsreaktion kann nur stattfinden, wenn sich die Proteine in ausreichender räumlicher Nähe befinden, d.h. wenn eine Bindung gegeben ist und die reaktiven Gruppen für das Quervernetzungsreagenz zugänglich sind. Für dieses Experiment wurde Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) eingesetzt, das effizient mit primären Aminogruppen reagiert, die sich an Lysinresten und am N-Terminus der Proteine finden. BS³ ist ein homobifunktionaler *Crosslinker*, der zwei reaktive Gruppen besitzt und daher räumlich nahe Aminogruppen kovalent miteinander verbinden kann.

Um die Löslichkeit des proBMP-2-BMPR-IA-Komplexes zu verbessern, wurden die Bindungspartner in Konzentrationen von nur 1 μM eingesetzt. Daher war eine Detektion des Komplexes durch SDS-PAGE wegen der zu geringen Sensitivität durch eine Coomassie-

Färbung nicht möglich. Deshalb wurden die Proteine immunologisch mit BMP-2-Antikörper detektiert. Mit diesem Antikörper kann BMP-2 noch im einstelligen nanomolaren Bereich nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine Reihe von Zusätzen wie Glycerol, Trehalose, Galactose und Sucrose im Bindungsansatz auf stabilisierende Eigenschaften getestet. So wurden die Bindungspartner proBMP-2 und BMPR-IA-ECD zusammen in 100 mM HEPES/KOH pH 7,0 mit den entsprechenden Zusätzen inkubiert, und nach 30 min wurde BS³ zugegeben. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine bzw. Proteinkomplexe mit BMP-2-Antikörper im *Western Blot* nachgewiesen.

Zunächst wurden die Zusätze in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um die Bedingungen zu ermitteln, unter denen Proteinkomplexe im *Western Blot* detektiert werden können. Neben Glycerol (1 / 2 / 4 M) wurde die Wirkung von Trehalose (0,1 / 0,5 / 1 M), Galactose (0,1 / 1 / 2 M) sowie Sucrose (0,1 / 0,5 / 1 M) auf die Löslichkeit der Komponenten untersucht.

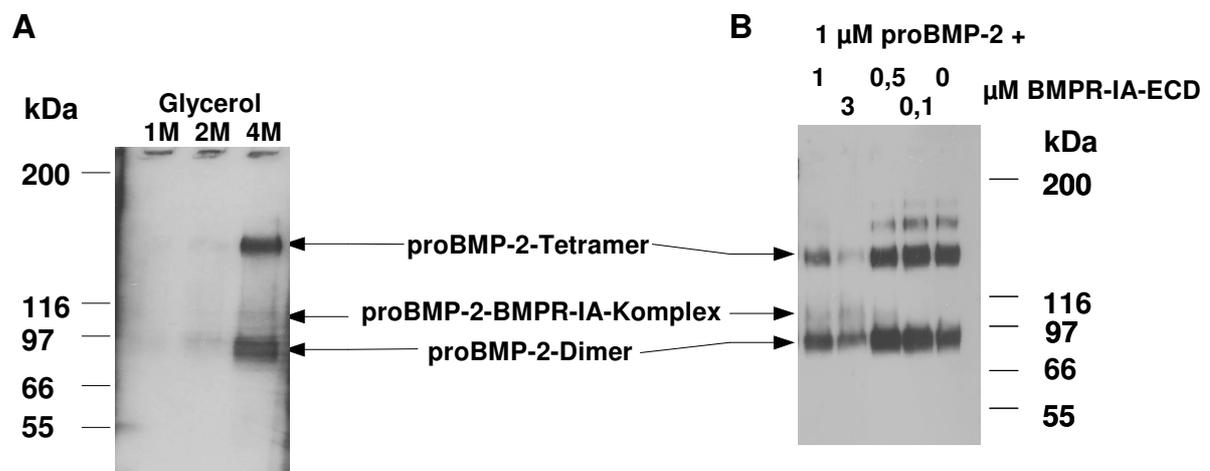


Abb. 3.2.5. Nachweis eines Komplexes von proBMP-2 und BMPR-IA-ECD durch *Crosslinking*. (A) 1 μM proBMP-2 mit 1 μM BMPR-IA-ECD in 0,1 M HEPES, pH 7,0 mit 1 M, 2 M und 4 M Glycerol. (B) 1 μM proBMP-2 mit BMPR-IA-ECD (1 μM, 3 μM, 0,5 μM, 0,1 μM) sowie in Abwesenheit von BMPR-IA-ECD in 0,1 M HEPES, pH 7,0 und 4 M Glycerol. Die Proteine wurden gemeinsam unter den angegebenen Pufferbedingungen inkubiert und chemisch vernetzt. Anschließend wurden die Ansätze mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine bzw. Proteinkomplexe immunologisch mit BMP-2-Antikörper detektiert.

In Abb. 3.2.5. A ist repräsentativ das Ergebnis des Quervernetzungsexperiments mit dem Zusatz von Glycerol dargestellt. Bei 1 M bzw. 2 M Glycerol im Bindungsansatz konnten keine Banden im *Western Blot* detektiert werden. Erst bei 4 M Glycerol, sowie auch bei 1 M und 0,5 M Trehalose; 1 M und 2 M Galactose und 0,5 M bzw. 1 M Sucrose konnten Proteine immunologisch detektiert werden.

In den Ansätzen mit geringeren Konzentrationen der stabilisierenden Zusätze ist der proBMP-2-BMPR-IA-Komplex wahrscheinlich unlöslich. Möglicherweise reagiert auch das proBMP-2 auf den Einsatz des aminoreaktiven *Crosslinkers* BS³ bei geringen Glycerolkonzentrationen mit Präzipitation. Präzipitation von proBMP-2 als Reaktion auf die Zugabe eines mit Aminogruppen reagierenden Agenzes wurde auch schon mit dem Biotinylierungsreagenz (Biotin-7-NHS) beobachtet.

Die untere Bande bei ca. 90 kDa in Abb. 3.2.5. A repräsentiert wahrscheinlich das proBMP-2-Dimer. Darüber liegt eine schwache Bande im Bereich von etwa 100 bis 110 kDa. Diese könnte dem Komplex aus einem proBMP-2-Dimer und einem Molekül BMPR-IA-ECD mit einer theoretischen Größe von 106 kDa zuzuordnen sein.

Die Identität der obersten Bande im Bereich von etwa 160 kDa war zunächst unklar, deswegen wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen unterschiedliche molare Verhältnisse der beiden Bindungspartner proBMP-2 und BMPR-IA-ECD eingesetzt wurden (Abb. 3.2.5. B). Dabei konnte festgestellt werden, dass die oberste Bande nicht dem proBMP-2-BMPR-IA-Komplex zugeordnet werden kann, da sie auch bei dem Ansatz ohne BMPR-IA auftrat. Wahrscheinlich repräsentiert diese Bande ein proBMP-2-Tetramer, das bereits beschrieben wurde (Frank Hillger 2004). Möglicherweise wird dieses Tetramer unter den verwendeten Bedingungen besonders stabilisiert.

Die Bande zwischen 100 und 110 kDa hingegen konnte im Kontrollexperiment reproduziert werden. Sie tritt bei den höheren Konzentrationen von BMPR-IA-ECD auf. Bei dem Ansatz ohne BMPR-IA-ECD fehlt diese Bande. Daher entspricht sie wahrscheinlich einem proBMP-2-BMPR-IA-Komplex. Die geringe Intensität dieser Bande im Vergleich zu den Banden des freien proBMP-2 könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Möglicherweise schwächt die Gegenwart von Glycerol die Interaktion zwischen proBMP-2 und BMPR-IA oder die Quervernetzungsreaktion ist wenig effektiv, so dass nur in einem geringen Teil der vorliegenden Komplexe die Bindungspartner kovalent verknüpft werden können. Es ist auch denkbar, dass im Komplex mit BMPR-IA die Zugänglichkeit für die BMP-2-Antikörper-Epitope reduziert ist.

3.2.5. Nachweis der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA-ECD durch Coelution der Bindungspartner

Proteininteraktionen können auch durch sogenannte “*Pulldown*”-Experimente nachgewiesen werden, bei denen ein Protein an eine Matrix bindet während der Bindungspartner, der allein nicht imstande ist eine Wechselwirkung mit der Matrix einzugehen, aufgrund seiner Interaktion mit dem Bindungspartner coeluiert werden kann.

3.2.5.1. Versuch der Coelution mittels Metallchelate-Chromatographie

Da proBMP-2 einen *His-Tag* besitzt, wurde zunächst ein *Pulldown*-Versuch mit einer Metallchelate-Chromatographiematrix (Ni-NTA) durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Bindung von proBMP-2 an die Matrix. Danach wurde BMPR-IA-ECD aufgetragen. Das schrittweise Vorgehen war notwendig, um eine Präzipitation des Komplexes zu vermeiden. Nach fünf Waschschrritten wurde mit Imidazol eluiert wobei Fraktionen gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert wurden. Aufgrund der geringen eingesetzten Proteinmenge war eine Silberfärbung für die Detektion von Proteinbanden erforderlich. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Bindung von BMPR-IA-ECD an die Säulenmatrix ohne Interaktion mit proBMP-2 auszuschliessen, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, mit denen bestätigt werden konnte, dass die ECD allein nicht mit der Matrix interagiert. Da BMP-2 nicht mit *His-Tag* zur Verfügung stand, konnte mit dem reifen Protein als Kontrolle kein *Pulldown*-Versuch mit Ni-NTA durchgeführt werden.

BMPR-IA-ECD und proBMP-2 ließen sich nicht gemeinsam von der Ni-NTA-Matrix eluieren (Abb. 3.2.6.). Während proBMP-2 allein erwartungsgemäss mit Imidazol von der Matrix eluiert werden konnte (Fraktionen E1 bis E3), war BMPR-IA-ECD hauptsächlich in den Waschfraktionen zu finden und nur zu einem geringen Teil in den Elutionsfraktionen. Möglicherweise verhindert die Bindung des Proteins an die Matrix die gleichzeitige Bindung an den Rezeptor, indem z.B. die Rezeptorbindungsstelle nicht mehr zugänglich ist oder allgemein Konformationsänderungen des Proteins eingeschränkt werden, die die Rezeptorbindung unterstützen, da der N-Terminus an der Säulenmatrix fixiert ist. Konformationsänderungen und eine hohe inhärente Flexibilität beider Bindungspartner wurden bereits bei der BMP-2-BMPR-IA-Interaktion beobachtet (Klages et al. 2008).

ProBMP-2 wurde nicht nur in den Elutionsfraktionen, sondern auch in den Durchflußfraktionen gefunden. Wahrscheinlich war so viel Protein aufgetragen worden, dass die Bindungskapazität der Säulenmatrix überschritten wurde und das proBMP-2, das nicht mehr binden konnte, sofort wieder eluierte.

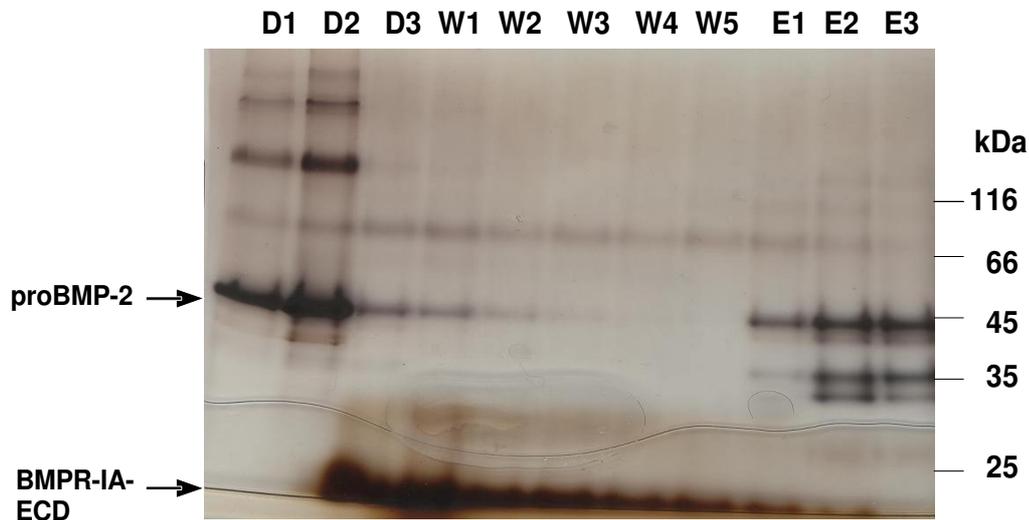


Abb. 3.2.6. Coelutionsexperiment zum Nachweis der Interaktion zwischen BMPR-IA-ECD und proBMP-2 mittels Metallchelate-Chromatographie (Ni-NTA). D1 – D3: Durchflußfraktionen; W1 – W5: Waschfraktionen; E1 – E3: Elutionsfraktionen. Als Laufpuffer wurde 100 mM K-HEPES, pH 7,0 verwendet, der zum Waschen zusätzlich 20 mM Imidazol und für die Elution zusätzlich 250 mM Imidazol enthielt.

3.2.5.2. Versuch der Coelution mittels Affinitätschromatographie (Heparin-Sepharose)

Nachdem mittels *Pulldown* über Metallchelate-Chromatographie kein Nachweis einer Bindung zwischen proBMP-2 und BMPR-IA-ECD möglich war, erfolgte ein weiteres Experiment mit Heparin-Sepharose, die schon bei der Reinigung von proBMP-2 und BMP-2 eingesetzt worden war. Hier bot sich auch der Vorteil, den Versuch zum Vergleich parallel mit BMP-2 durchführen zu können, um die prinzipielle Funktionalität des Tests zu überprüfen.

Allerdings erfolgte auch hier weder mit proBMP-2 noch mit BMP-2 eine Coelution der beiden Bindungspartner (Abb. 3.2.7. A + B). Während BMP-2 bzw. proBMP-2 vornehmlich in den Elutionsfraktionen zu finden waren, eluierte die BMPR-IA-ECD bereits in den Waschschrritten. Da das Experiment für BMP-2 ebenfalls kein positives Ergebnis brachte, ist

die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Tests in Frage zu stellen. Wie wir später aus der Literatur entnehmen, inhibiert Heparin die Bindung von BMP-2 an BMPR-IA (Kanzaki et al. 2008). Daher war das Experiment allgemein nicht zum Nachweis eines proBMP-2-BMPR-IA-ECD-Komplexes geeignet. Bei BMP-2 war in den Waschfraktionen neben der BMPR-IA-ECD auch noch BMP-2 zu finden. Dies ist möglicherweise auf eine Verdrängung des Heparin von BMP-2 durch die BMPR-IA-ECD zurückzuführen, wodurch BMP-2 gemeinsam mit BMPR-IA-ECD schon beim Waschen von der Matrix eluiert wird.

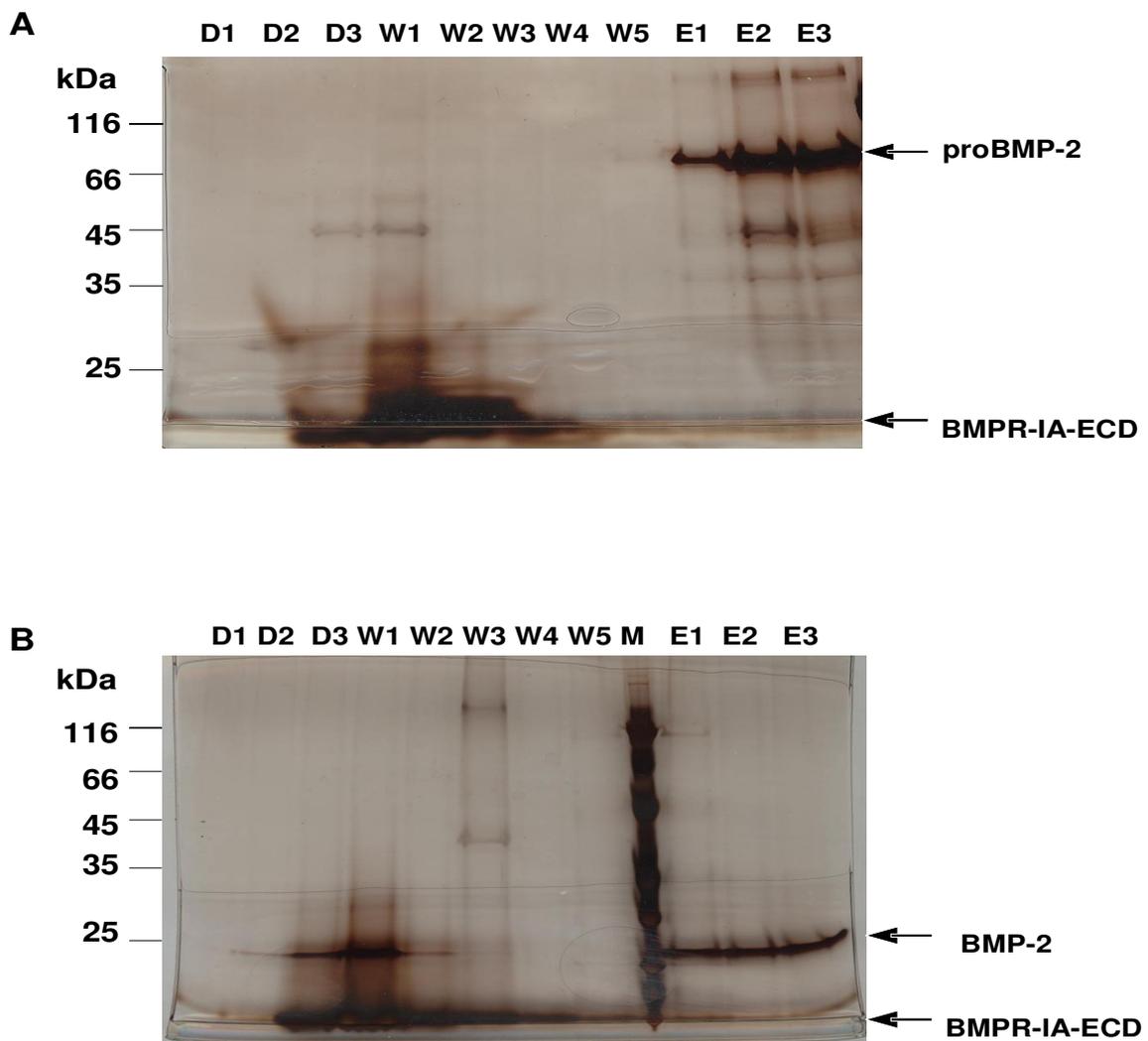


Abb. 3.2.7. Coelutionsexperiment zum Nachweis der Interaktion zwischen BMPR-IA-ECD und proBMP-2 (A) und BMP-2 (B) mittels Affinitätschromatographie über Heparin-Sepharose. D1 – D3: Durchflußfraktionen; W1 – W5: Waschfraktionen; E1 – E3: Elutionsfraktionen. Alle Proben wurden nicht-reduzierend aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 100 mM K-HEPES, pH 7,0 verwendet, der für die Elution zusätzlich 1 M NaCl enthält.

3.2.6. Nachweis der proBMP-2-BMPR-IA-Bindung durch *Western Blot*

Nachdem die Experimente mit chemischer Quervernetzung und Coelution keine eindeutige Aussage über die Interaktion zwischen proBMP-2 und BMPR-IA-ECD zuließen, erfolgte der Test eines weiteren experimentellen Ansatzes, bei dem einer der Bindungspartner an einen Träger gebunden war, in diesem Fall eine Nitrocellulosemembran (2.2.4.6.). Dazu wurden die Liganden (BMP-2 bzw. proBMP-2) durch SDS-PAGE unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die reduzierten Proben sollten als Negativkontrollen dienen, unter der Annahme, dass BMPR-IA nur nativen dimeren Liganden bindet. BMP-2 bzw. proBMP-2 können ihre dimere Form während der nicht-reduzierenden SDS-PAGE beibehalten. Während die SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen erfolgt, gelangen die Proteine nach dem Transfer auf die Membran in eine nicht-denaturierende Umgebung und können so ihre native Konformation wieder zurückerlangen, so dass eine Bindung von BMPR-IA möglich ist. Die Bindung und Detektion der gebundenen BMPR-IA-ECD erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen.

Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt und anschließend mit BMPR-IA-ECD inkubiert. Dann wurde ungebundene BMPR-IA-ECD durch Waschen entfernt und gebundene ECD mit einem spezifischen anti-BMPR-IA-Antikörper detektiert. Banden sollten nur dann auftauchen, wenn BMPR-IA-ECD an das entsprechende Protein bindet. Wie in Abb. 3.2.8. zu sehen ist, konnte BMPR-IA-ECD an nicht-reduziertes BMP-2 (Spur 1) binden, während eine Bindung an reduziertes BMP-2 (Spur 4) nicht erfolgte. Bei proBMP-2 konnte jedoch sowohl mit der reduzierten als auch mit der nicht-reduzierten Probe eine Bindung detektiert werden. Dadurch verliert das Ergebnis für proBMP-2 an Aussagekraft, da auch reduziertes Protein erkannt wird. Eine mögliche Erklärung wäre eine Kreuzreaktion von reduziertem proBMP-2 mit dem sekundären Antikörper.

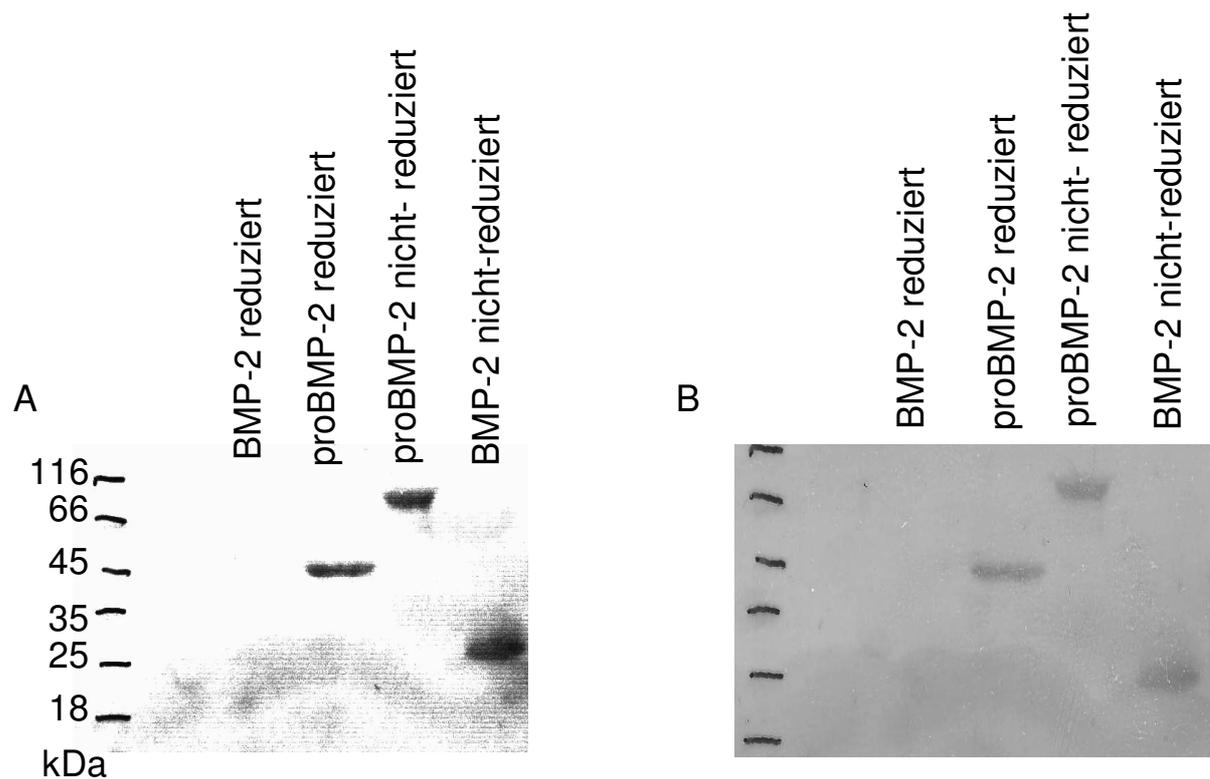


Abb. 3.2.8. Western Blot nach Detektion von gebundener BMPR-IA-ECD. Die Liganden wurden unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach der Inkubation der Membran mit BMPR-IA-ECD wurde gebundene ECD mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. In A ist eine bearbeitete Version des Original-Western Blots (B) dargestellt, bei der Kontrast und Helligkeit verbessert wurden.

3.2.7. Nachweis der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA durch ELISA

Ein weiterer experimenteller Ansatz, mit dem die proBMP-2-BMPR-IA-Bindung untersucht wurde, war der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Zur Umgehung des Löslichkeitsproblems des Komplexes wurde, wie auch bereits beim BIACORE, einer der Bindungspartner immobilisiert. Die Durchführung des Experimentes erfolgte in 96-well-Testplatten.

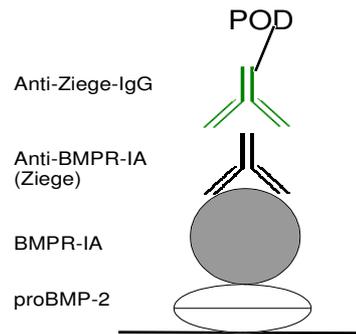


Abb. 3.2.9. Schematische Darstellung des Aufbaus des ELISA-Experiments, POD: Peroxidase.

Bei der Optimierung des Experimentes konnte festgestellt werden, dass eine Immobilisierung der BMPR-IA-ECD, wie im BIACORE, ungünstig war. Bei einer Immobilisierung von BMPR-IA-ECD mit anschließendem Blockierungsschritt und der darauffolgenden Inkubation mit proBMP-2/BMP-2 in verschiedenen Konzentrationen wurde ein so hohes Hintergrundsignal beobachtet, dass die Detektion einer spezifischen Rezeptor-Ligand-Bindung unmöglich war. Offensichtlich konnte die Oberfläche der Testplatte nicht erfolgreich gegen unspezifische Wechselwirkungen mit proBMP-2 bzw. BMP-2 abgesättigt werden. Deshalb wurde proBMP-2 bzw. BMP-2 immobilisiert (siehe 2.2.4.2.). Nach Immobilisierung fand ein Blockierungsschritt statt, um freie Bindungsstellen auf der Oberfläche der Testplatte abzusättigen. Hier zeigte TBST-Puffer mit 5 % BSA oder Milchpulver die besten Ergebnisse mit den niedrigsten Hintergrundsignalen. Für alle folgenden Experimente wurde deshalb TBST mit 5 % BSA zur Blockierung verwendet. Im nächsten Schritt wurde die BMPR-IA-ECD in acht unterschiedlichen Konzentrationen in Blockierungspuffer verdünnt und in der Testplatte mit immobilisiertem BMP-2/proBMP-2 inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte, um ungebundene BMPR-IA-ECD zu entfernen. Anschließend konnte mit dem spezifischen anti-BMPR-IA-ECD-Primärantikörper und dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in Verbindung mit ABTS gebundene BMPR-IA-ECD detektiert werden. ABTS bildet unter Peroxidaseeinfluss Radikalkationen, die bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt werden können.

In Abb. 3.2.10. wurden die Signalanstiege bei 405 nm gegen die entsprechenden BMPR-IA-ECD-Konzentrationen aufgetragen. Bei beiden Liganden konnte ein deutlicher Signalanstieg mit zunehmender BMPR-IA-ECD-Konzentration beobachtet werden (Abb. 3.2.10. A + B). Daraus folgt, dass beide Proteine an die BMPR-IA-ECD binden. Die höheren Signale bei proBMP-2 lassen sich damit erklären, dass sich proBMP-2 wesentlich effektiver in der

ELISA-Testplatte immobilisieren ließ als BMP-2, wie in Vorversuchen zur Blockierung bereits festgestellt worden war. Dadurch stand mehr proBMP-2 für die BMPR-IA-ECD-Bindung zur Verfügung und die Signalintensität war höher. Für das BMP-2-Propeptid allein konnte kein Signalanstieg, d.h. keine Interaktion mit der BMPR-IA-ECD beobachtet werden (s.a. Abb. 3.4.1. D).

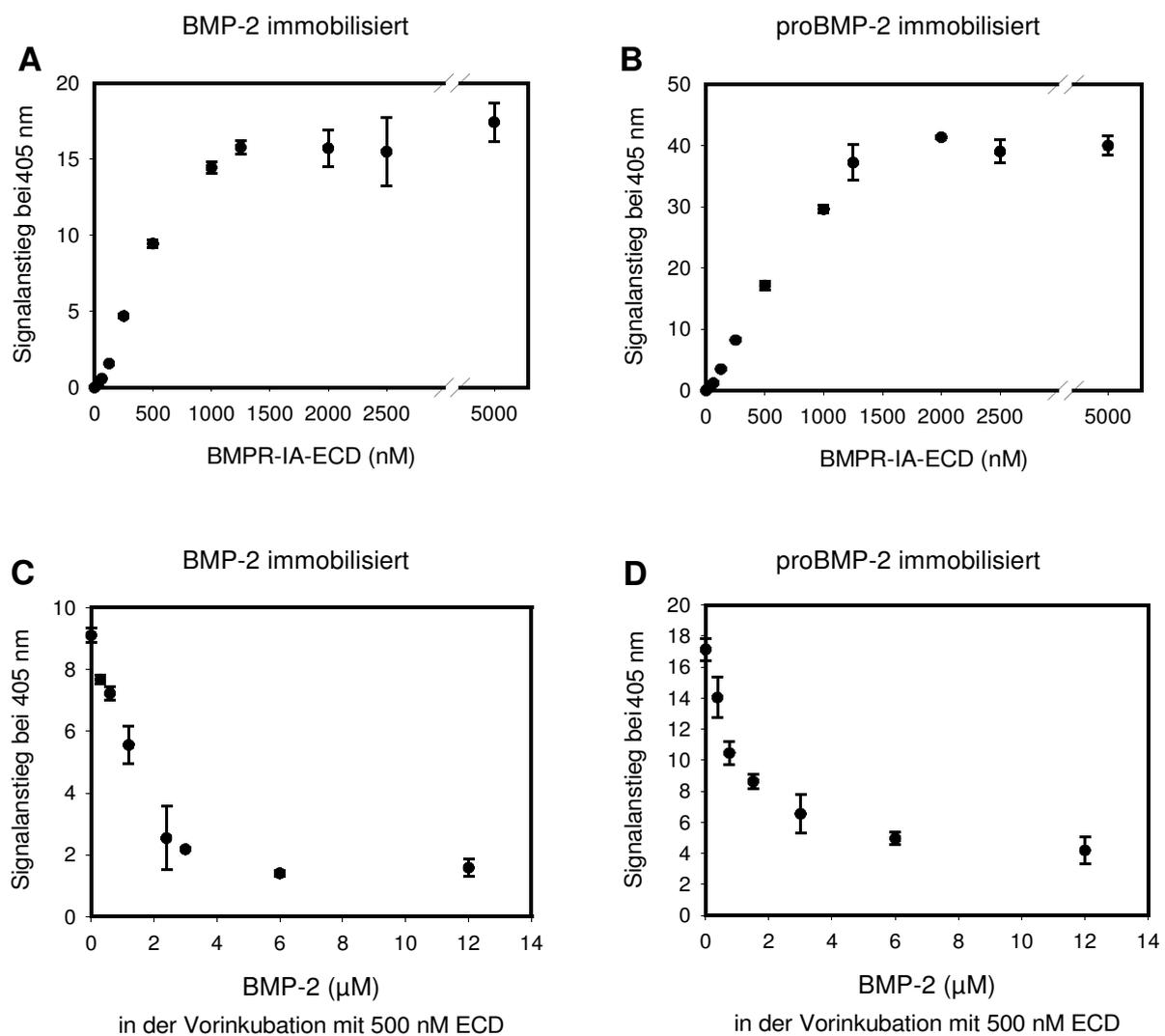


Abb. 3.2.10. ELISA zum Nachweis der Bindung von proBMP-2 an die BMPR-IA-ECD. Direkter ELISA mit immobilisiertem BMP-2 (A) und proBMP-2 (B). Kompetitiver ELISA nach Vorinkubation von BMP-2 mit BMPR-IA-ECD mit immobilisiertem BMP-2 (C) bzw. proBMP-2 (D). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

Um sicherzustellen, dass der Signalanstieg auch ausschließlich auf spezifische Ligand-BMPR-IA-ECD-Bindung zurückzuführen ist, wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Für diesen Versuch erfolgte zunächst eine Vorinkubation der BMPR-IA-ECD mit steigenden BMP-2-Konzentrationen. Dann wurde freie BMPR-IA-ECD mit dem im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen ELISA-Aufbau nachgewiesen. Dazu erfolgte die Analyse der Bindung freier BMPR-IA-ECD sowohl an immobilisiertes BMP-2 (Abb. 3.2.8. C) als auch an immobilisiertes proBMP-2 (Abb. 3.2.8. D). In beiden Fällen konnte mit steigender BMP-2-Konzentration in der Vorinkubation eine Abnahme des Signals beobachtet werden. Das bedeutet, dass je mehr BMP-2 in der Vorinkubation eingesetzt wurde, desto weniger freie ECD stand für die Interaktion mit dem immobilisierten Liganden und damit für die Detektion zur Verfügung. Damit konnte die Spezifität der im direkten ELISA detektierten Bindung bestätigt, und der ELISA als Test für die Interaktion validiert werden. Darüberhinaus wurde eine Konkurrenz auch mit immobilisiertem proBMP-2 beobachtet. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass BMPR-IA-ECD an BMP-2 und proBMP-2 gleichermaßen bindet und beide Proteine um die Bindung an den Rezeptor konkurrieren könnten.

Mit diesem Experiment konnte die Bindung von proBMP-2 an den BMPR-IA bestätigt werden, die bereits in den BIACORE-Experimenten beobachtet wurde. Das Propeptid inhibiert also die Bindung von BMP-2 an den Typ-I-Rezeptor nicht.

3.3. Nachweis der Bindung von proBMP-2 und BMP-2 an BMPR-IA auf der Zelloberfläche durch *Crosslinking*

Nach den *in vitro*-Untersuchungen zur Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA sollte auch die Bindung *in vivo* an Rezeptoren auf der Zelloberfläche untersucht werden. Durch die Quervernetzung von Liganden mit Zelloberflächenrezeptoren konnten bereits Ligand-Rezeptorwechselwirkungen mit Proteinen der TGF- β -Familie identifiziert werden (Gilboa et al. 2000; Moustakas et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Konstrukt für die Expression des BMPR-IA in Säugerzellen verwendet (pcDNA3.1~BMPR-IA-HA). Es enthält unter der Kontrolle eines CMV-Promotors die cDNA für den gesamten BMPR-IA. Außerdem erfolgte die Expression des Rezeptors mit einem *HA-Tag*. Dieser *Tag* besteht aus den Aminosäuren 98 – 106 des Haemagglutinins, einem Glykoprotein des Influenzavirus Typ A. Der *Tag* diente zur Detektion des Rezeptors im Gesamtzellysat durch *Western Blot* mit anti-HA-Antikörpern. Die Transfektion des Expressionskonstrukts erfolgte durch Lipofektion

in COS7-Zellen. Dazu wurde ein Transfektionsreagenz (2.2.5.2.) aus kationischen Lipidvesikeln eingesetzt, die mit der negativ geladenen DNA Komplexe bilden, die von den Zellen aufgenommen werden können. Die Transfektionsraten lagen bei durchschnittlich 50 %, wie durch die Transfektion eines Kontrollplasmids (pCMV *Sport β-gal*) und anschließende X-Gal-Färbung nachgewiesen werden konnte (2.2.5.2.). Die Expression des BMPR-IA wurde durch Analyse des Gesamtzellextrakts 48 h nach der Transfektion im *Western Blot* mit einem HA-Antikörper überprüft.

Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion 3 h lang mit proBMP-2 oder BMP-2 inkubiert, um die Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu ermöglichen. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C, um eine Internalisierung der Liganden-Rezeptorkomplexe mit anschließendem Abbau im Zellinneren zu unterdrücken. Dann wurden Liganden und Rezeptoren durch chemische Quervernetzung durch das Reagenz DSS kovalent verbunden, um die Komplexe anschließend nach SDS-PAGE und *Western Blot* nachweisen zu können. DSS ist ein homobifunktionaler N-hydroxysuccinimidester und das nicht-wasserlösliche Analogon von BS³ (s.a. 3.2.4.). Als Negativkontrollen wurden Proben ohne Liganden bzw. ohne Quervernetzungsreagenz (DSS) mitgeführt. ProBMP-2-BMPR-IA-Komplexe konnten im *Western Blot* aus dem Gesamtzelllysat mit BMP-2-Antikörper (Abb. 3.3.1. A) und HA-Antikörper (Abb. 3.3.1. B) nachgewiesen werden. Sie zeigten ein Laufverhalten, das einer Größe von ca. 140 kDa entsprach. Ein Komplex aus einem BMPR-IA-Monomer (60 kDa) und einem proBMP-2-Dimer (88 kDa) hat ein theoretisches Molekulargewicht von 148 kDa. In den Negativkontrollen wurden keine entsprechenden Banden beobachtet. Da eine Bande der entsprechenden Größe auch mit Antikörpern gegen BMPR-IA und proBMP-2 nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass es sich hier wahrscheinlich um den proBMP-2-BMPR-IA-Komplex handelt.

Um den Hintergrund in diesen *Western Blots* zu reduzieren, wurde eine Immunpräzipitation mit BMPR-IA-Antikörper durchgeführt (2.2.5.4.). Auch hier konnten im anschließenden *Western Blot* Banden auf der Höhe der vermuteten Liganden-Rezeptor-Komplexe detektiert werden. Mit BMP-2 wurden zwei Banden beobachtet: Die untere Bande entspricht mit einem Laufverhalten, das auf eine Größe von etwa 85 kDa schließen lässt, einem Komplex aus einem BMP-2-Dimer (26 kDa) und einem BMPR-IA-Monomer (60 kDa) (Abb. 3.3.1. C). Die Zusammensetzung der oberen Bande ist unklar. Es könnte sich um einen Komplex aus einem BMP-2-Dimer und einem BMPR-IA-Dimer handeln, jedoch zeigt diese Bande ein Laufverhalten, das auf eine Größe von 120 kDa schließen lässt, während der Dimer-Dimer-Komplex bei 145 kDa erwartet werden würde.

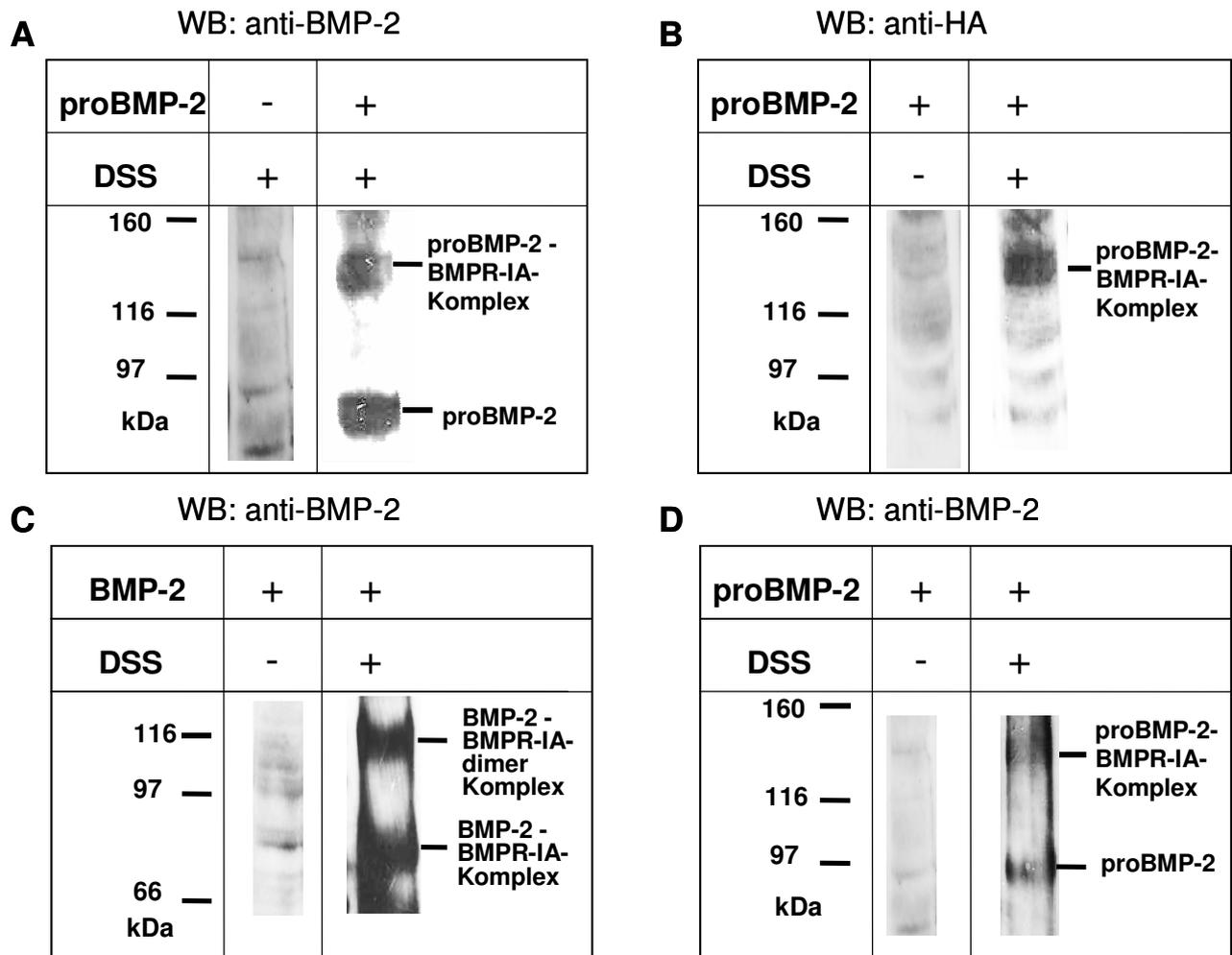


Abb. 3.3.1. Bindung von BMP-2 und proBMP-2 an BMPR-IA auf der Zelloberfläche. BMPR-IA exprimierende COS-7-Zellen wurden mit proBMP-2 (A,B,D) bzw. BMP-2 (C) inkubiert. Dann wurden Rezeptoren und Liganden durch chemische Quervernetzung (DSS) kovalent miteinander verbunden und im Western Blot mit BMP-2-Antikörper (A,C,D) oder HA-Antikörper (B) nachgewiesen. Um Hintergrundsignale zu reduzieren, wurde in (C) und (D) nach der Quervernetzung aus dem Gesamtzelllysat eine Immunpräzipitation mit BMPR-IA-Antikörper durchgeführt.

Mit proBMP-2 (Abb. 3.3.1. D) war neben freiem proBMP-2 bei etwa 90 kDa wieder eine Bande bei etwa 140 kDa zu beobachten. Da diese Bande auch mit BMP-2-Antikörper und HA-Antikörper (Abb. 3.3.1. A+B) im Gesamtzellextrakt detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass diese Bande den Komplex aus proBMP-2 und BMPR-IA repräsentiert. Das Auftreten von freiem proBMP-2 (untere Bande) nach Immunpräzipitation ist möglicherweise damit zu erklären, dass proBMP-2 unspezifisch mit der Protein-A-Sepharose-Matrix wechselwirkt (s.a. 3.2.3.). Eine andere Erklärung wäre, dass die Quervernetzungsreaktion

nicht vollständig war und bei einem Teil der proBMP-2-BMPR-IA-Komplexe keine kovalente Vernetzung der Bindungspartner stattgefunden hatte. Diese nicht-kovalenten Komplexe würden durch die Immunpräzipitation mit BMPR-IA-Antikörper ebenfalls angereichert, jedoch später während der SDS-PAGE wieder in ihre Einzelkomponenten auftrennen. Im nachfolgenden *Western Blot* wird mit dem anti-BMP-2-Antikörper dann nur das co-präzipitierte proBMP-2 detektiert.

Mit diesem Experiment konnte der Nachweis erbracht werden, dass proBMP-2 nicht nur *in vitro* an BMPR-IA-ECD binden kann, sondern auch *in vivo* an den BMPR-IA-Rezeptor auf der Zelloberfläche.

3.4. Untersuchung der Bindung von proBMP-2 und BMP-2 an die extrazelluläre Domäne des BMPR-II *in vitro*

Für die Induktion von Signalen durch BMP-2 ist nicht nur die Bindung an Typ-I-Rezeptoren erforderlich, sondern auch die Bindung an Typ-II-Rezeptoren (siehe 1.3.). Eine Signalinduktion findet nur statt, wenn ein ternärer Komplex aus dem BMP-Liganden, einem Typ-I- und einem Typ-II-Rezeptor-Dimer gebildet wird. Deshalb sollte nun auch die Bindung von proBMP-2 an einen Vertreter der Gruppe der Typ-II-Rezeptoren (BMPR-II) untersucht werden.

3.4.1. Rekombinante Herstellung der BMPR-II-ECD

Zunächst musste, wie auch bei BMPR-IA, die ECD des BMPR-II hergestellt werden, um die Bindung von proBMP-2 an den BMPR-II untersuchen zu können. Die Herstellung der BMPR-II-ECD erfolgte nach einem bereits publizierten Protokoll (Mace et al. 2007). In diesem Protokoll fand die cDNA-Sequenz des BMPR-II aus dem Schaf Verwendung. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein Expressionskonstrukt hergestellt, das die cDNA des humanen Rezeptors enthielt. In der oben genannten Publikation zeigte ein Fragment, das die Aminosäurereste 32 – 131 des gesamten BMPR-II umfaßte, die besten Reinigungsergebnisse. Deshalb wurde das entsprechende DNA-Fragment der cDNA des humanen BMPR-II mit Hilfe spezifischer *Primer* durch PCR amplifiziert (2.2.1.5.). Als *Template* diente ein Vektor, der die cDNA für den gesamten BMPR-II enthielt. Durch die *Primer* wurden auch

Restriktionsschnittstellen eingeführt, mit deren Hilfe das Fragment in den pET21a-Vektor kloniert werden konnte. Die Expression der BMPR-II-ECD erfolgte dann nach Transformation des Konstrukts pET21a :: BMPR-II-ECD (32-131) in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (Abb. 3.4.1.).

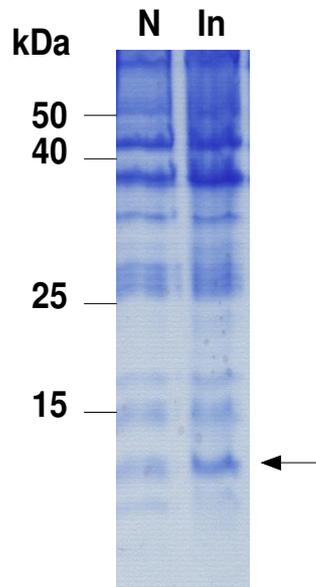


Abb. 3.4.1. Expression der BMPR-II-ECD in *E. coli* BL21(DE3). In: Gesamtzellextrakt induzierter Kulturen; N: Gesamtzellextrakt nicht-induzierter Kulturen. Der Pfeil kennzeichnet die Höhe der Expressionsbande der ECD.

Die Rückfaltung und Reinigung der BMPR-II-ECD wurde wie beschrieben durchgeführt (2.2.2.4.). Die Reinigung des Proteins nach der Renaturierung erfolgte zunächst mit Anionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose) und Größenausschluß-Chromatographie. Mit diesen Methoden konnte jedoch keine vollständige Separation der unterschiedlichen Faltungsspezies erreicht werden. Daher wurde im letzten Reinigungsschritt eine Anionenaustausch-Chromatographie (MonoP) verwendet. In einem flachen NaCl-Gradienten und einer Fraktionierung in sehr kleine Volumina konnte eine Trennung der verschiedenen Proteinspezies erreicht werden. Die Trennung wurde mit einer “nativen PAGE” überprüft (2.2.2.1.5. und Abb. 3.4.2.) Nach dem publizierten Protokoll repräsentiert der erste *Peak* native, aktive BMPR-II-ECD (Mace et al. 2007).

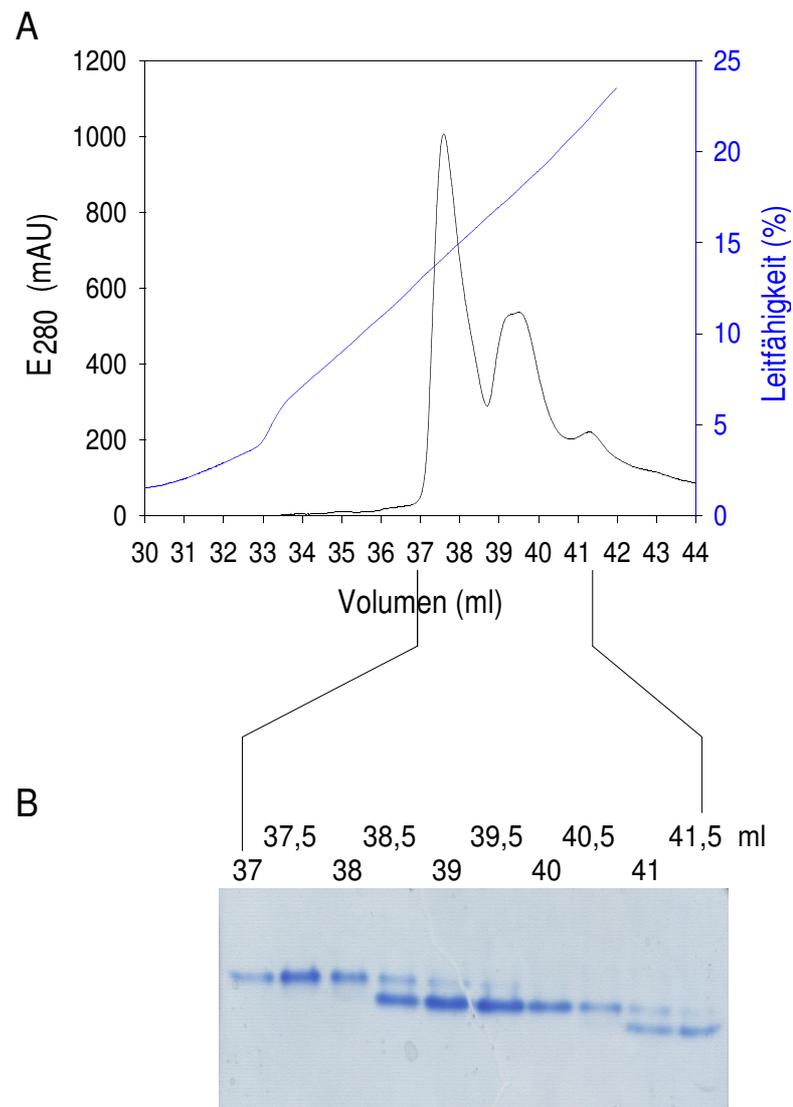


Abb. 3.4.2. Auftrennung verschiedener Faltungsspezies von BMPR-II-ECD durch Anionenaustausch-Chromatographie (MonoP). Chromatogramm (A) und Analyse der Fraktionen mit “nativer PAGE” (B).

Die Funktionalität der hergestellten BMPR-II-ECD wurde in Bindungstests mit BMP-2 überprüft. Jedoch konnte weder in BIACORE- noch in ELISA-Experimenten (s.a. 3.4.3. und 3.4.4.) eine Bindung von BMP-2 an die BMPR-II-ECD beobachtet werden. Daher wurde für die Bindungsstudien (3.4.) kommerziell erhältliche BMPR-II-ECD verwendet.

3.4.2. Untersuchung der Bindung von proBMP-2 an BMPR-II durch ELISA

Da mit der unter 3.4.1. bzw. 2.2.2.4. beschriebenen Methode zur Herstellung der BMPR-II-ECD kein bindungsaktives Protein hergestellt werden konnte, wurde ein von *R & D Systems* erworbenes BMPR-II-ECD-Fc-Fusionsprotein verwendet. Dieses Protein besteht aus der ECD von BMPR-II (AS 26 – 151), die durch einem Polypeptidlinker mit dem Fc-Teil des humanen IgG₁ verbunden ist. Zusätzlich befindet sich ein *His-Tag* am C-Terminus. Zwei Monomere des Fusionsproteins bilden ein über den Fc-Teil disulfidverbrücktes Dimer.

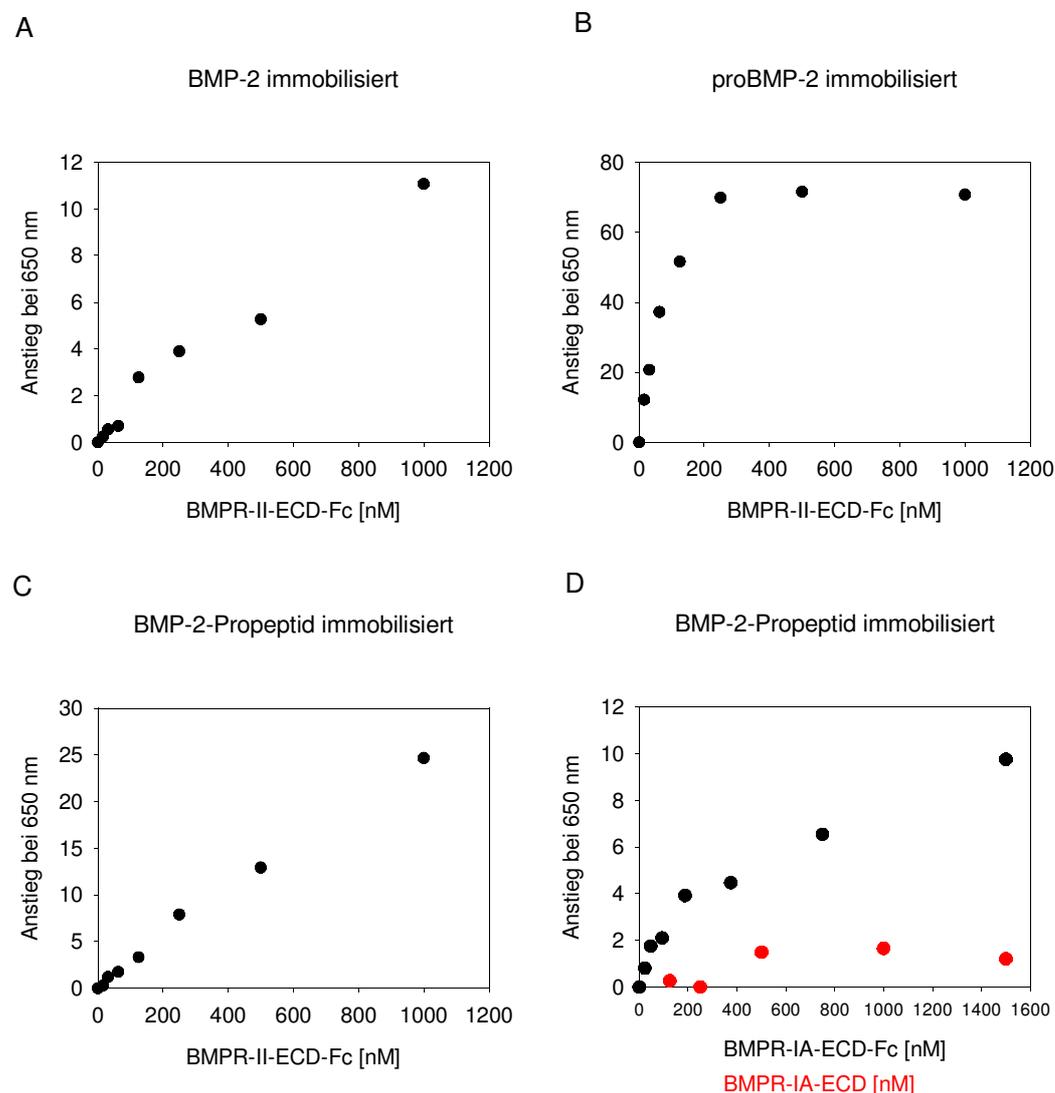


Abb. 3.4.4. ELISA zur Charakterisierung der BMPR-II-Bindung. Direkter ELISA mit immobilisiertem BMP-2 (A), proBMP-2 (B) bzw. BMP-2-Propeptid (C). Direkter ELISA mit immobilisiertem BMP-2-Propeptid (D) und BMPR-II-ECD mit (schwarze Punkte) und ohne (rote Punkte) Fc-Teil.

Der Nachweis der Interaktion von proBMP-2 mit BMPR-II erfolgte wie der Nachweis der Interaktion von proBMP-2 mit BMPR-IA durch ein ELISA-Experiment. Der Aufbau des Experimentes entsprach im Prinzip dem in 3.2.7. beschriebenen Schema.

Wie aus Abb. 3.4.4. ersichtlich, zeigten alle drei getesteten Liganden eine BMPR-II-Bindung. Da jedoch im nachfolgend beschriebenen BIACORE-Experiment (3.4.3.) keine BMPR-II-Bindung für proBMP-2 oder das BMP-2-Propeptid nachgewiesen werden konnte, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, um eine unspezifische Wechselwirkung des Propeptids mit dem Fc-Teil des Fusionsproteins auszuschliessen und die Spezifität des Ergebnisses zu verifizieren. Dazu fand ein ebenfalls kommerziell erhältliches BMPR-IA-ECD-Fc-Fusionsprotein Verwendung. Das Kontrollexperiment wurde, wie unter 3.2.7. beschrieben, durchgeführt. In diesem ELISA wurde die Bindung an die BMPR-IA-ECD getestet. Wie in Abb. 3.4.4. D ersichtlich ist, bindet das Propeptid nicht an die ECD des BMPR-IA, allerdings wird eine Bindung an die Fc-Chimäre beobachtet. Eine Interaktion des Propeptids mit BMPR-IA-ECD-Fc sollte demnach auf eine Interaktion mit dem Fc-Teil hindeuten (Abb. 3.4.4. D). Deshalb kann in dem ELISA-Experiment zur BMPR-II-Bindung nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Interaktion mit dem BMPR-II-ECD-Teil oder dem Fc-Teil des Fusionsproteins erfolgt.

3.4.3. Untersuchung der Bindung von proBMP-2 an BMPR-II durch Oberflächenplasmonresonanz

Die quantitative Charakterisierung der Bindung von BMP-2 bzw. proBMP-2 an BMPR-II erfolgte wie bei BMPR-IA mit Hilfe des BIACORE. Dazu wurde BMPR-II-ECD-Fc durch Aminkopplung (2.2.4.1.) auf einem CM5-Chip immobilisiert. Es konnten etwa 1000 RU BMPR-II-ECD-Fc gekoppelt werden. Dann wurde die Interaktion mit den Liganden (BMP-2 bzw. proBMP-2), wie bereits unter 3.2.2. beschrieben, analysiert. Für die Bindung von BMP-2 an die BMPR-II-ECD-Fc-Chimäre konnte eine Bindungskonstante von 60 nM ermittelt werden, etwa 60-mal höher als bei der Interaktion von BMP-2 mit der ECD von BMPR-IA (Abb. 3.4.5. und Tabelle 2). Für die Interaktion von BMP-2 mit BMPR-II-ECD-Fc werden in der Literatur Bindungskonstanten im Bereich von 100 nM angegeben, also in der gleichen Größenordnung (Kirsch et al. 2000b). Die schlechtere Bindung von BMP-2 an BMPR-II-ECD-Fc im Vergleich zu BMPR-IA-ECD liegt vor allem an der schnelleren Dissoziation, die sich in der um eine Größenordnung höheren Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation

widerspiegelt (vgl. Tabellen 1 und 2). Mit proBMP-2 konnte keine Bindung an die BMPR-II-ECD-Fc detektiert werden (Abb.3.4.5. B). Auch das BMP-2-Propeptid zeigte keine Interaktion mit BMPR-II-ECD-Fc (Daten nicht gezeigt).

Um zu bestätigen, dass das Propeptid tatsächlich die Bindung von BMP-2 an BMPR-II-ECD-Fc inhibiert, wurde ein BIACORE-Experiment durchgeführt, mit dem der Einfluss des nicht-kovalent gebundenen Propeptids auf die Bindung von BMP-2 an BMPR-II-ECD-Fc untersucht werden sollte.

Um den Einfluss von nicht-kovalent gebundenem Propeptid auf die Bindung von BMP-2 an BMPR-II zu untersuchen, sollte ein Komplex aus BMP-2 mit nicht-kovalent gebundenem Propeptid erzeugt werden. Dazu wurde BMP-2 in einer Konzentration von 400 μM mit dem isolierten Propeptid in Konzentrationen zwischen 0 und 1600 nM vorinkubiert und dann die Bindung an BMPR-II-ECD-Fc im BIACORE untersucht. Da das Propeptid nicht mit BMPR-II-ECD-Fc interagiert, kann eine Bindung nur auf BMP-2 zurückzuführen sein. Es wurde festgestellt, dass mit Zunahme der Propeptidkonzentration in der Vorinkubation die Signalhöhe im Gleichgewicht abnahm (Abb. 3.3.2.1. C). Das lässt den Schluss zu, dass das Propeptid auch dann mit dem reifen Teil in Wechselwirkung tritt, wenn es nicht-kovalent mit ihm verbunden ist (vgl. 3.6.). Wahrscheinlich wird durch die Interaktion von BMP-2 mit dem Propeptid die BMPR-II-Bindestelle unzugänglich, so dass keine Bindung an BMPR-II stattfinden kann. Je mehr Propeptid vorhanden ist, desto höher sollte der Anteil der BMP-2-Propeptid-Komplexe sein, die BMPR-II nicht binden können. Damit müsste weniger freies BMP-2 vorhanden sein und das Signal im BIACORE nimmt ab.

	$k_a [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_d [\text{s}^{-1}]$	$K_D [\text{nM}]$
BMP-2	$1.29 \pm 0.29 \times 10^5$	$7.7 \pm 1.23 \times 10^{-3}$	60 (± 23)

Tabelle 2. Kinetische Daten zur Assoziation und Dissoziation von BMP-2 mit BMPR-II-ECD-Fc. Die Konstanten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen aller BMP-2-Konzentrationen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

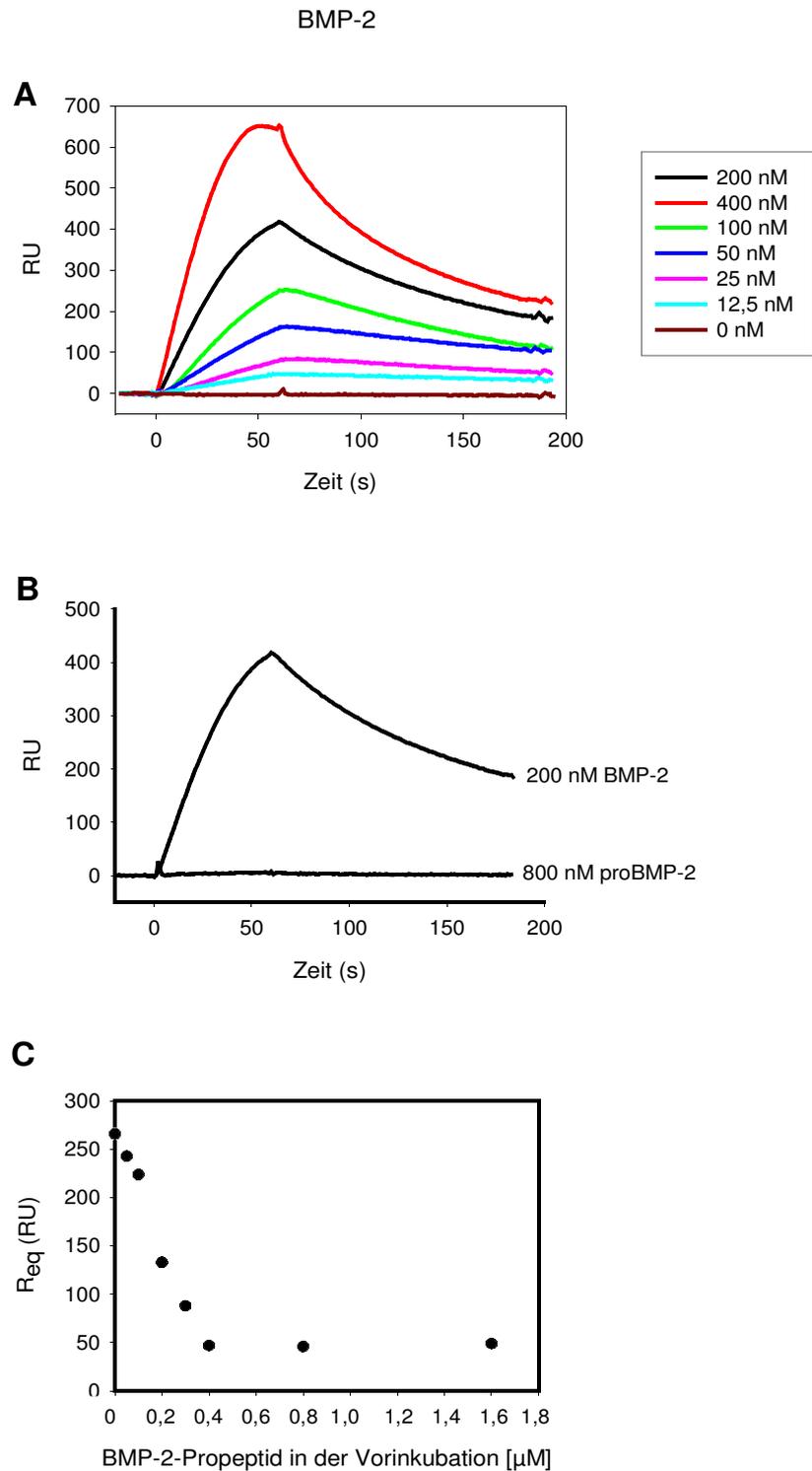


Abb. 3.4.5. Oberflächenplasmonresonanzmessungen für die Interaktion zwischen BMPR-II-ECD-Fc und BMP-2 (A), sowie BMP-2 und proBMP-2 im Vergleich (B). Einfluß des BMP-2-Propeptids auf die Bindung von BMP-2 an BMPR-II-ECD-Fc (C). BMP-2 (400 nM) wurde mit BMP-2-Propeptid in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Dann wurde die Bindung an BMPR-II-ECD-Fc im BIACORE untersucht. Die Assoziationsphase wurde bis zum Erreichen des Gleichgewichts verlängert. Das Signal im Gleichgewicht (R_{eq}) wurde gegen die in der Vorinkubation eingesetzte Propeptidkonzentration aufgetragen.

3.5. Aktivierung von zellulären Signalwegen durch proBMP-2

3.5.1. Induktion der Alkalischen Phosphatase in C2C12-Zellen durch BMP-2 bzw. proBMP-2

Nach der Charakterisierung der Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA und BMPR-II stellte sich nun die Frage wie sich die Rezeptorbindung von proBMP-2 auf die biologische Aktivität auswirkt.

Um die Aktivität von BMP-2 *in vivo* zu untersuchen, wird häufig der ALP-Test eingesetzt. Für diesen Test werden C2C12-Zellen, eine Myoblastenvorläuferzelllinie aus der Maus, verwendet. Sobald diese Zellen mit BMP-2 stimuliert werden, differenzieren sie zu Osteoblasten und ein Anstieg der Alkalischen Phosphatase (ALP), eines Markerenzym für die Knochenbildung, ist zu verzeichnen (Katagiri et al. 1994; Lecanda, Avioli, & Cheng 1997). Die ALP lässt sich nach entsprechender Inkubationszeit im Zelllysate colorimetrisch bestimmen. Typischerweise nimmt die Enzymaktivität mit steigender BMP-2-Konzentration zu.

ProBMP-2 ruft hingegen, wie bereits früher beobachtet, keine ALP-Induktion hervor (Matthias Krause 2003). Es hat darüber hinaus eine inhibitorische Wirkung, wenn es gemeinsam mit BMP-2 eingesetzt wird. Im fünffachen molaren Überschuss von proBMP-2 über BMP-2 wurde eine Reduktion der ALP um nahezu 70 % beobachtet (Abb. 3.5.1.).

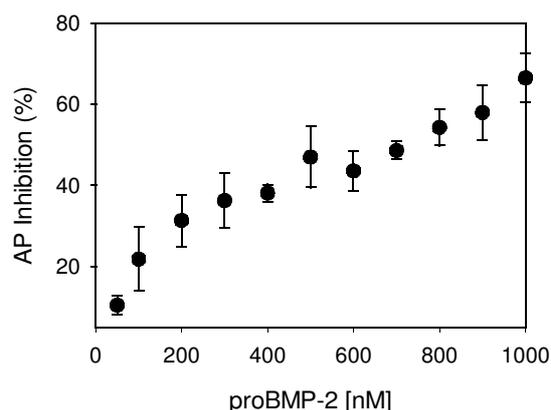


Abb. 3.5.1. Inhibierung der BMP-2-induzierten ALP in C2C12-Zellen durch proBMP-2 (mit freundlicher Genehmigung von Sabrina von Einem, aus Hauburger et al. 2009). 200 nM BMP-2 wurden zusammen mit proBMP-2 in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die maximale ALP-Induktion ohne proBMP-2 wurde gleich 100 % gesetzt.

Da proBMP-2, wie in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt, mit ähnlicher Affinität wie BMP-2 an die ECD des BMPR-IA bindet, könnte die inhibitorische Wirkung von proBMP-2 auf die ALP-Induktion durch BMP-2 mit einer Kompetition beider Proteine um diesen Rezeptor erklärt werden. Möglicherweise ist proBMP-2 dann nicht in der Lage, ein Signal auszulösen, das zu einer Induktion der ALP führt, weil es BMPR-II nicht binden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen und Informationen über die, von proBMP-2 induzierten, intrazellulären Signalwege zu erhalten, wurden im Folgenden die beiden durch BMP-2 induzierten Hauptsignalwege (s.a. 1.3.) untersucht.

3.5.2. Aktivierung von Signalwegen in C2C12-Zellen

Nach den Ergebnissen des ALP-Tests für BMP-2 und proBMP-2 erscheint es wahrscheinlich, dass die Signalwirkung beider Proteine unterschiedlich ist. Nun sollte untersucht werden, ob proBMP-2 tatsächlich nicht in der Lage ist, intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren, wie man nach dem Ergebnis des ALP-Tests annehmen könnte.

Im folgenden Abschnitt wurde die Aktivierung der Signalwege mit einer Ligandenkonzentration von 200 nM untersucht, da bei dieser Konzentration im ALP-Test mit BMP-2 das maximale Signal erreicht wurde (Hauburger et al. 2009; Matthias Krause 2003).

Die Phosphorylierung von zellulären Signalmolekülen, die bei der Aktivierung der Signalwege auftreten (s.a. 1.3.), wurde nach unterschiedlich langer Stimulierung von C2C12-Zellen mit BMP-2 bzw. proBMP-2 analysiert. Bei der Aktivierung des Smad-Signalweges werden die Smads 1/5/8 nach Ligandenbindung direkt am Liganden-Rezeptor-Komplex vom Typ-I-Rezeptor phosphoryliert. Bei der Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges wird nach der Ligandenbindung von den Rezeptoren eine MAP-Kinase-Kaskade in Gang gesetzt, die letztendlich zur Phosphorylierung von p38 führt. In beiden Fällen können die phosphorylierten Signalproteine p-Smad 1/5/8 bzw. p-p38 im *Western Blot* mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (2.2.5.5.).

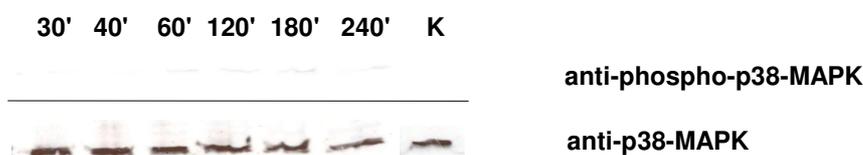
Im Gegensatz zu BMP-2 konnte mit proBMP-2 auch nach 240 min keine p38-Phosphorylierung beobachtet werden (Abb. 3.5.2. A + B). Damit kann erklärt werden, warum proBMP-2 die ALP in C2C12 nicht induziert, denn die Aktivierung des p38-Signalweges geht mit der Induktion der ALP einher (Nohe et al. 2002c). Es findet darüberhinaus auch eine Inhibierung der BMP-2-induzierten p38-Phosphorylierung durch proBMP-2 statt (Abb. 3.5.2.

C +D). Bei Zusatz von 800 nM proBMP-2 wurde die durch 200 nM BMP-2 induzierte p38-Phosphorylierung um etwa ein Drittel reduziert. So lässt sich auch die Inhibierung der BMP-2-induzierten ALP durch proBMP-2 (s.a. Abb. 3.5.1.) anhand der Reduktion der BMP-2-induzierten p38-Phosphorylierung durch proBMP-2 erklären.

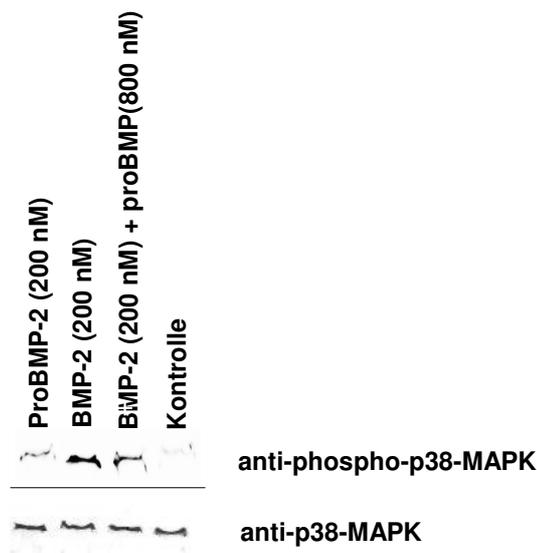
A BMP-2



B proBMP-2



C



D

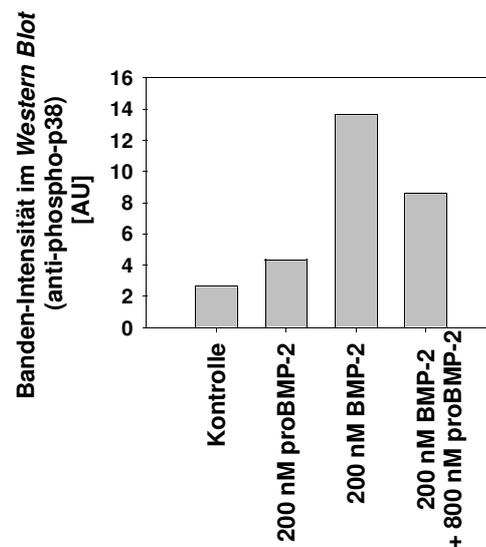


Abb. 3.5.2. p38-MAPK-Phosphorylierung in C2C12-Zellen nach Stimulierung mit 200 nM BMP-2 (A) bzw. proBMP-2 (B) für die jeweils angegebenen Zeiträume. Die Detektion von phosphoryliertem p38 erfolgte durch *Western Blot* im Gesamtzelllysat. Die nicht-phosphorylierten Proteine dienen als Ladekontrolle. In den mit K gekennzeichneten Spuren wurde Gesamtzelllysat von C2C12-Zellen aufgetragen, die nicht mit BMP-2 bzw. proBMP-2 stimuliert worden waren. Einfluß von proBMP-2 auf die Stimulation der p38-Phosphorylierung durch BMP-2 (C). Auswertung der Bandenintensitäten aus C (D).

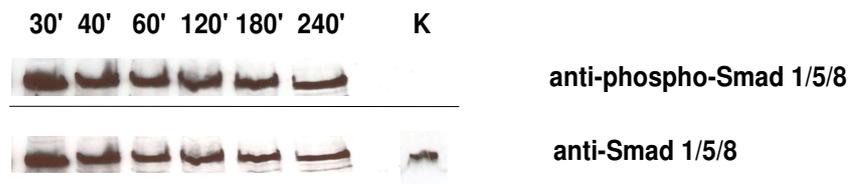
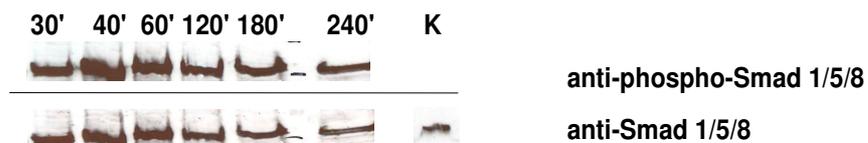
A BMP-2**B proBMP-2**

Abb. 3.5.3. Smad 1/5/8-Phosphorylierung in C2C12-Zellen nach Stimulierung mit 200 nM proBMP-2 bzw. BMP-2 für die angegebenen Zeiten. Detektion von phosphoryliertem Smad 1/5/8 durch *Western Blot* im Gesamtzelllysat. Die nicht-phosphorylierten Proteine dienen als Negativkontrolle. In den mit K gekennzeichneten Spuren wurde Gesamtzelllysat von C2C12-Zellen aufgetragen, die nicht mit BMP-2 bzw. proBMP-2 stimuliert worden waren.

Überraschenderweise zeigte sich bei der Smad 1/5/8-Phosphorylierung von proBMP-2 ein anderes Bild (Abb. 3.5.3. A+B) als bei der p38-Phosphorylierung. Während proBMP-2 offenbar nicht imstande ist, p38-Phosphorylierung in C2C12-Zellen zu induzieren, scheint die Induktion der Smad 1/5/8-Phosphorylierung im Vergleich zu BMP-2 nicht beeinträchtigt zu sein. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Proteinen, denn auch proBMP-2 induzierte die Smad-Phosphorylierung bereits nach 30 min.

3.5.3. Stimulation der Migration von b/c3t3-Zellen durch BMP-2 bzw. proBMP-2

In C2C12-Zellen konnte eine Inhibierung der BMP-2-Signale durch proBMP-2 festgestellt werden (siehe 3.5.1.). Nun sollte ein weiterer unabhängiger Test gefunden werden, um die biologische Aktivität von proBMP-2 möglichst durch einen positiven Nachweis zu überprüfen. Von der Firma NatuTec GmbH (Frankfurt/Main) wurde die biologische Aktivität von proBMP-2 mit Hilfe eines Migrationstests mit b/c3t3-Zellen bestätigt, daher wurde ein

ähnlicher Test hier durchgeführt.

Die Migration von Zellen ist ein wichtiger Vorgang bei Knochenheilungs- und Entwicklungsprozessen. So kann BMP-2 mesenchymale Vorläuferzellen zur chemotaktischen Migration anregen und dann an Ort und Stelle die Differenzierung zu Osteoblasten stimulieren (Fiedler et al. 2002; Yoon & Lyons 2004). Die Stimulation der Zellmigration durch BMP-2 wurde bereits bei einer Vielzahl verschiedener Zelltypen beobachtet: C2C12-Myoblastenvorläuferzellen, Chondrocyten, mesenchymalen Stammzellen, MC3T3-E1-Osteoblasten, Knochenkrebszellen, Prostatakrebszellen und embryonalen Zellen der Neuralleiste (Sotobori et al. 2006; Correia et al. 2007; Lai et al. 2008; Fong et al. 2008; Gamell et al. 2008; Hou et al. 2009). Offenbar stimuliert BMP-2, wie an C2C12- und NIH-3t3-Zellen untersucht wurde, eine Umlagerung des Actin-Cytoskeletts, einhergehend mit der Bildung von Protrusionen, die für die Migration typisch sind (Gamell et al. 2008).

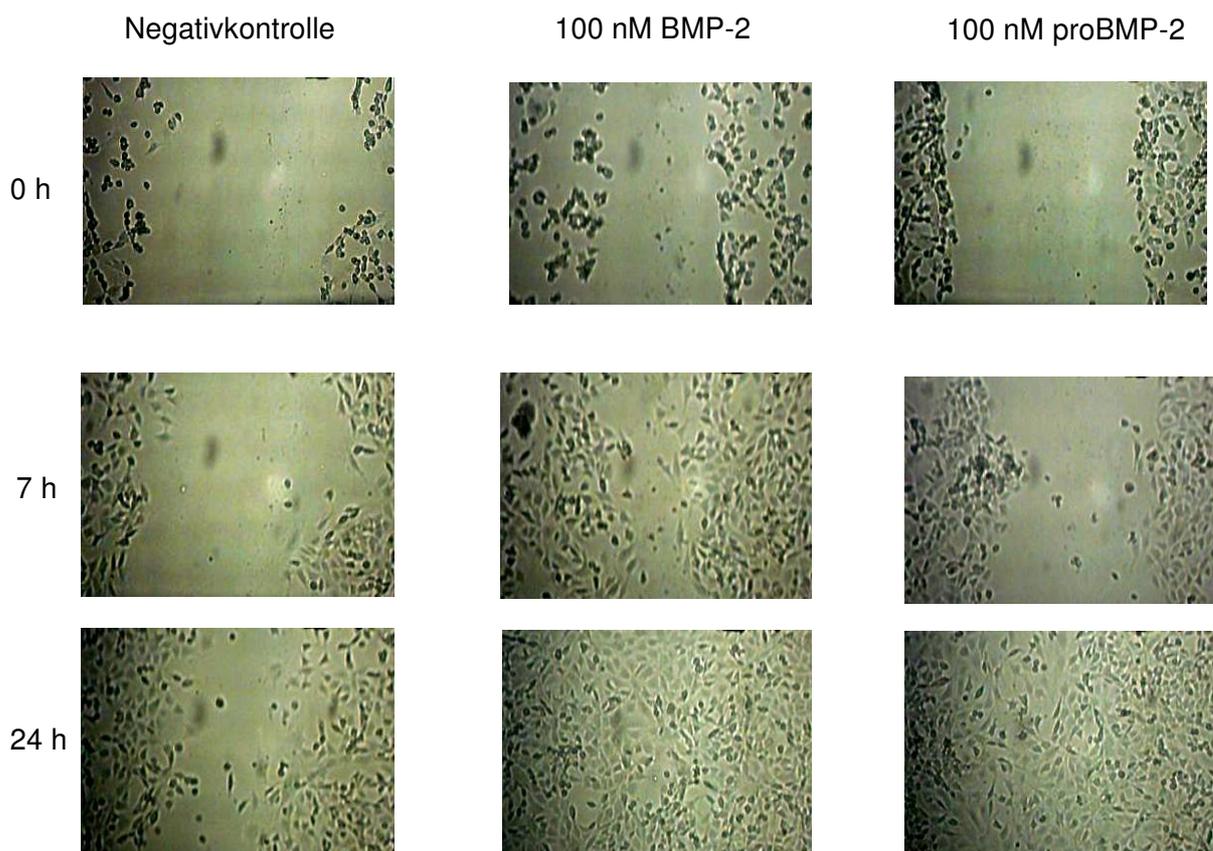


Abb. 3.5.4. Wundheilungstest (Migrationstest) mit b/c3t3-Zellen. b/c3t3-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, dann wurde die Zellschicht an gekennzeichneten Stellen vom Boden des Kulturgefäßes entfernt, und die Zellen wurden mit je 100 nM BMP-2 bzw. proBMP-2 für die oben angegebenen Zeiten weiterkultiviert.

Auch hier wurden 3t3-Zellen ausgewählt um die BMP-induzierte Migration zu untersuchen. b/c3t3-Zellen sind Fibroblasten, d.h. bewegliche Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft aus dem Mäuseembryo. In Abb. 3.5.4. sind die Ergebnisse des Migrationstests dargestellt. Die b/c3t3-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde die Zellschicht am Boden des Kulturgefäßes an markierten Stellen entfernt, so dass zellfreie Bereiche entstanden. Dann wurden die Zellen in Gegenwart von BMP-2 bzw. proBMP-2 weiterkultiviert. Nach 7 bzw. 24 h wurden die markierten Stellen fotografiert und die Größe der zellfreien Fläche vermessen.

Während bei der Negativkontrolle auch nach 24 h noch ein deutlich erkennbares zellfreies Areal vorhanden war, war die ehemals freie Fläche nach Inkubation mit BMP-2 bzw. proBMP-2 völlig mit eingewanderten Zellen bedeckt. Beim Vergleich der Bilder nach 7 h fällt auf, dass BMP-2 etwas effektiver zu sein scheint als proBMP-2, da die zellfreie Fläche mit BMP-2 bereits kleiner ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Reaktion verschiedener Zelltypen auf proBMP-2 unterschiedlich ausfällt. Während C2C12-Zellen auf proBMP-2 und BMP-2 unterschiedlich reagieren, ist die Reaktion von b/c3t3-Zellen auf eine Stimulation durch BMP-2 oder proBMP-2 ähnlich.

3.5.4. Aktivierung von Signalwegen in b/c3t3-Zellen

Da, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, auch durch proBMP-2 eine Migration von b/c3t3-Zellen ausgelöst werden konnte, sollte nun analysiert werden, ob auch die durch proBMP-2 aktivierten Signalwege in b/c3t3-Zellen mit den durch BMP-2 aktivierten übereinstimmen. Daher wurde auch an b/c3t3-Zellen die Smad1/5/8 bzw. die p38-Phosphorylierung untersucht. Überraschenderweise wurde in diesen Zellen, im Gegensatz zu den C2C12-Zellen, durch 200 nM proBMP-2 neben der Smad 1/5/8-Phosphorylierung auch eine p38-Phosphorylierung bereits nach 30 min beobachtet (Abb. 3.5.5. A+B). In Abb. 3.5.5. D zeigt eine Analyse der Bandenintensitäten bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen einen Anstieg der p38-Phosphorylierung mit zunehmender Konzentration an proBMP-2 bzw. BMP-2. Die unterschiedliche Reaktionen von C2C12-Zellen und b/c3t3-Zellen auf die proBMP-2-Stimulation spiegelt sich also auch auf der Ebene der induzierten Signalwege wider.

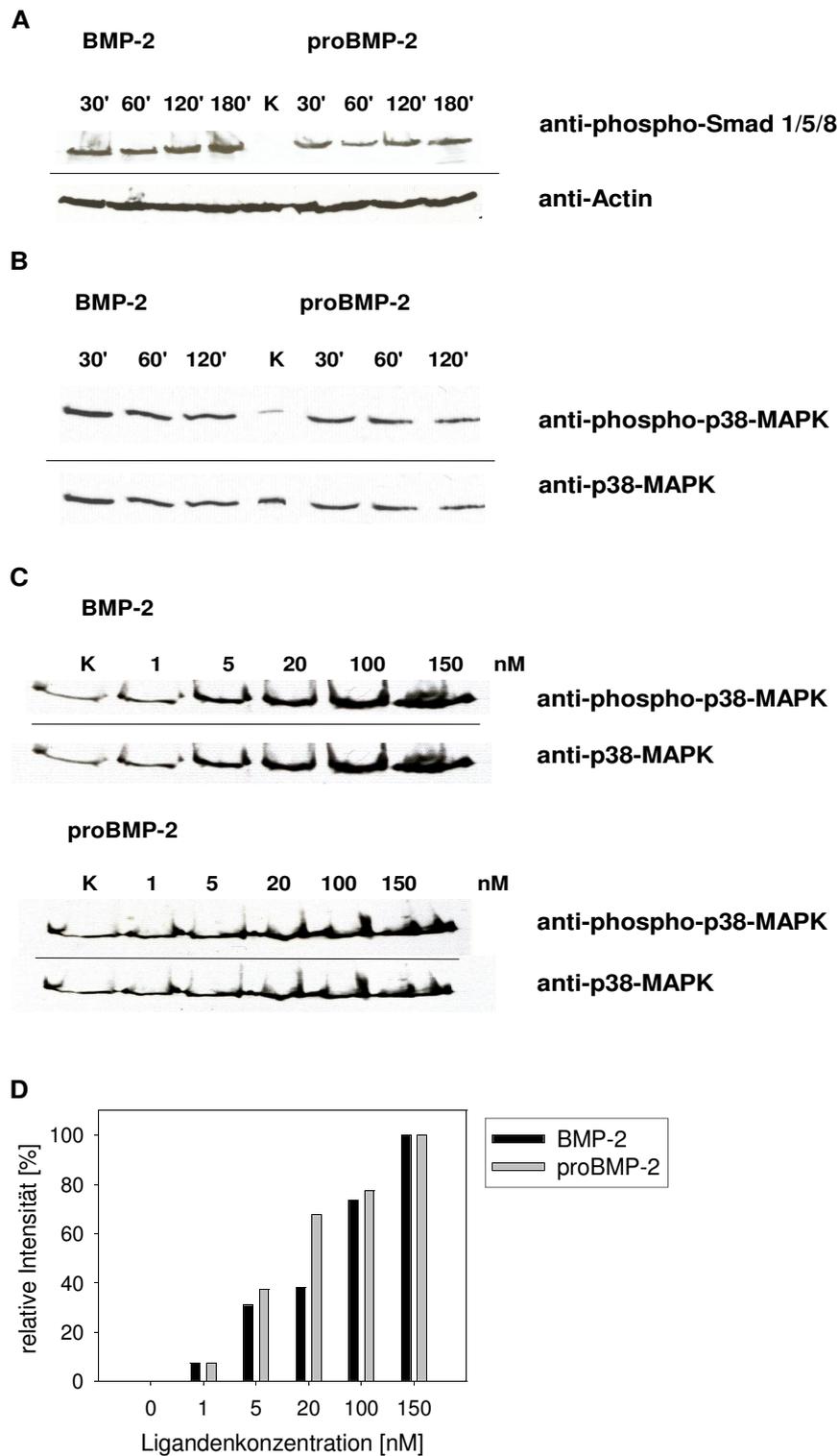


Abb. 3.5.5. Smad 1/5/8-Phosphorylierung und p38-Phosphorylierung in b/c3t3-Zellen nach Stimulation mit BMP-2 oder proBMP-2. Smad 1/5/8-Phosphorylierung nach 30- bis 180- minütiger Stimulation der Zellen mit 200 nM BMP-2 bzw. proBMP-2 (A). p38-MAPK-Phosphorylierung nach 30- bis 120- minütiger Stimulation mit 200 nM BMP-2 bzw. proBMP-2 (B). Abhängigkeit der p38-MAPK-Phosphorylierung von der Proteinkonzentration (C). In (D) Auswertung der Bandenintensität des *Western Blots* aus C bezogen auf die Negativkontrolle.

3.6. Nicht-kovalente Interaktion des BMP-2-Propeptids mit BMP-2

3.6.1. Nachweis der BMP-2-Propeptid-Interaktion durch Quervernetzung *in vitro*

Da in den Bindungsexperimenten von BMPR-II-ECD und BMP-2 nach Vorinkubation mit dem BMP-2-Propeptid eine Inhibierung der BMPR-II-Bindung durch das Propeptid festgestellt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass das Propeptid mit dem reifen Teil spezifisch interagiert und dadurch Aminosäurereste, die für die Typ-II-Rezeptorbindung notwendig sind, abschirmt (siehe auch 3.4.2.).

Daher wurde im Folgenden die Interaktion des Propeptids mit dem reifen Teil untersucht. Zunächst wurde eine chemische Quervernetzung mit anschließender Detektion der Komplexe im *Western Blot* durchgeführt, um die Interaktion qualitativ nachzuweisen. Das Experiment war grundlegend genauso aufgebaut wie das, welches für die Untersuchung der Interaktion von proBMP-2 mit der BMPR-IA-ECD verwendet wurde (3.2.6.). BMP-2 und das BMP-2-Propeptid wurden zunächst in 100 mM K-HEPES, pH 7,0 1 h lang inkubiert um eine Bindung zu ermöglichen, dann erfolgte die Zugabe des Quervernetzungsreagenzes BS³. Die Konzentration beider Bindungspartner betrug 5 μ M, da BMP-2 bei Konzentrationen über 10 μ M bei pH 7,0 nicht löslich ist. Nach dem Abstoppen der Quervernetzungsreaktion wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, und die Komplexe anschließend im *Western Blot* nachgewiesen. Sowohl mit Propeptid-Antikörper als auch mit BMP-2-Antikörper konnten in den Quervernetzungsproben (Abb. 3.6.1., Spur 4) Banden auf der Höhe von proBMP-2, das als Kontrolle diente, nachgewiesen werden. Diese Banden fehlten in den Proben, in denen nur einer der Bindungspartner eingesetzt worden war. Aufgrund des Laufverhaltens des Komplexes auf der gleichen Höhe wie proBMP-2 kann davon ausgegangen werden, dass von einem BMP-2-Dimer zwei Propeptidmonomere gebunden werden. Damit konnte die Bildung eines Komplexes des Propeptids mit BMP-2 bestätigt werden.

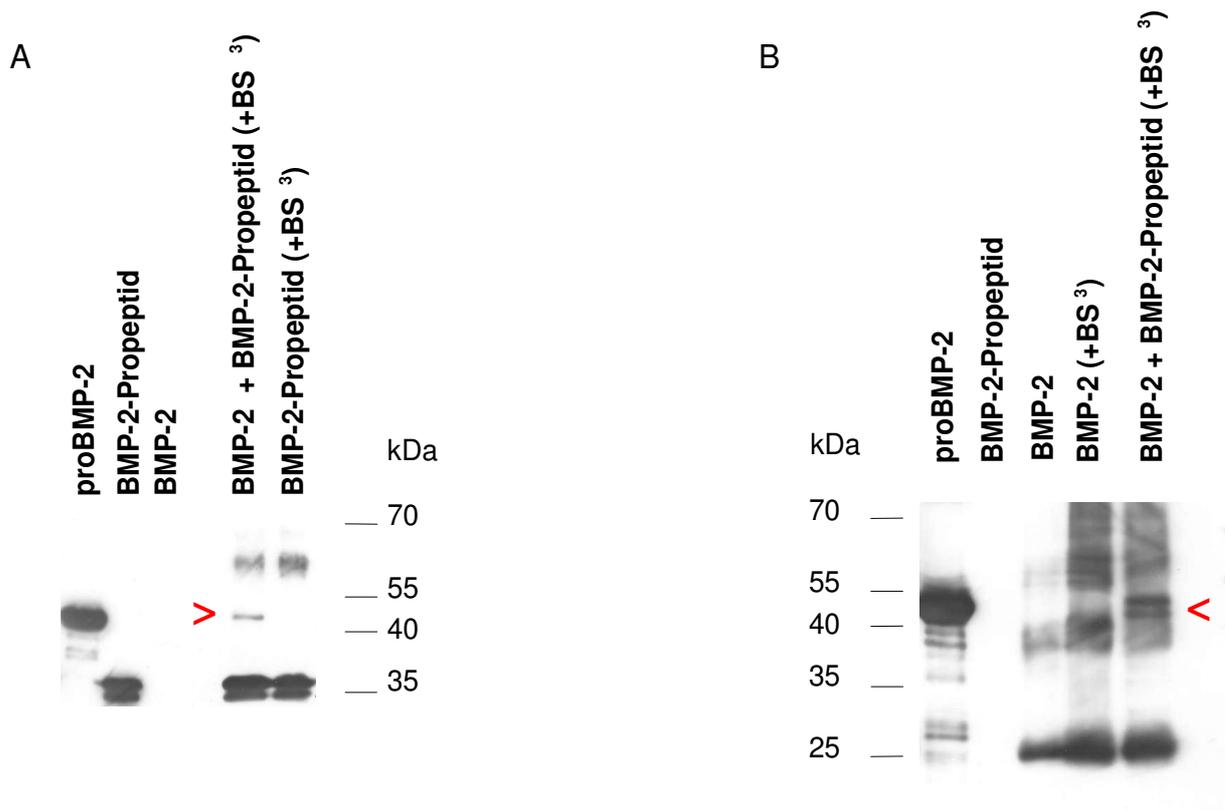


Abb. 3.6.1. Nachweis des Komplexes aus BMP-2 und dem nicht-kovalent gebundenen Propeptid nach chemischer Quervernetzung im *Western Blot*. Der immunologische Nachweis erfolgte in A) mit Antikörper gegen das BMP-2-Propeptid und in B) mit BMP-2-Antikörper. Die roten Pfeile kennzeichnen den BMP-2-Propeptidkomplex.

3.6.2. Nachweis der nicht-kovalenten Interaktion des Propeptids mit reifem BMP-2 durch Oberflächenplasmonresonanz

Die quantitative Charakterisierung und Bestätigung der nicht-kovalenten Interaktion des Propeptids mit BMP-2 erfolgte mittels BIACORE. Hierfür wurde das BMP-2-Propeptid auf einem CM5-Chip durch Aminkopplung immobilisiert (2.2.4.1.). Dann erfolgte die Bestimmung der Bindungskinetiken mit BMP-2 in verschiedenen Konzentrationen. Für die Auswertung wurde eine 1 : 1-Interaktion zugrunde gelegt, da die Immobilisierungsdichte der Propeptidmoleküle auf der Oberfläche des Chips wahrscheinlich nicht so hoch war, dass zwei Propeptidmoleküle von einem BMP-2-Dimer gebunden werden konnten. Es konnte eine apparente Dissoziationskonstante von 28 nM ermittelt werden (Abb. 3.6.2.). Die Interaktion

von BMP-2 mit dem freien Propeptid ist also weniger stark als die Interaktion mit dem hochaffinen Typ-I-Rezeptor ($K_D = 4 \text{ nM}$), aber stärker als mit dem weniger affinen Typ-II-Rezeptor ($K_D = 60 \text{ nM}$). Damit könnte erklärt werden, dass der Typ-II-Rezeptor das nicht-kovalent gebundene Propeptid nicht verdrängen kann und deshalb in Anwesenheit des Propeptids keine Bindung von BMP-2 an den BMPR-II erfolgt (vgl. 3.4.2.).

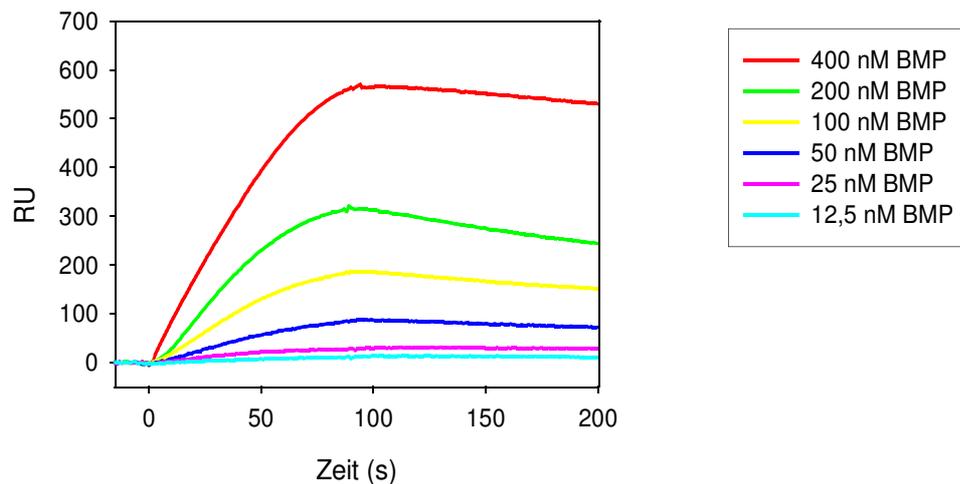


Abb. 3.6.2. Oberflächenplasmonresonanzmessungen für die Interaktion von BMP-2 mit dem BMP-2-Propeptid. Das Propeptid wurde auf dem CM5-Chip immobilisiert und die kinetischen Messungen mit den angegebenen BMP-2-Konzentrationen durchgeführt.

	$k_a [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_d [\text{s}^{-1}]$	$K_D [\text{nM}]$
BMP-2	$8.9 \pm 4.1 \times 10^4$	$2.5 \pm 0.3 \times 10^{-3}$	28 (± 16)

Tabelle 3. Kinetische Daten zur Interaktion von BMP-2 mit dem BMP-2-Propeptid.

3.7. Identifizierung einer Subdomäne im BMP-2-Propeptid

In einer früheren Dissertation der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das BMP-2-Propeptid eine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur mit vom Lösungsmittel abgeschirmten Bereichen besitzt (Frank Hillger 2004; Hillger et al. 2005). Aus CD-Spektren konnte abgeleitet werden, dass im Propeptid wahrscheinlich vorwiegend β -Faltblattstrukturen dominieren. Denaturierungsmittel-induzierte Übergänge, die mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt wurden, zeigten, dass das Propeptid eine unabhängig faltende Domäne darstellt. Außerdem konnte aus dem Vergleich zwischen freiem Propeptid und dem Propeptid in Verbindung mit BMP-2 festgestellt werden, dass der reife Teil das Propeptid thermodynamisch stabilisiert (Abb. 3.7.1.). Die Lage und die Eigenschaften von Sekundärstrukturelementen sind bis jetzt jedoch noch unbekannt, da kein Strukturmodell eines Propeptids der BMP-Familie zur Verfügung steht. Als Möglichkeit, Erkenntnisse über die Struktur des Propeptids zu erhalten, bieten sich z.B. NMR-spektroskopische Untersuchungen an. Für diese ist das Propeptid mit einer Größe von 32 kDa aber zu groß. Daher war es ein Ziel der Arbeit, unabhängig faltende Fragmente zu identifizieren, die nach rekombinanter Herstellung durch NMR-Spektroskopie untersucht werden können.

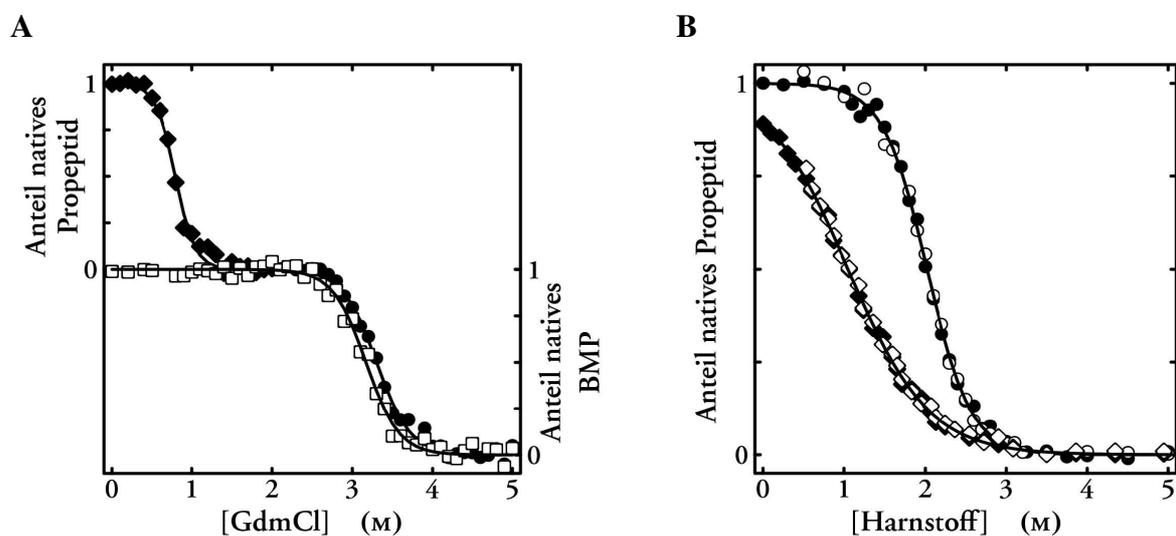


Abb. 3.7.1. Denaturierungsmittel-induzierte Übergänge aus (Frank Hillger 2004). ProBMP-2 (schwarze Symbole) und BMP-2 (offene Symbole) wurden mit Guanidiniumchlorid entfaltet (A). Die Entfaltung wurde über die Fluoreszenzemission bei 320 bzw. 360 nm verfolgt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Vor der Messung wurden die Proben bei den entsprechenden Guanidiniumchloridkonzentrationen für 24 h inkubiert. In (B) sind die Faltung (offene Symbole) und Entfaltung (schwarze Symbole) des freien Propeptids (Rautensymbole) und des Propeptids in Verbindung mit dem reifen Teil (Kreise) dargestellt.

Um Erkenntnisse über die Struktur des BMP-2-Propeptids zu gewinnen, wurden die nach limitierter Proteolyse mit Trypsin entstandenen Fragmente untersucht (Abb. 3.7.2.). Durch diese Methode kann das Vorhandensein von gefalteten Subdomänen überprüft werden, da Proteasen zuerst in leichter zugänglichen, an der Proteinoberfläche liegenden bzw. exponierten Bereichen schneiden. Für die Proteolyse wurde die Protease Trypsin ausgewählt, für die mehr als 30 Schnittstellen im Propeptid vorhanden sind und für die deshalb die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass einige Schnittstellen in Bereichen liegen, die durch Faltung vor proteolytischem Abbau geschützt sind.

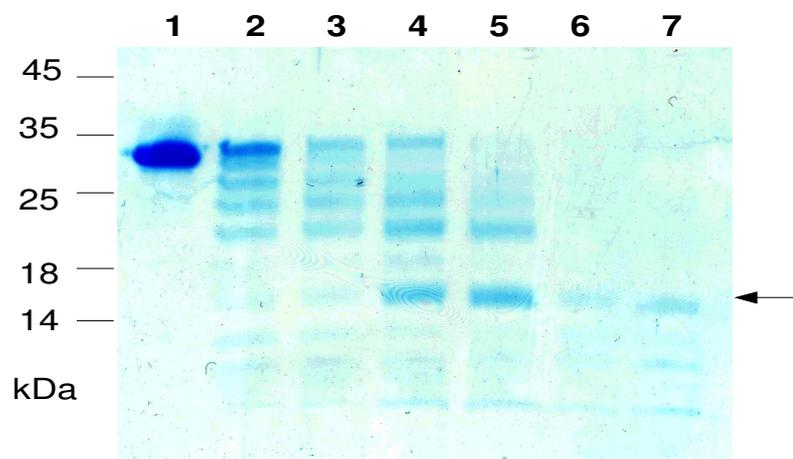


Abb. 3.7.2. Limitierte Proteolyse des BMP-2-Propeptids mit Trypsin. In Spur 1 wurde ungespaltenes Propeptid aufgetragen. Molares Verhältnis Trypsin/BMP-2-Propeptid im Proteolyseansatz: 1/2500 (Spur 2); 1/2000 (Spur 3); 1/1000 (Spur 4); 1/500 (Spur 5); 1/250 (Spur 6); 1/100 (Spur 7). Die Proteolyse wurde bei 25 °C für 30 min in 100 mM K-HEPES, pH 7,0 durchgeführt. Der Pfeil kennzeichnet ein proteolysestabiles Fragment, das massenspektrometrisch untersucht wurde.

Zunächst wurden die bei der Proteolyse entstehenden Fragmente mittels SDS-PAGE analysiert. Wie in Abb. 3.7.2. dargestellt, zeichnete sich dabei besonders ein Fragment einer Größe von etwa 15 kDa durch besondere Proteolyseresistenz aus. Um dieses Fragment eindeutig identifizieren zu können, wurde daraufhin eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Dazu erfolgte die Untersuchung der Proteolyseansätze nach definierten Inkubationszeiten mit definierten Proteasekonzentrationen mittels MALDI-TOF-MS (2.2.6.2.).

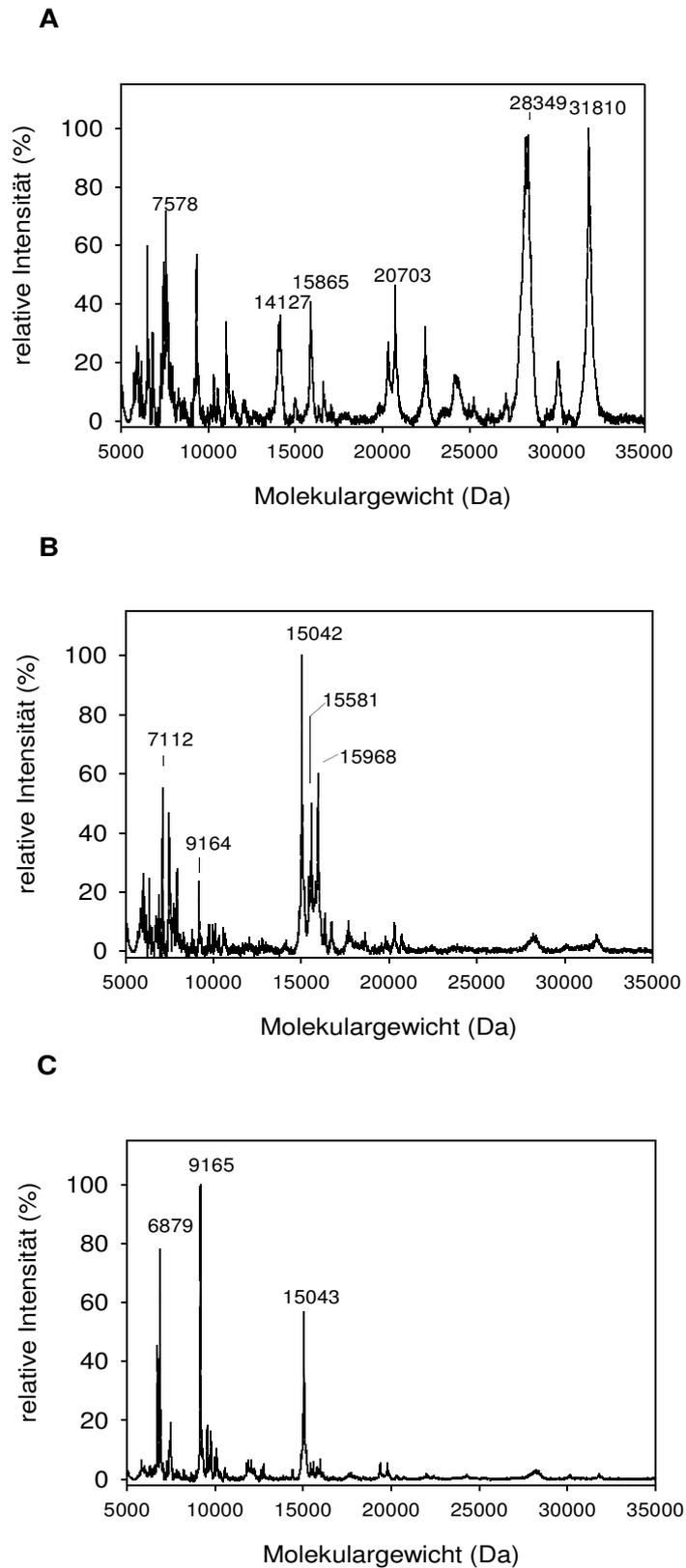


Abb. 3.7.3. Bestimmung des Molekulargewichts der BMP-2-Propeptid-Fragmente nach limitierter Proteolyse durch MALDI-TOF-MS. Trypsin wurde in einem molaren Verhältnis von 1/2500 (A), 1:500 (B) bzw. 1/50 (C) zum Propeptid eingesetzt.

Mit steigender Trypsinkonzentration wurden zunehmend kleinere Fragmente beobachtet (Abb. 3.7.3. A – C). Bei geringen Trypsinkonzentrationen (A) waren Fragmente mit der höchsten Intensität bei einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa zu finden, also kaum unter dem Molekulargewicht des intakten Propeptids von 32 kDa. Das Spektrum der gefundenen Fragmente verschob sich dann zu Massen um 15 kDa bei mittlerer Trypsinkonzentration bis hin zu Massen von unter 10 kDa bei der höchsten eingesetzten Trypsinkonzentration. Ein Fragment mit dem Molekulargewicht von 15043 Da war jedoch auch bei einem Verhältnis von Trypsin zu Propeptid von 1/50 noch vorhanden (Abb. 3.7.3. C). Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich hier um das bereits in der SDS-PAGE beobachtete stabile Fragment (Abb. 3.7.2.). Auch bei der Proteolyse von proBMP-2 wurde dieses Fragment beobachtet (Abb. 3.7.4.). Nach der Analyse der Aminosäuresequenz des Propeptids im Hinblick auf Fragmente mit diesem Molekulargewicht konnte der gelb markierte Bereich als das stabile Fragment (15029 Da) identifiziert werden (Abb. 3.7.5.).

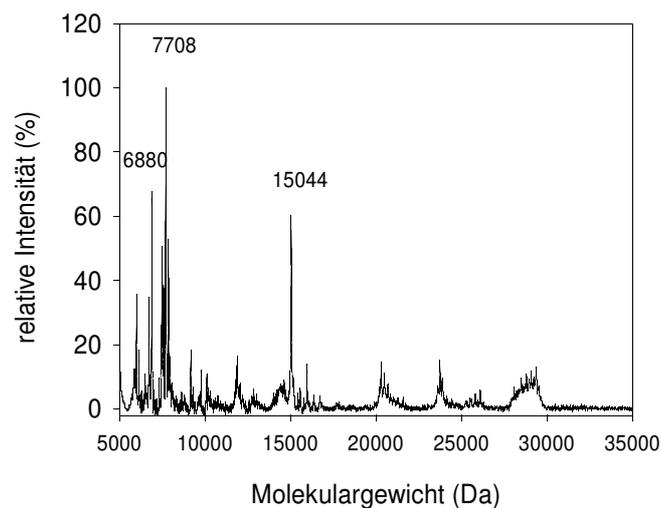


Abb. 3.7.4. Analyse der Fragmente von proBMP-2, die bei der limitierten Proteolyse mit Trypsin im molaren Verhältnis von 1/500 zu proBMP-2 entstanden durch MALDI-TOF.

Da die tatsächlich gefundene Masse des Fragments von 15043 Da um ca. 13 Da von der theoretisch erwarteten Masse abwich, wurden auch die anderen Fragmente im Bereich um 15000 Da berücksichtigt. Es zeigte sich, dass die beiden intensitätsstarken Fragmente mit Molekulargewichten von 15581 Da und 15968 Da denselben Sequenzbereich einschließen. Da sie jedoch höhere Massen aufweisen, sollten sie entweder C-terminal (112 – 246) oder N-terminal (103 – 242) weitere zusätzliche Aminosäurereste beinhalten (Abb. 3.7.3. B bzw. Tabelle 4).

Gemessene Masse (Da) (<i>average mass</i>)	Theoretische Masse (Da)	Abweichung (Da)	Sequenz (AS-Nr.)
15042	15029	13	112 - 242
15581	15577	4	112 - 246
15968	15956	12	103 - 242

Tabelle 4. Vergleich der mit MALDI-TOF-MS gefundenen Massen der Fragmente im Bereich von 15 kDa aus Abb. 3.7.3. B mit den theoretisch möglichen Fragmenten in diesem Bereich. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht Abb. 3.7.5..

BMP-2-Propeptid (32014.9 Da)

10 20 30 40 50 60
 GSSHHHHHHS SGLVPRGSHM GAAGLVPELG RRFKFAAASSG RPSSQPSDEV LSEFELRLLS

70 80 90 100 110 120
 MFGLKQRPTP SRDAVVPYIM LDLYRRHSGQ PGSPAPDHRL ERAASRANTV RSFHHEESLE

130 140 150 160 170 180
ELPETSSGKTT RRRFFNLSSI PTEEFITSAE LQVFREOMOD ALGNSSSFHH RINIYEIIKP

190 200 210 220 230 240
ATANSKFPVLT RLLDTRLVNQ NASRWESFDV TPAVMRWTAO GHANHGFEVVE VAHLEEKQGV

250 260 270 280
SKRHVRISRS LHQDEHSWSQ IRPLLVTFGH DGKGHPLHKKR EKR

Abb. 3.7.5. Sequenz des BMP-2-Propeptids. Das durch limitierte Proteolyse und Massenanalyse identifizierte stabile Fragment ist gelb markiert. Die unterstrichenen Bereiche wurden nach vollständiger proteolytischer Spaltung des stabilen Fragments mittels ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS gefunden.

Um die Identität des gefundenen Fragmentes zu bestätigen, wurden außerdem weitere massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Dazu wurde die Bande des 15 kDa großen Fragmentes (Abb. 3.7.2.) aus dem Gel ausgeschnitten und nach einer "in Gel"-Spaltung mit Trypsin die entstandenen Fragmente mittels ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS untersucht (Peptidmassen-*fingerprint*-Analyse). Dabei konnten die in Abb. 3.7.5. unterstrichenen Fragmente identifiziert werden. Alle liegen innerhalb des bereits durch MALDI-TOF-MS identifizierten Fragmentes mit einer Größe von 15029 Da. Damit kann dessen Identität als gesichert betrachtet werden.

4. Diskussion

Propeptide spielen bei der Regulation der biologischen Aktivität von Proteinen der TGF- β -Familie eine entscheidende Rolle. Sie können nicht nur die Faltung und Prozessierung der reifen Partner beeinflussen, sondern bleiben in vielen Fällen auch nach der Reifung und Sekretion mit den murenen Wachstumsfaktoren assoziiert. Knochenwachstumsfaktoren der TGF- β -Familie, und unter ihnen vor allem BMP-2, sind für die Anwendung in vielen therapeutischen Bereichen von besonderem Interesse. Jedoch war über die Struktur und Funktion des Propeptids von BMP-2 bisher wenig bekannt. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluß des Propeptids auf die Eigenschaften des Gesamtproteins besonders im Hinblick auf die Bindung an Rezeptoren und die Induktion intrazellulärer Signale zu untersuchen.

4.1. Einfluss des BMP-2-Propeptids auf die Bindung von BMP-2 an BMPR-IA und BMPR-II

Der Einfluß des BMP-2-Propeptids auf die Rezeptorbindung wurde an einem Vertreter der Typ-I-Rezeptoren, BMPR-IA und einem Vertreter der Typ-II-Rezeptoren, BMPR-II untersucht. Diese beiden Rezeptoren sind weit verbreitet und werden von BMP-2 bevorzugt gebunden (Shimasaki et al. 2004).

Das BMP-2-Propeptid beeinflusst die BMPR-IA-Bindung kaum, was sich in der, im Vergleich zu BMP-2, nur wenig erhöhten Dissoziationskonstante für die Interaktion von proBMP-2 mit BMPR-IA widerspiegelt. Es sind verschiedene Mechanismen für die Rezeptorbindung von proBMP-2 an BMPR-IA denkbar. Möglich wäre eine Verdrängung des Propeptids durch den BMPR-IA. Dafür spricht die langsamere Assoziation, die mit proBMP-2 beobachtet wurde. Auf der anderen Seite besteht auch die Möglichkeit, dass das Propeptid, aufgrund seiner Lage, die für die BMPR-IA-Bindung essentiellen Reste auf dem BMP-2-Dimer nicht abschirmt, womit sich ein indirekter Hinweis auf die Lage des Propeptids ergäbe. Für diese These spricht die Tatsache, dass proBMP-2 auch in der Lage ist, Noggin, einen BMP-2-Antagonisten zu binden (Anja Buttstedt 2007). Die Noggin-Bindestelle in BMP-2 ist zu großen Teilen mit der Bindestelle für die Typ-I-Rezeptoren identisch, umfasst jedoch auch Reste der Bindestelle für Typ-II-Rezeptoren (Groppe et al. 2002). Aufschluß hierüber könnte

nur die Aufklärung der 3D-Struktur von proBMP-2 bringen. Leider stehen weder für proBMP-2 noch für die Proformen verwandter BMPs Strukturdaten zur Verfügung, die Informationen über die Lage des Propeptids enthalten.

BMP-2 scheint somit zu den Mitgliedern der TGF- β -Familie zu gehören, deren Typ-I-Rezeptorbindung nicht durch die Anwesenheit des Propeptids beeinträchtigt wird, wie es z.B. auch bei BMP-7 (Sengle et al. 2008b) oder BMP-9 (Brown et al. 2005) der Fall ist.

Im Zuge der Untersuchung der Interaktion von proBMP-2 mit BMPR-IA konnte auch festgestellt werden, dass Heparin die Interaktion sowohl von BMP-2 als auch von proBMP-2 mit BMPR-IA inhibiert. Die hier dargestellten Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen von (Kanzaki et al. 2008), wonach Heparin durch die Bindung an sowohl BMP-2 als auch BMPR-IA die Rezeptorbindung von BMP-2 verhindert und somit die osteogene Aktivität von BMP-2 inhibiert. Diese Erkenntnisse werden in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. In anderen Studien wurde festgestellt, dass Heparin die Stimulation der osteogenen Differenzierung durch BMP-2 positiv beeinflusst (Zhao et al. 2006). Möglicherweise verlängert Heparin die Halbwertszeit von BMP-2 im Gewebe indem es vor dem Abbau durch extrazelluläre Proteasen schützt bzw. indem es BMP-2 lokal konzentriert und für eine verlängerte Halbwertszeit des Wachstumsfaktors im Gewebe und damit stärkere osteoinduktive Effekte sorgt (Würzler et al. 2004). Vor kurzem wurde auch entdeckt, dass die Differenzierung von Osteoblasten durch Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) vermittelt werden kann (Haupt et al. 2009). Während der osteoblastischen Differenzierung wurde eine verstärkte Expression von Glypican-3 festgestellt, einem Proteoglykan, das als HSPG mit Heparansulfat assoziiert vorliegt. Bei der Unterdrückung der Glypican-3-Expression durch *siRNA-Knockdown* wurde auch die Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors Runx2 unterdrückt. Diese neuen Erkenntnisse sprechen also für positive Effekte von Heparansulfat-Proteoglykanen auf die osteoblastische Differenzierung. Da in der vorliegenden Arbeit nur *in vitro* die Inhibierung der Bindung von BMP-2 an BMPR-IA-ECD durch Heparin festgestellt wurde, ist die Aussagekraft in Bezug auf die Wirkung von Heparin im zellulären Kontext beschränkt.

Nachdem kein Einfluß des Propeptids auf die Bindung eines Typ-I-Rezeptors an BMP-2 festzustellen war, wurde die Bindung der Pro-Form an den Typ-II-Rezeptor untersucht. Für die Induktion intrazellulärer Signale ist eine Bindung des Liganden an beide Rezeptoren notwendig. Im Gegensatz zu BMP-2 war proBMP-2 nicht in der Lage, BMPR-II zu binden. Auch das nicht-kovalent gebundene Propeptid inhibierte im Komplex mit BMP-2 dessen

Bindung an BMPR-II. Dadurch ist ein Verdrängungsmechanismus, wie er für BMP-7 bei der BMPR-II-Bindung beschrieben wurde (Sengle et al. 2008b), ausgeschlossen. Die Ergebnisse lassen hingegen den Schluß zu, dass das Propeptid so positioniert ist, dass es die Typ-II-Rezeptor-Bindestelle auf dem BMP-2-Dimer abschirmt, während die Typ-I-Rezeptorbindestelle unbeeinflusst bleibt. Die Typ-II-Rezeptorbindestelle befindet sich auf der äusseren konvexen Seite der "Finger"-Region des BMP-2 (Allendorph et al. 2006; s. a. 1.3.). Diese Hypothese wird von (Walton et al. 2009) unterstützt, die die Bindungsstelle zwischen Propeptid und reifem Teil der Inhibin α -Untereinheit, die ebenfalls ein Mitglied der TGF- β -Familie ist, durch *in vitro* Mutagenesestudien untersuchten. Dort konnten hydrophobe Reste in beiden Domänen identifiziert werden, die für die Interaktion zwischen Propeptid und reifem Teil von Bedeutung sind. Da die Mitglieder der TGF- β -Familie Homologien in Struktur und Sequenz aufweisen (s.a. 1.2.), und die identifizierten hydrophoben Reste von Inhibin α in fast identischer Form auch bei BMP-2 vorhanden sind, ist davon auszugehen, dass die Interaktion zwischen Propeptid und reifem Teil bei der Inhibin α -Untereinheit und proBMP-2 strukturell ähnlich ist. Die von (Walton et al. 2009) identifizierte Propeptidbindestelle liegt ebenfalls auf der äußeren konvexen Seite der "Finger"-Region von BMP-2 und überlappt mit der Typ-II-Rezeptorbindestelle, wodurch Propeptid und BMPR-II um die BMP-2-Bindung konkurrieren. In Übereinstimmung damit wurde mit Inhibin α eine Inhibierung der Typ-II-Rezeptorbindung durch das Propeptid festgestellt (Walton et al. 2009). Auch für TGF- β selbst wurde bereits eine Propeptidbindestelle identifiziert, die sich in der Region für die Typ-II-Rezeptorbindung befindet (Young & Murphy-Ullrich 2004).

4.2. Aktivierung von zellulären Signalwegen durch proBMP-2

4.2.1. Aktivierung von zellulären Signalwegen durch proBMP-2 in C2C12-Zellen

Nachdem der Einfluß des Propeptids auf die Bindung von BMP-2 an Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren am Beispiel von BMPR-IA und BMPR-II aufgeklärt werden konnte, wurde die Auswirkung der veränderten Rezeptorbindungseigenschaften von BMP-2 im Kontext mit seinem Propeptid auf die Induktion intrazellulärer Signale untersucht.

Es war bereits bekannt, dass proBMP-2, ebenso wie das Propeptid allein, im Gegensatz zu BMP-2 nicht die Differenzierung von Myoblastenvorläuferzellen zu Osteoblasten induziert (Matthias Krause 2003). Darüber hinaus hatten sowohl proBMP-2 als auch das BMP-2-

Propeptid eine inhibitorische Wirkung auf die Induktion der Alkalischen Phosphatase als Markerenzym für die osteogene Differenzierung durch BMP-2, wenn sie gleichzeitig eingesetzt wurden. Diese Beobachtung könnte durch eine Konkurrenz von proBMP-2 und BMP-2 um den BMPR-IA erklärt werden. Möglicherweise ist proBMP-2, obwohl es mit BMPR-IA interagieren kann, nicht in der Lage, zelluläre Signale auszulösen, die Differenzierungsvorgänge induzieren. Die Beobachtung, dass proBMP-2 den p38-MAPK-Signalweg in C2C12-Zellen nicht aktivieren kann, ist konsistent mit der Tatsache, dass proBMP-2 zu keiner ALP-Induktion führt. Eine p38-abhängige Signalkaskade, die zur Induktion der ALP führte, wurde vor einigen Jahren publiziert (Gallea et al. 2001; Guicheux et al. 2003; Hsu et al. 2007).

Im Gegensatz zum p38-MAPK-Signalweg wurde jedoch mit proBMP-2 eine Aktivierung von Smad-1/5/8-Signalen beobachtet, die neben dem p38-Signalweg einen weiteren wichtigen BMP-induzierten Signalweg darstellen (Massagué 2000). Da die Konzentration von 200 nM proBMP-2, die zur Stimulation der C2C12-Zellen eingesetzt wurde, physiologisch allerdings nicht relevant ist, wurde mit dem in dieser Arbeit hergestellten proBMP-2 auch die Induktion von pSmad 1/5/8-Signalen mit einer niedrigeren Konzentration von nur 10 nM proBMP-2 untersucht. Dieses Experiment wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Knaus in Berlin durchgeführt. Mit 10 nM proBMP-2, einer wahrscheinlich physiologischen Konzentration, konnte dort keine Smad 1/5/8-Phosphorylierung festgestellt werden (Hauburger et al. 2009).

Das Ergebnis, dass proBMP-2 bei höheren Konzentrationen Smad-Signale aktivieren kann, wurde durch ein Luciferase-Reporterexperiment (Nohe et al. 2002b), das ebenfalls in Berlin durchgeführt wurde, bestätigt (Hauburger et al. 2009). Hierzu wurden die C2C12-Zellen mit einem Vektor transfiziert (pSBE-luc), der ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines Promotors enthielt, der von einem *smad binding element* (SBE) gesteuert wird (Jonk et al. 1998). Das Luciferasereportergen wird nur bei Aktivierung des Smad 1/5/8-Signalweges transkribiert. Die Luciferase kann dann im Zelllysate nachgewiesen werden. In diesem Experiment wurde bereits in Anwesenheit von 50 nM proBMP-2 eine nur wenig geringere Luciferaseaktivität als mit der gleichen Konzentration an BMP-2 beobachtet (Hauburger et al. 2009). Im Unterschied zu BMP-2 konnte bei proBMP-2 in Konzentrationen unter 10 nM keine Luciferase nachgewiesen werden. Bei höheren Konzentrationen nahm die Luciferaseaktivität jedoch stark zu, so dass sie bei 50 nM fast das Niveau von BMP-2 erreichte. Bei diesem Test war jedoch die Inkubationszeit mit den Liganden länger, nämlich 16 h im Vergleich zu 120 min für den Test auf Smad 1/5/8-Phosphorylierung. Ein Abbau von proBMP-2 zu BMP-2 durch extrazelluläre Proteasen konnte mittels *Western Blot*-Analyse des

Kulturüberstandes nach 16 h ausgeschlossen werden. Es ist also davon auszugehen, dass proBMP-2 Smad 1/5/8-Signale in C2C12-Zellen bei höheren Konzentrationen und/oder längeren Inkubationszeiten aktivieren kann.

Einige Publikationen weisen darauf hin, dass auch über die Smad 1/5/8-Signalkaskade eine ALP-Induktion möglich ist (Aoki et al. 2001; Fujii et al. 1999). Jedoch wurden hier die Smad-Proteine in den C2C12-Zellen überexprimiert, und es wurden nur Effekte von BMP-4, BMP-6, BMP-7 und GDF-5 untersucht. Hinzu kommt, dass die BMP-Signalwege innerhalb der Zelle vernetzt sind (Herpin & Cunningham 2007b). Daher beeinflusst eine Überexpression von Smad-Proteinen möglicherweise auch den p38-Signalweg, so dass dann ALP induziert werden kann. Die p38-Phosphorylierung wurde in den vorgenannten Publikationen nicht untersucht. In C2C12-Zellen hingegen, die keine Smad-Proteine überexprimieren, wurde keine p38-unabhängige ALP-Induktion beobachtet. So wurde anhand einer BMPR-II-Mutante, die zwar die Smad-Phosphorylierung, nicht aber die p38-Phosphorylierung aktivieren konnte, auch nur eine minimale BMP-2-induzierte ALP-Aktivität festgestellt (Nohe et al. 2002b).

Im Kontext zu den Ergebnissen der Rezeptorbindungsstudien war die Aktivierung des Smad 1/5/8-Signalweges durch proBMP-2 eher unerwartet, da ohne Interaktion mit BMPR-II eine Bildung des ternären Rezeptorkomplexes unwahrscheinlich ist. Die Ausbildung eines solchen Komplexes ist jedoch für die Transphosphorylierung des Typ-I-Rezeptors durch den Typ-II-Rezeptor als Schlüsselereignis für die Aktivierung der Signalkaskaden notwendig (s.a. 1.3.). Der Smad-Signalweg wird durch die BMP-Bindung an sogenannte *preformed complexes* aus Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren aktiviert. Möglicherweise unterscheidet sich die Affinität von proBMP-2 zu den isolierten Rezeptoren, wie sie hier *in vitro* bestimmt wurde, von der Affinität zum *preformed complex in vivo*. Eventuell spielen bei der Rezeptorbindung *in vivo* auch noch andere Faktoren, wie die Glykosylierung der beteiligten Bindungspartner oder die Umgebung der Rezeptoren, die *in vivo* in der Zellmembran vorliegen, eine entscheidende Rolle.

Offenbar unterscheidet proBMP-2 zwischen der Bindung an *preformed complexes* und dem sequentiellen Bindungsmodus, da der p38-Signalweg, der durch die ligandeninduzierte Oligomerisierung aktiviert wird (sequentieller Bindungsmodus), in C2C12-Zellen offensichtlich nicht angeschaltet wurde. Wie unter 3.3. beschrieben, erfolgt eine Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA, also sollte proBMP-2 nach der BMPR-IA-Bindung im Gegensatz zu BMP-2 nicht in der Lage sein, den Typ-II-Rezeptor in den Komplex zu rekrutieren.

Dass manche BMPs, sogar im Komplex mit dem Propeptid, die Smad 1/5/8-Phosphorylierung und die Expression von BMP-Zielgenen induzieren können, wurde beispielsweise bei BMP-7 beobachtet (Sengle et al. 2008b). Inwieweit die Smad-Phosphorylierung ausreicht, um eine osteogene Differenzierung auszulösen, ist allerdings unklar. Es besteht Anlaß zu der Annahme, dass eine gleichzeitige p38-Phosphorylierung zumindest bei C2C12-Zellen für die Entwicklung zum osteoblastischen Phänotyp notwendig ist (Gallea et al. 2001; Guicheux et al. 2003), da die BMP-2 induzierte Expression der osteoblastischen Markerproteine ALP und Osteocalcin bei einer Blockierung dieses Signalweges durch p38-Inhibitoren stark reduziert wird. Somit wäre proBMP-2 trotz seiner Fähigkeit Smad-Phosphorylierung zu induzieren, nicht in der Lage, eine osteoblastische Differenzierung dieser Zellen auszulösen. Da die Reaktion auf BMPs je nach Zelltyp unterschiedlich ist, besteht jedoch die Möglichkeit, dass andere Zelltypen auch anders auf proBMP-2 ansprechen, wie auch am Beispiel der unterschiedlichen Reaktion der b/c3t3-Zellen und der C2C12-Zellen auf proBMP-2 deutlich wurde.

4.2.2. Aktivierung von zellulären Signalwegen durch proBMP-2 in b/c3t3-Zellen

In b/c3t3-Zellen konnte im Gegensatz zu C2C12-Zellen kein Unterschied in der Aktivierung von zellulären Signalen zwischen BMP-2 und proBMP-2 festgestellt werden, beide Proteine induzierten sowohl die Smad 1/5/8- als auch die p38-Phosphorylierung. Hinzu kommt, dass sowohl BMP-2 als auch proBMP-2 die Migration der Zellen förderten.

Die durch BMP-2 stimulierte Migration von b/c3t3-Zellen wird allerdings wahrscheinlich durch einen Smad-unabhängigen Signalweg gesteuert. So wurde in Gegenwart von BMP-2 eine Aktivierung von Cdc42 beobachtet, die für die Ausbildung von Actin-Ausstülpungen bei der Migration notwendig zu sein scheint (Gamell et al. 2008). Cdc42 ist ein Mitglied der Rho-GTPase-Familie. Diese Familie kleiner GTPasen kontrolliert die Organisation der Actinfilamente (Kardassis et al. 2009). Ein weiteres Signalprotein, dessen Aktivierung für die Migration erforderlich ist, ist PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase). Beide Signalwege werden parallel, aber unabhängig voneinander aktiviert, um eine BMP-2-abhängige Umorganisation des Actincytoskeletts als ersten Schritt der Migration auszulösen. Da auch mit proBMP-2 eine Stimulation der Migration beobachtet wurde (3.5.3.), kann proBMP-2 wahrscheinlich diese beiden Signalwege ebenfalls aktivieren. Zu den *Downstream*-Kinasen

der Rho-GTPasen gehört auch die p38-MAPK (Deaton et al. 2005; Kardassis et al. 2009) wodurch eine Aktivierung der p38, wie sie mit proBMP-2 in b/c3t3-Zellen beobachtet wurde, möglicherweise auch über den Rho-GTPase-Weg möglich ist, also ohne direkte Aktivierung des p38-Signalwegs nach Ligandenbindung an BMP-Rezeptoren. Denkbar ist jedoch auch, dass sich die Rezeptorbindung von proBMP-2 in b/c3t3-Zellen und C2C12-Zellen unterscheidet.

Wahrscheinlich spielen bei der unterschiedlichen Antwort von C2C12-Myoblastenvorläuferzellen und b/c3t3-Fibroblasten auch unterschiedliche Expressionsmuster von BMP-Rezeptoren eine Rolle, zumal b/c3t3-Zellen keine osteogenen Zellen sind. In C2C12-Zellen existiert z.B. eine alternative Splicevariante des BMPR-II (Nohe et al. 2004). Diese Variante weist einen verkürzten C-Terminus auf. Der C-Terminus von BMPR-II ist dahingehend von Bedeutung, dass er durch die Interaktion mit intrazellulären Signalproteinen wie z.B. der LIM-Kinase 1, eigene, vom Typ-I-Rezeptor unabhängige, Signalfunktionen übernehmen kann (s.a. 1.3.).

Im Gegensatz zu Myoblastenvorläuferzellen, wie C2C12-Zellen, und Osteoblasten zeigen Fibroblasten, wie b/c3t3-Zellen, keine osteogene Antwort, wenn sie mit BMP-2 stimuliert werden. Nachdem diese Zellen BMP-2 ausgesetzt worden waren, konnten weder erhöhte Osteocalcin- bzw. ALP-Werte noch eine Mineralisierung der Extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (Liu et al. 2009). Die fehlende ALP-Induktion nach BMP-2-Stimulation konnte auch mit den hier verwendeten b/c3t3-Zellen beobachtet werden (Sabrina von Einem, Martin-Luther-Universität Halle, unveröffentlichte Daten). Es wurde von (Liu et al. 2009) postuliert, dass dieses Phänomen durch das im Vergleich zu Myoblasten niedrige Expressionsniveau von BMPR-IA in Fibroblasten verursacht wird, das auch nach BMP-2-Stimulation nicht ansteigt.

Obwohl Fibroblasten also durch BMP-2 offenbar nicht zur osteoblastischen Differenzierung angeregt werden können, reagieren sie dennoch, wie beschrieben, auf die Stimulation mit BMP-2 und auch proBMP-2. Dabei werden neben den Smad- und p38-Signalwegen wahrscheinlich noch weitere Signalwege aktiviert, die die Zellmigration steuern und offenbar auch durch proBMP-2 aktiviert werden können. Das vorliegende Ergebnis verdeutlicht, dass die Reaktion auf BMP-Signale stark vom Zelltyp abhängt.

4.3. Interaktion des BMP-2-Propeptids mit dem reifen Teil

Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass BMP-2, wie so viele andere BMPs auch, nicht-kovalent mit dem Propeptid interagiert. Es ist daher möglich, dass BMP-2 auch *in vivo* im Komplex mit dem Propeptid vorliegt. Dies könnte einen wesentlichen Einfluss auf die biologische Funktion von BMP-2 ausüben.

Es konnte bereits für BMP-4, BMP-7, GDF-5 und GDF-8 eine Interaktion der Propeptide mit dem jeweiligen reifen Teil nachgewiesen werden (Sengle et al. 2008a). Auch BMP-2 wurde von Sengle et al. untersucht, jedoch konnte keine Interaktion des Propeptids mit dem reifen Teil festgestellt werden. Allerdings wurde dort der Nachweis von Komplexen in Gegenwart von 1 M Harnstoff durchgeführt. Nach (Hillger et al. 2005) liegt jedoch das freie BMP-2-Propeptid bei 1 M Harnstoff schon zum Teil denaturiert vor und ist daher möglicherweise nicht mehr in der Lage, mit dem reifen Teil zu interagieren (s.a. Abb. 3.7.1.). Außerdem wurde von Sengle et al. BMP-2-Propeptid verwendet, das nach dem von (Kuo et al. 2007) publizierten Protokoll gereinigt wurde. Nach diesem Protokoll fand die Reinigung unter der ständigen Gegenwart von 8 M Harnstoff statt. Es erfolgte kein Renaturierungsschritt wie in dem hier verwendeten Protokoll (siehe 2.2.2.2.3.). Daher lag das Propeptid möglicherweise schon nach der Reinigung denaturiert vor. Möglicherweise ist das BMP-2-Propeptid im Gegensatz zu den anderen, auf ähnliche Weise gereinigten Propeptiden auch empfindlicher gegenüber Denaturierungsmitteln wie Harnstoff, wodurch es im Unterschied zu anderen Propeptiden unter den gewählten Bedingungen keine Interaktion mit dem reifen Teil zeigte.

Von Sengle et al. wurde auch festgestellt, dass das BMP-2-Propeptid, wie auch die anderen untersuchten Propeptide, hochaffin an Fibrillin bindet. Fibrillin ist ein Protein, das Bestandteil der extrazellulären Matrix des Bindegewebes ist und dort mikrofibrilläre Strukturen bildet. *Latent TGF- β Binding Proteins* (s.a. 1.4.) sind oft mit Fibrillin assoziiert, so dass man davon ausgeht, dass das mikrofibrilläre Netzwerk ein Reservoir für TGF- β -Wachstumsfaktoren darstellen könnte (Sengle et al. 2008a). Offenbar ist es eine Funktion der BMP-Propeptide, im Komplex mit den reifen Domänen eine Bindung an Fibrillin zu ermöglichen, die essentiell für die Regulation der biologischen Funktion von BMPs sein könnte.

4.4. Identifizierung einer vor Proteolyse geschützten Subdomäne des BMP-2-Propeptids

Derzeit existieren keine Strukturdaten von Propeptiden der TGF- β -Familie. Dabei wären aufgrund der wachsenden Erkenntnis über die Bedeutung der Propeptide für die Regulation der biologischen Aktivität der reifen BMPs Informationen über die Struktur von großem Vorteil. Besonders Kenntnisse zur Interaktion des Propeptids mit dem reifen Teil und der Auswirkung auf die Rezeptorbindung ist von besonderem Interesse. Dass das BMP-2-Propeptid eine definierte Sekundärstruktur besitzt, die vom reifen Teil stabilisiert wird, konnte bereits früher gezeigt werden (Hillger et al. 2005). Die Lage der Sekundärstrukturelemente sowie die Position des Propeptids relativ zum reifen Teil sowie die an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste bleiben jedoch noch aufzuklären. Dabei könnte die Identifizierung einer Subdomäne des Propeptids hilfreich sein, das einer Strukturaufklärung durch z.B. NMR-Spektroskopie möglicherweise eher zugänglich ist als das gesamte Propeptid.

BMP-2-Propeptid (32014.9 Da)

```

      10      20      30      40      50      60
GSSHHHHHHS SGLVPRGSHM GAAGLVPELG RRFKFAAASSG RPSSQPSDEV LSEFELRLLS
      70      80      90     100     110     120
MFGLKQRPTP SRDAVVPYIM LDLYRRHSGQ PGSPAPDHRL ERAASRANTV RSFHHEESLE
      130     140     150     160     170     180
ELPETSGGKTT RRFFFNLSSI PTEEFITSAE LQVFREQMQD ALGNNSSFHH RINIYEIIKP
      190     200     210     220     230     240
ATANSKFPVT RLLDTRLVNQ NASRWESFDV TPAVMRWTAQ GHANHGFVVE VAHLEEKQGV
      250     260     270     280
SKRHVRI SRS LHQDEH SWSQ IRPLLVT FGH DGKGHPLH KR EKR

```

Abb. 4.1. Aminosäuresequenz des BMP-2-Propeptids. Die durch limitierte Proteolyse in dieser Arbeit identifizierte Subdomäne ist gelb markiert. Rot markiert sind die Aminosäuren, die einem hydrophoben Motiv zuzuordnen sind, das wahrscheinlich für die Interaktion mit dem reifen Teil notwendig ist. Dieses Motiv wurde von (Walton et al. 2009) in Inhibin α identifiziert und nach Sequenzvergleich auf andere Mitglieder der TGF- β -Familie übertragen.

Jedoch dürfen auch außerhalb dieses Bereichs liegende Aminosäurereste nicht als unwichtig für die Faltung und Funktion des Propeptids betrachtet werden. Die Ergebnisse von Walton et

al. zu Inhibin α , das eine große Ähnlichkeit mit BMP-2 und anderen Mitgliedern der TGF- β -Familie aufweist, deuten darauf hin, dass besonders ein hydrophobes Motiv (in Abb. 4.1. rot markiert), das außerhalb des hier identifizierten Bereichs liegt, für die Interaktion mit dem reifen Teil von Bedeutung sein könnte. Möglicherweise ist auch eine hohe konformationelle Flexibilität des gesamten BMP-2-Propeptids bzw. der Bereiche, die mit dem reifen Teil interagieren, in Betracht zu ziehen. Die Bindung von proBMP-2 an den BMP-2-Inhibitor Noggin deutet möglicherweise darauf hin (Anja Buttstedt 2007). Eine Bindung von Noggin an proBMP-2 war eigentlich unerwartet, da ja proBMP-2 den Typ-II-Rezeptor nicht binden kann, weil das Propeptid wahrscheinlich die Typ-II-Rezeptorbindestelle blockiert (siehe 3.4.2.). Noggin interagiert aber sowohl mit Resten der Typ-I-Rezeptorbindestelle als auch mit Resten der Typ-II-Rezeptorbindestelle (Groppe et al. 2002). Dennoch ist offenbar in proBMP-2 im Gegensatz zu BMP-2 die Bindestelle für Noggin groß genug, um eine Interaktion zu erlauben. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass das Propeptid durch Noggin verdrängt werden kann. Für einen Verdrängungsmechanismus würde die langsamere Assoziation, die bei der proBMP-2-Noggin-Interaktion im Vergleich mit der BMP-2-Noggin-Interaktion beobachtet wurde, sprechen (Anja Buttstedt 2007).

Untersuchungen an GDF-8, das mit BMP-2 eine 41 %ige Sequenzidentität aufweist, geben Aufschluß über funktionelle Regionen im Propeptid (Jiang et al. 2004). Das Propeptid von GDF-8 inhibiert die biologische Funktion des reifen Teils. Von Jiang et al. wurde die inhibitorische Aktivität verschiedener verkürzter Propeptide auf GDF-8 getestet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das GDF-8-Propeptid in zwei Bereiche unterteilt werden kann. Der C-terminale Teil, beginnend bei AS 100, weist eine hohe Stabilität auf, zeigt aber geringe inhibitorische Aktivität, ist also wahrscheinlich für die Interaktion mit dem reifen GDF-8 eher von untergeordneter Bedeutung. Der N-terminale Teil zwischen AS 42 und 115 hingegen weist eine hohe inhibitorische Aktivität auf, ist ansonsten aber eher weniger stabil. Besonders der Bereich zwischen AS 42 und 53 scheint wesentlich für die Inhibierung der GDF-8-Aktivität und somit für die Interaktion mit dem reifen Teil zu sein. Dieser Bereich deckt sich teilweise auch mit dem in Inhibin α identifizierten Bereich zwischen AS 50 und 56, der für die Interaktion mit dem reifen Teil notwendig ist (Walton et al. 2009).

Übertragen auf BMP-2 würde das bedeuten, dass der C-terminale Teil des Propeptids ab AS 112, der auch in der vorliegenden Arbeit als besonders proteolyseresistent identifiziert wurde, für die Stabilität des Propeptids verantwortlich ist (s.a. Abb 4.1.). Dagegen könnte ein Motiv, das wahrscheinlich im Bereich um AS 50 liegt und eine höhere Flexibilität besitzt, die Interaktion mit dem reifen Teil vermitteln.

4.5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals wesentliche Erkenntnisse über den Einfluss des Propeptids auf die Rezeptorbindung und die Induktion intrazellulärer Signale durch BMP-2 gewonnen werden. Die dargestellten Ergebnisse können als Ausgangspunkt für die weitere Erforschung der Funktion des BMP-2-Propeptids sowie den möglichen therapeutischen Einsatz von proBMP-2 dienen. Die identifizierte Subdomäne des Propeptids stellt eine Basis für die zukünftige Analyse der Struktur des Propeptids dar.

1. Um *in vitro* die Bindung von proBMP-2 an den BMPR-IA untersuchen zu können, wurde die BMPR-IA-ECD zunächst rekombinant in *E. coli* hergestellt, renaturiert und gereinigt.
2. Mit unterschiedlichen Methoden konnte eine Bindung von proBMP-2 an die BMPR-IA-ECD nachgewiesen werden. Dabei wurde BMP-2 als Positivkontrolle eingesetzt. Die für BMP-2 ermittelte Bindungskonstante für die Interaktion mit BMPR-IA stimmte mit den Werten aus der Literatur überein. Die Affinität von proBMP-2 zu BMPR-IA war nur wenig geringer als die Affinität von BMP-2 zu BMPR-IA. Mit dem Propeptid allein konnte keine Bindung an den BMPR-IA festgestellt werden.
3. ProBMP-2 zeigte wie auch BMP-2 eine Bindung an BMPR-IA auf der Oberfläche von COS-7-Zellen.
4. Es konnte eine inhibierende Wirkung von Heparin auf die Interaktion von sowohl proBMP-2 als auch BMP-2 mit BMPR-IA *in vitro* festgestellt werden.
5. Weder proBMP-2 noch das BMP-2-Propeptid zeigten eine Bindung an die BMPR-II-ECD. Hingegen konnte mit BMP-2 eine Interaktion mit BMPR-II-ECD festgestellt werden, deren Bindungskonstante mit den Daten aus der Literatur übereinstimmte.
6. Das BMP-2-Propeptid hatte einen inhibitorischen Einfluss auf die Interaktion von BMP-2 mit der BMPR-II-ECD. Die Inhibierung wurde sowohl mit kovalent an BMP-2 gebundenem Propeptid (in proBMP-2) beobachtet als auch mit nicht-kovalent gebundenem Propeptid nach Vorinkubation mit BMP-2.
7. Das freie BMP-2-Propeptid interagiert mit dem reifen Teil. Die Dissoziationskonstante, die für diese Interaktion ermittelt wurde, beträgt 28 nM.

8. Bei der Untersuchung der Induktion von zellulären Signalen durch proBMP-2 in C2C12-Zellen wurde festgestellt, dass die p38-Phosphorylierung auch mit hohen proBMP-2-Konzentrationen nicht induziert werden konnte. Eine Smad 1/5/8-Phosphorylierung wurde hingegen bei höheren proBMP-2-Konzentrationen und/oder längeren Inkubationszeiten festgestellt. Durch die mangelnde p38-Phosphorylierung nach Stimulation mit proBMP-2 ist auch die fehlende ALP-Induktion in C2C12-Zellen, die mit proBMP-2 bereits früher beobachtet worden war, erklärbar.
9. In b/c3t3-Zellen hingegen erfolgte mit proBMP-2 sowohl die Induktion der p38-Phosphorylierung als auch eine Smad 1/5/8-Phosphorylierung. Mit BMP-2 wurde in beiden Zelltypen die Induktion beider Signalwege festgestellt.
10. Innerhalb des BMP-2-Propeptids konnte eine Subdomäne identifiziert werden, die eine erhöhte Proteolyseresistenz aufweist und als Grundlage für zukünftige Untersuchungen der Struktur des BMP-2-Propeptids dienen soll.

Literaturverzeichnis

- Allendorph, G.P., Vale, W.W. & Choe, S. (2006) Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci U S A* , **103**, 7643-8.
- Aoki, H., Fujii, M., Imamura, T., Yagi, K., Takehara, K., Kato, M. & Miyazono, K. (2001) Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci* , **114**, 1483-1489.
- Attisano, L. & Wrana, J.L. (1996) Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* , **7**, 327-339.
- Beck, S., Le Good, J.A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F. & Constam, D.B. (2002) Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* , **4**, 981-985.
- Benglis, D., Wang, M.Y. & Levi, A.D. (2008) A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery*, **62**, (5 Suppl 2): ONS423-431.
- Bessa, P.C., Casal, M. & Reis, R.L. (2008) Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med*, **2**, 81-96.
- Betz, O.B., Betz, V.M., Nazarian, A., Pilapil, C.G., Vrahas, M.S., Bouxsein, M.L., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A. & Evans, C.H. (2006) Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, **88**, 355-365.
- Bishop, G.B. & Einhorn, T.A. (2007) Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop*, **31**, 721-727.
- Blanco Calvo, M., Bolós Fernández, V., Medina Villaamil, V., Aparicio Gallego, G., Díaz Prado, S. & Grande Pulido, E. (2009) Biology of BMP signalling and cancer. *Clin Transl Oncol*, **11**, 126-137.
- Bogdanovich, S., Perkins, K.J., Krag, T.O.B., Whittemore, L. & Khurana, T.S. (2005) Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J*, **19**, 543-549.

- Bostrom, M.P. (1998) Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S116-123.
- Bostrom, M.P., Lane, J.M., Berberian, W.S., Missri, A.A., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S.B., Glaser, D. & Rosen, V.M. (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res*, **13**, 357-367.
- Brown, M.A., Zhao, Q., Baker, K.A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I. & Choe, S. (2005) Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem*, **280**, 25111-8.
- Bryan, P.N. (2002) Prodomains and Protein Folding Catalysis. *Chem Rev*, **102**, 4805-4816.
- von Bubnoff, A. & Cho, K.W. (2001) Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*, **239**, 1-14.
- Anja Buttstedt. (2007) Untersuchungen zur Bindung der Pro-Form des Knochenwachstumsfaktors Bone Morphogenetic Protein-2 an Noggin, den Antagonisten des reifen Wachstumsfaktors. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Institut für Biochemie und Biotechnologie.
- Carlisle, E. & Fischgrund, J.S. (2005) Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *Spine J*, **5**, 240S-249S.
- Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G.R. (2004) Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, **22**, 233-241.
- 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.
- Correia, A.C., Costa, M., Moraes, F., Bom, J., Nóvoa, A. & Mallo, M. (2007) Bmp2 is required for migration but not for induction of neural crest cells in the mouse. *Dev Dyn*, **236**, 2493-2501.
- Creemers, J.W., Groot Kormelink, P.J., Roebroek, A.J., Nakayama, K. & Van de Ven, W.J. (1993) Proprotein processing activity and cleavage site selectivity of the Kex2-like endoprotease PACE4. *FEBS Lett*, **336**, 65-69.
- 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., 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.
- 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.
- Deaton, R.A., Su, C., Valencia, T.G. & Grant, S.R. (2005) Transforming growth factor-beta1-induced expression of smooth muscle marker genes involves activation of PKN and p38 MAPK. *J Biol Chem*, **280**, 31172-31181.
- Degnin, C., Jean, F., Thomas, G. & Christian, J.L. (2004) Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell*, **15**, 5012-20.
- Derynck, R. & Zhang, Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, **425**, 577-584.
- Devlin, R.D., Du, Z., Pereira, R.C., Kimble, R.B., Economides, A.N., Jorgetti, V. & Canalis, E. (2003) Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology*, **144**, 1972-1978.
- Diefenderfer, D.L., Osyczka, A.M., Garino, J.P. & Leboy, P.S. (2003) Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am*, **85-A Suppl 3**, 19-28.
- ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzén, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.H. & Miyazono, K. (1993) Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene*, **8**, 2879-2887.
- Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T., Kawabata, M., Miyazono, K. & Imamura, T. (1999) Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci*, **112**, 3519-3527.
- Eder, J. & Fersht, A.R. (1995) Pro-sequence-assisted protein folding. *Mol Microbiol*, **16**, 609-614.

- Eder, J., Rheinnecker, M. & Fersht, A.R. (1993) Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence. *J Mol Biol*, **233**, 293-304.
- Fiedler, J., Röderer, G., Günther, K. & Brenner, R.E. (2002) BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*, **87**, 305-312.
- Foletta, V.C., Lim, M.A., Soosairajah, J., Kelly, A.P., Stanley, E.G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massague, J., Bernard, O. & Soosairajah, J. (2003) Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol*, **162**, 1089-1098.
- Fong, Y., Li, T., Wu, C., Hsu, S., Kao, S., Chen, R., Lin, C., Liu, S., Wu, C. & Tang, C. (2008) BMP-2 increases migration of human chondrosarcoma cells via PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol*, **217**, 846-855.
- Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H. & Miyazono, K. (1999) Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell*, **10**, 3801-3813.
- Gallea, S., Lallemand, F., Atfi, A., Rawadi, G., Ramez, V., Spinella-Jaegle, S., Kawai, S., Faucheu, C., Huet, L., Baron, R. & Roman-Roman, S. (2001) Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone*, **28**, 491-8.
- Gamell, C., Osses, N., Bartrons, R., Rückle, T., Camps, M., Rosa, J.L. & Ventura, F. (2008) BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J Cell Sci*, **121**, 3960-3970.
- Gentry, L.E. & Nash, B.W. (1990) The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry*, **29**, 6851-6857.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendörfer, 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**, 1023-35.
- Antje Gotsch. (2004) Untersuchungen zur rekombinanten Produktion der Ligandenbindungsdomäne des BMP-2-Rezeptors IA. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Institut für Biochemie und Biotechnologie.

- Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Börner, M.G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van der Velde, D., Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R.L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P.M., Rondia, J., Rossouw, W.C., Daneel, P.J., Ruff, S., Rüter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T.A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R.B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A. & Wisniewski, T. (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*, **84-A**, 2123-2134.
- Graff, J.M. (1997) Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question. *Cell*, **89**, 171-174.
- Gray, A.M. & Mason, A.J. (1990) Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science*, **247**, 1328-1330.
- Gregory, K.E., Ono, R.N., Charbonneau, N.L., Kuo, C., Keene, D.R., Bächinger, H.P. & Sakai, L.Y. (2005) The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem*, **280**, 27970-80.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Belmonte, J.C.I. & Choe, S. (2002) Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*, **420**, 636-642.
- Guicheux, J., Lemonnier, J., Ghayor, C., Suzuki, A., Palmer, G. & Caverzasio, J. (2003) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res*, **18**, 2060-8.
- Hall, B.K. & Miyake, T. (2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, **22**, 138-147.
- Hauburger, A., von Einem, S., Schwaerzer, G., Buttstedt, A., Zebisch, M., Schräml, M., Hortschansky, P., Knaus, P. & Schwarz, E. (2009) The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *FEBS J*, **276**, 6386-98.
- Haupt, L.M., Murali, S., Mun, F.K., Teplyuk, N., Mei, L.F., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Nurcombe, V. & Cool, S.M. (2009) The heparan sulfate proteoglycan (HSPG) glypican-3 mediates commitment of MC3T3-E1 cells toward osteogenesis. *J Cell*

Physiol, **220**, 780-791.

- Herpin, A. & Cunningham, C. (2007) Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *FEBS J*, **274**, 2977-2985.
- Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M. & Qiu, Y. (2002) The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem*, **277**, 40735-40741.
- Frank Hillger. (2004) Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von proBMP-2, BMP-2 und dem BMP-2-Propeptid. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Institut für Biochemie und Biotechnologie.
- Hillger, F., Herr, G., Rudolph, R. & Schwarz, E. (2005) Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *J Biol Chem*, **280**, 14974-80.
- Hills, C.E. & Brunskill, N.J. (2009) Cellular and physiological effects of C-peptide. *Clin Sci (Lond)*, **116**, 565-574.
- Hortschansky, P. & Schmuck, K. D. (2004) Patentschrift DE000010337176B3: Verwendung und Verfahren zum Nachweis von biologisch aktivem BMP auf einem Substrat.
- Hou, C., Hsiao, Y., Fong, Y. & Tang, C. (2009) Bone morphogenetic protein-2 enhances the motility of chondrosarcoma cells via activation of matrix metalloproteinase-13. *Bone*, **44**, 233-242.
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M. & Harland, R.M. (1998) The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell*, **1**, 673-683.
- Hsu, M., Rovinsky, S., Penmatcha, S., Herlyn, M. & Muirhead, D. (2005) Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil? *Cancer Metastasis Rev*, **24**, 251-263.
- Hsu, Y., Chang, J., Tsai, C., Chien, T.C. & Kuo, P. (2007) Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochem Pharmacol*, **73**, 504-14.
- Ibáñez, C.F. (2002) Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci*, **25**,

284-286.

- 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.
- 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.
- Issa, J.P.M., Bentley, M.V.L.B., Iyomasa, M.M., Sebald, W. & De Albuquerque, R.F. (2008) Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process. *Anat Histol Embryol*, **37**, 181-187.
- de Jesus Perez, V.A., Alastalo, T., Wu, J.C., Axelrod, J.D., Cooke, J.P., Amieva, M. & Rabinovitch, M. (2009) Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways. *J Cell Biol*, **184**, 83-99.
- Jiang, M., Liang, L., Wang, S., Ratovitski, T., Holmstrom, J., Barker, C. & Stotish, R. (2004) Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 525-531.
- Jin, Y., Tipoe, G.L., Liong, E.C., Lau, T.Y., Fung, P.C. & Leung, K.M. (2001) Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMP-1A associated with malignancy of oral epithelium. *Oral Oncol*, **37**, 225-233.
- Jones, W.K., Richmond, E.A., White, K., Sasak, H., Kusmik, W., Smart, J., Oppermann, H., Rueger, D.C. & Tucker, R.F. (1994) Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. *Growth Factors*, **11**, 215-225.
- Jonk, L.J., Itoh, S., Heldin, C., ten Dijke, P. & Kruijer, W. (1998) Identification and Functional Characterization of a Smad Binding Element (SBE) in the JunB Promoter That Acts as a Transforming Growth Factor-beta , Activin, and Bone Morphogenetic Protein-inducible Enhancer. *J Biol Chem* , **273**, 21145-21152.
- Kain, M.S.H. & Einhorn, T.A. (2005) Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures. *Foot Ankle Clin*, **10**, 639-650, viii.

- Kanzaki, S., Takahashi, T., Kanno, T., Ariyoshi, W., Shinmyozu, K., Tujisawa, T. & Nishihara, T. (2008) Heparin inhibits BMP-2 osteogenic bioactivity by binding to both BMP-2 and BMP receptor. *J Cell Physiol*, **216**, 844-50.
- Kanzaki, T., Olofsson, A., Morén, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Miyazono, K., Claesson-Welsh, L. & Heldin, C. (1990) TGF- β -1 binding protein: A component of the large latent complex of TGF- β 1 with multiple repeat sequences. *Cell*, **61**, 1051-1061.
- Kardassis, D., Murphy, C., Fotsis, T., Moustakas, A. & Stournaras, C. (2009) Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J*, **276**, 2947-2965.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A. & Suda, T. (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, **127**, 1755-66.
- Khalil, N. (1999) TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect*, **1**, 1255-1263.
- Khosla, S., Westendorf, J.J. & Oursler, M.J. (2008) Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest*, **118**, 421-428.
- Kirsch, T., Nickel, J. & Sebald, W. (2000a) Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. *FEBS Lett*, **468**, 215-9.
- Kirsch, T., Nickel, J. & Sebald, W. (2000b) BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J*, **19**, 3314-24.
- Kirsch, T., Sebald, W. & Dreyer, M.K. (2000) Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol*, **7**, 492-6.
- Kliemann, M., Rattenholl, A., Golbik, R., Balbach, J., Lilie, H., Rudolph, R. & Schwarz, E. (2004) The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett*, **566**, 207-212.
- Klages, J., Kotsch, A., Coles, M., Sebald, W., Nickel, J., Müller, T. & Kessler, H. (2008) The solution structure of BMPR-IA reveals a local disorder-to-order transition upon BMP-2 binding. *Biochemistry*, **47**, 11930-11939.
- Knaus, P. & Sebald, W. (2001) Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol Chem*, **382**, 1189-1195.

- 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. (1994) Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, **14**, 5961-74.
- Matthias Krause. (2003) Untersuchungen zur Rolle des Propeptids von BMP-2. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Institut für Biochemie und Biotechnologie.
- Kuo, C., Isogai, Z., Keene, D.R., Hazeki, N., Ono, R.N., Sengle, G., Peter Bachinger, H. & Sakai, L.Y. (2007) Effects of Fibrillin-1 Degradation on Microfibril Ultrastructure. *J Biol Chem*, **282**, 4007-4020.
- Lai, C. & Cheng, S. (2002) Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, **277**, 15514-15522.
- Lai, T., Fong, Y., Fu, W., Yang, R. & Tang, C. (2008) Osteoblasts-derived BMP-2 enhances the motility of prostate cancer cells via activation of integrins. *Prostate*, **68**, 1341-1353.
- Lawrence, D.A. (1996) Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw*, **7**, 363-374.
- Lawrence, D.A. (2001) Latent-TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem*, **219**, 163-170.
- Lecanda, F., Avioli, L.V. & Cheng, S.L. (1997) Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem*, **67**, 386-396.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K. & Hempstead, B.L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, **294**, 1945-1948.
- Lee, S.J. & McPherron, A.C. (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9306-9311.
- Li, B. (2008) Bone morphogenetic protein-Smad pathway as drug targets for osteoporosis and cancer therapy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, **8**, 208-219.
- Lieberman, J.R., Le, L.Q., Wu, L., Finerman, G.A., Berk, A., Witte, O.N. & Stevenson, S. (1998) Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *J Orthop Res*, **16**, 330-

339.

- Lieberman, J.R., Daluiski, A., Stevenson, S., Jolla, L., Wu, L., McAllister, P., Lee, Y.P., Kabo, J.M., Finerman, G.A., Berk, A.J. & Witte, O.N. (1999) The Effect of Regional Gene Therapy with Bone Morphogenetic Protein-2-Producing Bone-Marrow Cells on the Repair of Segmental Femoral Defects in Rats. *J Bone Joint Surg Am*, **81**, 905-17.
- Lin, S.J., Lerch, T.F., Cook, R.W., Jardezy, T.S. & Woodruff, T.K. (2006) The structural basis of TGF- β , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction*, **132**, 179-190.
- Liu, F., Ventura, F., Doody, J. & Massagué, J. (1995) Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*, **15**, 3479-3486.
- Liu, R., Ginn, S.L., Lek, M., North, K.N., Alexander, I.E., Little, D.G. & Schindeler, A. (2009) Myoblast sensitivity and fibroblast insensitivity to osteogenic conversion by BMP-2 correlates with the expression of Bmpr-1a. *BMC Musculoskelet Disord*, **10**, 51.
- Luyten, F.P., Cunningham, N.S., Ma, S., Muthukumar, N., Hammonds, R.G., Nevins, W.B., Woods, W.I. & Reddi, A.H. (1989) Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem*, **264**, 13377-13380.
- Mace, P.D., Cutfield, J.F. & Cutfield, S.M. (2007) Bacterial expression and purification of the ovine type II bone morphogenetic protein receptor ectodomain. *Protein Expr Purif*, **52**, 40-9.
- Machado, R.D., Aldred, M.A., James, V., Harrison, R.E., Patel, B., Schwalbe, E.C., Gruenig, E., Janssen, B., Koehler, R., Seeger, W., Eickelberg, O., Olschewski, H., Elliott, C.G., Glissmeyer, E., Carlquist, J., Kim, M., Torbicki, A., Fijalkowska, A., Szewczyk, G., Parma, J., Abramowicz, M.J., Galie, N., Morisaki, H., Kyotani, S., Nakanishi, N., Morisaki, T., Humbert, M., Simonneau, G., Sitbon, O., Soubrier, F., Coulet, F., Morrell, N.W. & Trembath, R.C. (2006) Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*, **27**, 121-132.
- Massagué, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **67**, 753-791.
- Massagué, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 169-178.

- Mathews, L.S. & Vale, W.W. (1991) Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*, **65**, 973-982.
- McDonald, N.Q. & Hendrickson, W.A. (1993) A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, **73**, 421-424.
- Meinel, L., Hofmann, S., Betz, O., Fajardo, R., Merkle, H.P., Langer, R., Evans, C.H., Vunjak-Novakovic, G. & Kaplan, D.L. (2006) Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials*, **27**, 4993-5002.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R. & Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem*, **267**, 16396-16402.
- Morén, A., Olofsson, A., Stenman, G., Sahlin, P., Kanzaki, T., Claesson-Welsh, L., ten Dijke, P., Miyazono, K. & Heldin, C.H. (1994) Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J Biol Chem*, **269**, 32469-32478.
- Morrell, N.W. (2006) Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: a new paradigm for tissue remodeling? *Proc Am Thorac Soc*, **3**, 680-686.
- Morrell, N.W., Adnot, S., Archer, S.L., Dupuis, J., Jones, P.L., MacLean, M.R., McMurtry, I.F., Stenmark, K.R., Thistlethwaite, P.A., Weissmann, N., Yuan, J.X. & Weir, E.K. (2009) Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, **54**, S20-31.
- Moustakas, A., Lin, H.Y., Henis, Y.I., Plamondon, J., O'Connor-McCourt, M.D. & Lodish, H.F. (1993) The transforming growth factor beta receptors types I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J Biol Chem*, **268**, 22215-22218.
- Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P., Mazzieri, R., Nunes, I. & Rifkin, D.B. (1997) Latent transforming growth factor- β : Structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int*, **51**, 1376-1382.
- Nishihara, A., Watabe, T., Imamura, T. & Miyazono, K. (2002) Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell*, **13**, 3055-63.

- 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**, 5330-8.
- Nohe, A., Keating, E., Underhill, T.M., Knaus, P. & Petersen, N.O. (2003) Effect of the distribution and clustering of the type I A BMP receptor (ALK3) with the type II BMP receptor on the activation of signalling pathways. *J Cell Sci*, **116**, 3277-84.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L. & Petersen, C.M. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, **427**, 843-848.
- Ploger, F., Seemann, P., Schmidt-von Kegler, M., Lehmann, K., Seidel, J., Kjaer, K.W., Pohl, J. & Mundlos, S. (2008) Brachydactyly type A2 associated with a defect in proGDF5 processing. *Hum Mol Genet*, **17**, 1222-1233.
- Qiao, C., Li, J., Jiang, J., Zhu, X., Wang, B., Li, J. & Xiao, X. (2008) Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. *Hum Gene Ther*, **19**, 241-254.
- 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. *J Mol Biol*, **305**, 523-533.
- Robinson, Y., Heyde, C.E., Tschöke, S.K., Mont, M.A., Seyler, T.M. & Ulrich, S.D. (2008) Evidence supporting the use of bone morphogenetic proteins for spinal fusion surgery. *Expert Rev Med Devices*, **5**, 75-84.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. (1997) Folding Proteins. . *Protein Function. A Practical Approach*. (Creighton, T.E., ed.). pp. 57 - 99. IRL-Press, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Rudolph, R., Schwarz, E., Herr, G. & Hillger, F. (2008) United States Patent: US7354901B2 - Production of recombinant BMP-2.
- 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.

- Sachse, A., Wagner, A., Keller, M., Wagner, O., Wetzel, W., Layher, F., Venbrocks, R., Hortschansky, P., Pietraszczyk, M., Wiederanders, B., Hempel, H.J., Bossert, J., Horn, J., Schmuck, K. & Mollenhauer, J. (2005) Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone*, **37**, 699-710.
- Sampath, T.K., Maliakal, J.C., Hauschka, P.V., Jones, W.K., Sasak, H., Tucker, R.F., White, K.H., Coughlin, J.E., Tucker, M.M. & Pang, R.H. (1992) Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem*, **267**, 20352-20362.
- Scheufler, C., Sebald, W. & Hülsmeier, M. (1999) Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, **287**, 103-15.
- Sengle, G., Charbonneau, N.L., Ono, R.N., Sasaki, T., Alvarez, J., Keene, D.R., Bächinger, H.P. & Sakai, L.Y. (2008a) Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem*, **283**, 13874-13888.
- Sengle, G., Ono, R.N., Lyons, K.M., Bächinger, H.P. & Sakai, L.Y. (2008b) A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. *J Mol Biol*, **381**, 1025-39.
- Shields, L.B.E., Raque, G.H., Glassman, S.D., Campbell, M., Vitaz, T., Harpring, J. & Shields, C.B. (2006) Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine*, **31**, 542-547.
- Shimasaki, S., Moore, R.K., Otsuka, F. & Erickson, G.F. (2004) The Bone Morphogenetic Protein System In Mammalian Reproduction. *Endocr Rev*, **25**, 72-101.
- Sieber, C., Plöger, F., Schwappacher, R., Bechtold, R., Hanke, M., Kawai, S., Muraki, Y., Katsuura, M., Kimura, M., Rechtman, M.M., Henis, Y.I., Pohl, J. & Knaus, P. (2006) Monomeric and dimeric GDF-5 show equal type I receptor binding and oligomerization capability and have the same biological activity. *Biol Chem*, **387**, 451-460.
- Smith, D.M., Cooper, G.M., Mooney, M.P., Marra, K.G. & Losee, J.E. (2008) Bone morphogenetic protein 2 therapy for craniofacial surgery. *J Craniofac Surg*, **19**, 1244-1259.

- Sopory, S., Nelsen, S.M., Degnin, C., Wong, C. & Christian, J.L. (2006) Regulation of bone morphogenetic protein-4 activity by sequence elements within the prodomain. *J Biol Chem*, **281**, 34021-34031.
- Sotobori, T., Ueda, T., Myoui, A., Yoshioka, K., Nakasaki, M., Yoshikawa, H. & Itoh, K. (2006) Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp Cell Res*, **312**, 3927-3938.
- Steiner, D.F. & Clark, J.L. (1968) The spontaneous reoxidation of reduced beef and rat proinsulins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **60**, 622-629.
- Sun, P.D. & Davies, D.R. (1995) The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **24**, 269-291.
- Takada, T., Katagiri, T., Ifuku, M., Morimura, N., Kobayashi, M., Hasegawa, K., Ogamo, A. & Kamijo, R. (2003) Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*, **278**, 43229-35.
- Takita, H., Vehof, J.W.M., Jansen, J.A., Yamamoto, M., Tabata, Y., Tamura, M. & Kuboki, Y. (2004) Carrier dependent cell differentiation of bone morphogenetic protein-2 induced osteogenesis and chondrogenesis during the early implantation stage in rats. *J Biomed Mater Res A*, **71**, 181-189.
- Teixeira, J.O. & Urist, M.R. (1998) Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch Orthop Trauma Surg*, **117**, 27-34.
- Thies, R.S., Chen, T., Davies, M.V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A. & Wolfman, N.M. (2001) GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors*, **18**, 251-259.
- Tonetti, M.S. & Hämmerle, C.H.F. (2008) Advances in bone augmentation to enable dental implant placement: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, **35**, 168-172.
- Tsialogiannis, E., Polyzois, I., Oak Tang, Q., Pavlou, G., Tsiridis, E., Heliotis, M. & Tsiridis, E. (2009) Targeting bone morphogenetic protein antagonists: in vitro and in vivo evidence of their role in bone metabolism. *Expert Opin Ther Targets*, **13**, 123-137.
- Urist, M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science*, **150**, 893-899.

- Vahle, J.L., Sato, M., Long, G.G., Young, J.K., Francis, P.C., Engelhardt, J.A., Westmore, M.S., Linda, Y. & Nold, J.B. (2002) Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol*, **30**, 312-321.
- 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**, 185-94.
- Vallejo, L.F. & Rinas, U. (2004) Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnol Bioeng*, **85**, 601-9.
- Walton, K.L., Mankanji, Y., Wilce, M.C., Chan, K.L., Robertson, D.M. & Harrison, C.A. (2009) A Common Biosynthetic Pathway Governs the Dimerization and Secretion of Inhibin and Related Transforming Growth Factor β (TGF β) Ligands. *J Biol Chem*, **284**, 9311-9320.
- Weissman, J.S. & Kim, P.S. (1992) The pro region of BPTI facilitates folding. *Cell*, **71**, 841-851.
- Wieser, R., Wrana, J.L. & Massagué, J. (1995) GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J*, **14**, 2199-2208.
- Wikesjö, U.M.E., Huang, Y., Polimeni, G. & Qahash, M. (2007) Bone morphogenetic proteins: a realistic alternative to bone grafting for alveolar reconstruction. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, **19**, 535-551, vi-vii.
- Wong, W.K.P., Knowles, J.A. & Morse, J.H. (2005) Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II C-Terminus Interacts with c-Src: Implication for a Role in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **33**, 438-446.
- Wozney, J.M. (1992) The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*, **32**, 160-167.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, 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.
- Wozney, J.M. (2002) Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, **27**, S2-8.

- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massagué, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, **370**, 341-347.
- Wu, X., Li, Y., Schneider, A., Yu, W., Rajendren, G., Iqbal, J., Yamamoto, M., Alam, M., Brunet, L.J., Blair, H.C., Zaidi, M. & Abe, E. (2003) Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J Clin Invest*, **112**, 924-934.
- Würzler, K.K., Emmert, J., Eichelsbacher, F., Kübler, N.R., Sebald, W. & Reuther, J.F. (2004) Evaluation of the osteoinductive potential of genetically modified BMP-2 variants. *Mund Kiefer Gesichtschir*, **8**, 83-92.
- Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. & Matsumoto, K. (1999) XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J*, **18**, 179-187.
- Yanagita, M. (2009) BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression. *Biofactors*, **35**, 113-119.
- Yin, W., Smiley, E., Germiller, J., Mecham, R.P., Florer, J.B., Wenstrup, R.J. & Bonadio, J. (1995) Isolation of a novel latent transforming growth factor-beta binding protein gene (LTBP-3). *J Biol Chem*, **270**, 10147-10160.
- Young, G.D. & Murphy-Ullrich, J.E. (2004) Molecular Interactions That Confer Latency to Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem*, **279**, 38032-38039.
- Yoon, B.S. & Lyons, K.M. (2004) Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem*, **93**, 93-103.
- Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T. & Yamamoto, T. (2000) Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*, **103**, 1085-1097.
- Yu, P.B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E. & Bloch, K.D. (2005) Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type II Receptor Deletion Reveals BMP Ligand-specific Gain of Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem*, **280**, 24443-24450.
- Yudell, R.M. & Block, M.S. (2000) Bone gap healing in the dog using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Oral Maxillofac Surg*, **58**, 761-766.

Zhao, B., Katagiri, T., Toyoda, H., Takada, T., Yanai, T., Fukuda, T., Chung, U., Koike, T., Takaoka, K. & Kamijo, R. (2006) Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem*, **281**, 23246-53.

Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. & Thomsen, G.H. (1999) A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, **400**, 687-693.

Abkürzungen

(k)Da	(Kilo) Dalton
(m)A	(milli) Ampere
(m)M	(milli) molar
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriposphat
AU	<i>Arbitrary Units</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMPR-IA	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor IA</i>
BMPR-IB	<i>Bone Morphogenetic ProteinReceptor II</i>
bp	Basenpaare
BPTI	<i>Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor</i>
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
(c)DNA	(Kopie-)Desoxyribonukleinsäure
CM	<i>Carboymethylated Dextran</i>
CMV	Cytomegalovirus
DMSO	Dimethylsufoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol

ECD	Extrazelluläre Ligandenbindedomäne
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
FBS	Foetales Kälber Serum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
GDF	<i>Growth and Differentiation Factor</i>
GdmCl	Guanidinium Hydrochlorid
GSH	Gluthation, reduziert
GSSG	Gluthation, oxidiert
h	Stunde
HA	Haemagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His-Tag	Histidin- <i>Tag</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IB	<i>Inclusion Body</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
l	Liter
LAP	<i>Latency Associated Peptide</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LTBP	<i>Latent TGF-β Binding Protein</i>
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation; Time Of Flight
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>

min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NaDOC	Natriumdesoxycholat
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NTA	Nitrilotri-Essigsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P/S	Penicillin/Streptavidin
PAH	Pulmonale Arterielle Hypertonie
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PTH	Parathyroid Hormon
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Unit</i>
SBE	<i>Smad Binding Element</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAB	<i>TGF-β-activated binding protein</i>
TAK	<i>TGF-β-activated kinase</i>
TCA	Trichloressigsäure

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Anhang

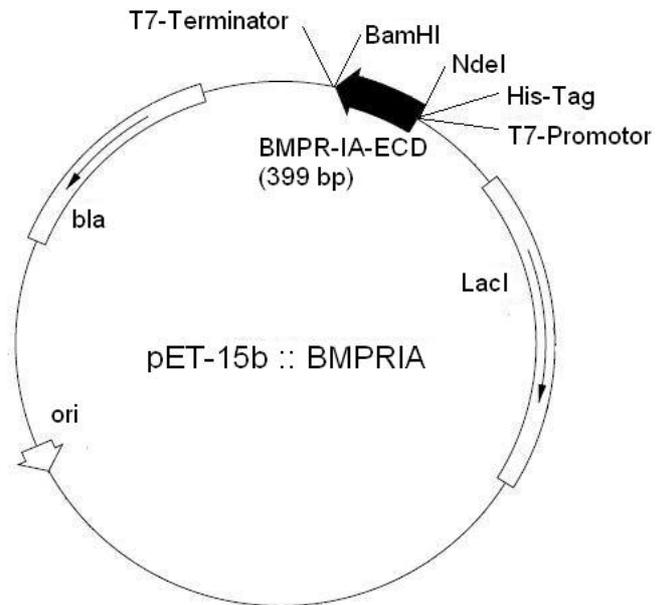


Abb. A1: Plasmid pET-15b::BMPR-IA-ECD.

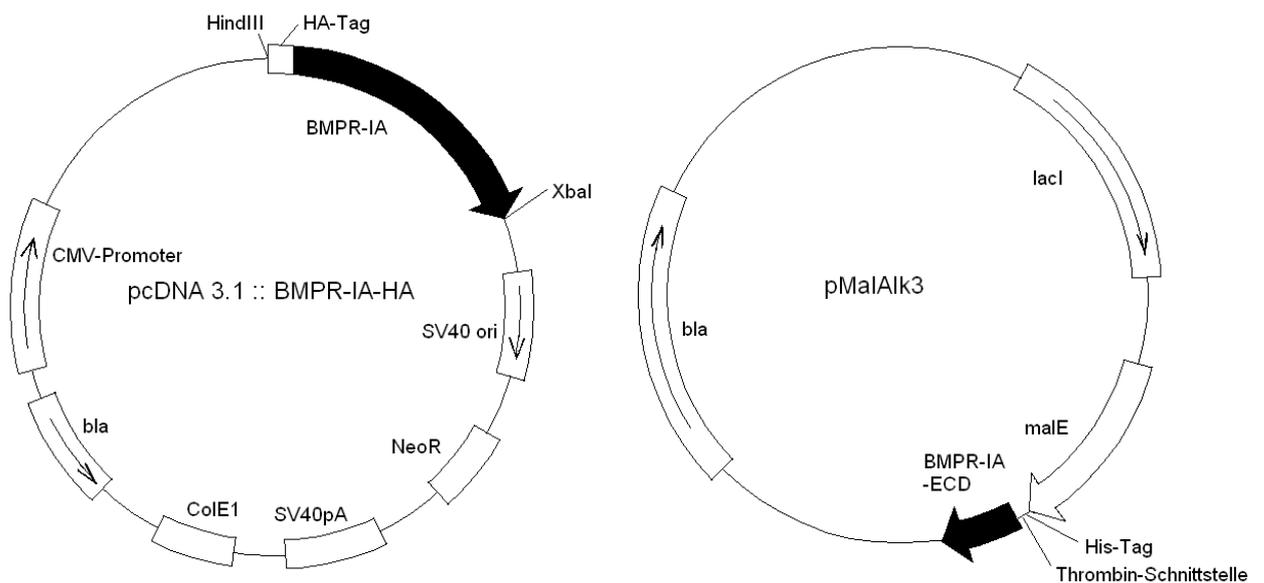


Abb. A2: Plasmide pcDNA::BMPR-IA-HA und pMalAik3.

Danksagung

Prof. Rainer Rudolph danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit am Institut für Biotechnologie durchführen zu können.

Prof. Elisabeth Schwarz danke ich dafür, mein Thema in ihrer Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen, ihre Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Prof. Andrea Sinz und Dr. Christian Ihling vom Institut für Pharmazie danke ich für die Messungen und die Anleitung zur Massenspektrometrie.

Prof. Petra Knaus von der FU Berlin danke ich für die Bereitstellung des Expressionkonstruktes für BMPR-IA.

Dr. Peter Hortschansky vom HKI Jena danke ich für die Bereitstellung des Konstruktes für die Expression der BMPR-IA-ECD in *E. coli*.

Besonders möchte ich meinen Laborkollegen, vor allem Sabrina von Einem, Anja Buttstedt, Mirko Sackewitz, Grit Lodderstedt, Reno Winter und meinen Forschungsgruppenpraktikanten und Diplomanden danken. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben Anja Hauburger
Hafenstrasse 42
06108 Halle

Geburtsdatum: 27. März 1982
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt (heute Chemnitz)

Seit 10/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Muskellabor der Klinik für Neurologie am
Universitätsklinikum Halle

Promotion

Seit 09/ 2005 **Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biotechnologie, Abteilung
Technische Biochemie, AG Schwarz (Betreuung: Prof. Elisabeth Schwarz)

gefördert im Rahmen des Exzellenznetzwerks Biowissenschaften "Strukturen und
Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung"

Studium

10/ 2000 – 07/ 2005 **Biochemie (Diplom) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,**

Diplomarbeit: „Spezifität der Pro-Peptid vermittelten Faltung von Neurotrophinen“

Schulabschluss

Abschluss 07/ 2000 Abitur am Gymnasium Hohe Straße in Chemnitz

1992 - 2000 Gymnasium Hohe Straße in Chemnitz

1988 - 1992 Grundschule Auerswalde

Publikationen

Hauburger, A., Kliemannel, M., Madsen, P., Rudolph, R. & Schwarz, E. (2007) Oxidative folding of nerve growth factor can be mediated by the pro-peptide of neurotrophin-3. *FEBS Lett*, **581**, 4159-64.

Hauburger, A., von Einem, S., Schwaerzer, G., Buttstedt, A., Zebisch, M., Schräml, M., Hortschansky, P., Knaus, P. & Schwarz, E. (2009) The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *FEBS J*, **276**, 6386-98.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und dass diese Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Ich versichere weiterhin, dass ich die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich habe mich mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben.