



Entwicklung und Charakterisierung einer löslichen und funktionalen BMP-2-Variante

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anette Hettwer

Neustadt (Oberschlesien, Polen)

Würzburg 2023



Eingereicht am: 17.03.2023

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Arthur Korte

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Gutachter: Prof. Dr. Angelika Loidl-Stahlhofen

Tag des Promotionskolloquiums: 24.05.2023

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen beiden Liebsten, Björn und Aron

Zusammenfassung

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind potente Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren, die strukturell der *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) - Superfamilie zugeordnet werden. Sie spielen eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl an zellulären Prozessen ab den frühen Stadien der Embryogenese. Dadurch sind BMPs nicht nur für die korrekte Festlegung der embryonalen Körperachse verantwortlich, sondern regulieren als multifunktionale Mediatoren neben der Morphogenese auch Proliferation, Differenzierung und Apoptose unterschiedlicher Zelltypen. *Bone Morphogenetic Proteins* sind somit für die Aufrechthaltung der Homöostase im adulten Körper mitverantwortlich. Ihre Funktionalität vermitteln die BMPs über eine Signalkaskade, indem sie als dimeres Protein spezifische transmembrane Serin/Threonin-Kinaserezeptoren von Typ I und Typ II in einem heteromeren Komplex assemblieren. Die intrazelluläre Signalweiterleitung verläuft über verschiedene Signalkaskaden (Smad-Proteine oder MAPKs), wodurch final im Zellkern Änderungen auf der Ebene der Gentranskription ausgelöst werden. Laut der namensgebenden Eigenschaft fungieren einige Wachstumsfaktoren als aktive Induktoren der Knochenbiosynthese. Ihre Anwesenheit ist essentiell für die vielen zellulären Prozesse, die während einer Frakturheilung auftreten, wobei eine Knochenneubildung ebenso stark abhängig ist vom Zusammenspiel verschiedener Stimulatoren und Inhibitoren, die die BMPs in ihrer Aktivität regulieren. Bedingt durch ihr großes Potential fanden die erstmals durch Marshal Urist 1965 aus Knochenmaterial isolierten BMP-Proteine ihren Einsatz in der regenerativen Medizin. Kommerziell erhältlich und bereits seit vielen Jahren in der klinischen Anwendung befindet sich derzeit das rhBMP-2 und rhBMP-7. Diese beiden Wachstumsfaktoren werden u.a. verwendet, um die Heilungsprozesse von langwierigen Schienbeinfrakturen zu verbessern, aber auch bei degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen und in der Kieferchirurgie. Jedoch führt die schlechte Löslichkeit des BMPs aufgrund der ausgeprägten Aggregationstendenz zu gravierenden Problemen, nicht nur während der biotechnologischen Herstellung, sondern auch bei der klinischen Anwendung.

Der Schwerpunkt des Optimierungsbedarfs der BMP-2 Herstellung im Rahmen dieser Doktorarbeit lag daher auf der Etablierung eines prokaryotischen Expressionssystems für die lösliche Produktion von BMP-2. Dafür wurde zunächst der Fokus auf die ungünstigen Löslichkeitseigenschaften des Wachstumsfaktors gelegt. Um die hohe Aggregationsneigung des BMP-2 während der Produktion in *Escherichia coli* zu minimieren, wurden anhand einer Algorithmus-basierten Analyse BMP-2-Varianten entworfen, in denen Aminosäuren mit stark hydrophoben Eigenschaften gegen solche mit hydrophilem Charakter ausgetauscht wurden. Hierdurch konnten die zur Aggregation neigenden Bereiche des BMP-2 weitestgehend eliminiert werden. Es wurden für die bezüglich ihrer Löslichkeit optimierten Proteinvarianten unterschiedliche Expressionsstrategien etabliert, wodurch dimere BMP-2-Mutene in angepassten chromatographischen Profilen mit einem Aufreinigungsschritt und ohne jegliche Renaturierungsmaßnahmen gewonnen wurden. Allerdings verbleiben hierbei Restmengen an

bakteriellen Kontaminationen, die vorwiegend aus endogenen ribosomalen *E. coli*-Proteinen stammen und nicht vollständig entfernt werden konnten. Während der umfassenden *in vitro*-Charakterisierung der BMP-2-Varianten konnte durch massenspektroskopische Analysen die Gesamtmasse beider Zielproteine bestätigt werden, wobei sequenzspezifische Fragmente eine eindeutige Identifikation der eingebrachten Mutationen ermöglichten. CD-spektroskopische Analysen erweitert um Auswertalgorithmen konnten die wesentlichen Wt-BMP-2-typischen Sekundärstrukturelemente identifizieren. Die neu generierten BMP-2-Varianten zeigen in der dynamischen Lichtstreuungsanalyse stark verminderte Aggregationstendenz im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2. Dessen Aggregationsverhalten wurde durch die kombinierte Analytik seiner mikrofluidischen Diffusion und der dynamischen Lichtstreuung zum ersten Mal über den Konzentrationsbereich von 0.5 μM bis 100 mM genau charakterisiert. Erste zellbiologische Versuche verliefen ohne Erfolg, wodurch die biologische Aktivität der BMP-Varianten nicht abschließend geklärt werden konnte.

Die simple Methode zur Expression und Aufreinigung der hydrophilisierten BMP-2-Mutante aus dieser Dissertation kann leicht in einen größeren Produktionsmaßstab überführt werden. BMP-2 kann dadurch schneller und kostengünstiger hergestellt werden. Final bleibt es jedoch erforderlich, die biologische Aktivität der neuen löslichen BMP-2-Varianten vollständig zu charakterisieren, um deren ganzes Funktionsspektrum zu entdecken. Der Fokus weiterer Forschung sollte zudem auf die verbleibende Oligomerisierungstendenz und die bestehende Kontamination mit Fremdproteinen gelegt werden, da diese beiden Faktoren letztendlich die Ausbeute an dimeren BMP-2 Varianten aus diesem System derzeit minimieren.

Summary

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are potent differentiation and growth factors that are structurally assigned to the transforming growth factor- β (TGF- β)-superfamily. They play key roles in a variety of cellular processes from the early stages of embryogenesis. Thereby, BMPs are not only responsible for the correct definition of the embryonic body axis, but also regulate proliferation, differentiation and apoptosis of different cell types as multifunctional mediators in addition to morphogenesis. Bone morphogenetic proteins are therefore jointly responsible for maintaining homeostasis in the adult body. The BMPs mediate their functionality via a signaling cascade by assembling specific transmembrane serine/threonine kinase receptors of type I and type II as a dimeric protein in a heteromeric complex. Intracellular signaling occurs via various signaling cascades (Smad proteins or MAPKs), which ultimately trigger changes in the cell nucleus at the level of gene transcription. According to the eponymous property, some growth factors act as active inducers of bone biosynthesis. Their presence is essential for many cellular processes that occur during fracture healing, while new bone formation is also heavily dependent on the interaction of various stimulators and inhibitors that regulate the activity of BMP's. Due to their great potential, BMP proteins, which were first isolated from bone material by Marshal Urist in 1965, were used in regenerative medicine. The rhBMP-2 and rhBMP-7 are currently commercially available and have been in clinical use for many years. Among others, these two growth factors are used to improve the healing processes of lengthy tibia fractures, but also in degenerative spinal diseases and in jaw surgery. Due to the pronounced tendency to aggregate, the decreased solubility of BMP's leads to serious problems, not only during biotechnological production but also in clinical use. The main focus of the need for optimization of BMP-2 production in the context of this doctoral thesis was the establishment of a prokaryotic expression system for the soluble production of BMP-2. For this purpose, the focus was initially placed on unfavorable solubility properties of the growth factor. In order to minimize the high aggregation tendency of BMP-2 during production in *E. coli*, BMP-2 variants were designed using an algorithm-based analysis, in which amino acids with strongly hydrophobic properties were exchanged for those with hydrophilic properties. Thereby, the areas of BMP-2 that tend to aggregate could mostly be eliminated. Different expression strategies were established for the protein variants optimized with regard to their solubility, whereby dimeric BMP-2 muteins were obtained in adapted chromatographic profiles with one purification step and without any renaturation measures. However, residual amounts of bacterial contamination remain, which originate mainly from endogenous ribosomal *E. coli* proteins and could not be completely removed. During the comprehensive *in vitro* characterization of the BMP-2 variants, the total mass of both target proteins could be confirmed by mass spectroscopic analysis, where sequence-specific fragments enabled unambiguous identification of the introduced mutations. CD spectroscopic analyzes extended by evaluation algorithms were able to identify the basic wt-BMP-2 typical secondary structure

Summary

elements. In dynamic light scattering analysis, the newly generated BMP-2 variants show a greatly reduced aggregation tendency compared to wildtype-BMP-2. Its aggregation behavior was characterized for the first time over the concentration range from 0.5 μM to 100 mM by the combined analysis of its microfluidic diffusion sizing and dynamic light scattering. Initial cell biological experiments were not successful, whereby the biological activity of the BMP variants could not be conclusively clarified. The simple method for expression and purification of the hydrophilized BMP-2 muteins from this dissertation can easily be scaled up. However, it remains necessary to fully characterize the biological activity of the new soluble BMP-2 variants in order to discover their full range of functions. Further research should also focus on the remaining oligomerization tendency and the existing contamination with foreign proteins, as these two factors ultimately minimize the yield of dimeric BMP-2 variants from this system at present.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung: Grundlagen und Stand der Forschung	1
1.1	Bone Morphogenetic Protein (BMP).....	1
1.1.1	Strukturelle Eigenschaften von BMP-2.....	1
1.1.2	Signaltransduktion des humanen BMP-2.....	4
1.2	Modulation der BMP-Signaltransduktion	7
1.2.1	Regulatorische Proteine in der BMP-Signalkaskade	7
1.2.2	Inhibitorische Smads	7
1.2.3	Intrazelluläre Inhibitoren.....	8
1.2.3.1	Smurf 1/2.....	8
1.2.3.2	Ski/SnoN/Fussel-15/-18.....	8
1.2.4	Pseudorezeptor-BAMBI.....	9
1.2.5	Extrazelluläre BMP-Antagonisten	9
1.3	Die Rolle von BMP-2 als therapeutisches Protein	15
1.4	Die klinische Realität: Weniger ist mehr?	18
2	Zielsetzung der Arbeit	21
2.1	Vorarbeiten	22
2.2	Projektziele der Dissertation.....	22
3	Material und Methoden	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Chemikalien	24
3.1.2	Kits	26
3.1.3	Zelllinien	26
3.1.4	Oligonukleotide	27
3.1.5	Antibiotika.....	27
3.1.6	Flüssigchromatographie Säulen	27
3.1.7	Bakterienstämme	27
3.1.8	Enzyme	28
3.1.9	Vektoren.....	29
3.1.10	Geräteleiste.....	30
3.2	Methoden.....	32

3.2.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	32
3.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	32
3.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.2.1.3	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	32
3.2.1.4	Restriktionsverdau	32
3.2.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	33
3.2.1.6	Kolonie-Polymerasekettenreaktion	33
3.2.1.7	Agarosegelelektrophorese.....	34
3.2.1.8	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	35
3.2.2	Allgemeine mikrobiologische Methoden.....	35
3.2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
3.2.2.2	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	36
3.2.3.1	Rekombinante Genexpression in <i>E. coli</i>	36
3.2.3.2	Zellaufschluss.....	36
3.2.3.3	SDS-Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.2.3.4	Dialyse.....	38
3.2.3.5	Chromatographie.....	39
3.2.3.6	Affinitäts-/Ionenaustauschchromatographie.....	39
3.2.3.7	Gelpermeationschromatographie	40
3.2.4	Biophysikalische Methoden	40
3.2.4.1	Massenspektrometrie-Analyse.....	40
3.2.4.2	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse und Quellenzerfall Massenspektrometrie.....	40
3.2.4.3	Elektrospray-Ionisation.....	41
3.2.4.4	Dynamische Lichtstreuungsanalyse	41
3.2.4.5	Mikrofluidische Diffusionstechnologie.....	42
3.2.4.6	Cirkulardichroismus.....	42
3.2.5	Zellbiologische Methoden.....	43
3.2.5.1	Kultivierung von Zellen	43
3.2.5.2	Kolorimetrischer Alkalische Phosphatase Assay.....	44
3.2.5.3	Dual-Luciferase Reporter Assay.....	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Vorarbeiten auf dem Weg zu löslichen BMP-2-Varianten	46
4.1.1	Zielvorgabe für die BMP-2-Varianten	52

4.1.1.1	Variante BMP-2-10M.....	52
4.1.1.2	Variante BMP-2-2Hep-7M	53
4.2	Klonierung, Expression und Reinigung von BMP-2-Varianten.....	54
4.2.1	Klonierungsstrategie der Expressionskonstrukte	54
4.2.1.1	Variante TrxA-BMP-2-10M.....	54
4.2.1.2	Variante BMP-2-10M.....	56
4.2.1.3	Variante BMP-2-2Hep-7M	56
4.2.2	Expression von BMP-2-Varianten	57
4.2.3	Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine	63
4.2.3.1	Reinigung der Variante BMP-2-10M	63
4.2.3.2	Reinigung der Variante BMP-2-2Hep-7M.....	66
5	Biophysikalische Charakterisierung der BMP-2-Varianten.....	69
5.1	Massenspektrometrische Analyse von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M.....	69
5.1.1	MALDI-MSD-Analyse.....	70
5.1.2	ESI-QTOF-MS-Analyse.....	71
5.2	Sekundärstrukturanalyse.....	76
5.2.1	Circulardichroismus-Spektroskopie von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2.....	77
5.3	Quantifizierung der Molekulargewichtsverteilung von Wildtyp-BMP-2 mittels dynamischer Lichtstreuung und mikrofluidischer Diffusionstechnologie	83
5.3.1	Dynamische Lichtstreuung vs. mikrofluidische Diffusionstechnologie am Beispiel vom Wildtyp-BMP-2	84
6	Zellbiologische Arbeiten.....	95
6.1	Funktionelle Charakterisierung und quantitative Bestimmung des Osteogenesepotentials der BMP-2-Varianten	95
6.1.1	Vergleichende Zellkulturanalyse der Variante BMP-2-10M und BMP-2- 2Hep-7M mit dem Wildtyp-BMP-2.....	96
6.1.1.1	Alkalische Phosphatase-Assay.....	96
6.1.1.2	Dual-Luciferase Reporter Assay.....	98
7	Diskussion.....	103
7.1	Der Weg zu löslichen BMP-2-Varianten	103
7.2	Lösliche Expression und Aufreinigung von BMP-2-Varianten	105
7.2.1	Lösliche Expression von BMP-2-Varianten in <i>E. coli</i>	105

7.2.2	Aufreinigung von BMP-2-Varianten aus <i>E. coli</i>	109
7.3	Biophysikalische Charakterisierung der BMP-2-Varianten.....	113
7.3.1	Charakterisierung von BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M und Wt-BMP-2 anhand von Massenspektroskopie	113
7.3.1.1	Circulardichroismus-Spektroskopie	114
7.3.1.2	Quantifizierung der Molekulargewichtsverteilung	116
7.4	Zellbiologische Arbeiten	121
8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	127
9	Anhang	129
9.1	Expressionsvektoren.....	129
9.2	Lagerungsstudien.....	130
9.3	Massenspektrometrie	131
9.4	CD-Spektroskopie	132
9.5	Zellbiologische Arbeiten	136
10	Literaturverzeichnis.....	137
11	Abkürzungsverzeichnis	165
12	Abbildungsverzeichnis	167
13	Tabellenverzeichnis.....	170
14	Danksagung.....	171
15	Publikationen.....	173

1 Einleitung: Grundlagen und Stand der Forschung

1.1 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Knochenmorphogenetische Proteine (*Bone Morphogenetic Proteins*) sind kleine sekretierte Proteine, die funktionell zu den pleiotropen Morphogenen gezählt werden und u.a. Chemotaxis, Mitose, aber auch die Differenzierung von Knochengewebszellen regulieren können [Reddi, 1995, Rider & Mulloy, 2010, Brazil et al., 2015]. Primär wurden BMPs als osteogene Wachstumsfaktoren klassifiziert, was gleichzeitig namensgebend für deren Akronym war. Im Laufe zahlreicher Forschungsversuche wurden jedoch weitere Eigenschaften nachgewiesen. So initiieren BMPs nicht nur die Rekrutierung von Vorläufer- und Stammzellen, sondern stimulieren auch die Angiogenese, die Differenzierung von Osteoblasten, sowie die Proliferation von Stammzellen des umliegenden mesenchymalen Gewebes [Wozney, 2002, Termaat et al., 2005]. Sie fungieren zudem in der frühen Embryogenese (Mesoderminduktion) [Yang et al., 2014] und in der Neurogenese [Christiansen et al., 2000]. BMPs sind somit elementar für die Entwicklung und Kontrolle von Differenzierungs-/Proliferationsvorgängen von Zellen [ten Dijke et al., 2003]. Bedingt durch das breite Funktionsspektrum wurde für die Bezeichnung der BMPs von *Bone Morphogenetic Proteins* eine Änderung der Nomenklatur in *Body Morphogenetic Proteins* vorgeschlagen [Reddi, 2005, Wagner et al., 2010].

BMPs gehören der TGF- β -Superfamilie (*Transforming Growth Factor*-beta) an und bilden mit ungefähr 20 Mitgliedern die größte Subgruppe dieser strukturell miteinander verwandten Proteine [Chen et al., 2004, Carreira et al., 2015]. Innerhalb dieser Subgruppe sind hinsichtlich Sequenzhomologie und der phylogenetischen Verwandtschaft weitere Einteilungen in Gruppen vorhanden, wie BMP-2/4, BMP-3/3B, BMP-5/6/7/8/8B, BMP-9/10, BMP-12/13/14, BMP-11, BMP-15/16 [Reddi, 1998, Termaat et al., 2005, Mueller & Nickel, 2012, Yang et al., 2014]. Lediglich das BMP-1 gehört trotz der vorhandenen Namensgebung nicht zur TGF- β -Superfamilie, da es sich hier um eine Metalloprotease handelt (Familie der Astacine), welche die Funktion einer Pro-Protein-Konvertase in der extrazellulären Matrix übernimmt [Mussano et al., 2007]. Innerhalb der BMP-Proteinfamilie ist das BMP-2 eines der am besten beschriebenen Proteine.

1.1.1 Strukturelle Eigenschaften von BMP-2

Das humane BMP-2 unterliegt einer komplexen biologischen Prozessierung und wird als ein PräPro-Protein synthetisiert. Das Vorläuferprotein beinhaltet eine N-terminale Signalsequenz (23 AS, Aminosäuren), die wichtig für seine Sekretion, eine Pro-Domäne, dessen Funktion bislang unbekannt, sowie ein reifes Polypeptid, das eigentliche Cytokin, ist [ten Dijke et al., 2003, Mulloy & Rider, 2015]. Dabei wird das Signalpeptid während dem Sekretionsprozesses proteolytisch gespalten, wodurch ein 2 x 396 AS großes dimeres Protein entsteht. Das

Pro-Protein, das durch eine FPC-Konsensussequenz (*furin-like prohormon-convertase*) vom reifen Teil getrennt ist (C-terminal), wird anschließend durch Metalloproteasen (Furin-Familie) entfernt. Es verbleibt ein dimerer Proteinrest (2 x 114 AS) des reifen C-terminalen BMP-2, der in der Lage ist an seinen Rezeptorkomplex zu binden und diesen zu aktivieren [Israel et al., 1992, Cui et al., 1998, Sieber et al., 2009, Gámez et al., 2013]. Als funktionell gelten vorwiegend BMP-2-Dimere, wobei in der Literatur auch Homo- und Heterodimere beschrieben werden [Lavery et al., 2008]. In *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen mit heterodimeren BMPs konnte eine erhöhte biologische Aktivität beobachtet werden [Valera et al., 2010]. Es wurden jedoch auch Fälle beschrieben, in denen die abgespaltene Pro-Domäne am reifen Polypeptid gebunden blieb (wie bei TGF- β zu beobachten), was wiederum zu einer verringerten Bioverfügbarkeit und Retention des BMPs im extrazellulären Raum führt [Ramel & Hill, 2012].

Aktives BMP-2 setzt sich aus zwei Monomeren zusammen, die durch drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert werden. Diese werden zwischen den Cysteinresten 296-361, Cys 325-Cys 393 und Cys 329-Cys 395 ausgebildet (AS-Nummerierung gemäß der PräPro-BMP-2-Sequenz). Das daraus resultierende Cystinknoten stellt somit ein weiteres Charakteristikum des BMP-2 dar und sorgt gleichzeitig für seine hohe physikochemische Stabilität [Scheufler et al., 1999, Ohta et al., 2005, Vallejo & Rinas, 2013]. Ein weiteres Cystein (Cys 360) in jedem Monomer ist zudem an der Ausbildung der BMP-Dimere über eine intermolekulare Disulfidverbrückung beteiligt. Bemerkenswert ist hierbei, dass das Cystinknotenmotiv nicht nur spezifisch für BMPs ist, sondern auch in allen Mitgliedern der TGF- β -Familie sowie seinen Modulatoren, wie z.B. Noggin, und Mitgliedern der DAN-Familie zu finden ist [Scheufler et al., 1999, Groppe et al., 2002, Nolan & Thompson, 2014].

Für die Beschreibung der Tertiärstruktur eines monomeren BMP-2 (auch TGF- β -Familie) wird oft das Modell der „linken Hand“ [Daopin et al., 1992] verwendet, indem der Daumen den N-Terminus repräsentiert und das Handgelenk die α -Helix ($\alpha 3$). Die Handinnenfläche wird dem Cystinknoten zugeordnet und die zwei β -Faltblätter ($\beta 1$ - $\beta 9$ -Stränge) gelten als die beiden Finger. Die antiparallelen β -Faltblätter, die sehr stark zueinander verdreht sind (liegen in "face-to-face"-Position zueinander), ermöglichen eine Interaktion der $\alpha 3$ -Helix des einen Monomers mit den β -Faltblättern des anderen. Die konvexe Fingerseite bezeichnet dieses Modell als „*knuckle*“ (Knöchel) und als „*wrist*“ (Handgelenk) dagegen die α -helikale Region (s. Abb.1). Dabei enthält die Bindestelle im dimeren BMP-2 das „*knuckle*“-Epitop für den Typ I-Rezeptor (hochaffine Bindestelle) und das „*wrist*“-Epitop für den Typ II-Rezeptor (niederaffine Interaktion) [Scheufler et al., 1999, Weber et al., 2007, Kirsch et al., 2000, Knaus & Sebald, 2001, Nickel et al., 2001].

Eine weitere charakteristische Eigenschaft, die das BMP-2 auszeichnet, ist eine N-terminale Heparinbindestelle, die seine biologische Aktivität modifiziert. Mit ihrer Hilfe ist das BMP-2 in der Lage an die Glucosaminoglycane (Heparin) der extrazellulären Matrix zu binden. Diese Besonderheit teilt sich das BMP-2 trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen BMPs,

weiteren Mitgliedern der TGF- β Superfamilie und den Aktiven jedoch lediglich mit dem BMP-4 [Ruppert et al., 1996, Billings & Pacifici, 2015].

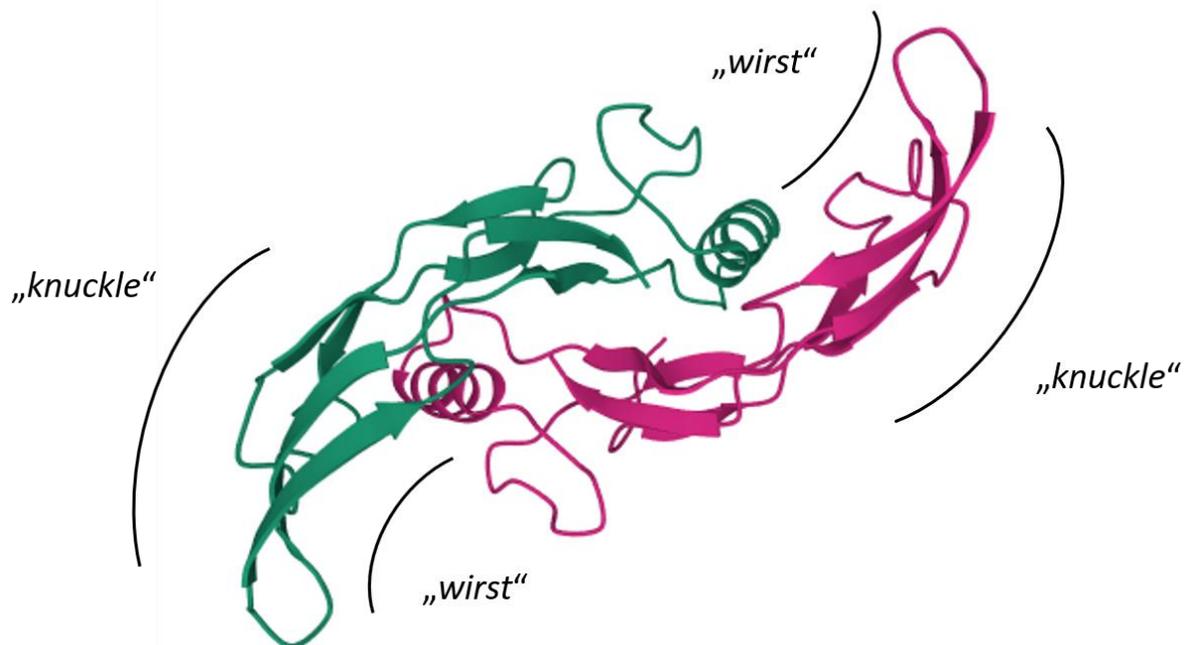


Abb. 1: 3D-Strukturmodell des BMP-2-Dimers

Bänderdarstellung der Kristallstruktur eines BMP-2-Dimers in Aufsicht. Die Monomere sind in grün (BMP-2A) und in pink (BMP-2B) dargestellt. Aufgrund der Symmetrie weist das BMP-2-Dimer jeweils zwei „knuckle“ und zwei „wirst“-Epitope auf. Die 3D-Darstellung erfolgte nach der Struktur aus der RCSB-Proteindatenbank [PDB-ID:3BMP, modifiziert nach Scheufler et al., 1999, Mol*-Viewer [Sehnal et al., 2021]].

Bereits Takada et al., 2003 zeigte in Zellkulturversuchen mit C2C12-Maus-Myoblasten, dass Heparin (aber auch Heparansulfat und Dextransulfat) die biologische Aktivität von Homodimeren (BMP-2, BMP-4) und Heterodimeren (BMP-2/6, BMP-2/7) deutlich verlängern können. Sowohl die Polysaccharid-Größe als auch die Anzahl der Sulfatreste spielt dabei eine essentielle Rolle. Das Heparin reduziert hierbei deutlich die Menge an BMP-2, die an den BMPR-IA-Rezeptor oder die Zelloberfläche bindet, wodurch seine Konzentration im Zellkulturmedium sichtlich ansteigt. Auch Zhao et al., 2006 beobachtete eine längere Halbwertszeit (20-fach erhöht) von BMP-2 im Kulturmedium, sowie eine Blockierung der BMP-2 Degradation, wenn exogenes Heparin vorhanden war. Die Zugabe von Heparin verstärkte außerdem die ektopische Knochenbildung, die durch BMP-2 induziert wurde.

Die positive Auswirkung des Heparins auf die biologische Aktivität des BMPs führten in der Vergangenheit bereits dazu, dass erste Modifikationen der N-terminalen Bindestelle durchgeführt wurden [Wuerzler et al., 2004, Depprich et al., 2005], wodurch im Rattenmodell eine signifikant verbesserte Knochenbildung stattfinden konnte. Die N-terminale Heparinbindestelle des BMP-2 ist für die Rezeptoranbindung obligatorisch [Ruppert et al., 1999]. Das Entfernen des basischen N-Terminus des BMP-2 hebt jedoch eine Heparinbindung

nicht komplett auf, da auch positiv geladene Bereiche im Cystinknoten mit Heparin interagieren können [Gandhi & Mancera, 2012].

1.1.2 Signaltransduktion des humanen BMP-2

Seinen biologischen Effekt vermittelt das BMP-2 nach Bindung sowie Aktivierung spezifischer Rezeptoren Typ-I und Typ-II (Serin/Threonin-Kinasen-Rezeptoren), die in der Zellmembran verankert sind [Massague, 1998, ten Dijke et al., 1996, Massague, et al., 2000]. Beide Rezeptorsubtypen weisen eine gemeinsame Grundarchitektur auf. Sie bestehen aus einer extrazellulären-Domäne (kleine Liganden und Binde-Domäne), einer Transmembranregion sowie einer Serin/Threonin-Kinase-Domäne [Weber et al., 2007]. Zu den Typ-I-Rezeptoren wurden aufgrund einer Sequenzhomologie sieben Rezeptoren klassifiziert: ALK-1, ALK-2, ALK-3 (BMPR-IA), ALK-6 (BMPR-IB), ALK-4, ALK-5, ALK-7. Die Typ-II-Rezeptoren umfassen: TGF β -II, AMHR-II, BMPR-II, ActR-IIB, ActR-IIA [Newfeld et al., 1999, Sebald et al., 2004]. Die Namensgebung ALK = *activin like receptor kinase* [ten Dijke et al., 1993] der Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie basierte zunächst auf einem Activin-Rezeptor [Mathews & Vale, 1991], der als erster Rezeptor dieser Proteinfamilie identifiziert wurde. Die Umbenennung der im Nachhinein entdeckten Rezeptoren erfolgte erst anhand der Zuordnung ihrer Liganden. So wurde zum Beispiel ALK-3 in BMPR-IA und ALK-6 in BMPR-IB umbenannt [Koenig et al., 1994].

Der Aktivierung des Signalweges der Typ-I und Typ-II-Rezeptoren liegt eine Heterooligomerisierung nach Ligandenbindung zu Grunde. Dabei ist es für die intrazelluläre Signaltransduktion von großer Bedeutung, welche Form der Rezeptor-Oligomerisierung im Vorfeld stattgefunden hat, da dadurch zwei voneinander unabhängige Signalkaskaden initiiert werden können. Es handelt sich dabei um den Smad- oder den MAPK-Signalweg. Bindet BMP-2 zunächst an einen pre-formed-complex (PFC, besteht aus 2x Typ-I und 2x Typ-II-Rezeptoren), dann kommt es zur Aktivierung des Smad-Signalweges [Gilboa et al., 2000]. Die Bindung des Liganden erfolgt dabei an die extrazelluläre-Domäne (des Typ-I- und Typ-II-Rezeptor), wodurch die Serin/Threonin-Kinase-Domänen näher zueinander rücken. Der konstitutiv aktive Rezeptor Typ-II (BMPR-II) transphosphoryliert nun die Glycin-Serin-reiche Domäne (GS-Box, SGSGS-Motiv) des Typ-I-Rezeptors (BMPR-I) und aktiviert diese [Wrana et al., 1994, ten Dijke et al., 1996, Miyazono et al., 2010, Gámez et al., 2013]. Nach der Aktivierung von BMPR-I folgt eine Signalübertragung an die Smad-Proteine, die in drei Klassen eingeteilt werden: R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5, 8, Rezeptorregulierung), Co-Smad (Smad 4, *common mediator*-Smads) und die I-Smad (Smad 6, Smad 7, Inhibierung) [Moustakes et al., 2001, Shi & Massague, 2003]. Nach dem jetzigen Wissensstand werden die R-Smad direkt durch die Typ-I-Rezeptor-Kinasen phosphoryliert und so aktiviert [Shi & Massague, 2003]. Die R-Smads werden von Endofin und CD44 zur Verfügung gestellt und nach erfolgter Signaltransduktion von diesen erneut rekrutiert [Shi et al., 2007]. Dabei aktiviert

BMP-2 in der Regel Smad-1, Smad-5 und Smad-8 [Miyazawa et al., 2002, Holzhausen et al., 2014]. Die so aktivierten R-Smads bilden anschließend mit den Co-Smads (Smad 4) einen heterotrimeren-Komplex aus, welcher in den Zellkern transferiert wird. Dort kann er durch Interaktion mit Co-Faktoren oder DNA-Bindeproteinen (Runx, Schnurri, Menin, OAZ, MAN1, MyoD, Vent2, Hoxc-8 und Msx1 [Massague, 2000, Massague & Wotton, 2000, Miyazono et al., 2010] koaktivatorisch die Expression der BMP-2-Zielgene reguliert werden [Reddi, 2000, Chen et al., 2012, Holzhausen et al., 2014]. Weiterhin ist eine Regulation anderer Transkriptionsfaktoren (z.B. Runx2 in Osteoblasten) möglich [Chen et al., 2004]. Im Zellkern folgt einer anhaltende Dephosphorylierung von R-Smads sowie eine Rückführung inaktiver R-Smads zurück ins Zytoplasma [Inman & Hill, 2002, Holzhausen et al., 2014]. Der Zyklus wird durch eine Smad-Ubiquitinierung sowie einer Proteasom-Degradation beendet [Massague, 2000, Miyazono et al., 2010, Holzhausen et al., 2014].

Wie bereits zuvor erwähnt, können BMP-Rezeptoren in einem Smad-unabhängigen Signalweg aktiviert werden. Im Rahmen dieser Signalwegweiterleitung spielen die MAPKs (*mitogen activated protein kinases*, auch bekannt als ERKs (*extracellular signal related kinases*) [Zhang & Liu, 2002], p38 (*p38 mitogen-activated protein kinases*) [Gallea et al., 2001] und die JNK (*c-Jun-NH2-terminal kinase*) [Guicheux et al., 2003] eine wichtige Rolle [Derynck & Zhang, 2003]. Findet eine Bindung des Liganden an den Typ-I-Rezeptor (hoch-affin) und eine Rekrutierung des Rezeptor Typ-II in einen BMP-*inducing signaling complex* (BISC) statt, dann wird der MAPK-Signalweg aktiviert (s. Abb. 2) [Nohe et al., 2002]. Der entstandene Komplex löst wiederum eine Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Domäne aus (s. Abb. 2, rechts). Durch die Phosphatrestübertragung auf TAB1 (*TAK1-binding protein*) wird dessen Inhibierung durch XIAP (*X-chromosomal linked inhibitor of apoptosis*) aufgehoben. Es folgt eine Aktivierung der MPKKK (*MAP-kinase kinase kinase*) TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*) über eine Phosphorylierung durch TAB1, wodurch die MAPK-Signalkaskade startet. In einer späteren Phase wird sowohl MKK3 (*MAP-kinase kinase 3*) als auch MKK6 (*MAP-kinase kinase 6*) phosphoryliert und dies wiederum aktiviert p38 [Matsuguchi et al., 2009]. JNK wird gleichzeitig von MKK4 und MKK7 phosphoryliert. Die phosphorylierten Transkriptionsfaktoren wandern in den Zellkern, wodurch die Expression von Knochenmarkerproteinen (z.B. alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Osteopontin (*secreted phosphoprotein 1*, SPP1)) induziert werden kann [Lai & Cheng, 2002]. Gerade p38 und JNK sind für die Osteoblasten-Differenzierung enorm wichtig [Matsuguchi et al., 2009, Greenblatt et al., 2010]. Das p38 aktiviert seinerseits Runx2 (*runt-related transcription factor 2*) und Osx (Osterix), wodurch eine Expressions-Stimulation früherer Osteoblastengene möglich ist [Greenblatt et al., 2010, Zhang, 2010]. JNK wiederum ist essentiell für die Aft4 (*activating transcription factor 4*) - Expression und begünstigt die späte Osteoblastendifferenzierung in der terminalen Phase [Matsuguchi et al., 2009, Komori, 2010]. Laut Yu et al., 2002 kann die Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges sowohl mit als auch ohne Beteiligung von Smad-

Proteinen stattfinden. Diese wiesen in epithelialen Brustgewebe (Maus) eine unabhängige Kinaseaktivität nach, die aus einer Mutation des TGF- β -Typ-I-Rezeptors (T β RI_ML45) resultierte. Die p38-MAPK kann zudem als möglicher Tumorsuppressor fungieren (auch mit/ohne JNK Beteiligung), was die Stressantworten und Entzündungsprozesse, die durch Tumorzellen verursacht werden, reguliert [Loesch & Chen, 2008].

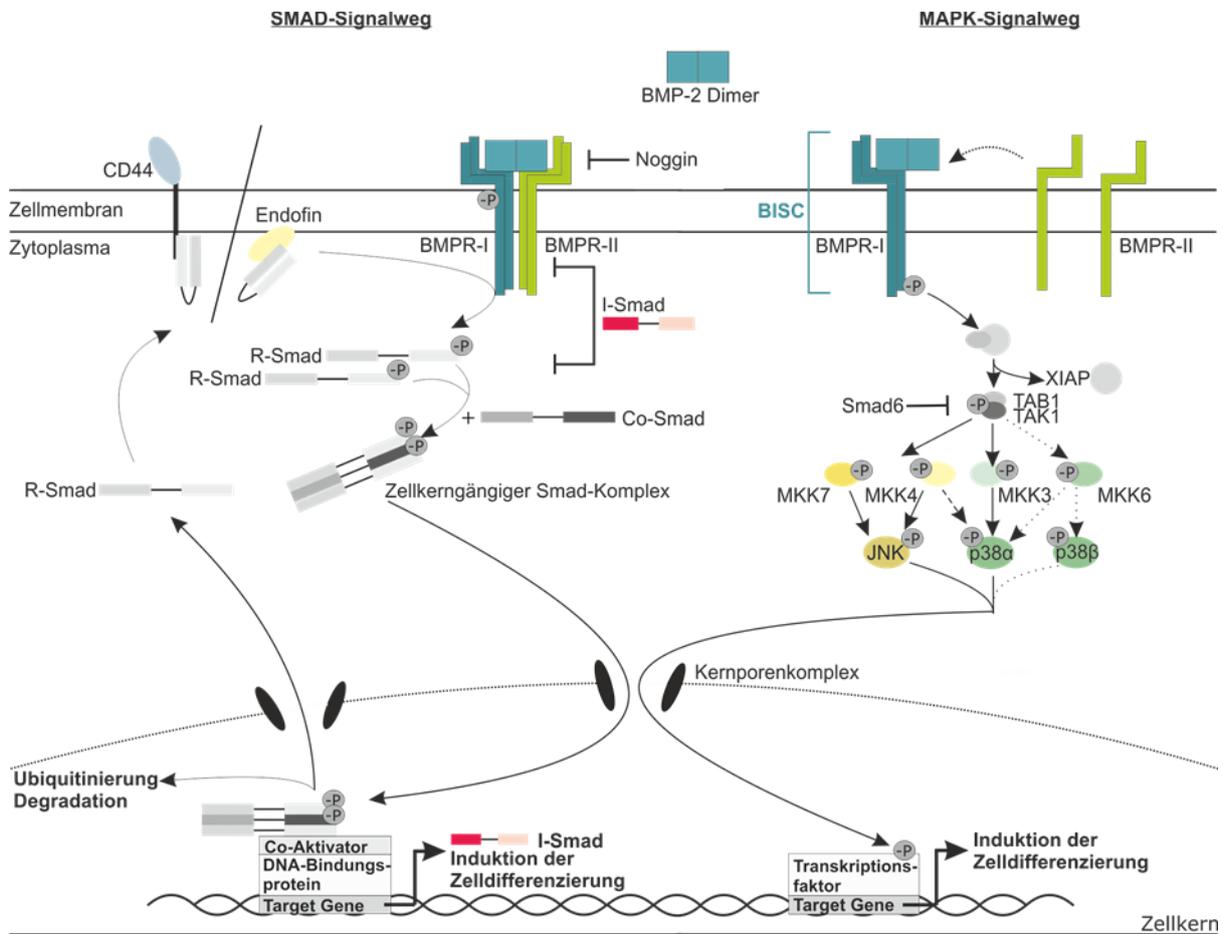


Abb. 2: BMP-2-Signaltransduktion

Links: SMAD-Signalweg: BMP-2-Dimer bindet an einen PFC (*pre-formed-complex*), wodurch die R-Smads phosphoryliert werden. Die R-Smads werden von Endofin und CD44 zur Verfügung gestellt [Shi et al., 2007]. Es entsteht ein trimere Komplex aus je zwei R-Smads mit einem Co-Smad. Nach Einwanderung in den Nukleus agiert dieser Smad-Komplex mit Co-Aktivatoren und reguliert mit Hilfe von DNA-Bindeproteinen die Zielgenexpression. Anschließend erfolgt die Dephosphorylierung der R-Smads und deren Recycling. Die Smad-induzierte Signalübertragung wird selbst über I-Smads negativ reguliert. I-Smads konkurrieren zum einen mit R-Smads, um die Rezeptorbindung und zum anderen mit Co-Smads um die Bindung der R-Smad. Durch Ubiquitinierung und anschließender Degradation im Proteasom kann dieser Zyklus zusätzlich unterbrochen werden. Eine weitere Inhibition des Signalweges erfolgt über den BMP-2-Antagonisten Noggin [modifiziert nach Chen et al., 2004, Miyazano et al., 2010 und Chen et al., 2012]. Rechts: MAPK-Signalweg: Durch die Bindung von BMP-2 an zwei BMPRI-Monomere (BISC-Komplex) und anschließender Rekrutierung von zwei BMPRI-Monomeren kommt zur Aktivierung der BMPRI-Kinase-Domäne. Es folgt die TAK-Phosphorylierung, wodurch zunächst MKK3 und p38 α aktiviert werden (frühes Stadium der Osteoblastendifferenzierung). Erst später kommt es durch die Phosphorylierung von MKK3 und p38 α zur Aktivierung von p38 α und β . Phosphorylierte MKK4 und MKK7 aktivieren ihrerseits die JNK. Final wird im Zellkern durch phosphorylierte Transkriptionsfaktoren die Zielgenexpression reguliert. [modifiziert nach Greenblatt et al., 2010, erstellt mit Coral Draw X7, ©Walden, K.D.].

P: phosphoryliert; BMPR: BMP-Rezeptor; Smad: bildet sich aus SMA (*small body size*) und MAD (*mothers against DPP homologs*); R-Smad: *receptor regulating Smad*; I-Smad (*inhibitory Smad*); MAPK: *mitogen activated protein kinase*; XIAP: *X-chromosomal linked inhibitor of apoptosis*; MKK3/4/6/7: *MAPK Kinase 3/4/6/7*; TAK1: *TGF- β -activated kinase 1*; TAB1: *TAK1-binding protein 1*.

1.2 Modulation der BMP-Signaltransduktion

Für alle zellulären Signalwege existieren multiple Signalkaskaden, die gesteuert und kontrolliert werden müssen. Die Signalweitergabe innerhalb der TGF- β -Superfamilie, zu der auch die BMP-Familie angehört, wird durch sezernierte Liganden initiiert. Die sehr spezifische Modulation ihrer Aktivität erfolgt mitunter durch Modulatorproteine, die sich sowohl positiv als auch negativ auf die jeweilige Signalkette auswirken. So existieren zum Beispiel mehr als zwanzig negative Effektoren (BMP-2-Antagonisten), die nicht nur direkt an TGF- β und BMP binden können, sondern deren Signaltransduktion inhibieren [Carreira et al., 2014, Rider & Mulloy, 2010].

1.2.1 Regulatorische Proteine in der BMP-Signalkaskade

Bedingt durch seine Komplexität der vielen zellulären Prozesse sind in der Literatur unterschiedliche, sehr gut beschriebene Mechanismen zu finden, durch welche Zellen auf natürliche Art u.a. die BMP-Signaltransduktion selbst regulieren. Das Aktivitätsniveau kann dabei zum einen durch eine Vielzahl von intrazellulären Proteinen, wie den I-Smads (inhibitorische Smads: Smad 6 und 7) [Nakao et al., 1997, Imamura et al., 1997], den Smurf 1/2-intrazellulären Inhibitoren [Lin et al., 2000, Suzuki et al., 2002], durch Pseudorezeptoren (u.a. Bambi) [Onichtchouk et al., 1999], extrazellulären Antagonisten (Chordin, Follistatin, Twisted Gastrulation, Noggin oder Vertreter der Cerberus/DAN-Familie), sowie auf der Membranebene gesteuert werden [Rosen, 2006, Nickel et al., 2009, Song et al., 2010, Mulloy & Rider, 2015].

1.2.2 Inhibitorische Smads

Neben der Modulation der Signalweiterleitung auf der extrazellulären Ebene kann die BMP-Signalkaskade (und die der TGF- β -Proteinfamilie) auch direkt intrazellulär reguliert werden. Hierbei spielen die inhibitorischen Smads eine wichtige Rolle. Die I-Smads gehören ebenfalls der Smad-Proteinfamilie an und besitzen eine charakteristische MH2-Domäne (C-Terminus), die zwischen den inhibitorischen Smads 6 und 7, aber auch den R-Smads und dem Co-Smads konserviert ist. Diese spezifische Domäne ist essentiell für die Interaktion mit dem aktivierten Typ-I-Rezeptor, aber auch für die Wechselwirkung zu R-Smads. So verhindern die inhibitorischen Smads die Phosphorylierung der R-Smads (1/5/8), indem sie an den Typ-I-Rezeptor binden, sodass die Ausbildung eines R-Smad-Co-Smad-Komplexes nicht mehr möglich ist [Imamura et al., 1997, Itoh et al., 2001]. Smad 6 unterbindet dabei effektiv durch BMP, sowie nur schwach die durch TGF- β /Activin induzierte Signalweiterleitung über ALK-3 (BMPR-IA), ALK-6 (BMPR-IB), sowie ALK-1/ALK-2-Rezeptoren [Goto et al., 2007].

Smad 7 hingegen ist stärker in seiner Inhibierung der TGF- β -Signaltransduktion im Vergleich zum Smad 6, obwohl diese beiden inhibitorischen Smads funktionelle Ähnlichkeit während der Inhibierung der BMP-vermittelten Signalweiterleitung zeigen [Hanyu et al., 2001]. Ergänzend regulieren die R-Smads den Non-Smad-Signalweg [Miyazawa & Miyazono, 2017].

1.2.3 Intrazelluläre Inhibitoren

1.2.3.1 Smurf 1/2

Die negative Modulation des BMP-/TGF- β -induzierten Signalweges kann über die Smurfs (*Smad ubiquitination regulatory factor* 1) erfolgen. Diese induzieren durch die Interaktion mit I-Smads die Degradation von Rezeptoren [Miyazawa & Miyazono, 2017]. Smurf 1 und Smurf 2 gehören zur Familie der HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen [Zhang et al., 2001]. Smurf 1 (E3-Ubiquitin-Ligase) triggert nicht nur die Poly-Ubiquitinierung der R-Smads (Smad 1 und Smad 5), sondern auch deren proteasomale Degradation. Diese Ubiquitin-Ligase wird dabei jedoch nicht durch den BMP-Signalweg reguliert [Zhu et al., 1999]. Smurf 2 (*Smad ubiquitination regulatory factor for Smad 2*) geht stattdessen Wechselwirkungen mit Smad 1, Smad 2, sowie Smad 3 ein, jedoch nicht mit Smad 4 [Zhang et al., 2001, Lin et al., 2000]. Durch die Expression von Smurf 2 werden die Protein-Level von Smad 1 und Smad 2 runterreguliert. Zudem inhibiert Smurf 2 spezifisch die biologische Funktion von Smurf 1 [Zhang et al., 2001]. Tang et al., 2011 zeigte durch *in vivo*-Versuche, dass Smurf 2 Smad 3 mehrfach mono-ubiquitinylieren kann. Beide intrazelluläre Inhibitoren rekrutieren ergänzend Smad 7 und induzieren anschließend dessen Ubiquitinierung, sowie seine Translokation in den Zellkern. Durch das anschließende Herausschleusen des Smad 7/Smurf 1-Komplexes zurück in das Zytoplasma erfolgt letztendlich die Degradation von T β R-I durch das rekrutierte Smad 7-Protein [Kavsak et al., 2000, Ebisawa et al., 2001].

1.2.3.2 Ski/SnoN/Fussel-15/-18

Eine weitere Möglichkeit der Smad-Signalinhibition besteht durch die c-Ski-Proteine (*cellular-sloan-Kettering Institute*) [Akiyoshi et al., 1999, Sun et al., 1999, Wu et al., 2002], die SnoN-Proteine (*Ski-related novel Protein N*) [Stroschein et al., 1999], aber auch durch Fussel-15 bzw.-18 (*Functional smad suppressing element on chromosome 15 oder 18*) [Arndt et al., 2005, Arndt et al., 2007]. Bei dem Ski/SnoN-Proteinen handelt es sich um Onkogene, welche die BMP, TGF- β und Activin-Signaltransduktion als Smad-abhängige Co-Repressoren, inhibieren [Deheuninck & Luo, 2009]. Die BMP-Signaltransduktion wird durch Ski infolge seiner Bindung an die MH-2-Domäne von Smad 1/5, aber auch von Smad 4 blockiert [Canalis et al., 2003]. Jedoch tritt dieser inhibitorischer Effekt von Ski nicht nur alleine bei der BMP-Signalkaskade auf, sondern auch während der TGF- β -Signaltransduktion, wo Ski als Co-repressor mit Smad 2 und Smad 3 interagiert und dadurch die Expression der TGF- β Zielgene hemmt [Luo et al., 1999, Xu et al., 2000, Leong et al., 2001]. SnoN, Fussel-15 und Fussel-18

und weitere Mitglieder der Ski-Proteinfamilie (nukleäre Onkoproteine) deaktivieren alle Smad 2 und Smad 3. Smad 1 wird zusätzlich von Fused-15, Smad 4 von SnoN bzw. Fused-18 inhibiert. Ski/SnoN fungieren im Zellkern nicht nur als Pro-, sondern auch als Anti-Onkogene [Fumagalli et al., 1993, Pan & Luo, 2009].

1.2.4 Pseudorezeptor-BAMBI

Der membranständige Pseudorezeptor BAMBI (BMP and *activin membrane-bound inhibitor*) agiert als eine Art negativer Rezeptor, wodurch die Bildung eines funktionsfähigen Rezeptorkomplexes während der BMP-, Activin-, aber auch TGF- β -Signaltransduktion verhindert wird.

BAMBI besitzt eine extrazelluläre Domäne, die den BMP- und TGF- β -Typ I-Rezeptoren ähnelt. Durch die Verkürzung des intrazellulären Bereichs des Typ I-Rezeptors und damit einhergehendem Fehlen der spezifischen Serin-/Threonin-Kinasedomäne kommt es zur Hemmung der Signaltransduktion, ein aktiver Rezeptorkomplex kann sich nicht ausbilden [Onichtchouk et al., 1999, Canalis et al., 2003]. Obwohl eine Rezeptorhomologie zwischen BAMBI und Typ I-Rezeptoren vorliegt, wurde hingegen bisher keine direkte Interaktion zwischen Pseudorezeptor und BMP oder TGF- β nachgewiesen. Das Glykoprotein BAMBI wird in terminal-differenzierten Osteoblasten exprimiert, seine Transkription wird durch TGF- β , BMP und Wnt kontrolliert. Zusammen mit BMP-4 wird BAMBI in vielen Entwicklungsprozessen während der Embryogenese in *Xenopus* produziert [Onichtchouk et al., 1999].

1.2.5 Extrazelluläre BMP-Antagonisten

Die BMP-Signaltransduktion wird gehemmt, indem ein sezernierter extrazellulärer Antagonist direkt an BMP-2 bindet und dadurch eine Interaktion und Aktivierung der BMPR-I/II-Rezeptoren verhindert [Groppe et al., 2002]. Es gibt eine Vielzahl an endogenen, hochaffinen BMP-2-Antagonisten, die aufgrund ihrer Strukturhomologie, sowie der Größe ihres konservierten Cystinknotens in drei Gruppen eingeteilt werden [Avsian-Kretschmer & Hsueh, 2004]. Dazu zählen zum einen die Dan (*differential screening selected gene aberrative in neuroblastoma*)/Cerberus-Familie, zu der die Proteine Cerberus, Dan/Can, Coco, Gremlin, PRDC/Gremlin 2, Sclerostin/SOST, Wise/USAG 1, Caronte und Dante, gehören. Als weitere Antagonisten sind die Twisted Gastrulation (TSG) und die Chordin-Familie (CHRD), zu der auch Noggin (NOG) gezählt wird, zu nennen. Trotz der Zugehörigkeit zu einer Proteinfamilie zeigen ihre Mitglieder doch unterschiedliche Wirkbereiche.

Die Gemeinsamkeit aller Proteine der Dan-Familie ist eine Cystein-reiche Domäne am C-Terminus (Cystinknotenmotiv mit einem Ring aus acht Cysteinen) [Avsian-Kretschmer & Hsueh, 2004]. Bei Cerberus handelt es sich um einen multivalenten Inhibitor der BMP-4,

Nodal- und Wnt-Signalwege [Piccolo et al., 1999]. Cerberus reguliert die Rechts/Links-Asymmetrie bei der Bildung des embryonalen Kopfes und Herzens in Vertebraten [Zhu et al., 1999]. Das Coco-Protein besitzt genau wie Cerberus auch antagonistische Aktivitäten gegen BMPs und Nodal [Bell et al., 2003], ist allerdings auch ein maternaler Wnt-Inhibitor [Marques et al., 2004]. Abhängig von den Liganden, an die er bindet, fungiert Coco sowohl als Inhibitor der Signaltransduktion (BMP, Activin, Nodal-System) als auch als Aktivator der TGF- β -Signaltransduktion [Deglincerti et al., 2015].

Dan als weiterer Vertreter dieser Proteinfamilie bindet BMP-2 und BMP-4 mit einer relativ hohen Affinität [Hung et al., 2012], wie dies auch bei Gremlin beobachtet wird [Shi et al., 2001]. Jedoch zeigt Gremlin ergänzend eine geringe Bindungsaffinität zur BMP-7 [Canalis et al., 2003, Church et al., 2015]. Beide Proteine (Dan, Gremlin) sorgen final für die korrekte Achsenbildung im Embryo [Hsu et al., 1998, Canalis et al., 2003].

Publizierte Daten über Sclerostin zeigen, dass es zwar ein negativer Regulator der Knochenbiosynthese (*in vivo/in vitro*-Studien) ist, jedoch keine direkte Wirkung auf die BMP-Signalkaskade besitzt [van Bezooijen et al., 2007]. Es antagonisiert stattdessen den kanonischen Wnt-Signalweg, indem das Protein die Wnt-Co-Rezeptoren LRP5 und LRP6 (*low-density lipoprotein-receptor related protein*) bindet, was zu einer verminderten Knochenbildung führt [Li et al., 2005, Vasiliadis et al., 2022]. Zwar bindet Sclerostin scheinbar verschiedene BMPs *in vitro*, dies jedoch mit einer schwachen Affinität [Kusu et al., 2003, Winkler et al., 2003], die sich *in vivo* nicht bestätigen ließ [van Bezooijen et al., 2007, Krause et al., 2010]. Sclerostin wird von den Osteocysten sekretiert [Winkler et al., 2003, Krause et al., 2010], konnte aber auch in Chondrozyten [Winkler et al., 2003] und Osteoklasten nachgewiesen werden [Kusu et al., 2003]. Außerhalb der Osteocysten wurde Sclerostin durch Weivoda et al., 2016 in der Lunge, der Leber, den Nieren, aber auch in der Epidermis gefunden.

Wise (auch bekannt als USAG1, Ectodin oder Sostdc1) gilt als weiteres Mitglied der Dan-Proteinfamilie und wurde zunächst als USAG1 (*uterine sensitization-associated gene 1*) identifiziert [Simmons & Kennedy, 2002], ein Gen, das im uterinen Endometrium von Ratten exprimiert wird. Itasaki et al., 2003 entdeckte dieses Protein unabhängig davon im *Xenopus embryo*. Hier inhibiert Wise in der frühen Embryogenese das Wnt-System und ist in die Körperachsen-Ausbildung, wie auch die Entwicklung des Neuralrohrs involviert. Wise bindet dabei an die extrazelluläre Domäne des Wnt-Co-Rezeptor LRP4, sowie an LRP5 und LRP6 [Semenov et al., 2005, Ohazama et al., 2008, Lintern et al., 2009, Ahn et al., 2010]. So wird die durch Wnt-induzierte Komplexbildung (Frizzles-LRP-Komplex) unterbunden und der Wnt-Signalweg blockiert. Das Protein gilt kontextabhängig als Aktivator und Inhibitor des Wnt-Signalweges [Itasaki et al., 2003]. Ergänzend antagonisiert dieses Modulatorprotein auch verschiedene Wachstumsfaktoren, u.a. auch die BMPs [Laurikalla et al., 2003].

Das PRDC (*Protein related to Dan and Cerberus*) ist ein weiterer BMP-Antagonist mit hoher Sequenzhomologie zur Gremlin, daher auch sein Synonym Gremlin 2. PRDC wird durch das Wnt-System induziert und zeigt zudem stark präferierte inhibitorische Wirkung auf BMP-2 und BMP-4, inhibiert aber auch BMP-7. Allerdings hemmt es nicht die Wnt-Signaltransduktion [Im et al., 2007, Kattamuri et al., 2012, Nolan et al., 2013]. Während der frühen Embryogenese spielt PRDC eine wichtige Rolle in der Neurogenese [Kriebitz et al., 2009], Osteogenese [Ideno et al., 2009] und Morphogenese der Zähne [Vogel et al., 2015]. Im adulten Körper jedoch ist Gremlin 2 nicht nur in den Knochenumbau, sondern auch in die Knochenreparatur involviert [Dean et al., 2010].

Caronte, ein *Cerberus like Protein*, ist für die korrekte Achsenbildung im Embryo verantwortlich, was sich bereits auch bei weiteren Mitgliedern der Dan-Proteinfamilie (Dan, Gremlin und Cerberus) beobachten lässt. Es aktiviert den Nodal-Signalweg, indem es die repressive BMP-2-Aktivität antagonisiert. Ergänzend wird durch die inhibitorische Wirkung von Caronte auf BMPs die Expression des Lefty-Gens in der Mittellinie (Embryo) induziert [Yokouchi et al., 1999, Rodríguez Esteban et al., 1999]. Entgegen früherer Publikationen von Yokouchi und Rodríguez Esteban propagieren Schlange et al., 2002 anhand eines neuen Modells für die L/R-Achsenbildung, dass BMP hier nicht als Repressor der Nodal-Expression agiert, sondern eher die endogene BMP-Signaltransduktion die Nodal-Expression unterstützt. Ergänzend reguliert BMP viele in die R/L-Achsenbildung involvierten Gene. Somit gelten die BMPs als positive Regulatoren der L/R-Achsen Formation [Schlange et al., 2002].

Dante, ein putatives Mitglied der Dan/Cerberus-Familie (*Cerberus like Protein*), fungiert als ein weiterer BMP-Antagonist (BMP-4), welcher in die Formierung der vertebraalen Links-Rechts-Asymmetrie durch Inhibierung von Nodal auf der rechten Seite des LPM (*lateral plate mesoderm*) involviert ist [Mine et al., 2008]

Twisted Gastrulation ist strukturell charakterisiert durch eine aus neun Cysteinen bestehende carboxyterminale Ring-Domäne [Avsian-Kretschmer & Hsueh, 2004, Walsh et al., 2010]. Es zeigt seine Funktion als BMP-Antagonist entweder eigenständig oder auch in Coexpression mit Chordin. Laut Oelgeschläger et al., 2000 ist die N-terminale Bindedomäne des TSG verantwortlich für die Bindung des Liganden (BMP), die C-terminale Domäne jedoch interagiert mit dem Antagonisten Chordin. Dabei wird ein sog. ternärer Chordin-BMP-TSG-Komplex gebildet, wodurch zunächst Chordin in seiner Wirkungsweise geschwächt wird. Auf der anderen Seite erleichtert dieser Komplex aufgrund einer proteolytischen Spaltung durch eine Metalloprotease (BMP-1/Tolloid) die Abspaltung von Chordin. Dadurch kann letztendlich das gebundene BMP wieder freigesetzt werden, womit Twisted Gastrulation sowohl als Antagonist als auch Agonist von BMP agieren kann [Larrain et al., 2001]. Durch die Coexpression beider Antagonisten (TSG und CHRD) kann zudem in ektodermalen Explantaten eine effizientere BMP-Inhibierung beobachtet werden [Chang et al., 2001].

Das gemeinsame Merkmal, das die Mitglieder der Chordin-Familie auszeichnet, ist eine cysteinreiche Domäne bestehend aus einem Ring von zehn Cysteinen [Avsian-Kretchmer & Hsueh, 2004]. Es enthält eine C-terminale zum von-Willebrandfaktor Typ C homologe Domäne (vWC, vier Cysteine), welche für die BMP-Bindung verantwortlich ist. Des Weiteren konnten in Chordin vier spezifische CHRD-Domänen gefunden werden, deren Funktion bislang unbekannt ist. Hyvönen identifizierte 2003 bei Datenbankrecherchen interessanterweise mehrere mikrobielle Homologe zu dieser Domäne. Bei Chordin handelt es sich um ein sekretorisches Protein, das direkt an BMP-2, BMP-4 und BMP-7 bindet, wodurch diese in ihrer Aktivität gehemmt werden und gleichzeitig eine Interaktion mit ihren Rezeptoren verhindert wird. Dabei ist die Bindungsaffinität zur BMP-2 und BMP-4 viel stärker ausgeprägt als die zur BMP-7 [Piccolo et al., 1996, Zhang et al., 2002]. Chordin spielt eine essentielle Rolle in der embryonalen Entwicklung, vorwiegend in der Skeletogenese [Zhang et al., 2002, Balemans & Van Hul, 2002]. Das Protein komplexiert BMPs in Zusammenarbeit mit Twisted Gastrulation [Larrin et al., 2001], wodurch diese unter physiologischen Bedingungen eine viel höhere Löslichkeit aufweisen.

Follistatin ist ein weiteres sekretorisches Glykoprotein, welches ursprünglich als Suppressor des FSH (Follikelstimulierendes Hormon) identifiziert wurde [Ueno et al., 1987]. Erst später wurde seine Funktion als Inhibitor der TGF- β -Superfamilie Mitglieder vor allem des Activins, aber auch von Myostatinen (GDF-8, *growth differentiation factor*), GDF-9 und GDF-11 entdeckt [Phillips & de Kretser, 1998, Gamer et al., 2001, Amthor et al., 2004]. Dabei verhindert Follistatin die Bindung der jeweiligen Liganden an ihre Rezeptoren. Darüber hinaus bindet Follistatin auch BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-7), jedoch mit einer viel geringeren Aktivität [Balemans & Van Hul, 2002, Canalis et al., 2003]. Die Inhibierung der BMP-Signaltransduktion erfolgt nicht durch die direkte Bindung des Liganden, wie es z.B. bei Noggin oder auch Chordin zu beobachten ist, sondern durch die Bildung eines trimeren Komplexes mit BMP und seinen Rezeptoren [Iemura et al., 1998].

BMP-3, auch als Osteogenin bekannt, gilt als Inhibitor der Osteogenese durch Suppression der Osteoblastendifferenzierung. Es reguliert aber auch negativ die Knochendichte [Dalviski et al., 2001]. Gamer et al., 2005 zeigten, dass BMP-3 nur eine Teilmenge der zellulären TGF- β -Signalwirkung inhibieren kann, mitsamt der „ventralisierenden“ Signale des BMP-2 und BMP-4.

1.2.5.1.1 Noggin- „der wichtigste“ extrazellulärer BMP-2-Antagonist

Beim Noggin handelt es sich um ein 64 kDa großes homodimeres Glykoprotein, welches durch die NOG-Gene codiert wird. Die Primärstruktur von Noggin weist einen sauren N-Terminus, sowie einen cysteinreichen C-Terminus auf [Krause et al., 2011]. Ein stark basisches heparinbindendes-Segment befindet sich auf seiner Zelloberfläche [Groppe et al., 2002]. Noggin gilt als erster beschriebener Modulator der TGF- β -Signaltransduktion und wurde

erstmalig im *Xenopus embryos* entdeckt (Sekundärachsenbildung) [Smith & Harland, 1992]. Als pleiotroper Faktor wird Noggin bereits in der frühen Embryogenese bedingt durch eine BMP-Induktion exprimiert (Gastrulation, Neurulation), aber auch im adulten Organismus produziert [Smith & Harland, 1992, Gazzo et al., 1998]. Das Protein ist essentiell für die normale Skelettentwicklung/Gelenkentwicklung [Brunet et al., 1998, Pathi et al., 1999, Aspenberg et al., 2001, Gazzo & Canalis, 2006]. Es ist wesentlich für die Strukturierung des Neuralrohrs, aber auch für die Entwicklung von Zähnen, Augen, Follikeln und Haaren [McMahon et al., 1998, Sharov et al., 2003]. In Vertebraten spielt Noggin eine weitere wichtige Rolle in der Nervensystemausbildung, sowie auch in der Aufrechterhaltung seiner Funktion [McMahon et al., 1998]. Bei Mäusen führt die homozygote Gendeletion des Noggins zur perinatalen Letalität bedingt durch Extremitätenanomalien (*limb malformation*) oder mangelhafter Somitenentwicklung. Eine heterozygote Deletion im gleichen Modellorganismus resultiert in unterschiedlichen skelettalen Abnormalitäten [McMahon et al., 1998, Brunet et al., 1998]. Wie wichtig jedoch die Funktion von Noggin beim Menschen ist, wurde u.a. durch Gong et al., 1999, Marcelino et al., 2001, Takahashi et al., 2001, Lehmann et al., 2006 beschrieben. Heterozygote NOG-Mutationen (erhöhte Noggin-Aktivität) lösen skelettale Dysplasien, Brachydaktylien, proximalen Symphalangismus (SYM1) oder das multiple Synostosis Syndrom (SYNS1) aus. Die Krankheiten äußern sich hauptsächlich durch Fehlbildungen an Händen oder Füßen. Konkret kommt es so zu Hypoplasien (Verkürzung der Finger und/oder Zähnen) auf, aber auch zu Aplasien (Fehlen) der Phalangen, sowie zu Synostosen (Verschmelzung zweier Knochen). Dabei kann der Schweregrad unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Gelegentlich treten sogar Gesichtsasymmetrien oder hypoplastische Nägel auf. Neben seiner vielfältigen Funktion zeigt Noggin auch einen Einfluss auf die Krebsprogression. So kann bei Brustkrebs beispielsweise eine erhöhte Expression von Noggin in Knochenmetastasen beobachtet werden (Förderung des osteolytischen Tumorwachstums und der Kolonisation, Maus-Modell) [Tarragona et al., 2012]. Andererseits zeigte Feeley et al., 2006, dass eine *in vivo*-forcierte Überexpression von Noggin zu einer Wachstumsinhibierung von osteolytischen Metastasen im Prostataatumoren führt. Des Weiteren kann Noggin die Überexpression gemischter metastatischer Lungenkrebsläsionen im Knochen inhibieren [Feeley et al., 2006]. Möglicherweise wird Noggin zukünftig in der Tumorthherapie als potentielles Adjuvans zur Behandlung von Knochenmetastasen eingesetzt. Schwaninger et al., 2007, beschreiben zudem, dass in humanen Brust- oder Prostatazelllinien eine erhöhte Nogginexpression (konstitutiv) nur in osteolytischen, jedoch nicht in osteoblastischen Zelllinien beobachtet werden kann.

Noggin gilt als extrazellulärer BMP-Antagonist, welcher mit unterschiedlicher Affinität BMP-2, -4, -5, -6, -7, -13 und BMP-14 binden und inhibieren kann [Zimmermann et al., 1996, Seemann et al., 2009, Song et al., 2010, Krause et al., 2011]. Die Signaltransduktion von BMP-3, -6, -9, -10 und BMP-15 bleiben davon jedoch unberührt [Gamer et al., 2005,

Song et al., 2010, Krause et al., 2011]. Die Noggin-Expression wird durch BMP-Proteine selbst induziert und kann somit als Feedback-Mechanismus verstanden werden, um eine übermäßige Knochenbildung zu verhindern [Gazzerro et al., 1998].

Groppe et al., 2002 ist es erstmalig gelungen, die Kristallstruktur von Noggin komplexiert mit BMP-7 zu identifizieren (PDB ID 1M4U). Bis heute konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das von ihm dargestellte Noggin/BMP-7-Strukturmodell auf die Bindung und Inhibierung weiterer BMPs durch Noggin übertragen werden kann. Die Bindung von Noggin am BMP-7 induziert eine Konformationsänderung des Cytokins. Ergänzend zeigt dieses Strukturmodell, dass der Antagonist bei seiner hoch affinen Bindung an seinen Liganden sowohl mit dem BMP Typ I-Rezeptorbindeepitop als auch mit dem Typ II-Rezeptorbindeepitop interagiert [Groppe et al., 2003]. Gleiches wurde bereits 1996 durch Zimmermann et al. beschrieben.

Wegen seiner modulierenden Effekte wird Noggin als vielversprechendes Medizinpräparat diskutiert. Seine Bindungseigenschaften an BMP-7 sind über zielgerichtete Punktmutationen charakterisiert worden. Dabei zeigten drei Noggin-Mutanten (L 46 D, E 48 K, I 218 E) verminderte BMP-7-Bindungskapazitäten. Alternativ besteht die Möglichkeit nicht Noggin, sondern direkt seinen Liganden genetisch so zu verändern, um auf diese Weise effektivere BMPs (sog. *second generation BMPs*) zu entwickeln. So zeigten Seemann et al., 2009 und Song et al., 2010, dass die Substitution einzelner Aminosäuren in BMPs (BMP-2/P36K, BMP-7/K60E) diese in der Lage versetzt sich einer Inhibierung durch Noggin zu entziehen, welche mit der natürlichen Nogginresistenz des BMP-6 und BMP-9 [s. auch Wang et al., 2013 und Tab. 1] gleichzusetzen ist. Dadurch bietet sich die Chance für eine potentielle klinische Applikation von BMPs mit verbesserter agonistischer Aktivität. Das große Problem der Applikation von Wachstumsfaktoren zur Regeneration von Knochen besteht zurzeit weiterhin darin, dass diese im humanen Einsatz stark überdosiert werden müssen (mg-Bereich), um einen deutlichen Heilungseffekt beobachten zu können. Es ist bekannt, dass die BMP-2-Signaltransduktion einer Regulation durch Antagonisten unterliegt, wodurch nicht nur endogenes BMP, sondern auch exogen zugefügtes rhBMP durch Noggin neutralisiert wird. Durch den Einsatz von Noggin-resistenten BMP-Varianten könnte die Knochenmorphogenese während einer Frakturheilung mit hoher Wahrscheinlichkeit viel effektiver verlaufen. So ließ sich gleichzeitig die medizinterapeutisch eingesetzte Wachstumsfaktor-Dosis deutlich minimieren.

Tab. 1: Resistenz unterschiedlicher BMPs gegen ihren Antagonisten-Noggin

Die aufgeführte Resistenz bezieht sich auf das Lysin in Position 60 (L60) des BMP-6. Eine Substitution der Aminosäuren in Position 60 des BMP-6, BMP-7 und BMP-9, sowie Position 36 des BMP-2 (P36L, Position entspricht der des BMP-6) durch ein Lysin, ist verknüpft mit einer Resistenz gegen die Hemmung durch Noggin [Rosen, 2006, Song et al., 2010, Lissenberg-Thunnissen et al., 2011].

	BMP-2	BMP-6	BMP-7	BMP-9
Grundsätzliche Resistenz gegen eine Noggin-Hemmung	Nein	Ja Durch Lysin in Position 60 (L60)	Nein	Ja Durch Lysin in Position 60 (L60)
Resistenz gegen Noggin-Hemmung durch Substitution in Position 60 durch ein Lysin	Ja Austausch P36L analog zu L60 des BMP-6	-	Ja Austausch E60L Analog zu L60 des BMP-6	-

Zusammengenommen zeigen die durch Song et al., 2010 publizierten Daten, dass BMP-2 und BMP-7 keine grundsätzliche Resistenz gegen Noggin aufweisen, wie das bei BMP-6 oder BMP-9 der Fall ist. Das Lysin in Position 60 des BMP-6 vermittelt hierbei durchaus eine Resistenz gegen Noggin. Diese kann darüber hinaus auf weitere BMPs (BMP-2, BMP-7, s. Abb. 3) übertragen werden, jedoch nur durch eine Aminosäuresubstitution in dieser Position durch ein Lysin).

	55	65
BMP-2-10M	WIVNPP	PGYHNP
BMP-2	WIVAPP	PGYHNP
BMP-6	WIIAPK	PGYHNP
BMP-7	WIIAPE	PGYHNP
BMP-9	WIIAPK	KEYEYEA

Abb. 3: Sequenzalignment der reifen Regionen von BMP-2-10M, BMP-2, BMP-6, BMP-7 und BMP-9 bezogen auf die Aminosäuren 55-65, ausgehend von BMP-6 Nummerierung

1.3 Die Rolle von BMP-2 als therapeutisches Protein

Die Knochenreparatur und Regeneration nach einer Fraktur ist ein komplexer Prozess, in dem es der Organismus normalerweise eigenständig schafft, das geschädigte Gewebe mitsamt der kompletten Knochenanatomie ohne Einwirkung von außen wieder zu regenerieren und damit seine Funktion wiederherzustellen [Dumic-Cule et al., 2018]. Bei Frakturen, die lange

Röhrenknochen betreffen, ist dieser Heilungsprozess meistens innerhalb 20 Wochen abgeschlossen [Littenberg et al., 1998]. Wenn Knochen jedoch nicht heilen, stellt das die Patienten infolge der drohenden Berufsunfähigkeit durch verzögerte Rekonvaleszenz mittelfristig nicht nur vor große wirtschaftliche Probleme. In der Regel erfolgen dann eine Vielzahl an chirurgischen Eingriffen, sowie eine starke Belastung des Gesundheitssystems durch die entstehenden hohen Behandlungskosten. Trotz der immer besser werdenden Behandlungsmöglichkeiten können vermehrt Komplikationen auftreten, die Infektionen, aber auch Pseudoarthrosen miteinbeziehen [Ehnert et al., 2010, Hausmann et al., 2014, Tannoury & An, 2014]. Der Fokus der regenerativen Medizin der letzten Jahre lag beim Einsatz autologer Knochentransplantate, was bis heute als Goldstandard angesehen wird [Damien & Parsons, 1991, Logeart-Avramoglou, et al., 2005, Argintar et al., 2011]. Eine potentielle Alternative dafür lieferte zunächst die Therapie mit plättchenreichem Plasma (PRP, *platelet rich plasma*), mit dessen Hilfe die natürlichen Heilungsprozesse des Körpers unterstützt werden sollen [Schnependahl et al., 2016]. Jedoch wird der medizinisch therapeutische Einsatz von Plasma für die Regeneration von Frakturen trotz vielversprechender Ergebnisse nur bedingt weiter optimiert, da die optimale Wirkungs-dosis hier nicht klar definiert werden kann. Die aktiven Bestandteile des Plasmas sind nach wie vor noch nicht vollständig bekannt [Rodriguez et al., 2014, Roffi et al., 2017, Everts et al., 2020]. Erst durch die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen während der Frakturheilung und der daran beteiligten Zellen, wie den mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, aber auch von Faktoren (u.a. das Parathormon oder Hypoxie-induzierter Faktor-alpha) und Modulatoren, rückten u.a. die BMPs als Induktoren der Osteogenese immer mehr in den Fokus der Forschung [Reddi, 2001, Bessa et al., 2008, Nauth et al., 2009,]. Als wichtigster Vertreter der endogenen BMPs wurde zunächst rhBMP-2 identifiziert, dessen Expression nach Verletzungen und des anschließenden Heilungsprozesses hochreguliert ist [Bostrom, 1998, Ruschke et al., 2012]. Durch diese Tatsache fungiert BMP-2 als eine Art physiologischer Mediator für Reparaturprozesse und gilt deswegen als interessanter Wirkstoff mit medizin-therapeutischen Eigenschaften. Zu den weiteren BMPs mit osteogenen Eigenschaften gehören auch das BMP-4, BMP-6, BMP-7 sowie BMP-9 [Gautschi et al., 2007]. Bislang existiert jedoch nur für das BMP-7 (rhOP-1) seit 2001 eine FDA-Zulassung als Osigraft®-Medizinprodukt (Firma Striker). Die erfolgsversprechende therapeutische Nutzung von BMP-2 aufgrund seiner osteoinduktiven Wirkung wächst seit seiner Entdeckung durch Urist im Jahre 1965 [Urist, 1965] stetig. Seit 2002 ist das Protein durch die FDA (US Food and Drug Administration) als Medizinprodukt zugelassen und als Infuse® Bone Graft (Medtronic Spinal and Biologics, USA Sektor) kommerziell verfügbar. Im gleichen Jahr erfolgte die Zulassung für InductOS® (Medtronic BioPharma B.V., EU Sektor) durch die europäische Arzneimittelagentur (EMA). Beide Genehmigungen basierten auf einer großen klinischen Studie mit 450 Patienten (BESTT-Study), die eine offene Tibiafraktur aufwiesen [Govender et al., 2002]. Durch die Implantation

einer Kollagenmatrix mit dem rhBMP-2-Präparat (1.5 mg/ml), ergänzt um einen Titanium-Käfig sog. LT-CAGE® für die mechanische Stabilität des Implantats [El Bialy et al., 2017], konnte eine signifikant schnellere Heilung eines Bruches bei allen Schweregraden beobachtet werden. Es traten zudem seltener Wundheilungsstörungen auf, wodurch die Rate an Folgeoperationen deutlich sanken [Govender et al., 2002]. Der vielversprechende Erfolg durch den Einsatz von rhBMP-2 bei offenen Tibiafrakturen wurde in vielen darauffolgenden Studien bestätigt [Swiontkowski et al., 2006, Jones et al. 2006, Wei et al., 2012].

Die human-therapeutische Anwendung von rhBMP-2 umfasst mittlerweile die unterschiedlichsten Anwendungsbereiche, zu der nicht nur die Behandlung von Schienbeinfrakturen zählen [Govender et al., 2002, Jones et al., 2006, Aro et al., 2011]. Zu nennen ist hier die regenerative Gelenkknorpeltherapie [Sellers et al., 2008], die Lendenwirbelkörperfusion bei degenerativen Bandscheibenerkrankungen [Beidas et al., 2013], so wie der dentale Einsatz von BMP-2 [Alonso et al., 2010, Park et al., 2019]. Obwohl mittlerweile ein sehr umfangreicher wissenschaftlicher Erkenntnisstand das Potential des Wachstumsfaktors bei bestimmten medizinischen Indikationen widerspiegelt, verhindert das teilweise vermehrte Auftreten von Nebenwirkungen, wie u.a. Schwellungen, immunogene Reaktionen, ektope Knochenbildung, lokale Toxizität und Hämatome im Weichteilgewebe [Gautschi et al., 2007, Carragee et al., 2011, Comer et al., 2012] durch die Applikation von rhBMP-2 die routinemäßige klinische Anwendbarkeit. Möglicherweise kann die bisherige Behandlungspraxis mit rhBMP-2 als spätfolge auch Tumorgenese induzieren [Devine et al., 2012, Lad et al., 2013, Cahill et al., 2015]. Die auftretenden Nebeneffekte nach der Behandlung mit InductOS® resultieren höchstwahrscheinlich durch den Einsatz von supraphysiologischen Dosen in Milligrammbereich [Schmidt-Bleek, et al., 2016], was vermutlich bis zum Faktor 10^6 mehr beträgt als physiologisch bei einer normalen Knochenreparatur vom Körper produziert wird [Gamradt & Lieberman, 2004]. Zudem muss auch die Diffusionsfähigkeit des BMPs kritisch betrachtet werden, um ektopische Knochenbildung nach rhBMP-2-Applikation auszuschließen. In Folge dessen wurden im Laufe der Jahre solche Stimmen lauter, die nicht nur eine geeignetere Applikationsform fordern, sondern vor allem eine optimale Anpassung der eingesetzten Konzentration, die genau auf die einzelne Spezies bzw. den einzelnen Patienten abgestimmt sein sollte. Mit zahlreichen neuen Entwicklungen wurde im letzten Jahrzehnt versucht das rhBMP-2 an verschiedene Biomaterialien zu koppeln, um einerseits seine Diffusionsfähigkeit zu minimieren und andererseits die Freisetzung des Wachstumsfaktors aus bzw. von der Trägermatrix kontinuierlich und zum richtigen Zeitpunkt zu gewährleisten. Die Ansätze zur Applikation von rhBMP-2 werden unterteilt in nicht-kovalente Adsorption, die kovalente Anbindung an ein Implantatoberfläche, sowie die lokale Abgabe mittels eines passenden Trägers [Masters, 2011, Vo et al., 2012, Hajimiri et al., 2015, Mumcuoglu et al., 2017]. Auch ganz neue Wege werden erforscht, um nicht nur die BMP-2-Effizienz zu steigern, sondern auch seine räumlich-zeitliche Präsenz zu verbessern. Dazu gehören u.a. die azelluläre

Gentherapie, wo die genetische Information des rhBMP-2 über einen Vektor vermittelt wird. Dieser kann am Defektort appliziert werden und ermöglicht nach Aufnahme in die Zellen eine BMP-2-Proteinexpression. Auf der anderen Seite kann durch zellbasierte Gentherapie (Zellen *ex vivo* transfiziert mit BMP-2 codierenden cDNA) direkt an der Verletzung die Proteinexpression des Wachstumsfaktors stattfinden [Betz et al., 2006, Schwabe et al., 2012, Mumcuoglu et al., 2017].

1.4 Die klinische Realität: Weniger ist mehr?

Doch was ist die optimale Dosis für ein Medizinpräparat auf Basis von rhBMP-2? Im gesamten menschlichen Organismus zirkulieren normalerweise ca. 2 mg BMP-2 [Halloran et al., 2020]. Das InductOS®/Infuse® Bone Graft-Medizinprodukte dagegen erzielt mit einer BMP-2 Dosis von 10-12 mg positive, osteogene Effekte in humanen Studien [Jones et al., 2006]. Zudem wird im Zuge eines negativen Feedback-Mechanismus durch Noggin die BMP-2-Signaltransduktion reguliert, wodurch die Noggin Expression signifikant steigt, wenn BMP-2 injiziert wurde [Dean et al., 2010, Chien et al., 2020]. Dieser Mechanismus muss entsprechend mit hohen exogenen Dosen des Wachstumsfaktors überkompensiert werden, um die inhibitorische Wirkung des Antagonisten Noggin zu mindern, was letztendlich zu den zuvor beschriebenen Komplikationen durch die Überdosierung von BMP-2 führt.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die übermäßige Applikation des BMP-2 ist seine hohe Aggregationsneigung. So beschreibt Halloran et al, 2020 in seinem Review, dass lediglich 75 µg des BMP-2 an den Kollagenschwamm gebunden sind, wobei der Rest des Wachstumsfaktors anscheinend direkt auf dieser Matrix präzipitiert. Auch dies würde erklären, warum das BMP-2 in so hohen Dosen in der Medizin eingesetzt wird.

Die Freisetzungskinetik des BMP-2 aus der Carriermatrix beruht zunächst auf einer explosionsartigen Freisetzung des Wachstumsfaktors, gefolgt von einer kontinuierlichen Abgabe [Geiger et al., 2003, King & Krebsbach, 2012]. Das BMP fungiert dabei als eine Art chemoattraktives Protein, welches bei großen Knochendefekten durch seine explosionsartige Freisetzung Osteoprogenitorzellen am Ort der Fraktur bzw. an die kollagenbasierte Matrix anlockt, die graduierte Abgabe des Wachstumsfaktors hingegen fördert die Osteoblastendifferenzierung und dadurch die Knochenregeneration [Fiedler et al., 2002, Brown et al., 2011].

Die Forschungsgemeinschaft ist sich einig, dass das beste Prinzip für eine optimale Pharmakokinetik des rhBMP-2 die Kombination aus explosionsartiger und kontinuierlicher Freisetzung beinhaltet. Jedoch werden für die explosionsartige Freigabe des rhBMP-2 aus der Kollagenmatrix, wie es bei InductOS®/Infuse® Bone Graft der Fall ist [King & Krebsbach, 2012], supraphysiologische Dosen des rhBMP-2 benötigt, wodurch wiederum das Risiko für die bereits beschriebenen Nebeneffekte signifikant erhöht wird. Aus diesem Grund wird nach

weiteren für die Klinik relevanten Immobilisierungsoberflächen gesucht, die es ermöglichen mit rekombinant humanem BMP-2 eine neue Knochenbildung nach Frakturen zu induzieren, die nebenwirkungsarm, effektiv und sicher für den Patienten sind und in Dosen eingesetzt werden, die sich dem physiologischen Konzentrationsbereich annähern.

Es macht den Anschein, dass trotz der Kenntnis über die möglichen Risiken einer Überdosierung viel zu oft die Größe des vorhandenen Knochendefekts eine wichtigere Rolle einnimmt, anstatt sich auf die minimal mögliche Dosis zu fokussieren, mit der noch eine Knochensynthese erzielt werden kann. Dabei scheint der osteoinduktive Effekt, der von BMP-2 ausgeht, weniger von der Gesamtmenge des applizierten BMPs abzuhängen, sondern sehr viel mehr von der real verfügbaren lokalen Dosis [Suh et al., 2002]. Die aktuell angewendete BMP-2-Dosis (InductOS®/Infuse® Bone Graft-Präparat) basiert jedoch weiterhin auf der durch Govender et al., 2002, publizierten Menge, mit der die besten Studienergebnisse erzielt worden sind. Dass es jedoch möglich ist, die eingesetzte BMP-2-Konzentration deutlich zu senken und trotzdem die Induktion von Knochen zu gewährleisten, wiesen einige Arbeitsgruppe in Tierexperimenten nach. Bereits Yasko et al., konnten 1992 zeigen, dass 11 µg rhBMP-2 ausreichen, um eine Heilung segmentaler Knochendefekte in Ratten zu induzieren. Des Weiteren geht aus der Publikation von Schmidt-Bleek et al., 2016 hervor, dass durch die Reduzierung der BMP-2-Dosis von 50 µg auf 5 µg bei der Behandlung eines 5 mm Femurdefekts (Femur - Oberschenkelknochen, kritische Größe) einer Ratte, eine knöcherne Verschließung des Defekts beobachtet werden kann. Auch Charles et al., 2015 konnte anhand eines Mausmodells (18-20 Monate alte Mäuse) belegen, dass eine niedrige Dosis BMP-2 (2 µg) in Kombination mit FGF-2 (5 µg) die Heilung von Schädelknochendefekten bewirkt.

Schlussfolgernd ist klar, dass auch 20 Jahren nach der Zulassung von rhBMP-2 in einem Medizinprodukt, immer noch wesentliche proteinchemische und medizinische Schwierigkeiten den klinischen Einsatz von rhBMP-2 erschweren. Die Schwerpunkte des Optimierungsbedarfs liegen dabei zunächst auf der Minimierung der BMP-2-Dosis, sowie der Entwicklung eines besseren Trägersystems mit einer kontrollierten Freisetzung des Wachstumsfaktors. Mindestens gleich entscheidend ist aber auch ein besseres Verständnis für alle molekularen Mechanismen, die während einer Frakturheilung wirken, sowie deren genaueres Zusammenspiel zu verstehen. Essentiell ist zudem die Beantwortung der Frage, wann und wie die hyperphysiologischen Dosen bei vielen Patienten Komplikationen verursachen können. Von besonderem Interesse sind außerdem die sogenannten „*second generation*“ BMPs, die nicht nur viel bioaktiver sind, sondern auch über einen viel längeren Zeitraum bleiben. Als ein interessantes therapeutisches Molekül (orthopädische Chirurgie) kann hierbei das BMP-2-Analogon L51P genannt werden [Keller et al., 2004, Albers et al., 2012, Khattab et al., 2014, Khattab et al., 2019], dass bei gleichzeitiger Anwendung mit IVD (*intervertebrale disc cells*)-Zellen (*in vitro*) einen synergistischen Effekt zeigt. L51P inhibiert die BMP-2-Antagonisten Noggin, Chordin, aber auch Gremlin (Expression durch IVD -Zellen) [Kellet et al., 2004, May

et al., 2020]. Es ist jedoch nicht in der Lage die BMP-2-Signaltransduktion auszulösen, wenn es alleine zu primären Osteoblasten MC3T3-E1-Zellen, ATDC5-Zellen oder pro-Myoblasten appliziert wird [Albers et al., 2012, Sebald et al., 2012, Khattab et al., 2014, Khattab et al., 2019].

2 Zielsetzung der Arbeit

Der Einsatz von rhBMP-2 (rekombinant humane *Bone Morphogenetic Protein-2*) als therapeutisches Protein gewinnt aus medizinischer Sicht im Verlauf der letzten Jahre immer mehr an Bedeutung. Einerseits wird ein steigender Bedarf des BMP-2 für eine bessere Frakturheilung bzw. die vollständige Wiederherstellung eines Knochenbruchs beobachtet, wenn die eigenen Reparatur- und Selbstheilungskräfte nicht ausreichen, andererseits wächst die dynamische Entwicklung im Bereich der regenerativen Medizin und Dentalchirurgie und dadurch der erhöhte Bedarf am löslichen und funktionalen BMP-2 [Hollinger et al., 1998, Bessa et al., 2008].

Die natürliche Tendenz des Wachstumsfaktors BMP-2 während der biotechnologischen Herstellungsweise in einem *E. coli*-System, unlösliche Aggregate bzw. *inclusion bodies* zu bilden, macht eine direkte klinische Applikation von prokaryotisch heterolog produzierten BMP-2 bisher unmöglich. Um biologisch aktives BMP-2 aus bakterieller Produktion zu gewinnen, bedarf es eines Renaturierungsprozesses [Israel et al., 1992, Fischer et al., 1993, Long et al., 2006, Vallejo et al., 2002, von Einem et al., 2010]. Dabei ist nicht auszuschließen, dass Chemikalien zum Einsatz kommen, die aus medizinischer Sicht kritisch zu betrachten sind, da sie ein nicht kalkulierbares Risiko für den Patienten darstellen.

Die hohe Aggregationsneigung des rhBMP-2* (NCBI: NP_001191.1) reduziert zudem die Konzentration der biologisch aktiven Proteinkomponente (Dimer). Entsprechend werden medizinisch unphysiologisch große Proteinmengen bis in den mg-Bereich (z.B. InductOS®/Infuse® Bone Graft) eingesetzt [Bessa et al., 2008, Schmidt-Bleek et al., 2016], wodurch vermehrt nachteilige Effekte beobachtet werden können, bei denen u.a. Entzündungsprozesse sowie eine ektopische Knochenbildung bis hin zur Tumorbildung (am Behandlungsort) den Gesundheitszustand der betroffenen Patienten erheblich verschlechtern können [Kim et al., 2014, James et al., 2016, siehe auch Pobloth et al., 2017].

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, in einem systematischen Verfahren zunächst Prototypen von BMP-2-Varianten herzustellen, die eine hohe Löslichkeit aufweisen und deren Funktionalität erhalten bleibt. Es sollten aber auch indirekte Agonisten produziert werden, um die Wirkung endogener BMP-2s zu steigern, indem diese z.B. klassische Inhibitoren von BMP-2 wie Noggin abfangen. Diese indirekten Agonisten dürfen nicht selbst an BMP-2-Rezeptoren binden. Die BMP-2-Muteine sollen anschließend biophysikalisch und biologisch analysiert werden. Dabei ist es wichtig, dass während der rekombinanten Herstellung in einem *E. coli*-System BMP-2 direkt in löslicher Form produziert wird, so dass die normalerweise bisher notwendigen folgenden Renaturierungsschritte entfallen.

2.1 Vorarbeiten

In Vorarbeiten für diese Dissertation wurde das Aggregationsverhalten des Wildtyp-BMP-2 *in silico* charakterisiert. Mittels einer bioinformatischen Analyse konnten in der Sequenz des Wt-BMP-2* (NCBI: NP_001191.1) mögliche Aggregationsbereiche, sog. *aggregation hot spots* (AHS), identifiziert werden. Diese insgesamt sechs nachgewiesenen AHS sind wiederum in zwei *Cluster* angeordnet, die punktuell auch Aminosäuren der Bindungs epitope für die BMP-2-Membranrezeptoren enthalten. Da diese oben genannten Sequenzabschnitte funktionell enorm wichtige Regionen repräsentieren, beruht die Strategie für die Erzeugung der BMP-2-Mutanten zunächst nur auf dem zielgenauen Austausch von Aminosäuren mit stark hydrophobem Charakter im Bereich der *aggregation hot spots* durch solche mit hydrophiler Beschaffenheit.

2.2 Projektziele der Dissertation

Die Konzeptionierung der BMP-Varianten beruhte auf der Klonierung von zunächst drei Varianten:

TrxA-BMP-2-10M → Die erste Variante diente als Vorläuferkonstrukt, um zu überprüfen, ob durch das gleichzeitige Einfügen einer Vielzahl an Mutationen (10 Mutationen, 10 M) in die Aminosäuresequenz des BMP-2 auch de facto die AHS eliminiert werden können und das BMP-2 direkt in löslicher Form und eventuell direkt als Dimer (TrxA-BMP-2-10M) hergestellt werden kann. Des Weiteren sollte getestet werden, welche Auswirkungen ein Löslichkeitsvermittelnder Fusionsanhang (hier TrxA) ergänzend zu den bereits veränderten Positionen auf die Löslichkeit von BMP-2 hat.

BMP-2-10M → Die zweite Variante diente als inverser Agonist, der durch eine umfassende hydrophilisierende Mutationsstrategie nicht an BMP-2-Rezeptoren binden kann. Er sollte im optimalen Fall jedoch in der Lage sein, BMP-2-Inhibitoren wie Noggin durch Bindung zu neutralisieren. BMP-2-10M enthält zehn Aminosäureaustausche (10 M) im Vergleich zu Wt-BMP-2*, wodurch die Löslichkeit des rekombinant produzierten Proteins gesteigert werden soll. Die Aufreinigung kann hierbei über die N-terminale Heparinbindestelle des BMP-2 erfolgen.

BMP-2-2Hep-7M → Die dritte Variante, diente als möglicher BMP-2-Agonist mit einer verdoppelten Heparinbindestelle, die durch das Einfügen von basischen Motiven KHK und RKR am N-Terminus (2Hep) realisiert werden sollte. Durch eine verbesserte Bindung der Variante an die zelluläre Matrix sollte dadurch nicht nur die osteogene Potenz des BMP-2 verstärkt werden, sondern auch die Aufreinigung des Proteins über Heparinsepharose noch effektiver möglich sein. Diese Variante besitzt sieben veränderte Aminosäuren (7M), welche die Löslichkeit des BMP-2-Proteins steigern sollen.

Für alle Proteinvarianten von BMP-2 galt es, optimal geeignete prokaryontische Expressionssysteme sowie die optimalen Expressionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Induktionsbedingungen) zu ermitteln, in dem die Zielproteine in hoher Ausbeute löslich dargestellt werden können.

Final sollte ein optimales chromatographisches Profil erarbeitet werden, um mit möglichst wenigen Schritten in möglichst hoher Ausbeute Dimere der BMP-2-Varianten in reiner Form zu erhalten.

Die angestrebten Proteinvarianten wurden auf verschiedene Weise biophysikalisch charakterisiert. Die Identität der Konstrukte sollte mit massenspektrometrischen Methoden belegt werden. Der Anteil nativer Faltungselemente wurde mit Hilfe von Circular dichroismus abgeschätzt. Die besondere Aggregationstendenz von BMP-2 sollte mit Hilfe komplementärer Methoden (mikrofluidische Diffusionsanalyse und dynamische Lichtstreuung) analysiert werden und mit der der Varianten, sowie gezielt entfaltetem BMP-2, verglichen werden.

Die funktionelle Charakterisierung und somit die quantitative Bestimmung des Osteogenesepotentials der BMP-2 Varianten sollte mit zellkulturbasierten Funktionstests näher untersucht werden. Angestrebt wurden die induzierbare alkalische Phosphatase Aktivität (ALP-Test) zu detektieren, sowie ein dualer BRELuc-Reporter-Gen-Assay, der in der Lage ist, BMP abhängige Transkription quantitativ zu spiegeln.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tab. 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamide 4K Lösung (30 %) – Mix 29:1	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Agar Bacteriology grade	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Agarose low EEO	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Ammoniumsulfat	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Antibiotika	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G250	Ral Diagnostics, Frankreich
D-Glucose-Monohydrat	Sigma Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
DNA-Marker GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
DMSO >99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Merck KGaA, Frankfurt
Ethanol 96 % ,70 %	VWR Chemicals, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Merck KGaA, Darmstadt

Material und Methoden

Glycerin 86 %, 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Isopropanol	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
L-Arginin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Fluka Chemie GmbH, Buchs/Schweiz
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
6x MassRuler™ DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Natriumchlorid (NaCl)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
One Taq- Quick Load Mastermix	New England Biolabs,
Natriumhydroxid (NaOH)-Perlen	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Ortho-Phosphorsäure 85 %	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
PageRuler Prestained Protein Lader (10-170 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech, Aidenbach
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich, Darmstadt
Piperazine-N, N'-bis(2-Ethansulfonsäure) (PIPES)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Puromycin Dihydrochlorid	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Salzsäure (HCl): rauchend 37 % und 2 M	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt

SYBR® Safe DNA gel stain	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Tricin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypton	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

3.1.2 Kits

Tab. 3: Verwendete Kits

Kits	Hersteller
NucleoSpin Plasmid EasyPure-Kit	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kit	Macherey & Nagel, Düren

3.1.3 Zelllinien

Tab. 4: Darstellung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Hersteller
C2C12-Zellen	Maus Myoblasten Zellen	ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten
HEK BRELuc-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen	AG Knaus, Institut der Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin

Die HEK BRELuc-Zellen wurden für diese Arbeit von der AG Knaus, Institut der Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin, zur Verfügung gestellt. Diese besitzen eine stabil transkribierte Genkassette, deren Genom u.a. für die Firefly-Luciferase (unter Kontrolle eines Id1-Promotors) und die Renilla-Luciferase (unter Kontrolle eines konsekutiven Promotors) codiert. Da die Arbeitsgruppe das Herstellungsverfahren noch nicht publiziert hat, werden an dieser Stelle keine genaueren Angaben für diese Zelllinie angegeben.

3.1.4 Oligonukleotide

Tab. 5: Primer für die Kolonie-PCR

Primer	Sequenz
Kolonie PCR-fwd	5`- AGCGTTTGCCTGTTTGTGT-3` (20)
Kolonie PCR-rev	5`- GCAGCCCAGTAGTAGGTTGA-3` (20)

3.1.5 Antibiotika

Tab. 6: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml
Gentamycin	20 mg/ml	20 µg/ml
Penicillin	10.000 U/ml	100 U/ml
Puromycin Dihydrochlorid	0.5 mg/ml	0.5 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml	100 µg/ml

3.1.6 Flüssigchromatographie Säulen

Tab. 7: Verwendete Chromatographie Säulen

Säulenart	Hersteller
HiTrap™ Heparin HP (5 ml Säule)	GE Healthcare, Solingen
HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR (120 ml Säule)	GE Healthcare, Solingen

3.1.7 Bakterienstämme

Tab. 8: Verwendete Bakterienstämme für Klonierung und Proteinexpression

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5α	F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hdsS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI ⁻ B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ nin5	NEB, Frankfurt am Main
<i>E. coli</i> SHuffle® T7	fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal λ att::pNEB3-r1-cDsbC (Spec ^R , lacI ^q) Δ trxB sulA11 R(mcr ⁻ 73::miniTn10--Tet ^S)2 [dcm] R(zgb ⁻ 210::Tn10 -Tet ^S) endA1 Δ gor Δ (mcrC-mrr)114::IS10	NEB, Frankfurt am Main
<i>E. coli</i> Origami™ B (DE3)	F-ompT hsdS _B (rB ⁻ mB ⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522:: Tn10 trxB (Kan ^R , Tet ^R)	Merck KGaA, Darmstadt
<i>E. coli</i> Arctic Express (DE3)	<i>E. coli</i> B F-ompT hsdS(rB–mB–) dcm ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte [cpn10 cpn60Gentr] [argU proL Str ^r]	Agilent technologies, Waldbromm

3.1.8 Enzyme

Tab. 9: Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Benzonase® Nuclease	Merck KGaA, Darmstadt
FastDigest Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lysozym	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Q5 Hight-Fidelity DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt am Main
One-Taq Polymerase (Quick -Load Master Mix)	NEB, Frankfurt am Main
Trypsin (0.05 % Trypsin / 0.02 % EDTA in PBS)	PAN-Biotech, Aidenbach

3.1.9 Vektoren

Tab. 10: Verwendete Vektoren für die Proteinexpression in *E. coli*

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pET32a	Expressionsvektor	Novagen, Sigma-Aldrich, Darmstadt
pEX-A2-BMP-2-10M	<i>bmp-2</i> -Gen mit 10 veränderten Positionen (s. Abb. 13) im Vergleich zum Wt-BMP-2*, flankiert mit <i>NdeI/XhoI</i> -Schnittstelle am 5' und 3'-Ende, kloniert in Liefervektor pEX-A2	Gensynthese, Eurofins Genomics, Ebersberg
pEX-A2-BMP-2-2Hep-7M	<i>bmp-2</i> Gen mit 7 veränderten Positionen (s. Abb. 13) im Vergleich zum Wt-BMP-2*, flankiert mit <i>NdeI/XhoI</i> -Schnittstelle am 5' und 3'-Ende, inkl. verlängerte Heparinbindestelle am N-Terminus, kloniert in Liefervektor pEX-A2	Gensynthese, Eurofins Genomics, Ebersberg
pET32a-TrxA-BMP-2-10M	<i>bmp-2</i> Gen mit 10 veränderten Positionen (s. Abb. 4 B) im Vergleich zum Wt-BMP-2* in <i>NdeI/XhoI</i> -Schnittstelle am 5' und 3'-Ende des Vektors pET32a	diese Arbeit, AG Prof. Dr. A. Loidl-Stahlhofen, WHS Recklinghausen
pET32a-BMP-2-10M	<i>bmp-2</i> Gen mit 10 veränderten Positionen (s. Abb. 4 B) im Vergleich zum Wt-BMP-2* in <i>NdeI/XhoI</i> -Schnittstelle am 5' und 3'-Ende des Vektors pET32a	diese Arbeit, AG Prof. Dr. A. Loidl-Stahlhofen, WHS Recklinghausen
pET32a-BMP-2-2Hep-7M	<i>bmp-2</i> Gen mit 7 veränderten Positionen (s. Abb. 4 B) im Vergleich zum Wt-BMP-2* in <i>NdeI/XhoI</i> -Schnittstelle am 5' und 3'-Ende des Vektors pET32a, sowie einer verlängerten Heparinbindestelle am N-Terminus	diese Arbeit: (Konzeptionierung, biophysikalische Charakterisierung); Masterarbeit/Heinks, 2019 (Expression, Aufreinigung, zellbiologische Analyse)

Ergänzung: pBMP-2-10M, pBMP-2-2Hep-7M

p =Plasmid

3.1.10 Geräteliste

Tab. 11: Darstellung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti JXN-26 Großraumzentrifuge (Rotor JA -14)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Avanti JXN-26 Zentrifuge (Rotor JA-25.50)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
AxioCam ERc 5s Carl	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Äkta-FPLC	Amersham Biosciences, Freiburg im Breisgau
CASY® Cell Counter (Model TT)	Innovatis AG, Bielefeld
CD-Spektrometer J-815	Jasco-Systems, Pfungstadt
Fluidity one	Fluidic Analytics, Cambridge/UK
HERA Cell CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler AT 72	Infors AG, Bottmingen/Schweiz
Lärmschutzbox LS4	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin
Magnetrührer (Model L-71)	Labinco laboratory equipment, DG Breda/Niederlande
Membran-Vakuumpumpe N 86	Laboport KNF Neuberger GmbH, Freiburg im Breisgau
Mikro 22 R Zentrifuge (Rotor 1016)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mikrowelle	Amica, Ascheberg
MS2 Minischüttler	IKA, Staufen
PCR-Thermocycler FlexCycler2	Analytik Jena AG, Jena

Material und Methoden

Photometer - Biospectrometer® kinetic	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer - Ultrospec 1100 pro	Amersham, Freiburg im Breisgau
Präzisionswaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Seven easy™ pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Sonotroden MS72, VS70T	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin
Sterilwerkbank Herasafe™	Heraeus, Hanau
Stromversorgungseinheit: PowerPac™ Basic, PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen
Tecan Infinite 200 PRO	Tecan Group AG, Crailsheim
Tecan Sunrise Plattenphotometer	Tecan Group AG, Crailsheim
Thermomixer confort	Eppendorf AG, Hamburg
Zetasizer Nano S (Software Version 7.11)	Malvern Panalytical GmbH, Herrenberg
Ultraflex-II TOF/TOF Gerät	Bruker -Daltonics GmbH, Bremen
Ultraschall-Generator Sonoplus HD 2200	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin
Ultraschallwandler Sonoplus UW2200	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin
UHPLC System (Agilent 1290 Infinity series)	Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn
Waage MC 1 Laboratory LC 620 D Sartorius AG	Sartorius AG, Göttingen
Wärme-/Inkubationsschrank BE 400	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad WNB 29	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wippschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
5415 D Zentrifuge (Rotor F-45-42-11)	Eppendorf AG, Hamburg
5424 R Zentrifuge (Rotor FA-45-24-11)	Eppendorf AG, Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit (Macherey & Nagel, Düren) durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse durch den Einsatz von Natriumhydroxid/Natriumdodecylsulfat der zuvor transformierten Bakterienzellen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte hierbei durch die Adsorption der Nukleinsäure bei hoher Salzkonzentration an eine Gelmatrix [Birnboim & Doly, 1979].

3.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA wurde photometrisch (Eppendorf BioSpektrometer) durch Messung der Extinktion bei 260 nm durchgeführt. Dabei erfolgte die Berechnung der Konzentration auf der Grundlage, dass die $OD_{260} \sim 1$ einer Doppelstrang-DNA einer Konzentration von $\sim 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ entspricht. Zudem wurden etwaige Verunreinigungen durch Proteine mittels Absorptionsbestimmung bei 280 nm abgeschätzt. Bei einer nahezu RNA und proteinfreien Lösung lag das Verhältnis von $A_{260} \text{ nm}/A_{280} \text{ nm}$ bei einem Wert zwischen 1.8 und 2 [Eppendorf USERGUIDE No. 13 I Mai 2015].

3.2.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von BMP-2-Expressionskonstrukten wurden die Gene für die Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M über chemische Gensynthese neu synthetisiert (Eurofins Genomics, Ebersberg) und jeweils als pEX-A2-BMP-2-10M oder pEX-A2-BMP-2-2Hep-7M-Konstrukt geliefert (s. Tab. 10). Eine ausführliche Darstellung liefert Abb. 4 B. Anschließend wurde das jeweilige Zielgen der BMP-2-Varianten über die am 5'- und 3'- flankierenden Restriktionsenzymen *NdeI/XhoI* in den Zielvektor pET32a (Novagen) kloniert.

3.2.1.4 Restriktionsverdau

Für die Durchführung von Restriktionen wurden sowohl die aus der Gensynthese stammenden Konstrukte (s. Tab. 10), PCR-Produkte als auch der pET32a-Zielvektor zunächst nach Herstellerangaben mit den *FastDigest*-Restriktionsenzymen *NdeI/XhoI* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) geschnitten und mit dem NucleoSpin® Gel-Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um eine späte Religation zu verhindern, wurde zusätzlich eine Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors mit einer alkalischen Phosphatase durchgeführt (Thermo Fischer Scientific, Schwerte).

Tab. 12: Zusammensetzung eines Standard Restriktionsverdaus

Komponente	Plasmid-DNA	PCR-Produkt
steriles ddH ₂ O	15 µl	17 µl
10x FastDigest Green Buffer	2 µl	2 µl
DNA	2 µl (bis 1 µg)	10 µl (~ 0.1-0.5 µg)
Enzym (FastDigest)	1 µl	1-2 µl (10-20 U)
Endvolumen	20 µl	30 µl

3.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden der zuvor mit *NdeI/XhoI*-Restriktionsenzymen geschnittene Zielvektor (pET32a, Novagen) und das Insert (Gene für die Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M) mittels T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) zusammengefügt. Der Ligationsansatz ist in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Zusammensetzung des Ligationsansatzes

Komponente	Finale Konzentration
Lineare DNA/Zielvektor	10-50 ng
T4-Ligase Buffer (10-fach)	1-fach
T4-DNA-Ligase	5U
ddH ₂ O	ad 50 µl

Anschließend wurde der Ligationsansatz für 90 min bei 20 °C inkubiert und für 5 min bei 70 °C inaktiviert. Es folgte eine Transformation der BMP-2-Expressionsplasmide in DH5 α -Zellen. Nach erfolgreicher Anzucht und Plasmid-Aufreinigung (s. Abschnitt 3.2.1.1) wurden die klonierten Konstrukte (pET32a-BMP-2-10M, pET32a-BMP-2-2Hep-7M, pET32a-TrxA-BMP-2-10M) mittels Sanger Sequenzierung (Firma Eurofins Genomics, Ebersberg) auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.2.1.6 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Die Kolonie-Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Identifikation von BMP-2-Expressionsplasmiden nach Klonierung eingesetzt. Dabei kann der Nachweis direkt und schnell aus einer einzelnen *E. coli*-Kolonie erfolgen, ohne, dass zuvor eine Plasmidpräparation angefertigt werden muss. Dazu wurden ausgehend von einer LB-Agarplatte, die zuvor unter selektiven Bedingungen mit einem Ligationsprodukt (s. Abschnitt 3.2.1.5) beimpft und kultiviert wurde, jeweils eine gut isolierte Bakterienkolonie entnommen und in 30 µl ddH₂O

eingesetzt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 15 min auf 95 °C erhitzt und nach dem Abkühlen für den PCR-Ansatz verwendet.

PCR-Ansatz (50µl):

One Taq- Quick Load
 Mastermix: 25µl
 Primer: Kolonie PCR- fwd. 1 µl
 Kolonie PCR- rew. 1 µl
 Template DNA 1 µl
 ddH₂O auf 50 µl

Die DNA wurde folgendermaßen amplifiziert:

<u>PCR-Schritte</u>	<u>Temperatur [° C]</u>	<u>Zeit [sec]</u>
Initiale Denaturierung	94	120 sec
<u>30 x:</u>		
<u>Denaturierung</u>	94	30 sec
<u>Anlagerung der Primer</u>	55	60 sec
<u>Elongation</u>	68	360 sec
Finale Verlängerung	68	600 sec
Halten der Temperatur	10	∞

Der Erfolg der durchgeführten PCR wurde folgend auf einem Agarosegel (s. Abschnitt 3.2.1.7) überprüft. Die positiv identifizierten Klone wurden abschließend einzeln mittels Plasmidpräparation (s. Abschnitt 3.2.1.1) isoliert und im Zuge einer Sequenzierung (Firma Eurofins Genomics, Ebersberg) auf Richtigkeit des eingeführten Genabschnitts geprüft.

3.2.1.7 Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse von PCR-Amplifikaten sowie der Überprüfung der Qualität durchgeführter Plasmidpräparationen wurden 1 % (w/v) - Agarosegele verwendet. Dabei konnte die Detektion der DNA-Banden durch die Anwendung von SYBR® Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, Schwerte), nach Herstellerangaben ermöglicht werden. Die Trennung der PCR-Produkte erfolgte bei 100-120 V für 45 min. Dafür wurden jeweils 2 µl des PCR-Produkts mit 3 µl ddH₂O und 1 µl (6x MassRuler™ DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht. Als Größenstandard diente der DNA-Marker GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Schwerte).

3.2.1.8 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA Amplifikaten erfolgte mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die gereinigte DNA für weitere Versuche eingesetzt, wie z.B. die Klonierung von DNA-Fragmenten.

3.2.2 Allgemeine mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung der chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde ausgehend von einer Übernachtskultur (ÜNK) des jeweiligen Bakterienstamms (s. Tab. 8) im 125 ml LB-Medium bis auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0.1 inokuliert und anschließend bei 37 °C und 160 rpm inkubiert (Inkubationsschüttler AT 72, Infors AG, Bottmingen/Schweiz). Beim Erreichen einer OD_{600} von 0.6-0.8 wurden die angezogenen Bakterienzellen zunächst 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C, 15 min und 48.300 x g zentrifugiert (Avanti JXN-26 Zentrifugen, Rotor JA-25.50, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Die pelletierten Zellen wurden im Nachgang in 50 ml TB-Puffer (kalt) resuspendiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Bakterienzellen (4 °C, 15 min, 48.300 x g) wurde anschließend das Zellpellet mit 7 % DMSO versetzt. Die hergestellten, chemisch kompetenten Zellen wurden in je 200 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

TB-Puffer

PIPES, pH 6.7	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl, autoklaviert	250 mM
MnCl ₂ , steril filtriert	55 mM

3.2.2.2 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (200 µl) (s. Abschnitt 3.2.2.1) zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend mit 0.1-1 ng der jeweiligen Plasmid-DNA (pBMP-2-10M, pBMP-2-2Hep-7M) versetzt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Hitzeschock für 2 min behandelt (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg). Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde direkt im Anschluss die Zellsuspension mit 800 µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und 1 h, bei 37 °C und 100 rpm im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert. Die Ausplattierung der transformierten Bakterienzellen erfolgte auf LB-Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum (s. Tab. 6) versetzt waren.

SOC-Medium

SOB-Medium:	autoklaviert
D-Glucose Monohydrat	20 mM

SOB-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0.59 g
KCl	0.19 g
MgCl ₂ (6xH ₂ O), autoklaviert	2.03 g
MgSO ₄ , steril filtriert	0.49 g

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Rekombinante Genexpression in *E. coli*

Die Expression der BMP-2-Varianten (BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M) erfolgte rekombinant in einem *E. coli*-System. Um den Anteil am löslichen BMP-2 zu erhöhen, wurden vorangegangene Expressionsstudien durchgeführt, indem Parameter wie Expressionsstamm, Temperatur, Expressionsdauer für die BMP-2-Varianten optimiert wurden. Basierend auf den gewonnenen Daten wurde die rekombinante Proteinexpression für BMP-2-10M in *E. coli* BL21(DE3) und BMP-2-2Hep-7M in *E. coli* SHuffle® T7 durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine Übernachtskultur (100 ml LB-Medium) mit dem jeweiligen Expressionsvektor (s. Tab. 10) angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm (Inkubationsschüttler AT 72, Infors AG, Bottmingen/Schweiz) inkubiert. Darauf folgend wurden am nächsten Tag 250-300 ml LB-Medium (1 L Schikanekolben) bei einer OD₆₀₀ (optische Dichte) ~ 0.15 angeimpft und bei 37 °C (BMP-2-10M) und 34 °C (BMP-2-2Hep-7M), sowie 160 rpm inkubiert. Bei Erreichen eines Absorptionswerts von 0.6-0.75 wurde mit IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert und für 3-4 h weiter kultiviert. Die Zellernte der Expressionskultur erfolgt durch Zentrifugation (15.300 x g, 15 min, 4 °C, Avanti JXN-26, Rotor JA-14). Aliquots der gewonnenen Zellmasse wurden bei -20 °C bis zum weiteren Einsatz gelagert.

3.2.3.2 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde zunächst das Zellpellet der BMP-2-Varianten in 12 ml kaltem Lysepuffer (A oder B) resuspendiert mit 3 µl Benzonase® Nuclease, 50 µl Lysozym, und 500 µl cComplete Protease Inhibitor Mix versetzt, sowie 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mittels einer Sonotrode VS70T (Sonoplus HD 2200.2,

Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin) unter Eiskühlung in 10 Intervallen und je von 30 sec. Schall / 30 sec. Pause aufgeschlossen (Amplitude 30 %). Die Proteinsuspension wurde sofort mit L-Arginin auf eine Endkonzentration von 0.5 M eingestellt und unter ständigem Rühren 1-3 h auf Eis inkubiert. Bei einem Zentrifugationsschritt von 48.300 x g (Avanti JXN-26, Rotor JA 25.50) für 15 min und 4 °C wurden dabei die löslichen von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Die löslichen Fraktionen wurden in weiteren Versuchen eingesetzt, um das rekombinant produzierte Protein aufzureinigen und besser zu charakterisieren.

Lysepuffer A

(Variante BMP-2-10M)

Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4 20 mM

Lysepuffer B

(Variante BMP-2-2Hep-7M)

Tris/HCl, pH 5.3 50 mM

3.2.3.3 SDS-Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinfractionen wurden 15 %-ige SDS-Tricin-Gele (SDS-Tricin-PAGE) verwendet. Diese bieten eine einfache Möglichkeit, niedermolekulare Proteine <30 kDa in einem elektrophoretischen System zu trennen. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist in Tab. 14 aufgelistet.

Tab. 14: Zusammensetzung SDS-Tricin Gele (2 Stück, 0.75 mm dick)

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Bisacrylamid-Lösung	4 ml	0.30 ml
H ₂ Odest	0.740 ml	2.467 ml
Glycerin (99%)	0.600 ml	---
Gel-Puffer	2.66 ml	1 ml
TEMED	30 µl	3.2 ml
APS (10 % (w/v))	30µl	32 µl
Gesamt	8 ml	4 ml

Zur Vorbereitung der PAGE wurden 12 µl Probe mit 4 µl 4-fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg). Um einen guten Eintritt der Proben ins Trenngel zu gewährleisten, erfolgte die Elektrophorese in einem horizontalen Gelsystem zunächst bei 80 V. Anschließend fand die eigentliche Auftrennung der Proteine bei 120 V statt. Als Größenmarker dienten 3 µl *PageRuler Prestained Protein Ladder*

(Thermo Fisher Scientific, Schwerte, #26616). Die Färbung der Gele wurde über Nacht mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung durchgeführt, wobei für das Entfärben Wasser verwendet wurde.

Gel-Puffer

Tris/HCl, pH 8.45	3 M
SDS	0.3 % (w/v)

Kathodenpuffer (1-fach)

Tris, pH 8.25	0.1 M
Tricin	0.1 M
SDS	0.1 %

Anodenpuffer (1-fach)

Tris/HCl, pH 8.9	0.2 M
------------------	-------

4-fach SDS-Probenpuffer

SDS	4 % (w/v)
Glycerin	12 % (w/v)
Tris/HCl, pH 6.8	50 mM
β-Mercaptoethanol	2 %
Bromphenolblau	0.01 %
ddH ₂ O	ad 20 ml

Kolloidale Coomassie- Färbelösung

Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
Coomassie G-250	0.1 % (w/v)
Orthophosphorsäure	3 % (v/v)
Ethanol	20 % (v/v)

3.2.3.4 Dialyse

Als Vorbereitungsschritt für den Einsatz in unterschiedlichen Versuchen (z.B. Rechromatographie auf HiTrapTM Heparin Säule, Gefriertrocknung) wurden ausgewählte

Proteinfractionen gegen 1 mM HCl dialysiert. Dies konnte unter dem Einsatz von speziellen Dialyseschläuchen (D-Tube™, Merck Millipore, Darmstadt) realisiert werden. Dazu wurden einzelne Proteinfractionen vereinigt und gegen das 300-500-fache Volumen unter ständigem Rühren dialysiert (4 °C, über Nacht). Um eine effiziente Entfernung von unerwünschten Pufferrückständen, wie Salzen und Additiven, ermöglichen zu können, wurde dieser Vorgang 3-4 Mal wiederholt.

3.2.3.5 Chromatographie

Die Proteinaufreinigung der zu analysierenden BMP-2-Varianten wurde anhand der im Folgenden aufgeführten Methoden ermöglicht. Dazu wurden zunächst die BMP-2-Varianten in Bezug auf *E. coli*-eigene Proteine über Kationenaustausch-/Affinitätschromatographie angereichert. Anschließend wurde das dimere BMP-2 von der monomeren Form über die Größenausschlusschromatographie (GPC) getrennt und vom Großteil der *E. coli*-Begleitproteinen final isoliert.

3.2.3.6 Affinitäts-/Ionenaustauschchromatographie

Die präparative Aufreinigung von dimerem BMP-2 aus BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M erfolgte nach Zellaufschluss (s. Abschnitt 3.2.3.2) mittels Chromatographie (Kationenaustausch- und partielle Affinitätschromatographie, Heparinsepharosechromatographie) an einem Äkta-FPLC- System durch die Anwendung einer 5 ml HiTrap™ Heparin HP Säule (GE Healthcare). Dafür wurde zunächst die Chromatographiesäule bei RT und einer Flussrate von 1 ml/min entweder mit Puffer A oder Puffer B äquilibriert. Anschließend wurde das Lysat (20-25 ml/g Nassgewicht) mit der gleichen Flussgeschwindigkeit auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen (6 CV) erfolgte die Elution, die je nach eingesetzter BMP-2-Mutante variierte. So wurde für die Elution von BMP-2-10M ein linearer Gradient mit Puffer A1 (20 mM Phosphat-Puffer), 0.5 M NaCl, pH 7.4 in 6 CV (1 ml/min) verwendet, für BMP-2-2Hep-7M dagegen ein linearer Gradient mit 50 mM Tris/HCl, pH 8.3, 0.5 M L-Arginin, 0.5 M NaCl (Puffer B1, 6 CV, 1 ml/min.). Die Elutionsfraktionen wurden anhand einer nicht reduzierenden SDS-PAGE analysiert (s. Abschnitt 3.2.3.3). Alle Fraktionen, die BMP-2-Varianten in dimerer Form enthielten, wurden anschließend für einen weiteren Aufreinigungsschritt durch Gelpermeationschromatographie vereinigt (s. Abschnitt 3.2.3.7).

Variante BMP-2-10M

Puffer A (Lyse-/Säulenpuffer)

Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4 20 mM

Variante BMP-2-2Hep-7M

Puffer B (Lyse-/Säulenpuffer)

Tris/HCl, pH 5.3 50 mM

L-Arginin 0.5 M

Puffer A1 (Elutionspuffer)

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7.4	20 mM
NaCl	0.5 M

Puffer B1 (Elutionspuffer)

Tris/HCl, pH 8.8	50 mM
L-Arginin	0.5 M
NaCl	0.5 M

3.2.3.7 Gelpermeationschromatographie

Proteinfraktionen mit hohem Anteil an dimerer Form der jeweiligen BMP-2-Varianten wurden nach Heparinsepharosechromatographie in einem zweiten Schritt mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) gereinigt. Für die Abtrennung der Begleitproteine wurde eine mit Elutionspuffer A1 (BMP-2-10M) oder B1 (BMP-2-2Hep-7M) equilibrierte (2 CV) HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR Säule (GE Healthcare) verwendet, die mit einem Äkta-FPLC System (Flussrate 0.4 ml/min) betrieben wurde. Nach der Charakterisierung der Elutionsfraktionen über eine SDS-PAGE wurde das dimere BMP-2 final dialysiert und biophysikalisch charakterisiert (s. Abschnitt 3.2.4).

Variante BMP-2-10M

Elutionspuffer A1

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7.4	20 mM
NaCl	0.5 M

Variante BMP-2-2Hep-7M

Elutionspuffer B1

Tris/HCl, pH 8.8	50 mM
L-Arginin	0.5 M
NaCl	0.5 M

3.2.4 Biophysikalische Methoden

3.2.4.1 Massenspektrometrie-Analyse

Die gereinigten Varianten BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M wurden durch den Einsatz von MALDI-TOF-MS (Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse und Quellenzerfall Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) sowie durch ESI-MS (Elektronenspray-Ionisation Massenspektrometrie) auf Identität und Gesamtmasse überprüft.

3.2.4.2 Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse und Quellenzerfall Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-MS-Analyse wurde an der Freien Universität Berlin durch Dr. Christoph Weise durchgeführt. Dazu wurde ein Ultraflex-II TOF/TOF-Gerät (Bruker-Daltonics GmbH, Bremen) eingesetzt, welches mit einem Smart beam™ Laser (200 Hz, *solid stated*) ausgestattet war. Es konnten zudem sequenzspezifische Informationen des zu analysierenden Proteins durch die Generierung von c-Ionen (N-Terminal) und z+2-Ionen (C-Terminal) im Zuge einer *in source-decay*-Analyse (ISD) gewonnen werden. Als Matrixsubstanz diente dabei

1.5 diaminonaphthalen (20 mg/ml 1.5-diaminonaphthalen in 50 % Acetonitril/0.1 % Trifluoressigsäure. In einem Messbereich von 600-4.000 Da wurden mit einem positiven Reflektiermodus Spektren aufgenommen, wobei das Sequenzalignent manuell erfolgte (Zuordnung der Daten im Messbereich von 1.000-3.500 m/z).

3.2.4.3 Elektrospray-Ionisation

Die Elektrospray-Ionisation-Analytik (ESI-Analytik) wurde am Forschungszentrum Jülich von Frau Dr. Beatrix Santiago-Schübel an einem Agilent UHPLC-ESI-QTOF-MS System (Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn) durchgeführt. Lyophilisierte Proteinproben wurden zunächst in 1 ml Acetonitril/ H₂O 1:1 gelöst. Die Proben wurden anschließend bis fast zur Trockene eingengt und in 50 µl H₂O wieder aufgenommen. Das UHPLC-System (Agilent 1290 Infinity series) bestand aus einem binären Pumpensystem, einem Autosampler, einem thermostatisiertem Säulenfach und einer 6250 Accurate-Mass QTOF inkl. einer Elektrospray-Ionisation Oberfläche mit einer Auflösung von 20.000. Eine chromatographische Vortrennung wurde mit einer Accucore-150-C4 Säule (100*4,6 mm) 2.6 µm Partikelgröße (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) erreicht. Die Säulentemperatur wurde bei 50 °C gehalten. Die Flussrate betrug 500 µl^{min}⁻¹. Die mobile Phase umfasste als Lösungsmittel A (0.1 % Ameisensäure in H₂O), als Lösungsmittel B wurde 0.1 % Ameisensäure in Fluorocyan eingesetzt. Das Probeninjektionsvolumen betrug 20 µl. Das Chromatographieprogramm setzte sich wie folgt zusammen: Start der Chromatographie mit einem isokratischen Schritt mit 5 % B (0-2 min), gefolgt von einem Anstieg auf 95 % B (in 30 min). Im Anschluss wurde für weitere 2 min mit 95 % B gespült. Der Gradient wurde anschließend innerhalb von 0.1 min auf 5 % B zurückgesetzt und das System für 2 min equilibriert. Die Detektion erfolgte mit dem QTOF-Massendetektor im ESI positiven Ionisationsmodus. Der Zerstäuberdruk betrug 20 psi, der Trocknungsgasstrom 11 L/min, die Quelltemperatur war auf 300 °C eingestellt. Zudem wurden eine Fragmentierspannung von 215 V, eine Skimmer-Spannung von 68 V, sowie eine Oktopolspannung von 750 V verwendet. Der Massenbereich wurde auf m/z 500-3000 gesetzt und die Datenerfassungsrate betrug zwei Spektren in 1-15 s. Die Kontrolle der Chromatographieanlage, sowie die Datenerfassung wurden mit der Software MassHunter LC-MS Data Acquisition B.05.01 (Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn) gesteuert. Final wurde die Massenkalkulation mit dem Programm ESI-Prot durchgeführt [Winkler, 2010].

3.2.4.4 Dynamische Lichtstreuungsanalyse

Die Untersuchung der Aggregationstendenz einer heterogenen BMP-2-Proteinlösung nach Gefriertrocknung und Resolubilisierung wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermöglicht. Die DLS-Messungen wurden bei 20 °C am Zetasizer Nano (Software Version 7.11, Malvern Panalytical, Herrenberg) durchgeführt. Dazu wurden die zu vermessenden Proben zunächst bei RT in 1 mM HCl resolubilisiert und anschließend für 10 min bei 21.190 x g (5424 R Zentrifuge, Rotor FA-45-24-11, Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Die

Lichtstreuung wurde in einer Quartzküvette (DTS2145, Hellma Analytics, Jena) bei einem Messwinkel von 173° (Backscatter, (NIBS default)) und einer Äquilibrierungszeit von 300 s durchgeführt. Die Anzahl an Experimenten lag bei $n=6$ (10 x Wiederholung des Probenscans vor Ausgabe des durchschnittlichen Ergebnisses). Um die Größenverteilung des BMP-2 besser beurteilen zu können, wurden die Proben im Konzentrationsbereich von 10-100 μM nach 1-8 Tagen untersucht. Ergänzend wurden Lichtstreuungsmessungen äquivalent dem oben bereits beschriebenen Messungen mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid durchgeführt, um Partikelgrößenverteilung von entfaltetem BMP-2 näher zu charakterisieren.

3.2.4.5 Mikrofluidische Diffusionstechnologie

Um die Aggregationstendenz der BMP-2-Varianten weiterhin einzugrenzen, wurde ergänzend zur Lichtstreuungsanalyse die mikrofluidische Diffusionstechnologie (*Microfluidal Diffusional Sizing*, MDS) angewandt. Es handelt sich hierbei um eine vergleichsweise neue Methode, mit der die Größenbestimmung von Molekülen durch deren Diffusionsgeschwindigkeit in einer mikrofluidalen laminaren Strömung erfolgen kann (Fluidic Analytic, Cambridge/UK). Entsprechend ist es möglich, sehr wenig Proben in einem niedrigen Konzentrationsbereich [μM] zu untersuchen. Hierfür wurden die zu analysierenden Proben des Wildtyp-BMP-2 und der erstellten Proteinvarianten nach Lyophilisierung in 1 mM HCl resuspendiert und in einem Konzentrationsbereich von 0.5-10 μM nach Herstellerangaben auf einem speziellen *Fluidity One*-Chip vermessen. Die Anzahl der Messungen lag bei $n=3$.

3.2.4.6 Cirkulardichroismus

Für die Aufnahme von Cirkulardichroismus (CD)-Spektren wurden die zuvor aufgereinigte und gefriergetrocknete BMP-2-Varianten (s. Abschnitt 3.2.3.5) entweder in 1 mM HCl oder 20 mM Phosphat-Puffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4) gelöst, um eine Arbeitskonzentration von 10-12 μM zu erhalten. Als Leerwerte dienten die jeweils verwendeten Puffer. Anschließend wurden die zu messenden Proben mit einem finalen Volumen von 200 μl in eine Quartzküvette übertragen (Pfadlänge 10 mm).

Zur Aufnahme von CD-Spektren der rekombinant hergestellten BMP-2-Varianten wurden folgende Parameter verwendet:

Gerät: Jasco J-815 CD Spectrometer, [Serinnummer: B047561168]

Sensitivität: Standard

D.I.T: 1 sec.

Bandweite: 2 nm

Messbereich: 260-190 nm

Data pitch: 0.5 nm

Scan-Geschwindigkeit: 50 nm/min

CD-Detektor: PMT

Akkumulation der finalen Messung: 10

Temperatur: 10 °- 96 °C

Alle aufgenommenen Spektren wurden bei konstanter Temperatur gemessen, die über eine mit dem Gerät verbundene Temperatorkontrolleinheit permanent gesteuert wurde. Am Ende der Messungen wurden die Spektren (korrigiert um den jeweiligen Referenzpuffer) einer Analyse durch den Online-Server Dichroweb [Lobley et al., 2002, Whitmore & Wallace, 2004] unterworfen, um eine Dekonvolution-Analyse mit Hilfe des CDSSTR-Algorithmus [Compton & Johnson, 1986] und dem Referenzdatensatz 4 (oder 7) [Sreerama & Woody, 2000] durchzuführen.

Um die Temperaturabhängigkeit der zu untersuchenden Proteine im Bereich von 10-96 °C näher zu charakterisieren, wurden ausgehend von den bereits zuvor beschriebenen Messbedingungen weitere CD-Spektren aufgenommen. Dabei erfolgte die Messung von Wt-BMP-2 und der BMP-2-Varianten in Schritten von 10 °C bis zum Erreichen der gewünschten Höchsttemperatur. Die jeweilige Messtemperatur wurde während der Aufnahme der CD-Spektren auch hier auf einem konstanten Niveau gehalten. Die Temperaturabhängigkeit der Proteinfaltung/-entfaltungskinetik konnte dann durch das Plotten der CD-Signale gegen die Temperatur wiedergegeben werden.

3.2.5 Zellbiologische Methoden

3.2.5.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien (C2C12 und HEK BRELuc, s. Abschnitt 3.1.3) erfolgte bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 10 % (C2C12-Zellen) bzw. 5 % (HEK BRELuc-Zellen) im Brutschrank. Dafür wurde das Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (inkl. 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Vollmedium) und 0.5 µg/ml Puromycin (nur bei HEK-Zellen) verwendet. Die C2C12-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 60-70 % passagiert, die HEK-Zelllinie hingegen bei 90 % Konfluenz. Dafür wurde zunächst das Vollmedium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen, trypsinisiert und letztendlich geerntet. Ein Teil der Zellsuspension wurde anschließend in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Anzuchtmedium überführt und unter den bereits oben erwähnten Bedingungen weiter kultiviert.

Vollmedium

DMEM

L-Glutamin 2 mM

FKS	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Puromycin**	0.5 µg/ml

** wird nur bei HEK BRELuc-Zelle angewendet

3.2.5.2 Kolorimetrischer Alkalische Phosphatase Assay

Zunächst wurden 1×10^4 C2C12-Zellen / well (ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten) einer 96-*Multiwell*-Zellkulturplatte ausgesät und bei 37 °C, 10 % CO₂ für 24 h inkubiert. Das Gesamtvolumen pro well nach Zugabe des Kultivierungsmediums lag bei 150 µl. Am nächsten Tag erfolgte das Ersetzen des Vollmediums gegen 50 µl Hungermedium. Nach der Hungerphase (6 h) wurden pro well 50 µl einer konzentrierten Ligandenlösung zugegeben (4-fach Bestimmung), damit eine definierte Endkonzentration (2-800 nM, abhängig vom Liganden) in 100 µl/well entstehen konnte. Es wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte für drei Tage bei 37 °C und 10 % CO₂. Final wurde das Medium entfernt, die Zellen mit DPBS (100 µl) gewaschen und für 1 h mit einem ALP-1 Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Messung der Extinktion bei 405 nm wurde zudem jedem well 100 µl eines chromogenen Substrats (4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat in ALP-2 Puffer) zugegeben. Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität wurde am Tecan (Tecan Sunrise Plattenphotometer; Programm i-control 1.11; Tecan Group AG, Crailsheim) durchgeführt.

Hungermedium

DMEM	
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Puromycin**	0.5 µg/ml

** wird nur bei HEK BRELuc-Zelle angewendet

Vollmedium

DMEM	
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Puromycin**	0.5 µg/ml
FKS	10 %

ALP-1 Puffer

Glycin, pH 9.6	0.1 M
MgCl ₂ wasserfrei	1 mM
ZnCl ₂	1 mM
IGEPALR CA-630	1 % (v/v)

ALP-2 Puffer

Glycin, pH 9.6	0.1 M
MgCl ₂ wasserfrei	1 mM
ZnCl ₂	1 mM

3.2.5.3 Dual-Luciferase Reporter Assay

Für den Zellassay wurden 1×10^5 stabil transfizierte HEK BRELuc-Zellen (AG Kaus, FUB) pro *well* einer 96-Multiwell-Zellkulturplatte ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre für 48 h in einem Vollmedium kultiviert. Die Zellen wurden anschließend für 6 h einem Hungermedium ausgesetzt. Erst dann wurden jeder Vertiefung 50 µl einer definierten Ligandenlösung (auf 100 µl/*well* bezogen) zugesetzt (4-fache Bestimmung). Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre erfolgte das Waschen der Zellen mit je 100 µl DPBS. Für die anschließende Zelllyse wurde zunächst 50 µl/*well* eines 1 x Lysepuffer zugegeben und durch das Einfrieren bei -80 °C für 30 min, sowie das Auftauen bei Raumtemperatur die Zellen lysiert. Die Messung der Luciferaseaktivität, ausgehend von einer Firefly-Luciferase und von der Renilla-Luciferase, erfolgte automatisiert am Tecan Infinite 200 PRO (Tecan Group AG, Crailsheim), gesteuert durch das Programm Magellan 7.1. Dafür wurden je 10 µl des Zelllysates in eine 96-*well* Mikroplatte (F-Boden/Kaminform (flacher Boden), LUMITRAC™ 600, high binding) pipettiert und mit einem speziellen Substrat versetzt. Es handelt sich dabei um ein Substrat, welches von der AG Knaus (FUB) selbst hergestellt wurde und an ein kommerziell hergestelltes Substrat angelehnt ist. Weitere Angaben werden an dieser Stelle nicht aufgeführt, da es bislang keine Publikationen der Arbeitsgruppe über die Zusammensetzung des Substrates gibt und diese der Geheimhaltung obliegt.

Hungermedium

DMEM	
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Puromycin**	0.5 µg/ml

** nur bei HEK BRELuc-Zellen angewendet

Vollmedium

DMEM	
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Puromycin**	0.5 µg/ml
FKS	10 %

4 Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten auf dem Weg zu löslichen BMP-2-Varianten

Seit der Entdeckung der osteogenen Wirkung des *Bone Morphogenetic Protein-2* durch Urist im Jahr 1965 [Urist, 1965] rückte im Laufe der letzten Jahre die Bedeutung des Wachstumsfaktors als potentiell Therapeutikum für eine verbesserte Frakturheilung oder Knochenneubildung immer mehr in den Fokus der medizinischen Forschung [Gautschi et al., 2007, Ali & Brasil, 2014, El Bialy et al., 2017]. Jedoch verursacht die starke Aggregationsneigung des rhBMP-2* und die daraus resultierende geringe Löslichkeit des Proteins eine limitierte klinische Anwendbarkeit, sowie eine potentielle Überdosierung des BMP-2 Proteins, was eine Reihe an klinischen Nebenwirkungen nach sich ziehen kann [Carrage et al, 2011, Comer et al., 2012, James et al., 2016].

Die herausfordernden Aufgaben bei der Produktion dieses therapeutischen, humanen Proteins in einem prokaryotischen Expressionssystem bestehen aus einer Reihe an wichtigen Punkten, wie der Ausbildung des Cystin-Knotens mit drei Disulfidbrücken oder der disulfidverbrückten Dimerstruktur, denn nur als Dimer kann das BMP-2 letztendlich seine Bioaktivität ausüben. Die Produktion des BMP-2 im *E. coli*-System resultiert bedauerlicherweise oft in der Ausbildung von unlöslichen Aggregaten (*inclusion bodies*) im bakteriellen Cytoplasma, was wiederum zur Notwendigkeit oxidativer Renaturierungsschritte führt, die sowohl zeit- als auch kostenintensiv sind, den Einsatz von toxischen Chemikalien (z.B. Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid, Lithiumsulfat, DTT) und Detergenzien (CHAPS, CHES) erfordern, sowie aufwendige Aufreinigungsprotokolle, für die große Proteinmengen benötigt werden, nach sich ziehen [Ruppert et al., 1996, Kübler et al., 1998, Vallejo et al., 2002, Vallejo & Rinas, 2004, von Einem et al., 2010].

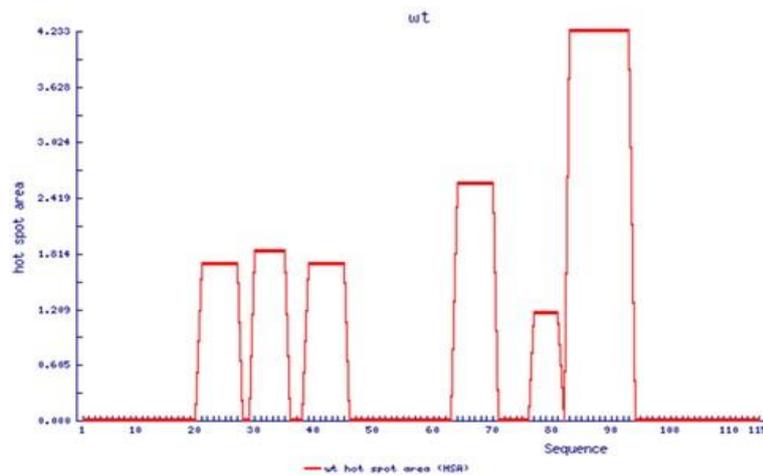
Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Zuge dieser Forschungsarbeit ein Lösungsansatz entwickelt, dessen Ziel lösliche BMP-2-Varianten mit verbesserter Funktionalität sind. Dabei war es unabdingbar, dass die konzipierten BMP-2-Mutanten während des rekombinanten Herstellungsprozesses in einen prokaryotischen Wirt (*E. coli*) nicht als *inclusion bodies* im Cytoplasma produziert werden, sodass keine anschließenden Renaturierungsschritte notwendig sind. Entsprechend wurde bei Vorarbeiten zunächst das Aggregationsverhalten des Wildtyps BMP-2 näher untersucht. Mittels einer bioinformatischen Analyse unter Zuhilfenahme des webbasierten Programms *AggreScan* [Conchillo-Sole et al., 2007] konnten somit in der Sequenz des rhBMP-2* mögliche Aggregationsbereiche, sog. *aggregation hot spots* (AHS), identifiziert werden. Dieses Programm stützt sich auf experimentelle Daten, mit deren Hilfe eine definierte Wertung jeder Aminosäure im Zielprotein hinsichtlich der Aggregationsneigung zugeordnet werden kann. Dabei werden die Sequenzbereiche, die möglicherweise zu einer Aggregation beitragen (AHS), durch die Häufung von Aminosäuren mit hoher

Aggregationswertung (*aggregation score*) ermittelt. Die *AggresScan*-Analyse vom Wildtyp-BMP-2* (*mature Domain*) ergab insgesamt sechs *aggregation hot spots* (Maximum in HSA: 4.233), die wiederum in zwei Cluster angeordnet sind (s. Abb. 4 A, oben).

Bei der Variante BMP-2-10M wurden alle AHS aufgehoben, dagegen weist Variante BMP-2-2Hep-7M nur noch einen AHS (s. Abb. 4 A, unten) mit moderater Intensität (Maximum in HSA: 1.837) auf, welche durch ein Alanin 35 verursacht wird (Ala 35 entspricht dem Ala 316 in der komplett annotierten Sequenz des Wt-BMP-2* (s. NCBI: NP_00119.1)). Dies ist für die Rezeptor Typ II-Bindung unverzichtbar und damit für die Bioaktivität des Proteins von essentieller Bedeutung [Kirsch et al., 2000, Sebald et al., 2004].

A

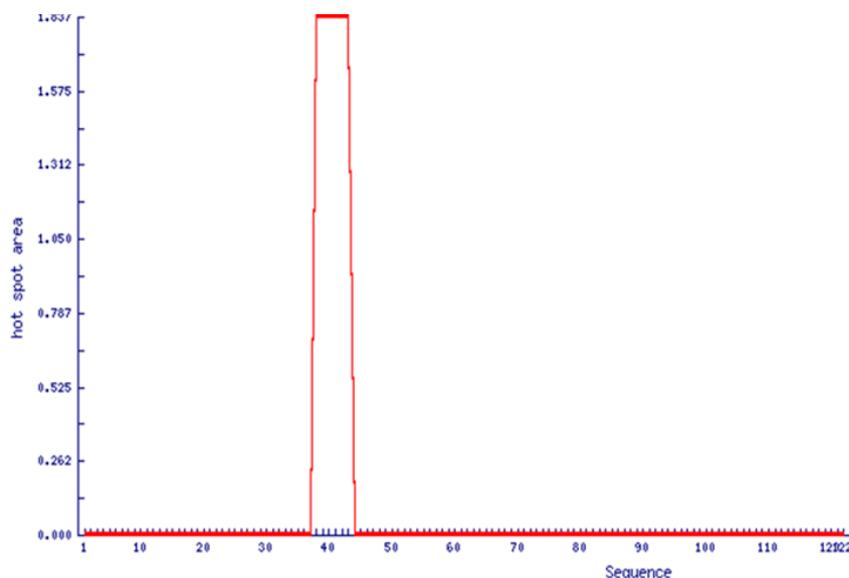
Wt-BMP-2*



BMP-2-10M



BMP-2-2Hep-7M



B.

BMP-2-10M	1	MQ	AKHKQRKR L	R	KSSCKRHPL	YVDYSDVGWN	DWIVNPPGYH	40+1
BMP-2-2Hep-7M	1	MQ	AKHKQRKR	AKHKQRKR L	KSSCKRHPL	YVDYSDVGWN	DWIVAPPGYH	40+8
Wt-BMP-2*	1	AQ	AKHKQRKR L	KSSCKRHPL	YVDFSDVGWN	DWIVAPPGYH		40
↓								
BMP-2-10M	41+1	NFYCHGECPF	PLADHLNSTN	HARTQTLVNS	VNSKIPKACC	TPTELSASSQ		90+1
BMP-2-2Hep-7M	41+8	NFYCHGECPF	PLADHLNSTN	HAIQTLVNS	VNSKIPKACC	TPTELSASSQ		90+8
Wt-BMP-2*	41	AFYCHGECPF	PLADHLNSTN	HAIQTLVNS	VNSKIPKACC	VPTELSAISM		90
↓								
BMP-2-10M	91+1	LYLDENEKVV	LKNYQD	---	VVE	GCGCR		115
BMP-2-2Hep-7M	91+8	LYLDENEKVV	LKNYQD	---	VVE	GCGCR		115+7
Wt-BMP-2*	91	LYLDENEKVV	LKNYQD	M	VVE	GCGCR		115

Abb. 4: A: AggreScan-Analyse von Wildtyp-BMP-2* (oben), der Variante BMP-2-10M (Mitte) und BMP-2-2Hep-7M (unten). B: Aminosäuren-Sequenzalignment von Wildtyp-BMP-2*, Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M

Der Austausch von einzelnen Aminosäuren für die Eliminierung der *aggregation hot spots* ist rot hervorgehoben (9 AS in Variante BMP-2-10M und 6 AS in Variante BMP-2-2Hep-7M). Die Erweiterung des N-Terminus in BMP-2-2Hep-7M um basische Aminosäuren (A KHK Q RKR) ist blau dargestellt, die Insertion an Position 12 (BMP-2-10M) in grün, die Deletion an Position 108 (BMP-2-10M) bzw. 107 (BMP-2-2Hep-7M), im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2*, wurde mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Grau hinterlegte Bereiche wurden als *aggregation hot spots* identifiziert (niedrige/mittlere HSA < 2), türkis markierte Bereiche entsprechen starken HSA > 2. Die verwendete Nummerierung der Aminosäuren erfolgt an die Anlehnung des biologisch gespaltenen reifen BMP-2* (komplett annotierte Sequenz s. NCBI: NP_001191.1), dabei entsprechen die Positionen 1-115 den Aminosäuren 282-396. Die Kennzeichnung 1-115+7 resultiert aus den 8 Insertionen und 1 Deletion in der Variante BMP-2-2Hep-7M [modifiziert nach Heinks & Hettwer et al., 2021].

Entscheidend für die Elimination der *aggregation hot spots* ist es zunächst nur solche Aminosäuresubstitutionen vorzunehmen, bei denen Aminosäuren mit stark hydrophobem Charakter gegen solche mit hydrophiler Beschaffenheit ausgetauscht werden (s. Abb. 4 B). Bei

der Substitution gilt es die BMP-2-Wildtyp Tertiärstruktur im Wesentlichen zu erhalten, um physiologisch funktionelle Varianten des Wachstumsfaktors zu generieren. Die *in silico*-Aggregationsanalyse über *AggreScan* liefert allerdings keine dreidimensionalen Informationen. Entsprechend wurde die Proteinstruktur der Varianten mit Hilfe der Modellierungsprogramme *Phyre* (*Protein homology/analogy recognition engine*) [Kelley & Sternberg, 2009] und über *PSIPRED/SwissModell* (*PSI-blast based secondary structure PREDiction*) modelliert [Jones, 1999, McGuffin et al., 2000, Cuff & Barton, 2000, Buchen & Jones, 2019]. Diese Programme erlauben eine erste Schätzung über die Verteilung von Sekundär- und Tertiärstrukturelementen. Die *PSIPRED*-Vorhersage ergab eine hohe Sekundärstrukturhomologie zwischen BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M und dem Wt-BMP-2* (NCBI: NP_001191.1) (s. Abb. 5).

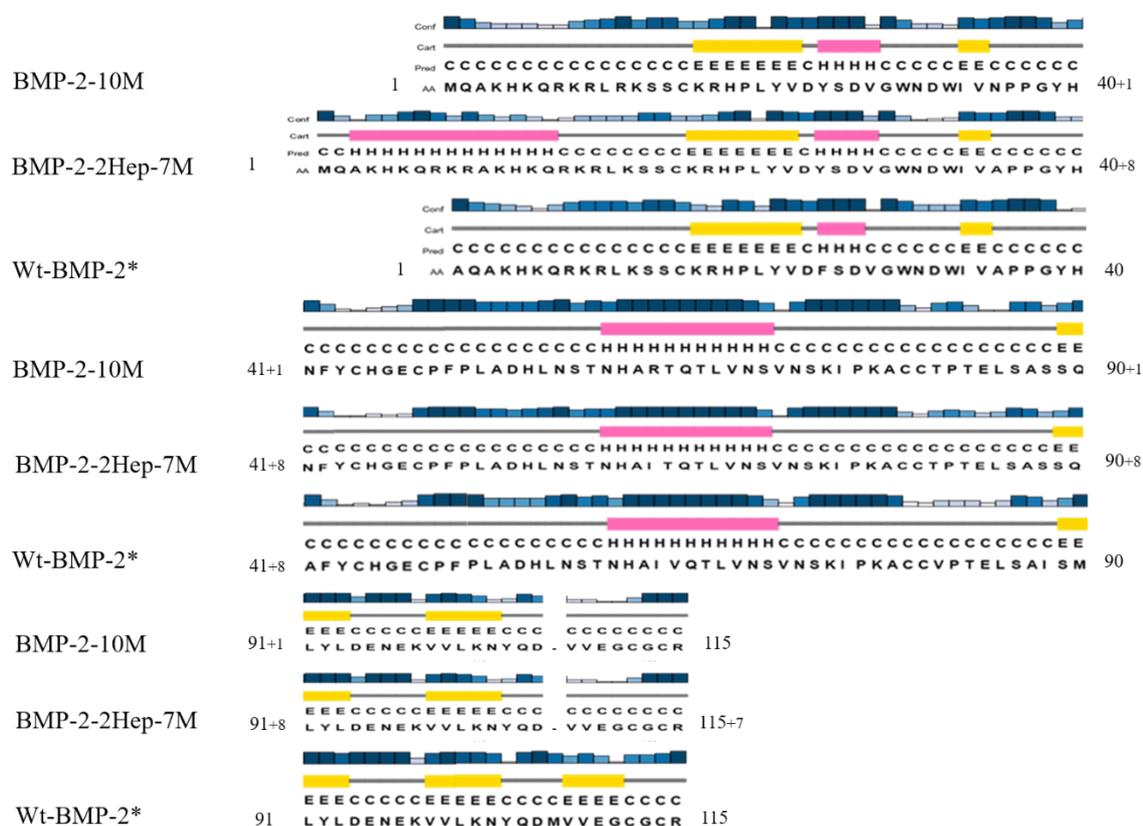


Abb. 5: Sekundärstrukturabschätzung der Variante BMP-2-10M (oben) und BMP-2-2Hep-7M (Mitte) im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2* (unten) modelliert mit dem Programm PSIPRED
 α-helikale Strukturen sind pink dargestellt, β-Faltblattstrukturen sind gelb markiert. Das Konfidenzintervall der Sekundärstrukturvorhersage wird durch die Intensität der blauen Balken über der Aminosäuresequenz veranschaulicht. Die Aminosäuren 1-115 entsprechen dem reifen Wt-BMP-2*-Protein (AS 282-AS 396 des präpro-BMP-2, komplett annotierte Sequenz s. NCBI: NP_001191.1). Die Beschriftung der Aminosäuren der Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M basiert auf dem des reifen Wt-BMP-2*. Sie wurde bei BMP-2-2Hep-7M (1-115+7) mit Indices bezüglich der vorgenommen 8 Insertionen und 1 Deletion vervollständigt [modifiziert nach Heinks & Hettwer et al., 2021].

Lediglich das an der Position 108-111 im Wt-BMP-2* (entspricht den Aminosäuren 389-392 im präpro-BMP-2) vorhandene β-Faltblatt fehlt in den beiden BMP-2-Varianten (BMP-2-10M,

BMP-2-2Hep-7M). Dies wiederum beeinträchtigt jedoch nicht die Rezeptorbindung. Die mit hoher Konfidenz (veranschaulicht über Intensität der blauen Balken über der Aminosäuresequenz in der Sekundärstrukturabschätzung, s. Abb. 5) vorhergesagte α -Helix des Wt-BMP-2* in den Positionen 60-70 (entspricht den Aminosäuren 341-351 im präpro-BMP-2) liegt in BMP-2-10M (Position 61-71) und BMP-2-2Hep-7M (Position 68-78) ebenfalls vor. Diese Positionen entsprechen den Aminosäuren 341₊₁-351₊₁, (BMP-2-10M) sowie 341₊₈-351₊₈ (BMP-2-2Hep-7M) des präpro-BMP-2. Lediglich die Verdopplung der Heparinbindestelle (Position 3-15) im BMP-2-2Hep-7M resultierte in der Vorhersage einer zusätzlichen α -helikalen Struktur, bestehend aus 12 Aminosäuren (entspricht Aminosäure 283₊₁-288₊₈ im präpro-BMP-2). Somit erscheinen die Abweichungen der Varianten zum Wildtyp in grober Näherung tolerierbar.

Schließlich gilt es die besondere Faltungstabilisierung von BMP-2 in den Blick zu nehmen. BMP-2 ist durch einen Cystinknoten stabilisiert, das Monomer enthält drei interne Disulfidbrücken und ist mit einer weiteren zum Homodimer verbunden. Mit Hilfe des Programms DiANNA (*Diaminoacid neural network application*) [Ferre & Clote, 2005] sollte daher vorhergesagt werden, welche Disulfidbrücken in den Varianten BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M wahrscheinlich sind. Laut dieser Analyse sind in den Monomeren der Varianten ebenfalls drei Disulfidbrücken zu erwarten. Diese zeigen die gewünschte Konnektivität 1-5, 2-6 und 3-7.

Tab. 15: Vorhersage zur Ausbildung von hoch konservierten Disulfidbrücken in BMP-2-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2*

Die Daten wurden mit dem Programm DiANNA ermittelt.

Disulfidbrücken-Vorhersage		
BMP-2-10M	16-81 45-113 49-115	LRKSSCKRHPL-IPKACCTPTTEL YHNFYCHGECF-DVVEGCGCRXX YCHGECFPLA-VEGCGCR
BMP-2-2Hep-7M	16-81 45-112 49-114	RLKSSCKRHPL-IPKACCTPTTEL YHNFYCHGECF-DVVEGCGCRXX YCHGECFPLA-VEGCGCR
Wt-BMP-2*	23-88 52-119 56-121	RLKSSCKRHPL-IPKACCVPTTEL YHAFYCHGECF-MVVEGCGCRXX YCHGECFPLA-VEGCGCR

Vorhergesagte Konnektivität

1-5, 2-6, 3-7

Die *in silico*-Strukturvorhersagen *AggreScan*, *Phyre* und *DiANNA* stellen damit in Aussicht, lösliche BMP-2-Varianten mit vergleichbarer Tertiärstruktur erstellen zu können. Jedoch kann weiterhin keine Aussage über die Funktionalität der Varianten getroffen werden. Fakt ist, dass die dafür nötigen Epitope in BMP-2 nicht verändert werden dürfen, wenn das Zielprotein weiterhin an die BMP-2-Rezeptoren I und II binden soll [Kirsch et al., 2000, Nickel et al., 2001, Keller et al., 2004, Sebald et al., 2004, s. Tab. 16]. Allerdings können punktuelle Veränderungen im Bereich der BMP-2-Rezeptor-Bindungsepitope trotzdem einen interessanten und sogar vielversprechenden Ansatz darstellen.

Tab. 16: Übersicht von Aminosäure Positionen in der BMP-2-Aminosäuresequenz die für die Bindung von BMP-2-RI und BMP-2-RII nötig sind.

Rezeptor: BMP-2-RI	Rezeptor: BMP-2-RII
His 17	Ala 34
Val 26	His 39
Asp 30	Ser 88
Trp 34	Leu 90
Phe 49	Leu 100
Pro 50	
Asp 51	
Ala 52	
Asp 53	
His 54	
Ile 62	
Leu 66	
Ser 69	
Lys 101	
Tyr 103	

Sollte es gelingen, BMP-2-Varianten zu erstellen, die zwar nicht mehr an die nativen Rezeptoren, dafür aber noch hochaffin an endogene physiologische Inhibitoren, wie z.B. Noggin [Albers et al., 2012, Seemann et al., 2012] binden, so wären diese dadurch in der Lage die Osteoinduktion indirekt zu stimulieren. Ein „Abfangen“ von BMP-2-Inhibitoren würde die Effekte körpereigener BMP-2s deutlich steigern. Das hydrophilisierte Protein wäre aber grundsätzlich nicht osteogen aktiv, sodass entsprechende Nebenwirkungen damit ausgeschlossen sind. Diese Idee sollte mit der Variante BMP-2-10M umgesetzt werden.

Auf Grund dieser Rahmenbedingungen gab es klare Zielvorgaben zur Entwicklung löslicher und gleichzeitig funktioneller BMP-2-Varianten, die nachfolgend im Abschnitt 4.1.1 zusammengefasst werden.

4.1.1 Zielvorgabe für die BMP-2-Varianten

4.1.1.1 Variante BMP-2-10M

Bei dieser Variante handelt es sich um einen potentiellen BMP-2-Antagonisten, der Affinität gegenüber Noggin aufweisen soll. Noggin besitzt die Fähigkeit einige BMPs zu inhibieren, u.a. auch das BMP-2 [Gamer et al., 2005, Seemann et al., 2009, Song et al., 2010]. Es fungiert als Modulatorprotein, das die Wechselwirkung zwischen dem Liganden-BMP-2 und seinen Rezeptor hemmen kann [Sasai et al., 1994, Merino et al., 1999, Groppe et al., 2002].

Das Design der Variante BMP-2-10M beruht hierbei auf dem Einbringen von 10 hydrophilisierenden Mutationen im Vergleich zum Wt-BMP-2* (s. Tab. 17 und Abb. 4 B), um *aggregation hot spots* zu eliminieren. Punktmutationen in den Positionen A 34 und I 62 stellen sicher, dass diese BMP-2-Variante nicht mehr an BMP-2 Rezeptoren binden kann [Kirsch et al., 2000, Nickel et al., 2001]. Angestrebt wird jedoch eine hochaffine Bindung an den BMP-2-Inhibitor Noggin, wodurch endogenes BMP-2 besser osteogen wirken soll. Dadurch kann möglicherweise indirekt die Knochenbildung stimuliert werden, ohne dass eine unmittelbare osteogene Aktivität von der BMP-2-Variante ausgeht.

Bis dato existieren nur wenige Publikationen, in denen eine BMP-2-Hemmung durch seinen Antagonisten Noggin explizit skizziert wurde. Aus verschiedenen Studien ist jedoch bekannt, dass Noggin mit unterschiedlicher Affinität mit BMP-2, BMP-4, BMP-7 und BMP-14 interagiert bzw. komplexiert und somit die Bindung an deren Rezeptoren blockiert [Zimmermann et al., 1996, Lim et al., 2000, Mulloy & Rider, 2015]. Groppe et al., gelang es erstmalig 2002 die dreidimensionale Struktur des BMP-2 Antagonisten Noggin aufzuklären. Anhand einer Kristallstruktur des Noggins gebunden an BMP-7 wurde zudem die Inhibierung der BMP-Signalkaskade aufgezeigt, die auf einer Blockade molekularer Grenzflächen der Rezeptor Typ I und II-Bindungs epitope beruht. Die Inhibierung der Rezeptorbindung wird durch das Pro 35 des Noggin verursacht, welches in die hydrophobe Tasche des BMP-7 (Trp 52, Trp 55, Val 87, Tyr 128, Met 131) bindet. Analog existiert auch in BMP-2 eine hydrophobe Spalte (Ile 62, Val 63, Leu 66, Trp 28, Tep 31, M 106) [Kirsch et al., 2000]. In BMP-2-10M wurde im Zuge der Hydrophilisierungsoptimierung V 63→R ausgetauscht und M 106 deletiert, wodurch in Zellkulturversuchen noch zu klären ist, ob durch diese Punktmutationen eine hochaffine Bindung dieser BMP-2-Varianten an ihren Antagonisten (Noggin) überhaupt möglich ist.

Ein weiterer Punkt, der nicht außer Acht gelassen werden sollte, ist die natürliche Resistenz, von einigen BMPs gegen Inhibierung durch Noggin. Diese interessante Tatsache wurde 2010

durch Song et al. für das BMP-6 nachgewiesen und publiziert. Die Resistenz wird dabei durch ein Lysin in Position 60 (Lys 60) verliehen. Neben dem BMP-6 verfügt auch das BMP-9 an dieser Stelle über ein Lysin und ist somit auch resistent gegen eine Nogginhemmung. Die Variante BMP-2-10M dagegen enthält an dieser Position ein Prolin (Pro 36, entspricht der Position 60 der des BMP-6, vgl. Tab. 1) und sollte deswegen durch Noggin inhibiert werden können.

Tab. 17: Auflistung der eingebrachten Mutationen in BMP-2-10M und TrxA-BMP-2-10M.

Veränderte Position im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2*	Wichtige Informationen
R 12 → Insertion	
F 23 → Y	
A 34 → N	Wichtig für Signaltransduktion (BMPR-II)
A 40 → N	
I 62 → R	Wichtig für Signaltransduktion (BMPR-I)
V 63 → T	
V 80 → T	
I 87 → S	
M 89 → Q	
M 106 → Deletion	

4.1.1.2 Variante BMP-2-2Hep-7M

Die Variante BMP-2-2Hep-7M soll das Potential besitzen als BMP-2-Agonist osteogene Prozesse therapeutisch zu verstärken. Das Augenmerk liegt somit darauf ein lösliches BMP-2-Analogon zu entwickeln. Für dieses Konstrukt gelten die Eliminierung der *aggregation hot spots* (AHS) und der Erhalt der BMP-2-Funktionalität als Basiskriterien. Das Design dieser Variante beruht auf sieben hydrophilisierenden Mutationen im Vergleich zum Wt-BMP-2* (s. Tab. 18 und Abb. 4 B). Da für die Bindung von BMP-2 an die Rezeptoren von Typ I und II die Aminosäurepositionen Ala 34 und Ile 62 des Wildtyps unverzichtbar sind [Kirsch et al., 2000, Nickel et al., 2001, Sebald et al., 2004], entsprechen sie in Variante BMP-2-2Hep-7M dem Wildtyp-BMP-2*, wodurch eine Signaltransduktion möglich wäre. Durch zusätzliches Einfügen von basischen Motiven wie KHK und RKR (s. Abb. 4 B) am N-Terminus der Variante BMP-2-2Hep-7M, ähnlich dem bereits 2004 von Wuerzler et al. publizierten Ansatz, wird außerdem die natürliche Heparinbindestelle des BMP-2 verstärkt [s. auch Depprich et al., 2005]. Dadurch soll *in vivo* die Bindung des BMP-2 an die extrazelluläre Matrix gestärkt und somit die osteogene Potenz des Wachstumsfaktors gesteigert werden. In Hinblick auf eine spätere Applikation der hier designten BMP-2-Muteine wäre eine Steigerung der Bioaktivität

für eine verbesserte Osteoinduktion sehr von Vorteil. Erste Daten für die Regulierung der Bioaktivität durch Heparinbindung aus *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen liegen bereits vor [Kübler et al., 1999, Kübler et al., 2000, Wuerzler et al., 2004]. Ein weiterer Vorteil dieser Verdopplung kann eine bessere Aufreinigungseffizienz dieser Variante mittels Heparinaffinitäts- und Kationenaustauschchromatographie sein [Ruppert et al., 1996, Migliorini et al., 2017].

Tab. 18: Auflistung der eingebrachten Mutationen in BMP-2-2Hep-7M.

Veränderte Position im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2*	Wichtige Informationen
R 12 → Insertion	entfällt
F 23 → Y	
A 40 → N	
V 63 → T	
V 80 → T	
I 87 → S	
M 89 → Q	
M 106 → Deletion	
A 34 → N	Rückmutation, da Position wichtig für die Signaltransduktion (BMPR-II)
I 62 → R	Rückmutation, da Position wichtig für die Signaltransduktion (BMPR-I), (Masterarbeit/Heinks, 2019)
Verdoppelte Heparinbindestelle	<u>A KHK Q RKR</u> [s. ähnlicher Ansatz: Wuerzler et al., 2004, Depprich et al., 2005]

4.2 Klonierung, Expression und Reinigung von BMP-2-Varianten

4.2.1 Klonierungsstrategie der Expressionskonstrukte

Basierend auf den oben zusammengefassten Zielvorgaben für potentielle BMP-Varianten, die eine optimierte Funktionalität aufweisen, wurden die im Folgenden näher beschriebenen Klonierungsstrategien entwickelt.

4.2.1.1 Variante TrxA-BMP-2-10M

Bei der Variante TrxA-BMP-2-10M sollte im Sinne eines „*proof of concept*“ zunächst validiert werden, ob ein gleichzeitiges Einbringen zahlreicher Mutationen im *bmp-2* codierenden

Sequenzbereich zur Eliminierung der *aggregation hot spots* tatsächlich vorteilhaft ist und BMP-2 dadurch direkt während der rekombinanten Produktion in *Escherichia coli* in löslicher Form hergestellt werden kann.

Dafür wurde basierend auf den Ergebnissen der bioinformatischen Analyse zunächst über chemische Gensynthese eine für *E. coli* codon-optimierte cDNA für Variante BMP-2-10M hergestellt. Diese enthält im Vergleich zum Wt-BMP-2 (Auflistung veränderter Positionen, s. Abb. 4 B) zehn veränderte Aminosäuren. Der *bmp-2*-codierende Bereich wurde außerdem mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NdeI* (5'-Ende) und *XhoI* (3'-Ende) flankiert, sodass eine anschließende Subklonierung in den Expressionsvektor pET32a, (Vektorkarte, s. Abb. 38) möglich wird. Dabei wurde zuvor die N-terminale *NdeI*-Schnittstelle der TrxA-Sequenz über eine Mutations-PCR so verändert, dass diese zunächst beim Einbringen der *bmp-2*-codierenden Sequenz nicht entfernt wird. Die veränderte BMP-2-Gensequenz steht hierbei unter der Kontrolle des T7-Promotors. Das Plasmid weist eine Ampicillinresistenz auf. Die im Vektor vorhandene His₆-Peptidsequenz, die S-Peptidsequenz, die Enterokinase- sowie die Thrombin Proteolysesequenz wurden durch die gewählte Klonierungsstrategie entfernt, wobei vor der zweiten His₆-Sequenz ein Stop-Codon eingeführt wurde, damit dieser nicht weiter transkribiert wird (s. Abb. 6).

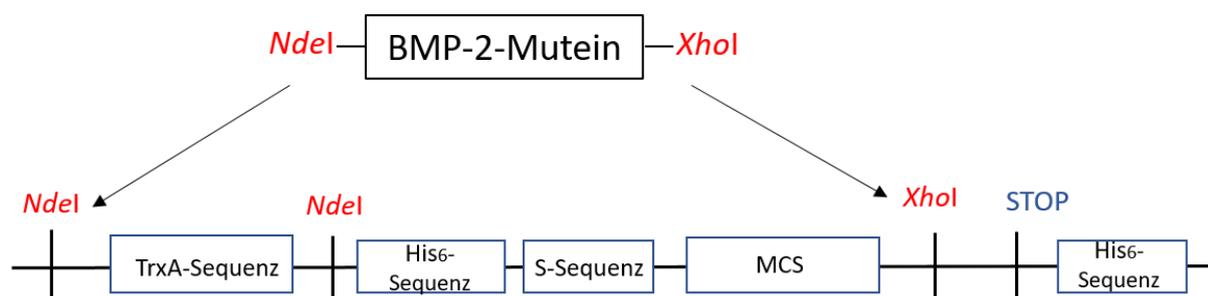


Abb. 6: Subklonierung der BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M-Varianten-codierenden Gensequenz in den Vektor pET32a

Die BMP-2-Varianten-Gensequenz flankiert am 5'-Ende mit der Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NdeI* und am 3'-Ende *XhoI* wurde in den Expressionsvektor pET32a (Novagen) subkloniert. Die gewählte Klonierungsstrategie ermöglicht es zudem, dass die His₆-Peptidsequenz, die S-Peptidsequenz, die Enterokinase- sowie die Thrombin-Proteolysesequenz entfernt wurden, wobei vor der zweiten His₆-Sequenz ein Stop-Codon eingeführt wurde, um ein weiteres ablesen der Erkennungssequenz zu verhindern. Der Erhalt der TrxA-Peptidsequenz in der Variante TrxA-BMP-2-10M wurde über Mutations-PCR gewährleistet.

Die Aufreinigung dieser Variante soll nach der Produktion in einem möglichst gut geeigneten prokaryontischen Expressionssystem *E. coli* B121(DE) mit Hilfe der N-terminalen Heparinbindestelle der BMP-2-Variante über Heparinsepharose und nicht über Thioredoxin-Affinitätschromatographie erfolgen.

4.2.1.2 Variante BMP-2-10M

Die Gensequenz der Variante BMP-2-10M, die flankierend mit Restriktionsschnittstellen versehen ist, wurde zunächst über chemische Gensynthese (Eurofins Genomics, Ebersberg) hergestellt und anschließend im Labor über die Restriktionsschnittstelle *NdeI* und *XhoI* in den Vektor pET32a (Novagen) eingebracht. Bei diesem Konstrukt wurde komplett auf die Verwendung von bestehenden reinigungsunterstützten Anhängen verzichtet, da diese in präklinischen und klinischen Anwendungen auf Grund des allergenen Potentials ein nicht kalkulierbares Risiko darstellen können. Die TrxA-Sequenz entfällt hier über einen N- und C-terminalen *NdeI*-Restriktionsschnitt. Die C-terminale His₆-Sequenz hingegen wird durch das Einfügen eines Stop-Codons nicht exprimiert (s. Abb. 6). Nach der Transformation des klonierten Plasmids erfolgte final die Produktion des rekombinanten Proteins in *E. coli* BL21(DE3). Zu Aufreinigungszwecken dieser Variante wurde erneut die natürliche N-terminale Heparinbindestelle genutzt, wodurch eine Reinigung mittels Heparinsepharose möglich war.

4.2.1.3 Variante BMP-2-2Hep-7M

Ausgehend vom Design der Variante BMP-2-10M wurde die Gensequenz für BMP-2-2Hep-7M über chemische Gensynthese (Eurofins Genomics, Ebersberg) erzeugt, die nicht nur die verlängerte Heparinbindestelle, sondern auch sieben veränderte Aminosäurepositionen im Vergleich zum reifen Wt-BMP-2* aufwies (s. Abb. 4 B). Es folgte daraufhin eine Subklonierung über die Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* in den Vektor pET32a (Novagen). Auch in diesem Konstrukt wurden die im Expressionsvektor vorhandenen aufreinigungsunterstützten Fusionsanhänge entfernt bzw. die zweite His₆-Sequenz über ein Stop-Codon ausgeschaltet. Die Expression dieser Variante erfolgte in *E. coli* SHuffle® T7.

Der Erfolg der molekularbiologischen Klonierungsarbeiten wurde in dieser Arbeit über Agarosegelelektrophorese überprüft. Dabei erfolgte zuvor eine Restriktionshydrolyse der potentiellen Klone mit *NdeI* und *XhoI* basierend auf dem im Abschnitt 3.2.1.4. beschriebenen Verfahren. In Abb. 7 wurde exemplarisch am Beispiel des BMP-2-10M der Erfolg der Subklonierung dargestellt. Sowohl bei der Variante TrxA-BMP-2-10M als auch bei der Variante BMP-2-2Hep-7M wurde analog verfahren. Zudem wurde die Richtigkeit der drei erzeugten BMP-2-Varianten zusätzlich über eine Sequenzierung (Eurofins Genomics, Ebersberg) überprüft.

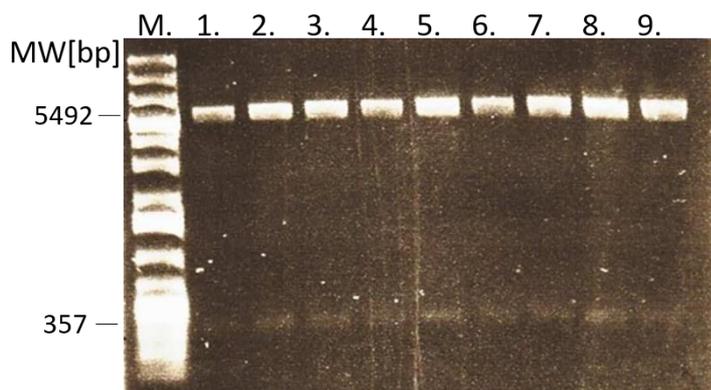


Abb. 7: 1% -Agaroseelektrophorese von potentiellen Klonen von pET32a-BMP-2-10M nach Restriktionsverdau mit *NdeI* und *XhoI*.

Spuren: M: Marker (GeneRuler plus DNA Ladder, 1kb (Thermo Fisher Scientific), Spur 1-9: BMP-2 Klone nach Restriktionsverdau mit *NdeI/XhoI*. Zu erkennen ist jeweils das BMP-2-Insert (357 bp) und der geschnittene pET32a Vektor (5492 bp).

4.2.2 Expression von BMP-2-Varianten

Nach der erfolgreichen Klonierung der BMP-2-Genvarianten galt es zunächst die im Vorfeld gestellte These zu belegen, dass das gleichzeitige Einbringen einer Vielzahl an Punktmutationen in die *bmp-2*-Gensequenz keine negative Auswirkung auf die rekombinante Darstellung des in dieser Arbeit untersuchten Wachstumsfaktors hat. Somit wurden zunächst erste Expressionsstudien mit der TrxA-BMP-2-10M in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Da die vorhandene TrxA-Peptidsequenz hierbei als Löslichkeitsverstärker fungiert, begünstigt das TrxA-BMP-2-10M-Fusionsprotein ein lösliches BMP-2-Konstrukt [Yasukawa et al., 1995, Hammarström et al., 2006]. Zudem verhindert dieser Löslichkeit vermittelnde Anhang während einer rekombinanten Proteinproduktion in *E. coli* die Bildung von *inclusion bodies* durch seine Einflussnahme auf die intrinsische Oxidoreduktase-Aktivität, die für die Reduktion von Disulfidbrückenbindungen bedingt durch einen Thiol-Disulfid-Austausch verantwortlich ist [Stewart et al., 1998, LaVallie et al., 2000, Young, et al., 2012].

Für die native Faltung des Wachstumsfaktors BMP-2 ist der Cystinknoten entscheidend [Vallejo & Rinas, 2013]. Bildet sich eine derartig disulfidverbrückte Proteinstruktur auch, wenn an 10 Positionen des BMP-2-Wildtyps hydrophilisierende Mutationen vorgenommen werden oder sind die hydrophoben Wechselwirkungen im BMP-2 maßgeblich für die Ausbildung des Cystinknotens? Erweist sich der TrxA-Fusionsanhang möglicherweise kontraproduktiv für die BMP-Faltung? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden erste Expressionsstudien mit der TrxA-BMP-2-10M in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Im Zuge dieser Versuche konnte eine sehr gute Expression an löslichem BMP-2 beobachtet werden (s. Abb. 8).

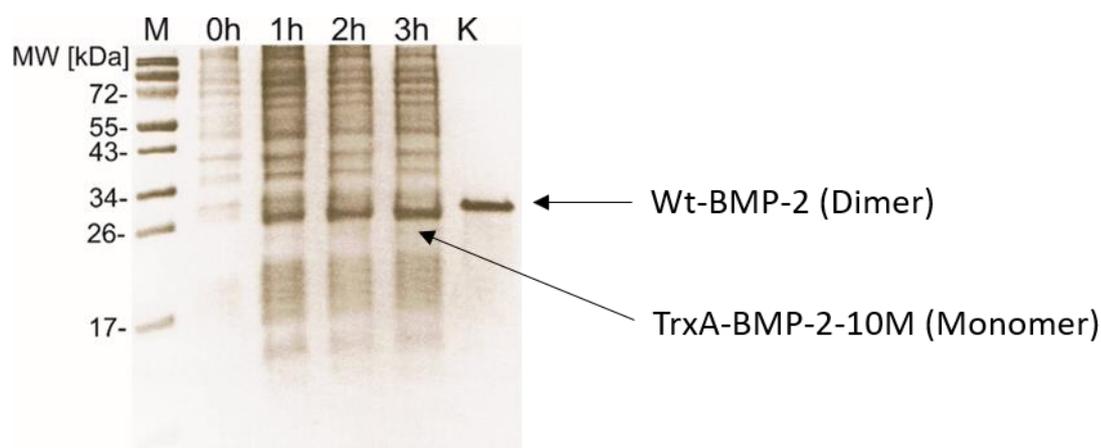


Abb. 8: Proteinexpression von TrxA-BMP-2-10M in *E. coli* BL21(DE3)

Zeitabhängige Analyse der rekombinanten Expression von TrxA-BMP-2-10M bei 37°C in *E. coli* BL21(DE3) für drei Stunden (h) induziert mit 1 mM IPTG. Spuren: M: Marker (PageRuler™, #26616, Thermo Fisher Scientific), 0 h: Gesamtprotein vor Induktion, 1-3 h: Gesamtprotein nach Induktion mit 1 mM IPTG, K: Kontrolle (Wildtyp-BMP-2, Universität Würzburg, nicht reduziert). Auf der SDS-Tricin-PAGE (nicht reduziert) wurde das Gesamtprotein der Proteinexpression aufgetragen. Zu erkennen ist eine zeitliche Zunahme des BMP-2-Monomers (~26 kDa).

Nach Zellaufschluss und Aufreinigung mittels Heparinsepharose-Affinitätschromatographie (s. Abschnitte 3.2.3.2 und 3.2.3.5) konnte das BMP-2-Protein aus TrxA-BMP-2-10M erfolgreich als Monomer (~26 kDa) und Dimer (~56 kDa) dargestellt werden, wie in Abb. 9 in Spur 1 zu erkennen ist. Gleichzeitig wurde ein geringer Anteil an Zielproteinen in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen (Spur 2). Das Monomer liegt im Vergleich zum BMP-2-Dimer überpräsentiert vor (Spur 3-4).

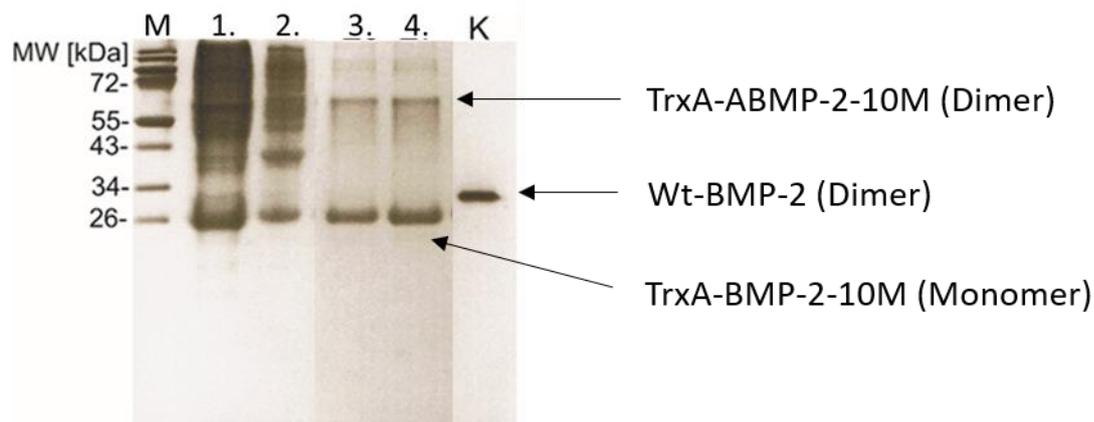


Abb. 9: Aufreinigung von TrxA-BMP-2-10M aus *E. coli* BL21(DE3) über Heparinsepharose-/ Ionenaustauschchromatographie

Die Analyse der Proteinfractionen wurde mit einer SDS-Tricin-PAGE-15% unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Das SDS-Gel wurde mittels Coomassie blau gefärbt. Spuren: M: Marker (PageRuler™, #26616, Thermo Fisher Scientific), 1. Lysat, 2: unlösliche Proteinfraction, 3-4: Elutionsfraktionen nach Heparinsepharose. K: Kontrolle (Wildtyp-BMP-2, Universität Würzburg, nicht reduziert). Die SDS-PAGE zeigt eine klare Anreicherung des TrxA-BMP-2-10M-Monomers (~26 kDa) und Dimers (~54 kDa), sowie eine deutliche Abnahme von hochmolekularen Begleitproteinen nach Chromatographie.

Im Nachgang an die Aufreinigung des BMP-2-Proteins wurde die Stabilität bzw. die Lagerfähigkeit der TrxA-Variante, sowie das Vorhandensein von Disulfidbrücken zwischen zwei Monomer-Molekülen untersucht. Die SDS-PAGE-Analyse (s. Abb. 10) belegt, dass es durch den Einsatz von DTT zur Spaltung der intermolekularen Disulfidbrücken kam und dadurch eine deutliche Zunahme des BMP-2-Monomers (~ 26 kDa) zu beobachten ist. Dies ist aber noch kein Beleg für die wirklich korrekte Ausbildung des Disulfidknotens der TrxA-BMP-2-10M-Variante.

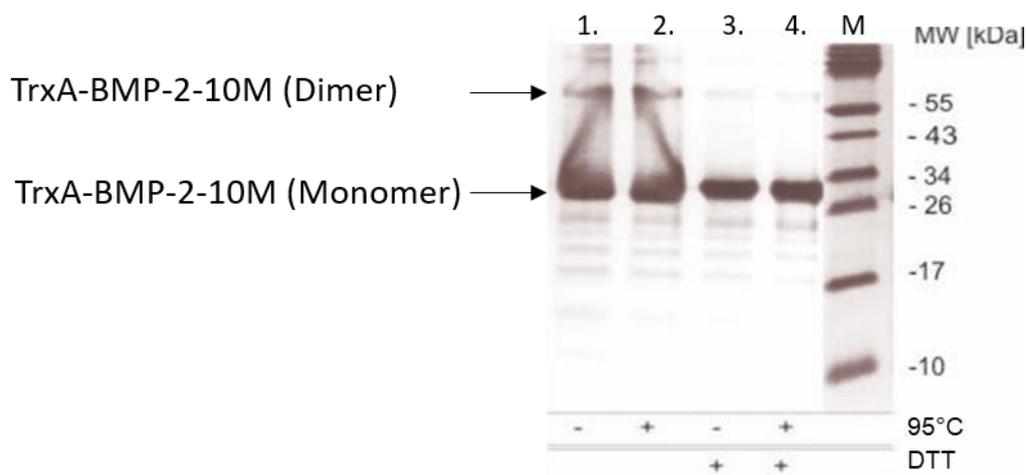


Abb. 10: SDS-Tricin-PAGE von TrxA-BMP-2-10M nach Heparinsepharosechromatographie

Spuren: 1- 2: TrxA-BMP-2-10M nach Heparinsepharose. 3-4: TrxA-BMP-2-10M nach DTT Spaltung. Zu erkennen ist die Zunahme des TrxA-BMP-2-10M- Monomers auf der Höhe von ~26 kDa (Spur 1-2) und die Abnahme des Dimers bei ~54 kDa durch die Spaltung der Disulfidbrücken mit 50 mM DTT (Spur 3-4). M: Marker (PageRuler™, #26616, Thermo Fisher Scientific).

Die Vorstudien mit der TrxA-BMP-2-10M beweisen, dass die gewählte Mutationsstrategie die Löslichkeit von BMP-2 sehr wohl befördert und selbst nach Expression in einem prokaryotischen Expressionssystem (*E. coli* BL21(DE3), reduzierendes Milieu) Disulfidbrücken generiert werden, was ohne fehlende Proteinstruktur unwahrscheinlich wäre [Kübler et al., 1998, Bessho et al., 2000, Quaas et al., 2019]. Allerdings ist TrxA ein potentiell immunogener Fusionsanhang, die die medizinische Applikation eines solchen Konstrukts unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde diese BMP-2-Variante nicht weiter charakterisiert. Stattdessen lag das weitere Augenmerk nun darauf, ob das Dimer von BMP-2-10M mit seinen analogen hydrophilisierenden Mutationen auch ohne TrxA ausreichend löslich ist.

Da die Expression vom BMP-2-Wildtyp in einem prokaryotischen Wirt vorwiegend in der Bildung von *inclusion bodies* resultiert, was wiederum Renaturierungsschritte [Israel et al., 1992, Fischer et al., 1993, Long et al., 2006, Vallejo et al., 2002, von Einem et al., 2010] nach sich zieht, mussten optimale Parameter gefunden werden, um die Zielproteine direkt in löslicher und funktioneller Form darzustellen. Für die Faltung eines BMP-2-Monomers werden drei intramolekulare Disulfidbrücken benötigt. Die Dimerisierung zum biologisch funktionellen

Molekül gelingt über eine weitere intermolekulare Cysteinverbrückung. Zu beachten war insbesondere, dass in allen *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen reduktive Bedingungen im Cytoplasma vorliegen, die somit implizieren, dass der Cystinknoten, der für bioaktive BMP-2-Moleküle essentiell ist, eigentlich erst nach Zellaufschluss gebildet werden kann [Fischer et al., 1993, Kübler et al., 1998, Vallejo & Rinas, 2013]. Entsprechend wurden für die Konstrukte BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M neben dem bereits routinemäßig eingesetzten Stamm *E. coli* BL21 (DE3) auch zwei Stämme getestet, die für besonders schwierige bzw. speziell gefaltete Proteine mit Disulfidbrücken geeignet sind. Dabei handelte es sich zum einen um *E. coli* SHuffle® T7 (New England Biolabs) und zum anderen um Origami™ B (DE3) (Novagen). Während einer Expression eines Zielproteins in *E. coli* SHuffle® T7 wird zusätzlich die cytoplasmatische Disulfidisomerase C (DsbC) konstitutiv exprimiert. Diese kann die richtige Ausbildung von Disulfidbrücken auch im reduktiven Cytoplasma von *E. coli* begünstigen [Lobstein et al., 2012]. Die Deletion der Gene *gor* (kodiert für Glutathionreduktase) und *trxB* (kodiert für Thioredoxinreduktase) stört das *E. coli*-eigene Glutathion- und Thioredoxinsystem empfindlich [Prinz et al., 1997]. Dies wiederum fördert bei einer heterologen Proteinbiosynthese in *E. coli* ebenfalls die Ausbildung von Disulfidbrücken [Prinz et al., 1997, Stewart et al., 1998, Bessette et al., 1999, Lobstein et al., 2012]. Diese beiden Gene sind auch in *E. coli* Origami™ B (DE) deletiert, weswegen dieser Stamm in die nähere Auswahl potentieller Expressionsstämmen aufgenommen wurde.

Ein weiterer optimierter *E. coli*-Wirtstamm, der für die Expression von löslichem BMP-2 in Betracht gezogen wurde, ist ArcticExpress™ (DE3) (Agilent Technologies). Dieser ermöglichte nicht nur die Expression von Proteinen bei 13 °C, sondern auch die gleichzeitige Coexpression von Chaperonen (*cpn10*, *cpn60*), die auf zusätzlichen Plasmiden codiert sind. Dadurch soll die Aggregationstendenz des BMP-2 herabgesetzt werden. Zudem führt eine niedrige Expressionstemperatur zu verlangsamer Proteinbiosynthese und erhöht damit die Chance auf eine korrekte Faltung des zu exprimierenden Proteins [Schein & Noteborn, 1988, Vera et al., 2007].

Neben der Identifikation des besten Expressionsstamms für die BMP-2-Varianten wurden auch generelle Parameter wie die Temperatur oder die Zeit variiert. Der Einfluss einer Änderung der Temperatur auf die Translation existiert natürlich nicht in *E. coli* ArcticExpress™ (DE3). Außerdem kann der Expressionsprozess auch stets über die Variation der Induktorkonzentration optimiert werden.

Die Resultate der durchgeführten Expressionsstudien von Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M wurden in Tab. 19 und Tab. 20 zusammengefasst. Für die Evaluierung der Daten wurden die rekombinante Proteinproduktion zum Zeitpunkt vor der Induktion (0 h), sowie an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion (1, 2, 3, 4, 5, 6 h) miteinander verglichen, wobei die Zusammenfassung der Daten in den genannten Tabellen nur die zwei signifikantesten Zeitpunkte nach 3 h und 5 h beinhaltet. Die Darstellung zeigt einerseits vergleichende

Expressionsdaten in unterschiedlichen *E. coli*-Expressionsstämme (*E. coli* BL21 (DE3), ArcticExpress™ (DE3), Origami™ B (DE), SHuffle® T7), die mittels SDS-Tricin-PAGE analysiert wurden (Färbeintensität). Andererseits wird die Effizienz der Expression veranschaulicht (gemessen am Gesamtprotein aus Zelllysat, erste Position), die als keine (-), niedrig (±), und hohe (+) gekennzeichnet ist. Die Analyse der Löslichkeit der Proteine (lösliche/unlösliche Fraktionen) ist in der zweiten Position angegeben.

Tab. 19: Expressionsstudien der Variante BMP-2-10M

Die Expression dieser Variante wurde in den *E. coli*- Expressionsstämmen BL21 (DE3), Origami™ B (DE3), SHuffle® T7 und Arctic Express™ (DE3), durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Expressionszeiten und IPTG-Konzentrationen für die Gewinnung von Gesamtprotein (erste Position) bzw. von löslichem Protein (zweite Position) untersucht. Die Effizienz der Expression ist angegeben als keine (-), niedrige (±) und hohe (+n).

		Gesamtprotein / lösliches Protein			
		0.5 mM IPTG		1.0 mM IPTG	
		<u>Expressionszeit [h]</u>		<u>Expressionszeit [h]</u>	
<i>E. coli</i>-Stamm		3	5	3	5
	13 °C				
ArcticExpress™ (DE3)		- / -	- / -	- / -	- / -
	20 °C				
BL21 (DE3)		+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
Origami™ B (DE3)		± / ±	± / ±	± / ±	± / ±
SHuffle® T7		± / ±	± / ±	± / ±	± / ±
	30 °C				
BL21 (DE3)		+ / +	+ / +	+ + / + +	+ + / + +
Origami™ B (DE3)		± / ±	± / ±	± / ±	± / ±
SHuffle® T7		± / ±	± / ±	± / ±	± / ±

Tabelle 19 verdeutlicht, dass die besten Expressionsbedingungen für BMP-2-10M in *E. coli* BL21 (DE3), sowie bei 30 °C und mit 1 mM IPTG erzielt wurden. Eine niedrigere Temperatur und Induktorkonzentration führten zu einer deutlich geringeren Menge des löslichen Proteins (Monomer/Dimer). Als optimale Expressionsdauer können drei Stunden angesehen werden,

eine längere Expressionszeit (5 h) ergab keine besseren Resultate. Eine mittlere Expression an löslichem Monomer/Dimer in BMP-2-10M ließ sich bei den Stämmen *E. coli* OrigamiTM B (DE) und SHuffle® T7 beobachten. Hierbei sind die Ergebnisse bei 30 °C und einer IPTG-Konzentration von 1 mM IPTG mit denen bei 20 °C und 0.5 mM IPTG vergleichbar. Die Expressionsstudien ergaben zudem, dass in *E. coli* ArcticExpressTM (DE3) trotz niedriger Expressionstemperatur und Coexpression von Chaperonen (Spezifität dieses Expressionsstammes) keine Proteinbiosynthese der Variante BMP-2-10M induziert werden konnte, obwohl dieser Stamm eine bessere Faltung von zu Aggregation neigenden Proteinen (*aggregation-prone proteins*) begünstigen sollte [Lebediker & Danieli, 2014]. Bei den Stämmen *E. coli* SHuffle® T7 als auch OrigamiTM B (DE3) wurden zwar unabhängig von Temperatur und Induktorkonzentration BMP-2-Monomere nachgewiesen, jedoch in viel geringeren Mengen als in *E. coli* BL21(DE3). Erstaunlicherweise ist hierbei die Tatsache, dass weder eine geringere IPTG-Konzentration noch eine verminderte Temperatur bessere Resultate ergaben. Ebenso führte der Einsatz spezieller Expressionsstämme nicht zu einer Erhöhung der Expression.

Anders als bei BMP-2-10M konnten bei der heterologen Expression von BMP-2-2Hep-7M (s. Tab. 20) in den zuvor genannten Expressionsstämmen interessante Ergebnisse generiert werden. Diese veranschaulichen sehr deutlich, dass die besten Bedingungen für die Expression der löslichen Variante BMP-2-2Hep-7M (Monomer) sowohl in *E. coli* OrigamiTM B (DE3) als auch in -SHuffle® T7 erzielt wurden. Expressionsversuche in *E. coli* BL21(DE3) zeigten keine Expression an monomerem BMP-2-2Hep-7M, weder in einer löslichen noch unlöslichen Form. In *E. coli* OrigamiTM B (DE3) und in SHuffle® T7 wird bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C hingegen ein besserer Effekt auf die produzierte Gesamtmenge an löslichen BMP-2-2Hep-7M erzielt. Bei 20 °C dagegen fielen die Ergebnisse deutlich schlechter aus. Nur bei *E. coli* SHuffle® T7 konnte bei 20 °C überhaupt eine Expression von BMP-2-2Hep-7M beobachtet werden. Als optimal erwiesen sich außerdem eine Induktorkonzentration von 1 mM IPTG, sowie eine Mindestexpressionszeit von 3-5 h. Trotz der vielversprechenden Expressionsergebnisse in den unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen konnte zunächst keine Bildung von dimerem BMP-2 beobachtet werden (nicht reduzierende SDS-Tricin-PAGE). Eine Erhöhung der Temperatur beim Expressionsstamm *E. coli* SHuffle® T7 auf 34 °C brachte hierbei letztlich den entscheidenden Durchbruch. Das Resultat war eine zeitabhängige Zunahme einer Dimer-Bande (aus Zellysat) in einer nicht-reduzierenden SDS-Tricin-PAGE. Weitere Temperatursteigerungen bis 37 °C führten wiederum zu starker Minimierung des Gesamtproteins, sowie dem Verlust des BMP-2-Hep-7M-Dimers (Daten nicht gezeigt). Wie bereits bei BMP-2-10M konnte auch bei BMP-2-2Hep-7M keine Expression in *E. coli* ArcticExpressTM (DE3) erreicht werden.

Tab. 20: Expressionsstudie der BMP-2-2Hep-7M-Variante

Die Expression dieser Variante wurde in den *E. coli*-Expressionsstämmen ArcticExpress™ (DE3), BL21 (DE3), Origami™ B (DE3), SHuffle® T7 durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Expressionszeiten und IPTG-Konzentrationen für die Gewinnung an Gesamtprotein (erste Position) vs. lösliches Protein (zweite Position) untersucht. Die Effizienz der Expression ist angegeben als keine (-), niedrige (±) und hohe (+n) [modifiziert nach Masterarbeit/Heinks, 2019, Heinks & Hettwer, 2021].

Gesamtprotein / lösliches Protein				
<i>E. coli</i> -Stamm	0.5 mM IPTG		1.0 mM IPTG	
	<u>Expressionszeit [h]</u>		<u>Expressionszeit [h]</u>	
	3	5	3	5
	13 °C		13 °C	
ArcticExpress™ (DE3)	- / -	- / -	- / -	- / -
	20 °C		20 °C	
BL21 (DE3)	- / -	- / -	- / -	- / -
Origami™ B (DE3)	- / -	- / -	- / -	- / -
SHuffle® T7	- / -	- / -	± / ±	± / ±
	30 °C		30 °C	
BL21 (DE3)	- / -	- / -	- / -	- / -
Origami™ B (DE3)	+ / +	+ / +	++ / ++	++ / ++
SHuffle® T7	+ / +	+ / +	++ / ++	++ / ++

4.2.3 Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine

Der Zellaufschluss sowie die Aufreinigung der BMP-2-Varianten erfolgten in Anlehnung an die im Abschnitt 3.2.3.2 beschriebenen Verfahren. Auch hierbei galt das Kriterium eine hohe Ausbeute an löslichem BMP-2 zu gewinnen, sowie das BMP-2 so gut wie möglich während des anschließenden *Downstream Prozess* zu stabilisieren und somit eine mögliche Aggregation zu verhindern.

4.2.3.1 Reinigung der Variante BMP-2-10M

Für die Aufreinigung wurde zunächst das Zellpellet (20 ml/g Nassgewicht) in 20 ml Auftragspuffer (20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4) resuspendiert und anschließend lysiert

(s. Abschnitt 3.2.3.2). Um das BMP-2 vor einer möglichen Aggregation zu schützen und seine Löslichkeit zu erhöhen, wurden direkt nach dem Zellaufschluss zusätzlich Arginin (Endkonzentration 0.5 mM) hinzugefügt und danach für 3 h auf Eis inkubiert. Das Arginin fördert hierbei die Disaggregation von Proteinen und erhöht somit deren Löslichkeit [Tsumoto et al., 2004, Arakawa et al., 2007, Chen et al., 2008]. Da dieser Schritt maßgeblich zur Verbesserung der Ausbeute der BMP-2-Variante beitrug, wurde er anschließend in das Zellaufschlussprotokoll eingeführt.

Die Aufreinigung dieser BMP-2-Variante wurde unter Zuhilfenahme einer 5 ml HiTrap® Heparin HP-Säule (GE Healthcare) durchgeführt, die als eine Mischung von Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie fungieren kann. Das Heparin weist eine Vielzahl negativer Ladungen auf, die durch das hoch sulfatierte Glycosaminoglycan begründet sind. Dadurch initiiert es einerseits die extrazelluläre Matrix und kann andererseits als Kationenaustauscher fungieren.

Wie aus dem Chromatogramm der Aufreinigung ersichtlich ist (s. Abb. 11, links), konnte das Zielprotein erst bei Erreichen von 100 % des Elutionspuffers (20 mM Phosphat-Puffer, 0.5 M NaCl, pH 7.4) eluiert werden. Das Chromatogramm weist ein klar abgegrenztes UV-Absorptionsmaximum auf. Wie aus Abb. 11 (rechts) zunächst zu entnehmen ist, reichen bereits 2-3 h aus, um BMP-2-10M erfolgreich zu exprimieren (s. Spur 1). Dies äußert sich durch eine distinkte Bande auf der Höhe von ~26 kDa (Dimer) und ~13 kDa (Monomer). Nach dem Zellaufschluss lag das BMP-2 aus BMP-2-10M nahezu ausschließlich in löslicher Form vor (s. Spur 2). Spur 3 hingegen spiegelt den Proteingehalt der unlöslichen Fraktion wieder, die laut SDS-Tricin-PAGE weder die monomere noch die dimere Form der BMP-2-Variante enthält. Einzelne während der Chromatographie bei 280 nm Wellenlänge detektierten Proteinfractionen wurden exemplarisch auf einer 15 %-SDS-Tricin-PAGE analysiert (s. Spur 4-8). Dort können sowohl das Monomer als auch das Dimer klar nachgewiesen werden. Die Zuordnung zur angestrebten Proteinvariante von BMP-2 wurde durch eine Referenz des BMP-2-Wildtyps erleichtert (Wildtyp-BMP-2, Universität Würzburg), deren Disulfidknoten mit Hilfe von DTT reduziert wurde. Das Konstrukt BMP-2-10M konnte also durch die Affinitätschromatographie auf Heparinsepharose effizient angereichert werden. Von der Expression bis zum Ende der Chromatographie wurde das Verhältnis der monomeren und dimeren Spezies immer zu Gunsten des Dimers verschoben. Final gelang es jedoch nicht alle endogenen *E. coli*-Proteine durch diese Chromatographieform vollständig abzutrennen.

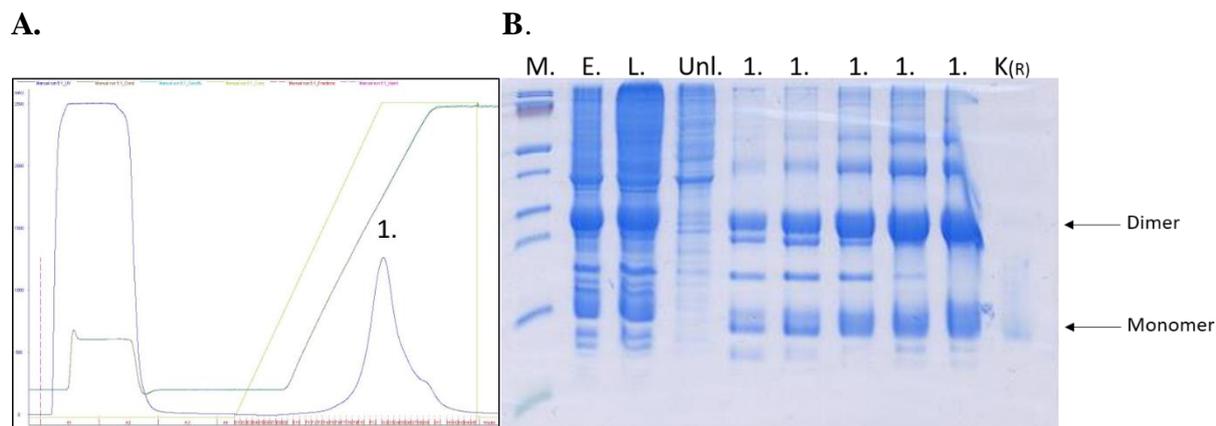


Abb. 11: Heparinsepharose/Ionenaustauschchromatographie und SDS-Tricin-PAGE-15% von BMP-2-10M

A: Chromatogramm der Affinitäts-/Ionenaustauschchromatographie (HiTrap® Heparin HP-Säule, GE Healthcare) von BMP-2-10M in 20 mM Phosphat-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Zu erkennen ist ein klar abgegrenztes UV-Absorptionsmaximum, das vorwiegend eine Mischung als BMP-2-10M-Dimer (~26 kDa) und -Monomer (~13 kDa) enthält (vgl. SDS-Tricin-PAGE-Analyse, rechts). B: 15 %-SDS-Tricin-PAGE-Analytik (nicht reduzierend, Färbung mit Coomassie blau) der entsprechenden Proteinfractionen nach Heparinsepharose. Spuren: M: Marker (PageRuler™, #26616, Thermo Fischer Scientific), E: Fraktion nach 3,5 h Expression, L: Lysat, Unl: unlösliche Fraktion, 1: Elutionsfraktionen nach Chromatographie auf Heparinsepharose, K_(R): Kontrolle (Wt-BMP-2, Universität Würzburg, reduziert mit DTT). Die SDS-PAGE-Analytik weist überpräsentiert das BMP-2-10M-Monomer (~13 kDa) und Dimer (~26 kDa) auf und belegt eine deutliche Abnahme von hochmolekularen Begleitproteinen nach Affinitätschromatographie.

Entsprechend war nach der Affinitäts-/Ionenaustauschchromatographie ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt notwendig, um letzte Verunreinigungen zu entfernen und monomere bzw. dimere Formen von BMP-2-10M voneinander zu trennen. Dies erfolgte durch Gelpermeationschromatographie, deren Ergebnisse in Abb. 12 dargestellt sind. Dafür wurden ca. 2 mg Protein (vereinigte Elutionsfraktion nach Heparinsepharose) auf eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR-Säule (GE Healthcare) aufgetragen und chromatographiert (s. Abschnitt 3.2.3.7). Als Elutionspuffer wurde analog zur Chromatographie auf Heparinsepharose 20 mM Phosphat-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 7,4 eingesetzt. Das Chromatogramm in Abb. 12 (links) zeigt zwei deutlich abgegrenzte UV-Absorptionsmaxima auf. Eine SDS-Tricin-PAGE-Analyse (s. Abb. 12, rechts) einzelner Proteinfractionen nach GPC veranschaulichte eine klare Anreicherung des gewünschten BMP-2-Dimers (~26 kDa), das allerdings immer noch mit Spuren des korrespondierenden Monomers (~13 kDa) verunreinigt war. Des Weiteren wurden geringe Mengen an hochmolekularen Kontaminationen beobachtet.

Die Fraktionen, in denen das BMP-2-Dimer dominierte, wurden vereinigt, gegen 1 mM HCl dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Es folgten ergänzende Analyseschritte, um die Stabilität und Funktionalität des aufgereinigten BMP-2 aus BMP-2-10M näher zu charakterisieren (s. Abschnitte 5 und 6).

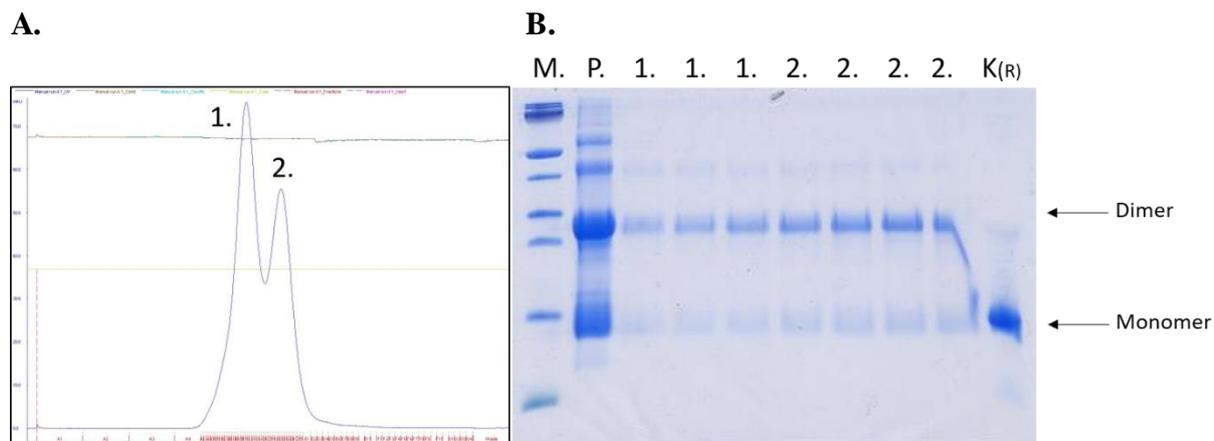


Abb. 12: Gelpermeationschromatographie und SDS-Tricin-PAGE-15% von BMP-2-10M

A: Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie (HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR-Säule, GE Healthcare) von ca. 2 mg BMP-2 in 20 mM Phosphat-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Zu erkennen sind zwei UV-Absorptionsmaxima, die vorwiegend eine Mischung als BMP-2-10M-Dimer/Monomer enthalten (vgl. SDS-PAGE, Abbildung rechts). B: SDS-Tricin-PAGE-15% (nicht reduzierend, Färbung mit Coomassie blau) der entsprechenden Proteinfractionen nach Gelpermeation-schromatographie. Spuren: M: Marker (PageRuler™, #26616, Thermo Fisher Scientific), P: Auftragsfraktion nach Heparinsepharosechromatographie, 1-2: Elutionsfraktionen der UV-Absorptionsmaxima 1-2, K(R): Kontrolle (Wt-BMP-2, Universität Würzburg, reduziert mit DTT). Die SDS-PAGE zeigt die Anreicherung des BMP-2-10M-Dimers (~26 kDa, aus BMP-2-10M), verunreinigt mit Spuren an korrespondierendem Monomer (~13 kDa). Die hochmolekularen Begleitproteine wurden durch Gelpermeationschromatographie deutlich reduziert.

4.2.3.2 Reinigung der Variante BMP-2-2Hep-7M

Die heterologe Proteinexpression der Variante BMP-2-2Hep-7M, der anschließende Zellaufschluss der *E. coli* SHuffle® T7-Zellen und sowie die Affinitätschromatographie mittels Heparinsepharose wurden zunächst analog zu den in den Abschnitten 3.2.3.1, 3.2.3.2 und 3.2.3.6 beschriebenen Protokollen durchgeführt. Da unter den Chromatographiebedingungen der BMP-2-10M-Variante allerdings keine Elution des Zielproteins möglich war, musste eine neue Aufreinigungsstrategie entwickelt werden [Masterarbeit/Heinks, 2019].

Da auch das Wt-BMP-2-Protein nach Renaturierung aus *inclusion bodies* in Tris basierten Puffern gereinigt wird, wurde bei BMP-2-2Hep-7M ein prinzipieller Pufferwechsel von Phosphat-Puffer pH 7,4 auf Tris getestet. Darüber hinaus erfolgte die Applikation des Proteins auf Heparinsepharose bei saurem pH, um durch Protonierung der BMP-2-Variante eine noch bessere Bindung an den Kationentauscher zu erreichen. Für die Elution wurde entsprechend eine pH-Verschiebung auf 8,8 vorgenommen. Analog zum BMP-2-10M-Mutein wurde auch hier im Vorfeld überprüft, ob das gewünschte Konstrukt löslich exprimiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Letztendlich gelangen die Aufreinigung bzw. Anreicherung von BMP-2 aus BMP-2-2Hep-7M unter folgenden Bedingungen: Lysispuffer: 50 mM Tris (pH 5,3), 0,5 M L-Arginin; Auftrags- und Waschpuffer: 50 mM Tris (pH 5,3); Elutionspuffer: 50 mM Tris (pH 8,8), 0,5 M NaCl, 0,5 M L-Arginin.

Abbildung 13 zeigt das Elutionsprofil einer Heparinsepharose/Ionenaustauschchromatographie. Während der 30-minütigen Gradientenelution wurden zwei separate UV-Absorptionsmaxima detektiert. Dabei konnte in der SDS-Tricin-PAGE-Analyse (s. Abb. 13, rechts) lediglich in einzelnen Elutionsfraktionen des zweiten UV-Absorptionsmaximums dimeres BMP-2 nachgewiesen werden (Spur 4-6), wobei dieses stark mit bakterien-endogenen *E. coli*-Proteinen kontaminiert waren. Des Weiteren lag das BMP-2-2Hep-7M anteilig als Monomer und Dimer in der unlöslichen Fraktion vor (Spur 3). Aus diesem Grund wurde im Nachgang ein weiterer Aufreinigungsschritt mittels Gelpermeationschromatographie durchgeführt.

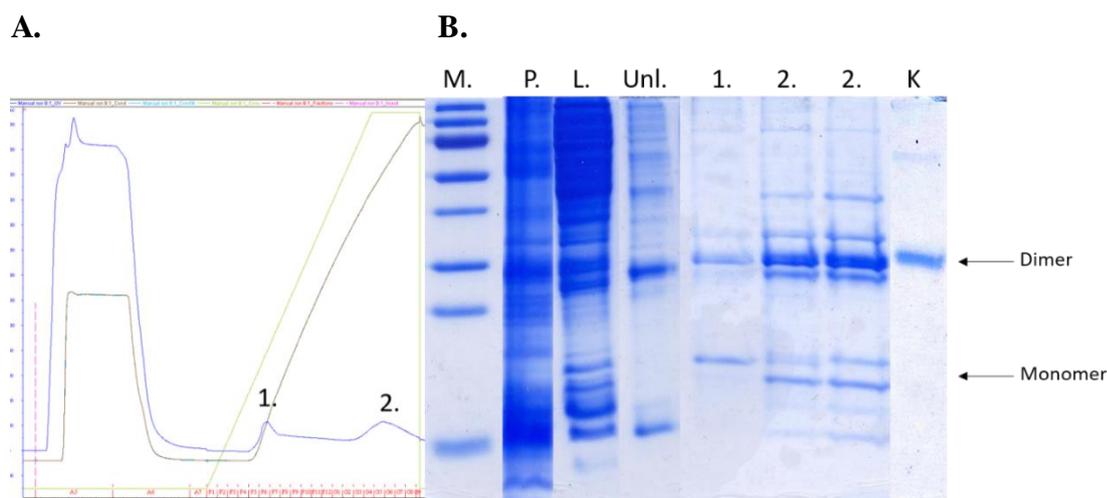


Abb. 13: Heparinsepharose/Ionenaustauschchromatographie und SDS-Tricin-PAGE-15% von BMP-2-2Hep-7M

A: Elutionsprofil der Affinitäts-/Ionenaustauschchromatographie (HiTrap® Heparin HP-Säule, GE Healthcare) Auftrag in 50 mM Tris, pH 5.3, 0.5 M L-Arginin. Gradient auf 100 % 50 mM Tris pH 8.8, 0.5 M NaCl, 0.5 M L-Arginin. Im Durchlauf wurde ein Gemisch aus *E. coli*-Proteinen nachgewiesen (Spur 2, Abbildung rechts). Das zweite kleine UV-Absorptionsmaximum dagegen veranschaulicht dimeres und monomeres BMP-2-2Hep-7M, kontaminiert mit Begleitproteinen. B: SDS-Tricin-PAGE-15 % (nicht reduzierend, Färbung mit Coomassie blau) der entsprechenden Fraktionen nach Heparinsepharose. Spuren: M: Marker (PageRuler™, #26616, Thermo Fisher Scientific), P: Fraktion nach 4 h Expression, L: Lysat, Unl.: unlösliche Fraktion, 1-2: Elutionsfraktionen (UV-Absorptionsmaximum 1 und 2), K: Kontrolle (Wt-BMP-2, Universität Würzburg, nicht reduziert). Die SDS-PAGE der Elutionsfraktion 2 zeigt überpräsentiert das BMP-2-2Hep-7M Monomer (~14 kDa) und Dimer (~28 kDa) der Variante BMP-2-2Hep-7M [modifiziert nach Masterarbeit/Heinks, 2019].

Für Gelpermeationschromatographie (GPC) (s. Abschnitt 3.2.3.7) wurde ein Probenpool aus hochkonzentriertem BMP-2 von ca. 1.7 mg in 50 mM Tris pH 8.8, 0.5 M NaCl, 0.5 M L-Arginin verwendet. L-Arginin wurde bei dieser Chromatographie im Vergleich zur BMP-2-10M eingesetzt, da diese Variante weniger hydrophilisierende Mutationen besitzt und dadurch den Einsatz eines Löslichkeitsvermittlers benötigte.

Für die GPC-Analyse wurde auch hier eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR-Säule (GE Healthcare) verwendet. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abb. 14 (links) dargestellt und zeigt die Detektion von drei unterschiedlichen UV-Absorptionsmaxima.

Wie aus der SDS-Tricin-PAGE-Analyse (s. Abb. 14, rechts) entsprechender Fraktionen aus den einzelnen UV-Absorptionsmaxima ersichtlich ist, eluiert die dimere Form des BMP-2 sowohl im ersten als auch im zweiten Maximum gefolgt von der monomeren Variante (siehe drittes Maximum). Das Monomer (~14 kDa) und das Dimer (~28 kDa) des BMP-2 aus BMP-2-2Hep-7M wurden klar voneinander getrennt, allerdings sind Spuren von kontaminierenden Begleitproteinen deutlich zu erkennen. Im Nachgang wurden die Fraktionen mit BMP-2-Dimer vereinigt und einer Dialyse gegen 1 mM HCl unterzogen, sowie gefriergetrocknet. Ergänzend folgten weitere Analyseschritte, um das isolierte Protein besser zu charakterisieren (s. Abschnitte 5 und 6).

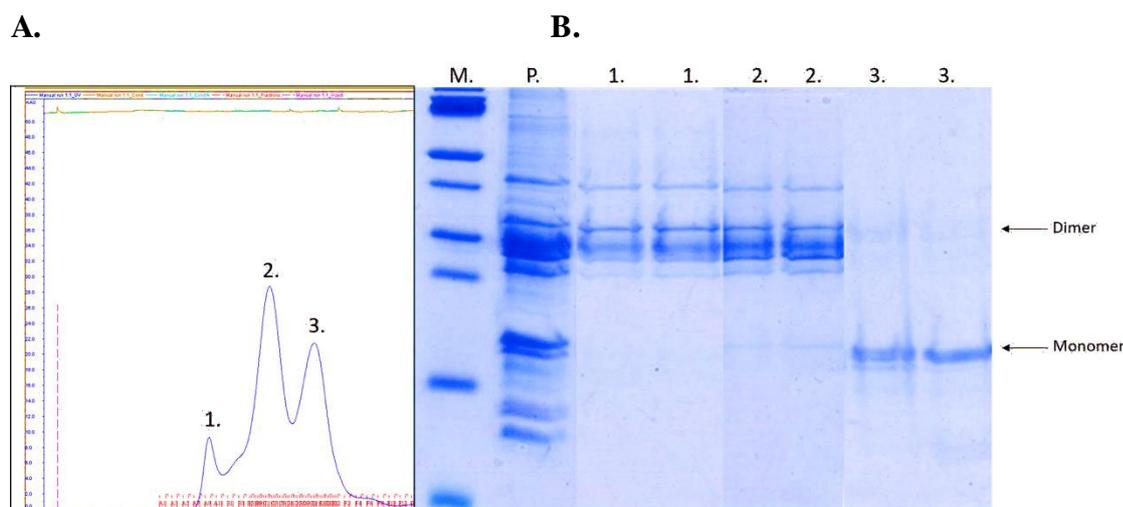


Abb. 14: Gelpermeationschromatographie und SDS-Tricin-PAGE-15% von BMP-2-2Hep-7M.

A: Elutionsprofil der Gelpermeationschromatographie (HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR-Säule, GE Healthcare) von ca. 1.7 mg BMP-2-2Hep-7M in 50 mM Tris (pH 8.8), 0.5 M NaCl, 0.5 M L-Arginin. Zu erkennen sind drei signifikante UV-Absorptionsmaxima, die vorwiegend BMP-2-2Hep-7M als dimere und monomere Form enthalten (vgl. Abbildung rechts). B: SDS-Tricin-PAGE-15% (nicht reduzierend, Färbung Coomassie blau) nach Gelpermeationschromatographie. Spuren: M: Marker (PageRuler™, #26616, Thermo Fisher Scientific), P: Proteinauftrag (Pool an ausgewählten Elutionsfraktionen nach Heparinsepharose), 1-3: Elutionsfraktionen des UV-Absorptionsmaximums 1-3. Die SDS-PAGE weist in dem ersten und zweiten Maximum überpräsentiert das BMP-2-2Hep-7M Dimer (~28 kDa) nach, das Monomer (~14 kDa) eluiert in Maximum 3. Zudem wurden eine geringe Menge an Verunreinigungen mit Fremdproteinen detektiert [modifiziert nach Masterarbeit/Heinks, 2019].

5 Biophysikalische Charakterisierung der BMP-2-Varianten

5.1 Massenspektrometrische Analyse von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M

Die in dieser Arbeit bereits charakterisierten BMP-2-Mutante (BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M) wurden nach der Präparation und Reinigung (s. Abschnitte 3.2.3.2 und 3.2.3.5) zunächst massenspektrometrischen Analysen unterzogen, um sie auf ihre Identität zu überprüfen. Zudem war es wichtig, die Gesamtmasse der Proteine zu ermitteln, wobei es zu überprüfen galt, ob ein Unterschied zwischen der theoretischen Molekülgröße aus der bereinigten ProtParam-Analyse (Korrektur der Massenänderung durch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken) und dem experimentell ermittelten Wert der aktiven dimeren BMP-2-Form besteht. Für den Nachweis der dimeren und monomeren BMP-2-Formen sowie einer Kontrolle (Wildtyp-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet, einerseits eine MALDI-TOF-MS-Analyse (Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight (Flugzeitanalyse) - mit in-source decay (Zerfall in der Quelle) (s. Abschnitt 3.2.4.2), bei der durch die Messung von Fragmenten Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz des getesteten Proteins gezogen werden können und andererseits erfolgte die Bestimmung der Gesamtmasse durch eine ESI-QTOF-MS-Analyse (s. Abschnitt 3.2.4.3).

Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-in source decay (MALDI-MS)

Diese Methode stellt eine Variante der top-down-Proteinanalytik dar, bei der es ausgehend vom intakten Protein bereits in der MALDI-Ionenquelle zu einer Fragmentierung des Proteins kommt. Dabei können sowohl N- als auch C-terminale Sequenzen von Aminosäuren in einem Massenspektrum bestimmt werden. Bei der Proteinsequenzierung erfolgt die Bezeichnung der N-terminalen Fragmente mit a, b und c, wohingegen die C-terminalen Fragmente mit x, y und z benannt werden (s. Abb. 15 A) [Roepstorff & Fohlman, 1984]. Aus den Abständen der ermittelten Ionen kann eine Sequenz abgelesen und mit der Zielsequenz verglichen werden (s. Abb. 15 B).

Elektrospray-Ionisation-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie

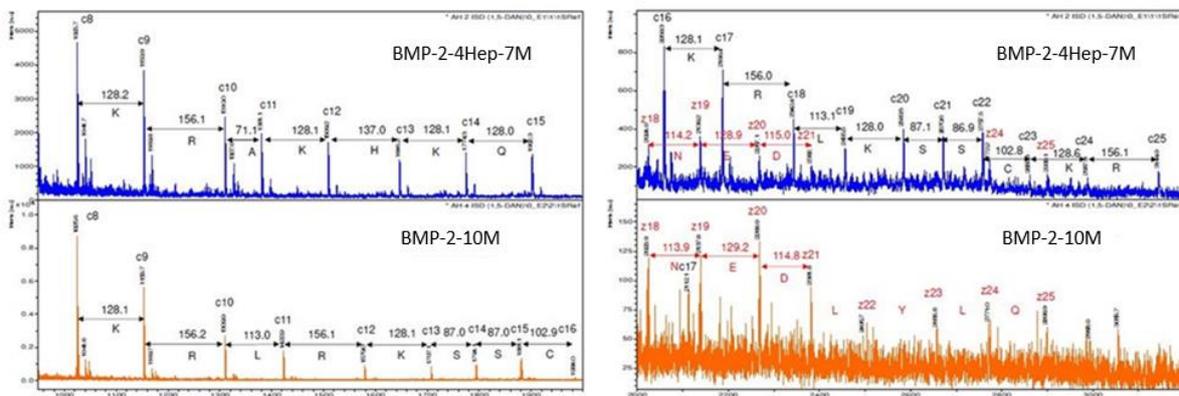
Bei der Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-QTOF-MS) handelt es sich um ein sehr schonendes Ionisierungsverfahren, bei dem es möglich ist Molekülmassen von Ionen im Hochvakuum zu bestimmen. Zusätzlich erfolgt hierbei eine Kopplung des Systems an ein QTOF-MS-System. Die Methode erlaubt es die molekulare Größe eines Analyten zu ermitteln, indem Ionen während der Analyse aus der Flüssig- in die Gasphase überführt werden können. Dabei ist die Voraussetzung, dass der Analyt eine gute Löslichkeit in einem entsprechenden Lösemittel besitzt. Im Zuge dieser Ionisierungsmethode erfolgt letztendlich die Bestimmung

des gesamten Molekulargewichts aus sog. „Quasimolekularionen“, wie $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oder auch $[M+K]^+$.

5.1.1 MALDI-MSD-Analyse

Durch die Analyse von sequenzspezifischen Fragmenten durch eine MALDI-TOF-MSD-Analyse (Dr. Christoph Weise, FUB) im Massenbereich von 800-4.000 Da mit 1.5 Diaminonaphthalen als Matrixsubstanz gelang die Identifikation der BMP-2-Mutante: BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M. So wurde für die N-terminale c-Ionen-Serie aus den annotierten Fragmenten der Variante BMP-2-10M die Sequenz KRLRKSSC (c8-c16) ermittelt. Für BMP-2-2Hep-7M dagegen wurde aus den erzeugten Ionen die Sequenz KRAKHKQRKRLKSSCKR (c8-c25) bestimmt. Damit geht aus dieser Analyse klar hervor, dass die untersuchten Proben beider Varianten Veränderungen einzelner Aminosäuren (fett markiert) enthalten, die im Zuge der in dieser Arbeit entwickelten Klonierungsstrategie mit dem Ziel der Verbesserung der Löslichkeit des Wachstumsfaktors in die BMP-2 codierende Sequenz eingebacht wurden (s. Auflistung der veränderten Aminosäuren in Tab. 17 und Tab. 18). Dieses Ergebnis wird zudem durch den Nachweis der c-Terminalen z+2-Ionen mit der Sequenz NEDLYLQ (z18-z25), für BMP-2-10M untermauert.

A.



B.

BMP-2-10M				BMP-2-2Hep-7M					
N-terminal		c-ions	C-terminal	z+2-ions	N-terminal		c-ions	C-terminal	z+2-ions
	c					c		S 26	2985.4207
149.0743	1	M	Q 25	2898.3886	149.0743	1	M	Q 25	2898.3886
277.1329	2	Q	L 24	2770.3301	277.1329	2	Q	L 24	2770.3301
348.1700	3	A	Y 23	2657.2460	348.1700	3	A	Y 23	2657.2460
476.2650	4	K	L 22	2494.1827	476.2650	4	K	L 22	2494.1827
613.3239	5	H	D 21	2381.0986	613.3239	5	H	D 21	2381.0986
741.4188	6	K	E 20	2266.0717	741.4188	6	K	E 20	2266.0717
869.4774	7	Q	N 19	2137.0291	869.4774	7	Q	N 19	2137.0291
1025.5785	8	R	E 18	2022.9861	1025.5785	8	R	E 18	2022.9861
1153.6735	9	K	K 17	1893.9435	1153.6735	9	K	K 17	1893.9435
1309.7746	10	R	V 16	1765.8486	1309.7746	10	R	V 16	1765.8486
1422.8587	11	L	V 15	1666.7802	1380.8117	11	A	V 15	1666.7802
1578.9598	12	R	L 14	1567.7117	1508.9067	12	K	L 14	1567.7117
1707.0547	13	K	K 13	1454.6277	1645.9656	13	H	K 13	1454.6277
1794.0868	14	S	N 12	1326.5327	1774.0606	14	K	N 12	1326.5327
1881.1188	15	S	Y 11	1212.4898	1902.1191	15	Q	Y 11	1212.4898
1984.1280	16	C	Q 10	1049.4265	2058.2202	16	R	Q 10	1049.4265
2112.2229	17	K	D 9	921.3679	2186.3152	17	K	D 9	921.3679
2268.3241	18	R	V 8	806.3409	2342.4163	18	R	V 8	806.3409
---	19	H	V 7	707.2725	2455.5004	19	L	V 7	707.2725
2502.4357	20	P	E 6	608.2041	2583.5953	20	K	E 6	608.2041
2615.5198	21	L	G 5	479.1615	2670.6274	21	S	G 5	479.1615
2778.5831	22	Y	C 4	422.1401	2757.6594	22	S	C 4	422.1401
2877.6515	23	V	G 3	319.1309	2860.6686	23	C	G 3	319.1309
2992.6785	24	D	C 2	262.1094	2988.7635	24	K	C 2	262.1094
3155.7418	25	Y	R 1	159.1002	3144.8647	25	R	R 1	159.1002

Abb. 15: MALDI-MS-Spektrum von Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M in einem Massenbereich von 800-4.000 Da

Aus der Fragmentierung der erzeugten Ionen kann die Sequenz der analysierten Peptide abgelesen werden. Für die N-terminale Serie aus den annotierten Fragmenten wurde die Sequenz **KRAKHKQRKRLKSSCKR** für BMP-2-2Hep-7M und die Sequenz **KRLRKSSC** für BMP-2-10M ermittelt (A). ISD-Spektrum der Muteine (BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M). (B) Theoretische ISD-Ionen zum Abgleich der untersuchten BMP-2-Varianten mit einer Zielsequenz. Es wurde 1.5 Diaminonaphthalen als Matrixsubstanz verwendet.

5.1.2 ESI-QTOF-MS-Analyse

Im Anschluss an den Nachweis sequenzspezifischer Fragmente, mit der die eingebrachten Mutationen in die Gensequenz der BMP-2-Varianten eindeutig identifizierbar waren, wurde im Zuge einer ESI-QTOF-MS-Analyse (s. Abschnitt 3.2.4.1) die Gesamtmasse von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M ermittelt (s. Tab. 21).

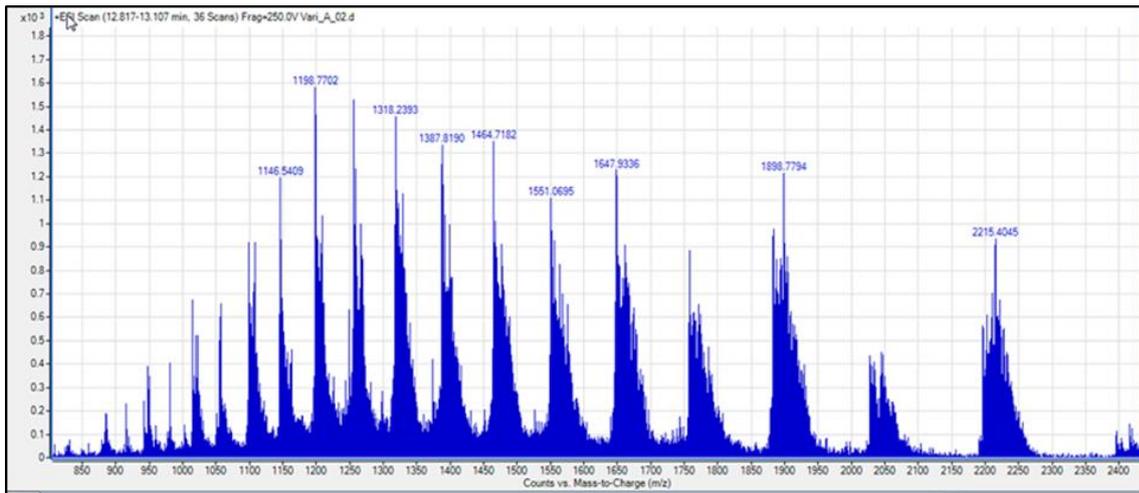
Tab. 21: ESI-Auswertung der gesamt Molekulargewichtsbestimmung für BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M und Wildtyp-BMP-2

Dargestellt ist die Übersicht einer ESI-QTOF-MS-Analyse, in der die Gesamtmasse (Da) des Wildtyp-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) und der BMP-2-Varianten BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M ermittelt wurde. Hierbei konnte das zu erwartende Molekulargewicht der Muteine durch eine ESI-Analyse bestätigt werden. Die Masse der detektierten Hauptspezies stimmt hierbei mit den theoretisch zu erwartenden Werten gut überein, nur das Monomer von BMP-2-10M kann so nicht detektiert werden.

Probe	BMP-2-10M	BMP-2-10M	BMP-2-2Hep-7M	BMP-2-2Hep-7M	Wildtyp-BMP-2 (Referenz)
	Dimer	Monomer	Dimer	Monomer	Dimer
Molekulargewicht (Da) BMP-2 (ProtParam-Analyse)	26.343.8	13.1809	27.925.8	13.971.9	25.933.8
Molekulare Abzüge durch Disulfidbrücken	-14	-6	-14	-6	-14
Massenaddition: 2 Ketten=eine Peptidbindung weniger	18		18		18
Massenaddition durch Protonierung im ESI	1	1	1	1	1
Erwartetes MW (Da)	26.348.8	13.175.9	27.930.8	13.966.9	25.938.8
ESI Ergebnis (Da)	26.348.3	13.282.5	27.928.0	13.965.9	25.937.8
Übereinstimmung	Sehr gut	Keine Übereinstimmung	Gut	Gut	Sehr gut

Wie die Zusammenfassung in der Tab. 21 zeigt, konnte die Gesamtmasse der dimeren Spezies von BMP-2-10M mittels Elektrospray-Ionisation (ESI-Analyse, s. Abschnitt 3.2.4.3) bestätigt werden. Über ESI-MS wurde ein Molekulargewicht (MW) von 26.348.3 Da ermittelt, was mit großer Genauigkeit dem zu erwartenden MW von 26.348.8 Da entspricht. Das korrespondierende Spektrum und die Bestimmung des analytischen Molekulargewichts sind in Abb. 16 dargestellt.

A.



B.

INPUT		RESULTS		
	Peaks from spectrum	charge (+)	MW [Da]	error [Da]
m/z (1):	1146.5	23	26346.3299973377	-1.9628990137316578
m/z (2):	1198.7	22	26349.2373887578	0.9444924063682265
m/z (3):	1255.8	21	26350.6447801779	2.351883826468111
m/z (4):	1318.2	20	26343.852171598	-4.4407247534327325
m/z (5):	1387.8	19	26349.0595630181	0.766666666700621
m/z (6):	1464.7	18	26346.4669544382	-1.8259419132300536
m/z (7):	1551.0	17	26349.8743458583	1.5814495068698307
m/z (8):	1647.9	16	26350.2817372784	1.988840926969715
m/z (9):	1757.4	15	26348.8891286985	0.5962323470703268

charge min. (+):	1	Deconvoluted MW [Da]:	26348.29289635143
charge max. (+):	100	Std. deviation [Da]:	2.256386429345693

Abb. 16: ESI-Massenspektrum von BMP-2-10M (Dimer) bei 12.8-13.5 min. (A). Berechnung der deconvoluierten Masse des BMP-2-Proteins (B)

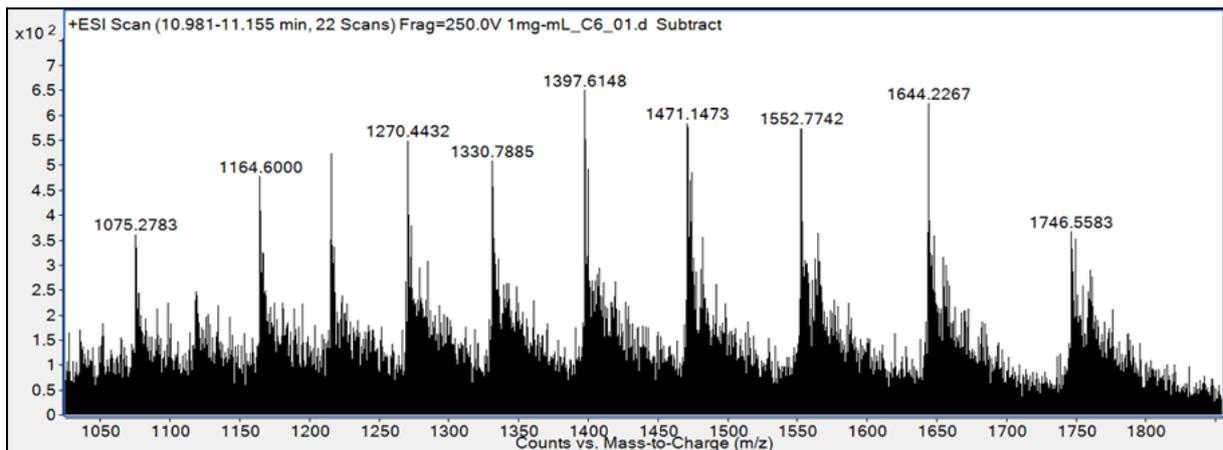
Dabei wurde die Massenberechnung für BMP-2-10M mit dem Programm ESI-Prot (www.bioprocess.org > esiprot_form) durchgeführt. Hierbei beruht die Ermittlung der Molekülmasse (kDa) aus der Konversion aufeinanderfolgender Serien von mehrfach geladenen Ionen eines Proteins, wie aus den Abb. 16 (A) und (B) ersichtlich ist.

Die ProtParam-Analyse schlägt für die dimerisierte Variante BMP-2-10M eine Molekülmasse von 26.343.8 Da vor. Jede Untereinheit von BMP-2 ist durch einen Cystinknoten, also drei Disulfidbrücken, stabilisiert. Die beiden Untereinheiten sind zudem durch eine weitere intermolekulare Disulfidbrücke verbunden, wodurch von der theoretisch angenommenen ProtParam-Masse 14 Da abzuziehen sind. Da ProtParam darüber hinaus von einer einzigen langen Peptidkette, also zwei Unterheiten, über Wasserabspaltung zu einem Mono-peptid

verbunden ausgeht, muss für das Molekulargewicht des nativen Dimers der Wert 18 (nicht erfolgte Wasserabspaltung) addiert werden. Schließlich registriert das ESI-Spektrum $[M+H]^+$ Ionen, was eine weitere Massenverschiebung um +1 bewirkt.

Das theoretische Molekulargewicht der Variante BMP-2-2Hep-7M beträgt laut ProtParam 27.925.8 Da. Nach Korrektur des Masseneffektes durch das Vorhersagetool (siehe oben) wird für die dimere Form 27.930.8 Da errechnet, was mit dem experimentell ermittelten Molekulargewicht von 27.928.0 Da ebenfalls gut übereinstimmt (s. Abb. 17 B).

A.



B.

INPUT		RESULTS		
	Peaks from spectrum	charge (+)	MW [Da]	error [Da]
m/z (1):	1164.7	24	27928.622605917604	-2.200869970347412
m/z (2):	1215.4	23	27931.0299973377	0.20652144974883413
m/z (3):	1270.4	22	27926.6373887578	-4.186087130150554
m/z (4):	1331.1	21	27931.9447801779	1.1213042899471475
m/z (5):	1397.6	20	27931.852171598	1.0286957100470318
m/z (6):	1471.1	19	27931.7595630181	0.936087130146916
m/z (7):	1552.7	18	27930.4669544382	-0.3565214497502893
m/z (8):	1644.2	17	27934.274345858303	3.45086997035105
m/z (9):	0	0	0	0

<input type="button" value="Clear m/z values"/>		<input type="button" value="Calculate MW"/>	
charge min. (+):	<input type="text" value="1"/>	Deconvoluted MW [Da]:	<input type="text" value="27930.82347588795"/>
charge max. (+):	<input type="text" value="100"/>	Std. deviation [Da]:	<input type="text" value="2.318780886061464"/>

Abb. 17: ESI-Massenspektrum von BMP-2-2Hep-7M (Dimer) bei 10.9 – 11.1 min (A). Berechnung der deconvoluierten Masse des BMP-2 Proteins (B)

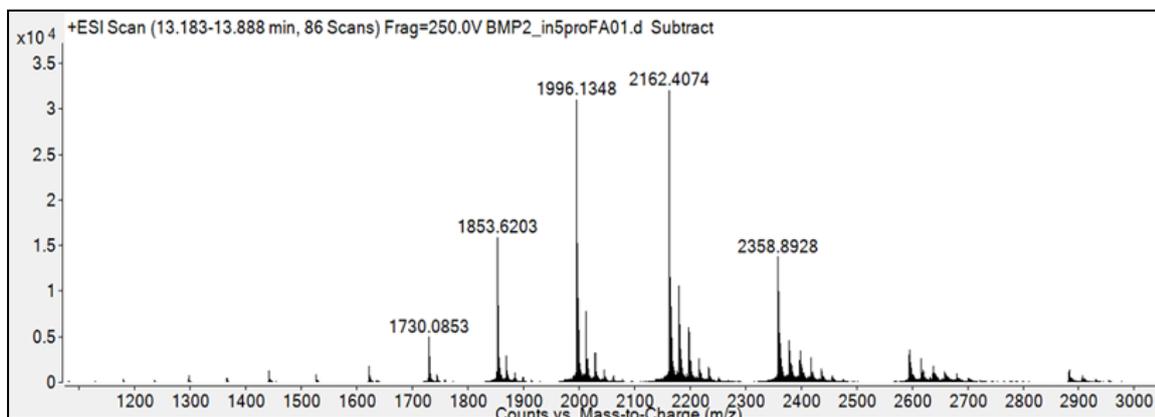
Auch für die monomere Form von Variante BMP-2-2Hep-7M korrelierte das über ESI-Analyse ermittelte Molekulargewicht 13.965.0 Da gut mit dem korrigierten ProtParam-Wert von 13.966.9 Da. Im Gegensatz dazu konnte für das Monomer der Variante BMP-2-10M keine

Übereinstimmung der Molekulargewichtsbestimmung mittels ESI-Analyse ermittelt werden (s. Tab. 21).

Wildtyp-BMP-2

Zur Verifizierung der Werte für die eigens hergestellten BMP-2-Mutante wurde im Zuge der durchgeführten ESI-Analyse als Kontrolle das bereits gut untersuchte Wildtyp-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) eingesetzt. Hierbei stimmte die theoretische Molekülmasse des Dimers von 25.938.8 Da sehr gut mit dem analytischen Wert von 25.937.8 Da überein, der sich aus der Dekonvolution des Massenspektrums ergibt (s. Abb. 18 B). Die entsprechenden Rohdaten der massenspektrometrischen ESI-Analyse für die Referenz (Wildtyp-BMP-2) können aus den Abb. 18 (A) und (B) entnommen werden.

A.



B.

INPUT		RESULTS		
	Peaks from spectrum	charge (+)	MW [Da]	error [Da]
m/z (1):	1730.0	15	25934.8891286985	-1.0747828402018058
m/z (2):	1853.6	14	25936.296520118598	0.3326085798944405
m/z (3):	1996.1	13	25936.203911538698	0.239999999999432475
m/z (4):	2162.4	12	25936.711302958804	0.7473914201000298
m/z (5):	2358.8	11	25935.718694378902	-0.24521715980154113
m/z (6):	0	0	0	0
m/z (7):	0	0	0	0
m/z (8):	0	0	0	0
m/z (9):	0	0	0	0

charge min. (+):
 Deconvoluted MW [Da]:

charge max. (+):
 Std. deviation [Da]:

Abb. 18: ESI-Massenspektrum des Wt-BMP-2 (Dimer) bei 13.1-13.8 min (A). Berechnung der dekonvoluierten Masse des BMP-2-Proteins (B).

Zusammenfassend kann an dieser Stelle gesagt werden, dass MALDI-MS und ESI-Analysen übereinstimmend die erfolgreiche Produktion und Aufreinigung der Varianten BMP-2-10M

und BMP-2-2Hep-7M in dimerer und damit potentiell aktiver BMP-2 Form eindeutig belegen. Nun gilt es, in einem weiteren Schritt die Aktivität dieser Wachstumsfaktoren in Zellkultur-Assays zu überprüfen (s. Abschnitte 3.2.5.2 und 3.2.5.3).

5.2 Sekundärstrukturanalyse

Zur Evaluierung der Sekundärstruktur der Variante BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M sowie des Wt-BMP-2 wurden CD-spektroskopische Experimente durchgeführt (AG. Nagel-Steger, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Dabei war es wichtig, nicht nur die Proteinfaltung, sondern auch die Stabilität dieser rekombinant hergestellten Proteine näher zu analysieren. Es wurde dafür der ferne UV-Bereich (typischerweise 180-240 nm, Amid-Region) untersucht. Zudem galt es für das Monitoring struktureller Veränderungen bedingt durch das Einbringen von Mutationen bzw. einem Aminosäureaustausch in den BMP-2-Varianten einen Temperaturwechsel, aber auch die Änderung des Resolubilisierungs-Puffers nach Gefriertrocknung und des pH-Wertes im Zuge der CD-Spektroskopie näher zu charakterisieren.

Cirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Cirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) dient der räumlichen Strukturanalyse von Proteinen. Dabei beruht das Prinzip dieser Messmethode auf der Absorption von links und rechts zirkulär polarisiertem Licht. Die CD-Spektroskopie kann sowohl im nahen (260 nm-320 nm, aromatische Aminosäuren) als auch im fernen UV-Bereich (180 nm-240 nm, sog. Amid-Region → Bestimmung der Peptidbindungen/Sekundärstrukturanalyse) durchgeführt werden [Kelly & Price, 2000]. Dabei ist es möglich, anteilig Sekundärstrukturelemente in Proteinen nachzuweisen. Eine α -Helix zeichnet sich durch ein lokales Maximum bei 192 nm sowie lokale Minima bei 209 nm und 222 nm aus. Für ein β -Faltblatt sind eine positive Bande bei 196 nm sowie eine negative Bande bei 218 nm charakteristisch. Freie Konformation bzw. eine *Random coil*-Struktur wird anhand eines lokalen Maximums bei 212 nm und eines lokalen Minimums bei 195 nm detektiert [Manavalan & Johnson Jr., 1987, Kelly, 2005]. Abbildung 19 zeigt einen typischen Verlauf von CD-Spektren mit den charakteristischen Strukturelementen am Beispiel von Poly-L-Lysin.

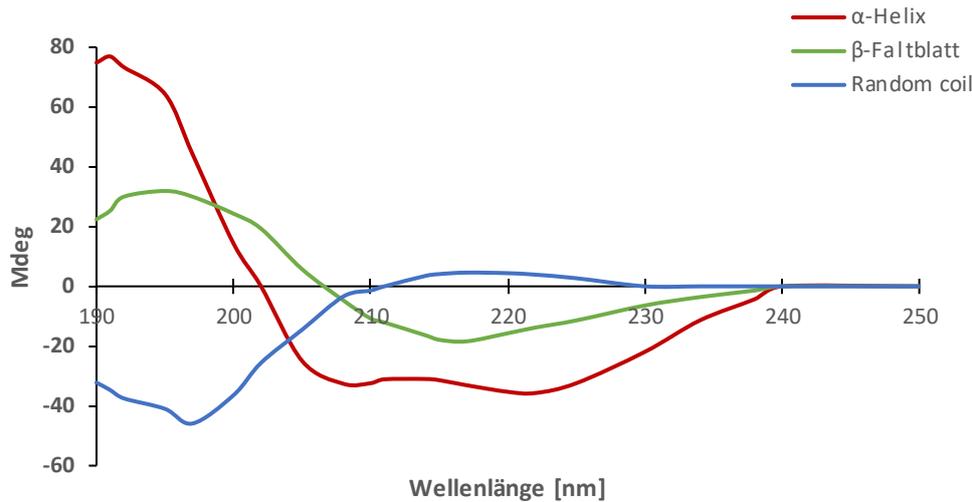


Abb. 19: Darstellung der verschiedenen Strukturelemente in CD-Spektren am Beispiel von Poly-L-Lysin (nach Greenfield & Fasman, 1969)

5.2.1 Circulardichroismus-Spektroskopie von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2

Die CD-spektroskopische Analyse wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Sekundärstruktur der rekombinant hergestellten BMP-2-Mutene näher zu untersuchen. Da die Rekonstitution der zu untersuchenden Proben in einem optimalen Puffer bei einem bestimmten pH-Wert oder auch einer bestimmten Temperatur entscheidende Aspekte für die Durchführung von erfolgreichen Sekundärstrukturanalysen sind [Kelly et al., 2005], wurden je nach BMP-2-Variante unterschiedliche Messbedingungen gewählt. Dafür wurden zunächst die aufgereinigten und gefriergetrockneten Proben des Wachstumsfaktors entweder in 1 mM HCl oder 20 mM Phosphat-Puffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 7.4 gelöst, um eine Arbeitskonzentration von 10-12 μM zu erhalten. Anschließend wurden CD-Spektren in einem Temperaturbereich von 10, 20 und 37 °C (BMP-2-Varianten und Wildtyp-BMP-2), sowie einem Temperaturgradienten 10-96 °C (BMP-2-2Hep-7M, Wildtyp-BMP-2) aufgenommen. Es wurden jeweils BMP-Dimer-Proben von Wildtyp und Muteninen untersucht, da diese die aktive Form des Wachstumsfaktors darstellen.

Ergänzend ist zu erwähnen, dass die Anwendung eines chloridhaltigen-Puffers für Messungen im fernen UV-Bereich (üblicherweise hohe Kochsalzkonzentrationen von 100-500 mM, oder Cl-Konzentration von ~140 mM, die aus der Titration des pH-Wertes im Tris-Puffer stammen) in der CD-Spektroskopie grundsätzlich als sehr kritisch anzusehen ist, da Chloridionen die CD-Spektroskopie empfindlich stören können. Sie absorbieren im niedrigeren UV-Bereich, wodurch das Spektrum unterhalb 200 nm sehr rauschend wirken können [Kelly et al., 2005]. In diesem Fall jedoch wurde nur eine HCl-Konzentration von 1 mM verwendet, was für die Aufnahme von CD-Spektren noch unproblematisch anzusehen ist.

Beim Betrachten der dargestellten CD-Spektren der BMP-2-Varianten (20 °C, 1 mM HCl, s. Abb. 20) fällt auf, dass Variante BMP-2-10M in einer ungeordneten Konformation mit einem Minimum bei ~195 nm und einem Plateau bei Null angenähert von 220-240 nm vorliegt.

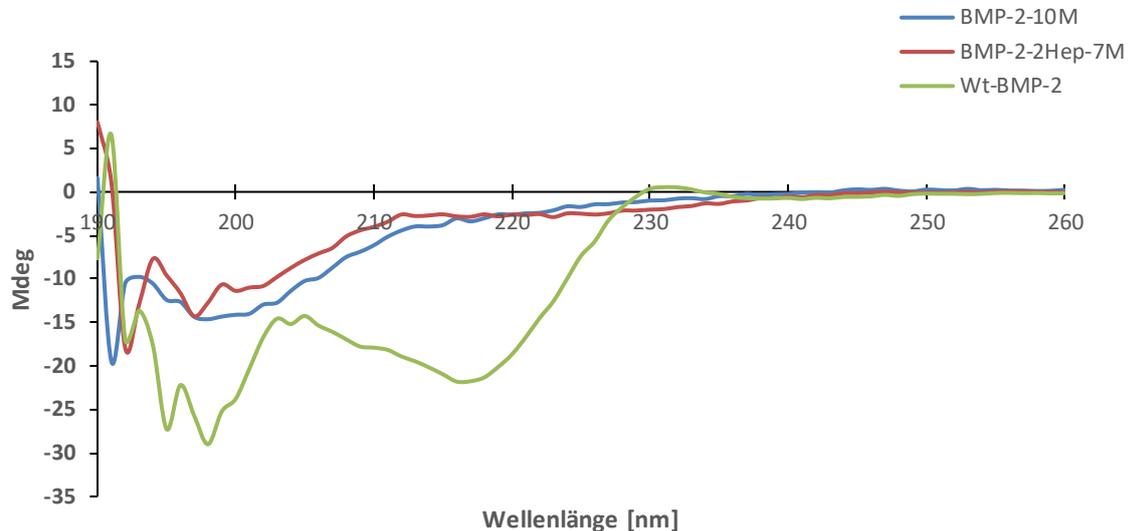


Abb. 20: Vergleichende CD-Spektren von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M zum Wt-BMP-2

Die Messung erfolgte mit dem Jasco J-815 CD-Spektrometer bei einer Temperatur von 20 °C im fernen UV-Bereich (hier 190 nm-260 nm). Die verwendeten Proben wurden zuvor in 1 mM HCl gelöst, um eine Arbeitskonzentration von 12 µM zu erreichen. Die CD-Spektren wurden aus zehn Messungen gemittelt.

Die Variante BMP-2-2Hep-7M zeigt im Vergleich dazu bei 190 nm ein positives Signal und ein angedeutetes Minimum bei 225 nm. Die Aufnahme der CD-Spektren des Wildtyp-BMP-2 (Referenz), die auch in Abb. 20 veranschaulicht wurden, weisen einen deutlich abweichenden Kurvenverlauf im Vergleich zu den gemessenen BMP-2-Varianten auf. Der BMP-2-Wildtyp (gelöst in 1 mM HCl) besitzt im CD-Spektrum Minima bei ca. 196/198/200 nm und 218 nm. Das breite Minimum zwischen 220-208 nm resultiert aus der Überlappung des β -Faltblatt-Anteils und der α -Helix, das hintere Minimum dagegen geht aus dem *Random coil*-Anteil hervor. Ergänzend kann das Minimum bei der Wellenlänge von 218 nm als ein deutlicher Hinweis für ausgeprägte Sekundärstrukturelemente gewertet werden.

Da die meisten Proteine aber nur selten in einer Konformation vorliegen und gerade im Fall der neuen Protein-Variante die korrekt gefaltete/verknüpfte Dimerstruktur ambitioniert ist, zeigen die gemessenen CD-Spektren eine Zusammenfassung des Konformationsensembles. Um im Nachhinein den relativen Sekundärstrukturanteil der untersuchten Proteine zu ermitteln, wurden im Anschluss an die CD-Spektroskopie alle gemessenen Spektren dekonvolutiert. Anhand einer Datenanalyse unter Zuhilfenahme des DichroWeb-Programms (CDSSTR-Auswertealgorithmus, Datensatz Set 7 [Sreerama & Woody, 2000]) konnten die jeweiligen prozentuellen Anteile an α -Helix, β -Faltblatt, β -Turn und *Random coil* der untersuchten

Proteine ermittelt werden. Die entsprechenden Ergebnisse bei 20 °C werden in der Tab. 22 und Abb. 21 dargestellt. Eine vollständige Zusammenfassung weiterer Messergebnisse inkl. der Spektren bei 10 °C und 37 °C sind dem Anhang zu entnehmen.

Tab. 22: Sedundärstrukturanteil [%] von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M im Vergleich zum Wt-BMP-2

Die Sekundärstrukturanalyse wurde bei 20 °C, 1 mM HCl mit dem Jasco J-815 CD-Spektrometer durchgeführt. Die Auswertung der CD-Daten erfolgte mit dem DichroWeb-Programm (CDSSTR-Auswertealgorithmus, Datensatz Set 7 [Sreerama & Woody, 2000]).

Sedundärstrukturanteil [%]								
	Helix 1	Helix 2	Strand 1	Strand 2	Turn	Unfold.	Σ	Rmsd
BMP-2-10M	0.03	0.02	0.43	0.21	0.23	0.05	0.96	0.015
BMP-2-2Hep-7M	0.03	0.02	0.25	0.18	0.26	0.27	0,7	0.013
Wt-BMP-2	0.00	0.00	0.33	0.16	0.25	0.24	0.98	0.022

20 °C, Lösungsmittel: 1 mM HCl, CDSSTR-Auswertealgorithmus: Set 7 Datensatz

Nach der Dekonvolierung der CD-Spektren lassen sich in beiden Varianten (BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M) alle wesentlichen Sekundärstrukturelemente des Wachstumsfaktors rhBMP-2 identifizieren (s. Abb. 21) [Scheufler et al., 1999]. Vor allem die Anteile β -Strang 1 und 2, der Anteil für Turn, sowie der unstrukturierte Anteil liegen in ähnlicher Größenordnung vor. Beim Vergleich der Ergebnisse mit der verwendeten Referenz (Wildtyp-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) ist deutlich erkennbar, dass die größten, detektierbaren Unterschiede im prozentuellen Anteil für Helix 1 und Helix 2 existieren. Dabei wurde für die Varianten ein sehr geringer bzw. kein Anteil an α -Helix 1- und 2-Struktur berechnet, sowie keine prozentuelle Menge an Helices für den Wildtyp-BMP-2. Diese Ergebnisse sind hingegen gegensätzlich zu den Daten aus der *PSIPRED*-Modellierung (α -Helix am N-terminus).

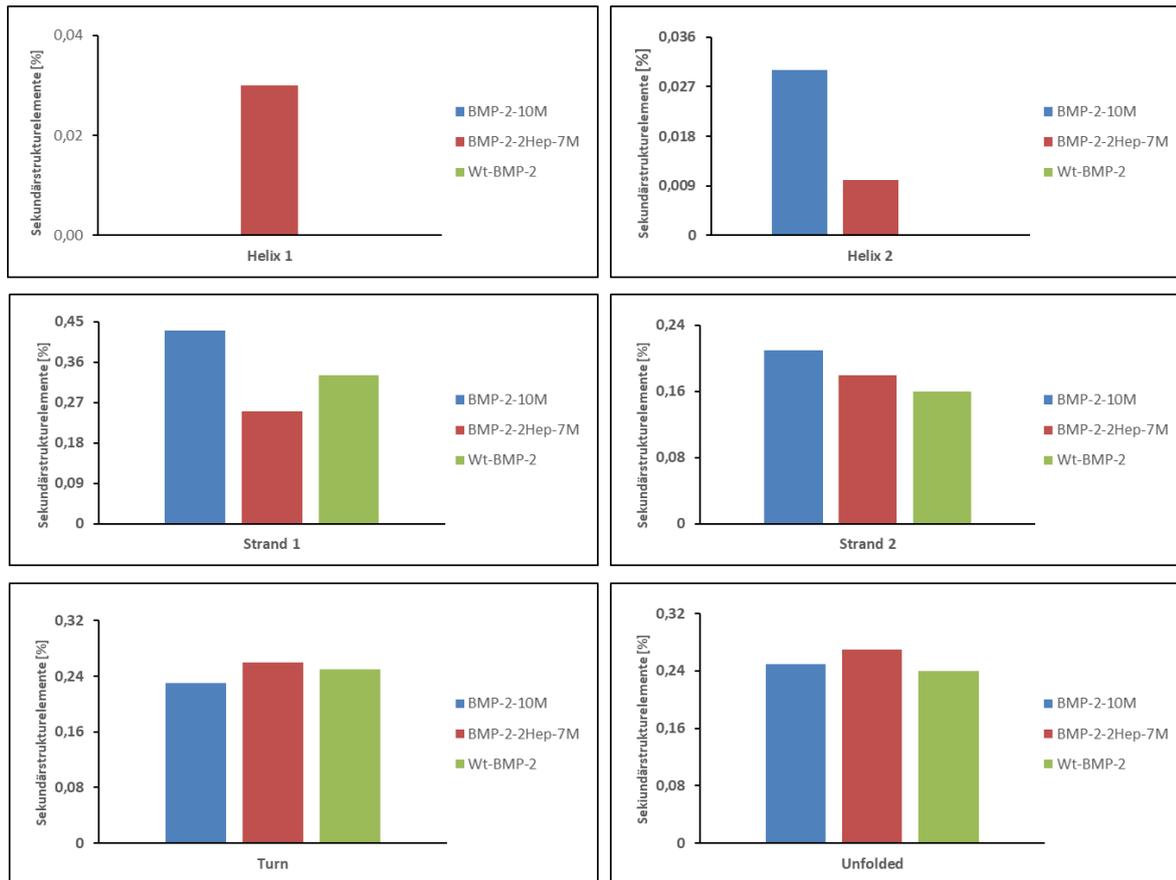


Abb. 21: Graphische Darstellung der Sekundärstrukturanalyse [%] von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M im Vergleich zum Wt-BMP-2

Die Sekundärstrukturanalyse wurde bei 20 °C, 1 mM HCl mit dem Jasco J-815 CD-Spektrometer durchgeführt. Die Dekonvolution der Daten nach der CD-Spektroskopie erfolgte mit DichroWeb-Programm (CDSSTR-Auswertalgorithmus, DatensatzSet 7 [Sreerama & Woody, 2000]).

Als Fazit der durchgeführten CD-spektroskopischen Analyse, ergänzt durch die Datenaufarbeitung mittels DichroWeb Dekonvolierung (CDSSTR Datensatz Set 7 [Sreerama & Woody, 2000]), kann an dieser Stelle zusammengefasst werden, dass bei BMP-2-Varianten (gelöst in 1mM HCl, 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4) das Vorhandensein von gefalteten Sekundärstrukturelementen, aber auch von *Random coil* detektiert werden konnte. Eine mögliche Ursache dafür kann durch eine kurze Inkubationszeit nach der Resolubilisierung (20 min), sowie einen sauren pH-Wert von ~3, indem die Proben vorgelöst wurden, begründet werden. Nichtsdestotrotz ähneln die detektierten Strukturelemente denen des Wildtyp-BMP-2, weshalb von einer zumindest anteiligen physiologischen Aktivität der BMP-2-Varianten ausgegangen wird. Da die Berechnung der Sekundärstrukturanteile von Proteinen und Peptiden stark von der verwendeten Methode und Analysesets abhängig ist, kann an dieser Stelle keine 100%ig quantitative Auswertung der CD-Spektren stattfinden, sowie auch keine exakte Quantifizierung der Anteile an Sekundärstrukturelementen vorgenommen werden und somit die

softwarebasierte Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen eher als kritisch angesehen werden. In Summe sind diese Daten lediglich ein erstes Indiz für das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen, die durch weitere Analytik, beispielsweise eine NMR oder eine Röntgenstrukturanalyse, zu verifizieren sind.

In weiteren Experimenten war es zudem möglich zu beweisen, dass eine längere Inkubationszeit und ein Pufferwechsel eine signifikante Auswirkung auf den Anteil einzelner Sekundärstrukturmerkmale haben. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer längeren Inkubation der zu messenden Proben bei 4 °C für 24 h der prozentuelle Anteil an Helix 1 (0.01 % auf 0.41 %) und Helix 2 von (0.01 % auf 0.12 %) bei 10 °C deutlich ansteigt (s. Abb. 22, Auswertung mit Datenset 7, CDSSTR-Auswertalgorithmus [Sreerama, & Woody, 2000]). Dies wird als ein Indiz dafür gewertet, dass sich die Proteinklösung nach der Resolubilisierung in 20 mM Phosphat-Puffer noch nicht im Gleichgewicht befunden hat. Für die richtige Eingliederung der Ergebnisse aus der CD-Spektroskopie zur Abschätzung des Sekundärstrukturanteils an α -Helix kann das Ergebnis aus der *PSIPRED*-Modellierung herangezogen werden, die im Vorfeld dieser Doktorarbeit durchgeführt wurde. Die Vorhersage der Sekundärstruktur mittels *PSIPRED* ergab für BMP-2-2Hep-7M eine zusätzliche α -Helix am N-Terminus, was mit dem Ergebnis der CD-Analyse (Inkubation der Proben 24 h) vergleichbar ist.

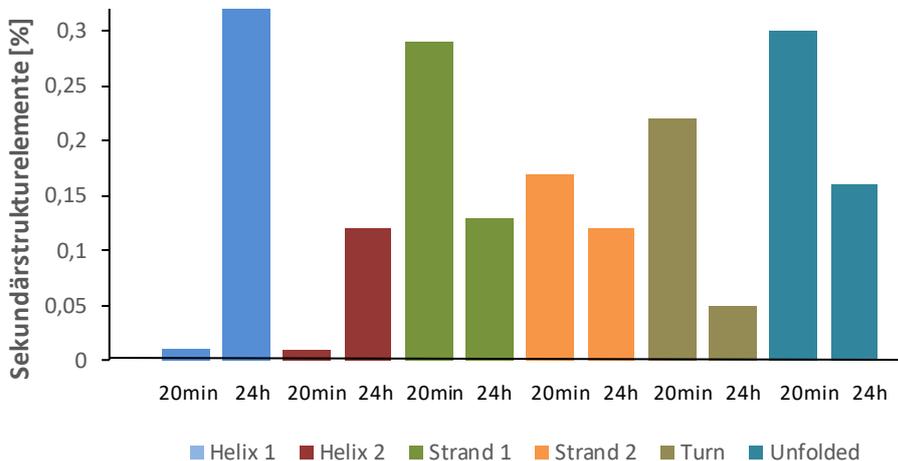


Abb. 22: Prozentueller Anteil an Sekundärstrukturelementen des Muteins BMP-2-2Hep-7M nach 20 min und 24 h

Die untersuchte Probe wurde zuvor in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 gelöst und bei 10 °C mit dem Jasco J-815 CD-Spektrometer zu den angegebenen Zeiten vermessen. Die Dekonvolution der Daten nach der CD-Spektroskopie erfolgte mit DichroWeb-Programm (CDSSTR-Auswertalgorithmus, Datensatz Set 7 [Sreeraman & Woody, 2000]).

Es ist deutlich sichtbar, dass eine Solubilisierung und eine Konformationsumwandlung durchaus mehrere Stunden benötigt. Interessant ist an dieser Stelle auch die Tatsache, dass auch der Anteil an ungeordneten Strukturen bei längerer Inkubationszeit in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 signifikant sinkt (von 0.3 % auf 0.16 %) (Variante BMP-2-2Hep-7M). Eine weitere systematische Analyse optimaler Versuchsbedingungen war ergänzend bedingt durch den Einsatz einer hausfremden Analysemethode (AG. Nagel-Steger, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) nicht möglich. Dadurch kann der Anteil an gefalteten und nicht nativen Strukturanteilen auf Grund der vorliegenden Datenlage nicht genauer angegeben werden.

Neben der Bestimmung der Sekundärstrukturelemente kann mittels CD-Spektroskopie auch die thermische Faltungstabilität von Proteinen ermittelt werden. Um diese Konformationsstabilität für das Wildtypprotein BMP-2 erstmalig genau zu charakterisieren, wurde eine 10 μ M Lösung von BMP-2 in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 5.0 hergestellt und danach im Langzeitexperiment (Temperaturbereich 10-96 °C) untersucht. Im Anschluss wurden alle erhaltenen CD-Signale gegen die Temperatur geplottet. Dabei lässt sich eine temperaturabhängige Entfaltung von Wt-BMP-2 bei $T > 60$ °C erkennen (s. Abb. 23).

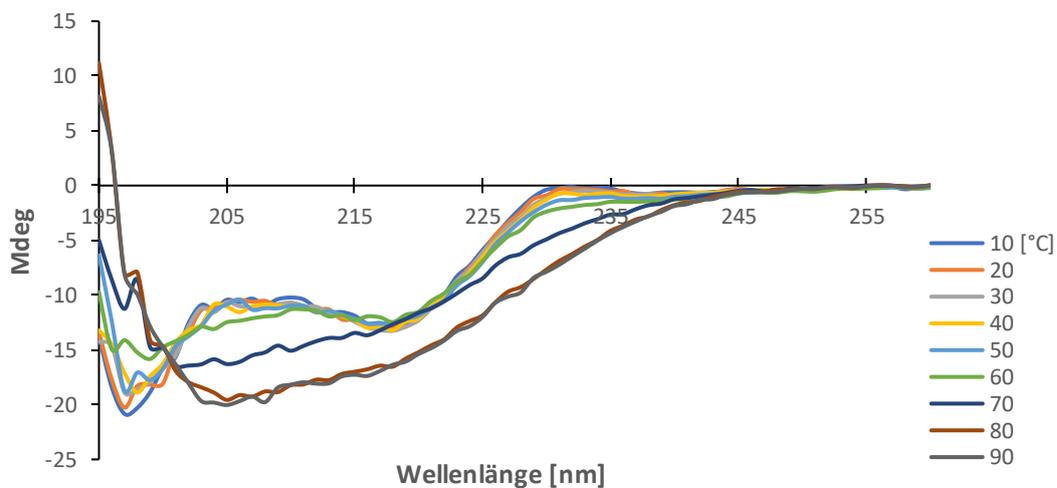


Abb. 23: Temperaturabhängige Kinetik der Proteinfaltung/-entfaltung von Wt-BMP-2

Das verwendete Protein (Konzentration 10 μ M) wurde zuvor in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 5.0 gelöst und mit Jasco J-815 CD- Spektrometer vermessen im Temperaturbereich von 10-90 °C. Eine Entfaltung des Wt-BMP-2 findet bei einer Temperatur > 60 °C statt.

5.3 Quantifizierung der Molekulargewichtsverteilung von Wildtyp-BMP-2 mittels dynamischer Lichtstreuung und mikrofluidischer Diffusionstechnologie

Der Wachstumsfaktor BMP-2 ist ein hoch aggregationsempfindliches Protein, was seine Aufreinigung nach heterologer Proteinexpression enorm erschwert. Derzeit wird BMP-2 nach Expression in CHO-Zellen als Medizinprodukt InductOs® eingesetzt, da es durch seine Osteogenese induzierenden Eigenschaften bei pathologischen Knochenfrakturen die Heilungsdauer deutlich verkürzen kann [10-12 Wochen, Gautschi et al., 2007]. Das Darstellungssystem erlaubt jedoch nur geringe Ausbeuten bei hohem experimentellem Aufwand. Prokaryontische Expressionssysteme liefern zwar hohe Proteinmengen, allerdings wird das medizinisch relevante Protein bislang nur in Form von *inclusion bodies* gewonnen [Vallejo & Rinas, 2004, Hillger et al., 2005, Long et al., 2006, Zhang et al., 2011], was noch einmal die hohe Aggregationstendenz von BMP-2 belegt.

Um den Wachstumsfaktor auch unter dem Aspekt der Aggregationsneigung vollumfänglich zu verstehen, wurde seine Partikelverteilung in dieser Arbeit erstmalig sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht. Für niedrige Konzentrationsbereiche wurde komplementär die mikrofluidische Diffusionstechnologie eingesetzt.

Dynamische Lichtstreuung-Analyse

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) beruht auf der Streuung von Licht (Laserstrahlen) an Partikel-Streuzentren, die zu Interferenzen zwischen den Lichtwellen führen kann. Bei verschiedenen, streuenden Partikeln ändern sich durch die Diffusion der Teilchen die Orientierung und der Abstand der Streuzentren mit der Zeit. Das Licht weist dann Intensitätsfluktuationen auf, da die Moleküle in ständiger Bewegung sind. Unterschiedlich große Moleküle in einer Lösung erzeugen also unterschiedlich starke Fluktuationen der Lichtintensität $I(t)$, die sich überlagern. Diese können durch mathematische Methoden (Autokorrelationsanalyse oder schnelle Fourier-Transformation) separiert und analysiert werden, so dass Rückschlüsse auf die Diffusionskoeffizienten der Teilchen, ihre Partikelgröße, die eingenommene Struktur, sowie ihren Oligomierzustand möglich sind. Bei der Methode ist explizit zu berücksichtigen, dass die Größe der Teilchen die Detektion beeinflusst und größere Teilchen werden überdimensional stark registriert. Ein großer Vorteil ist jedoch die Wiederverwendbarkeit der Probe nach der Messung. Die Größenverteilung von einer nach Gefriertrocknung in 1 mM HCl resolubilisierter Probe wurde in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration untersucht.

Mikrofluidische Diffusionstechnologie

Die Größenbestimmung anhand mikrofluidischer Diffusion (*Microfluidic Diffusional Sizing*, MDS) beruht auf der Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen in mikrofluidischer, laminarer Strömung. Die Methode erlaubt es, Molekulargewichte und hydrodynamische Radien von Biomolekülen zu bestimmen und zeichnet sich dabei durch einen extrem geringen Substanzbedarf (ng) aus. Darüber hinaus ist die MDS-Analytik im Gegensatz zur Lichtstreuung auch für sehr verdünnte Lösungen ($> \mu\text{M}$) anwendbar. Mit Hilfe der mikrofluidischen Diffusion lassen sich somit auch die Proteinfaltung und die Proteinaggregation visualisieren. Ein großer Nachteil ist allerdings, dass die Probe durch die Messung verbraucht wird, was in der aminbasierten Fluoreszenzdetektion des Messprinzips begründet ist.

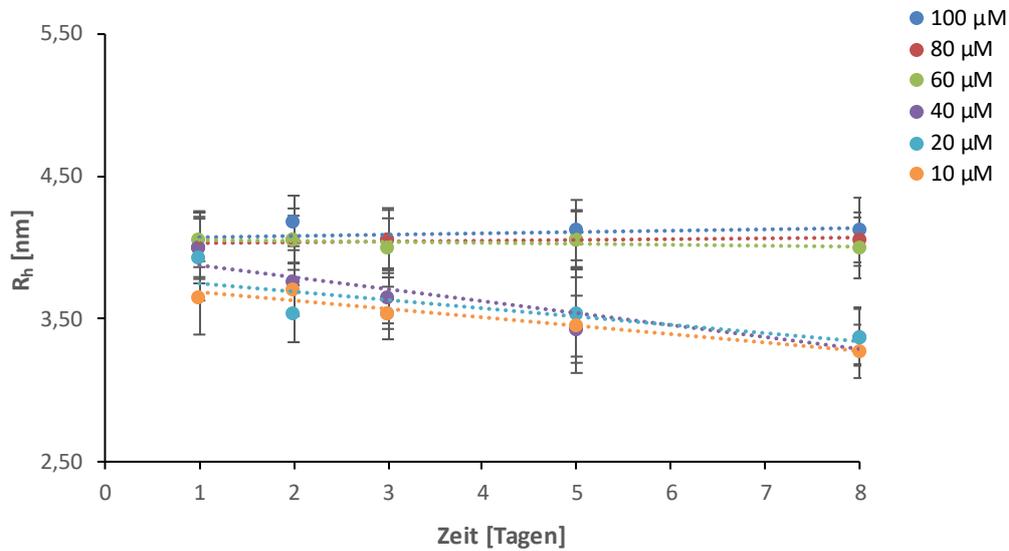
5.3.1 Dynamische Lichtstreuung vs. mikrofluidische Diffusionstechnologie am Beispiel vom Wildtyp-BMP-2

Lyophilisiertes Wildtyp-BMP-2-Protein (Referenz, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) wurde in 1 mM HCl resolubilisiert und im Konzentrationsbereich 10-100 μM mit Hilfe eines Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) in 6x-facher Wiederholung vermessen (s. Abschnitt 3.2.4.4). Die Messreihen wurden nach den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5 und 8 Tagen wiederholt, um den Einfluss der Zeit auf die Solubilisierungs- bzw. Aggregationstendenz von BMP-2 zu erfassen.

Höhere Konzentrationen fördern die Aggregation des Proteins (s. Abb. 24). Im Konzentrationsbereich von 60-100 μM bleibt der hydrodynamische Radius (R_h) unabhängig von der Lagerungszeit im Bereich von $4 \text{ nm} \pm 0.213$ und liegt damit klar über dem *Radius of Gyration* (R_g), für den durch X-Ray-Analyse ein Wert von 2.08 bestimmt wurde. Messdaten aus DLS-Analysen von Partikeln mit sehr ähnlicher Größenordnung sind im Sinne einer Gaussverteilung zu interpretieren. Aus dem errechneten hydrodynamischen Radius, kann also eine Mittelwertaussage über die dort gleichzeitig existierenden oligomeren Formen von BMP-2 getroffen werden. Es ist von daher anzunehmen, dass BMP-2 in diesen Konzentrationen nicht nur als Dimer, sondern auch als lösliches Oligomer vorliegt.

Wird das Protein jedoch weiter verdünnt (Konzentrationsbereich 10-40 μM), so sinkt R_h in Abhängigkeit von Verdünnung und Lagerungszeit und nähert sich R_g . Im physiologisch wirksamen nanomolaren Bereich kann deshalb die Assoziationsform Dimer als gesichert gelten.

A.



B.

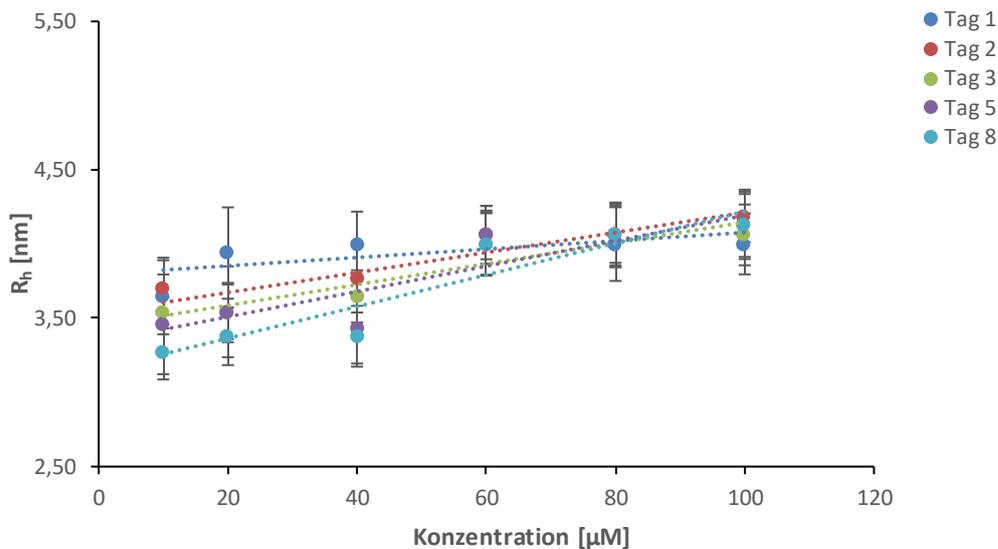


Abb. 24: Dynamische Lichtstreuung-Analyse von Wt-BMP-2 in einem Konzentrationsbereich 10-100 μM
 A: Dargestellt ist der hydrodynamische Radius (R_h) des Wildyp-BMP-2 (~26 kDa, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg, in 1 ml HCl) über einen Zeitraum von acht Tagen (1, 2, 3, 5, 8 Tag). Dabei stagniert der R_h in einem Konzentrationsbereich von 60-100 μM über den gesamten Beobachtungszeitraum. Bei niedrigeren Konzentrationen (40-10 μM) sinkt dagegen der hydrodynamische Radius in dem genannten Zeitraum. B: Hydrodynamischer Radius von Wt-BMP-2 in Abhängigkeit von der Konzentration (10-100 μM). Es tritt keine Änderung des R_h bei hohen Konzentrationen auf. Im Vergleich dazu sinkt der hydrodynamische Radius bei niedrigen Konzentrationen, die physiologisch relevant sind. Die DLS-Messungen wurden am Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical) durchgeführt.

Mit Hilfe der mikrofluidischen Diffusionstechnologie wurde der hydrodynamische Radius von Wt-BMP-2 in einer Konzentration von 500 nM zugänglich und konnte bis zur Konzentration von 10 μ M verfolgt werden. Dafür wurde der Wildtyp jeweils dreimal im Fluidity One (Fluidic Analytics, Cambridge/UK) vermessen (s. Abb. 25).

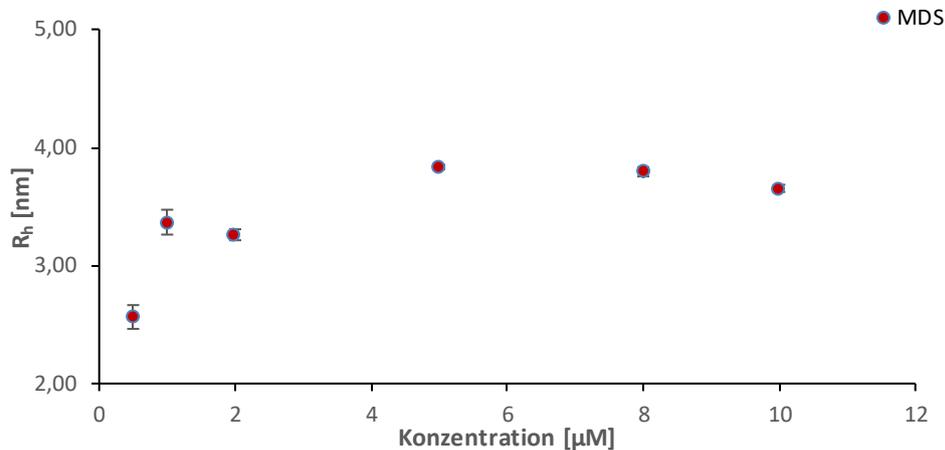


Abb. 25: Analyse mikrofluidischer Diffusion von Wildtyp-BMP-2 in einem Konzentrationsbereich 0.5-10 μ M

Dargestellt ist der hydrodynamische Radius (R_h) des Wildtyp-BMP-2 (~26 kDa, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg, in 1 ml HCl) im Konzentrationsbereich von 0.5-10 μ M. R_h sinkt vor allem bei niedrigen Konzentrationen, die physiologisch relevant sind. Die Messungen wurden am Fluidity One (Fluidic Analytics) durchgeführt.

Je niedriger die Konzentration der Lösung, umso mehr kann der wirkliche hydrodynamische Radius des BMP-2-Dimers erfasst werden. Bei 500 nM konnte ein R_h von 2.56 ± 0.101 nm ermittelt werden. Auffallend bei der MDS-Analytik sind zudem die extrem kleinen Fehlerbalken, was für die Signifikanz der Messungen spricht.

Der Messpunkt bei 10 μ M wurde sowohl über DLS-Analytik als auch über MDS bestimmt. Die Messmethoden zeigen fast exakt gleiche Werte für R_h (~ 3.65 nm) und sind somit optimal kompatibel.

Die Kombination der Daten aus der Dynamischen Lichtstreuung mit denen aus der mikrofluidischen Diffusionstechnologie ermöglicht es erstmalig, das Aggregationsverhalten von Wt-BMP-2 über einen sehr großen Konzentrationsbereich (0.5-100 μ M) zu erfassen (s. Abb. 26).

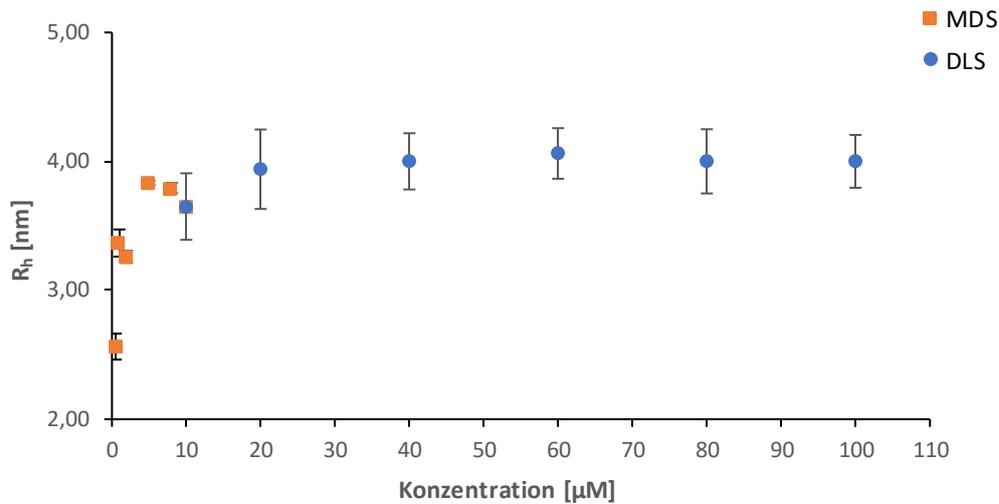


Abb. 26: Hydrodynamischer Radius von Wildtyp-BMP-2 in Abhängigkeit von der Konzentration

Datenkombination aus dynamischer Lichtstreuung (10-100 μM) und mikrofluidischer Diffusionstechnologie (0.5-10 μM). Die DLS-Messungen wurden am Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical) durchgeführt, die MDS-Messungen hingegen am Fluidity One (Fluidic Analytics, Cambridge/UK). Der Wildtyp-BMP-2 wurde in 1 mM HCl gelöst.

Das beobachtete Assoziationsgleichgewicht beschreibt offensichtlich eine hyperbole Kurve, die in ihrer Form an die Abhängigkeit der enzymatischen Kinetik in Abhängigkeit der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Beziehung) erinnert.

$$\text{MM Gleichung: } y = \frac{a \cdot x}{b + x} \quad (1)$$

Im untersuchten Assoziationsgleichgewicht wird jedoch im Gegensatz zu einer Reaktionskinetik $y \neq 0$ für $x \rightarrow 0$. Vielmehr ist hier für y der hydrodynamische Radius bzw. der Gyrationradius (R_g) des physiologisch aktiven Dimers als kleinste biologisch sinnvolle Einheit anzunehmen.

$$R_h(c \rightarrow 0) = R_{h0} \cong R_g = 2,08 \text{ nm} \quad (2)$$

Mit $c \rightarrow \infty$ scheint die Aggregation von Wt-BMP-2 eine Sättigung anzustreben, die bei gegebener Datenlage bei $R_h \approx 4,0$ nm liegt.

$$R_h(c \rightarrow \infty) = R_{h\infty} \cong 4 \text{ nm} \quad (3)$$

Die Werte für R_{h0} und $R_{h\infty}$ können als Grenzwerte interpretiert werden, innerhalb derer sich die assoziativen Formen von Wt-BMP-2 (bis zu einer Konzentration von 100 μM) bewegen. Da

eine Verdopplung im R_h mit dem Faktor 8 in die Volumenberechnung eingeht, scheint Wt-BMP-2 sich zunächst in einer oligomeren Konformation von ca. acht Dimeren zu stabilisieren. Eine weitere Assoziation höherer Ordnung im mM-Bereich ist damit aber nicht ausgeschlossen und passt zum Resultat der Bildung von *inclusion bodies* nach heterologer Expression des Wildtypproteins in *E. coli*.

Das Verhalten des im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Assoziationsgleichgewichtes lässt sich wie folgt mathematisch annähern.

$$y = \frac{R_{h\infty} * c + R_{h0} * k}{c + k} \quad (4)$$

Dabei ist wichtig festzuhalten, dass diese Gleichung nicht durch eine mathematische Analyse des eigentlichen Assoziationsgleichgewichtes ermittelt wurde, sondern die gemessenen Daten empirisch einer Gleichung dieser Form entsprechen.

Mit $c \rightarrow 0$ gilt

$$y = \frac{R_{h\infty} * c + R_{h0} * k}{c + k} \cong \frac{R_{h0} * k}{k} = R_h \quad (5)$$

Dort also liegt Wt-BMP-2 als Dimer vor. Wird $c \rightarrow \infty$ gesteigert, so wird $R_{h\infty}$ erreicht, der maximale Größenwert der zu sehenden, assoziierten Formen.

$$y = \frac{R_{h\infty} * c + R_{h0} * k}{c + k} = \frac{R_{h\infty} * c}{c} = R_{h\infty} \quad (6)$$

Welche biologische Bedeutung kommt der Konstante k zu? Für $c = k$ ergibt sich:

$$y = \frac{R_{h\infty} * k + R_{h0} * k}{k + k} = \frac{R_{h\infty} + R_{h0}}{2} \quad (7)$$

k entspricht somit der Konzentration, bei der die durchschnittliche Größe der molekularen Spezies dem Mittelwert zwischen minimaler und maximaler Spezies entspricht. Da bei dieser Konzentration ein Gemisch aus Dimeren und größeren Spezies vorliegt, gibt es für k keine einfache Interpretation und dient nur zur Orientierung. Gleichung 4 ergibt für $k = 1 \mu\text{M}$ eine hyperbole Funktion, die die Messdaten mit erstaunlicher Genauigkeit annähert.

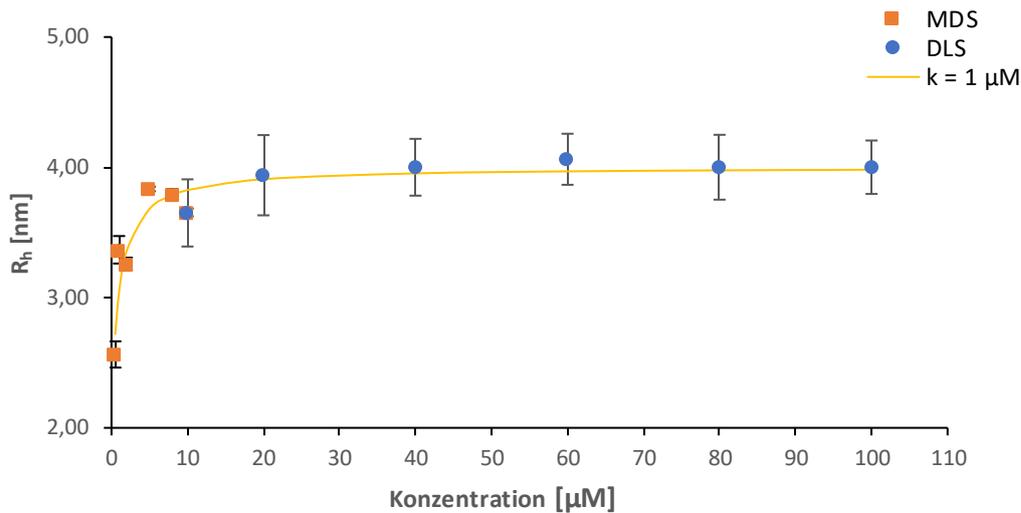


Abb. 27: Hydrodynamischer Radius von Wt-BMP-2 in Abhängigkeit von der Konzentration

Datenkombination aus dynamischer Lichtstreuung (10-100 μM) und mikrofluidischer Diffusionstechnologie (0.5-10 μM). Der Wt-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) wurde zuvor in 1 mM HCl gelöst. Die DLS-Messungen wurden am Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical) durchgeführt, die MDS-Messungen hingegen am Fluidity One (Fluidic Analytics, Cambridge/UK).

$$\text{Approximation mit } y = \frac{R_{h\infty} * k + R_{h0} * c}{k + c} = \frac{4 \text{ nm} * c + 2,08 \text{ nm} * 1 \text{ nm}}{c + 1 \text{ nm}}$$

Die Assoziationseigenschaften von BMP-2 stellen sich somit als charakterisierbar dar, ohne, dass das Assoziationsgleichgewicht quantitativ analysiert wird.

Um diese These zu validieren, wurde das Oligomerisierungsverhalten des Proteins Lysozims ebenfalls konzentrationsabhängig mit DLS und MDS charakterisiert. Lysozym wurde hierfür in verschiedenen Konzentrationen in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 vorverdünnt. Außerdem sollte analysiert werden, ob eine möglichst vollständige Entfaltung von BMP-2 in 6 M Guanidiniumhydrochlorid die konzentrationsabhängige Aggregationstendenz des Proteins aufzulösen vermag.

Auch Lysozym zeigt im höheren Konzentrationsbereich einen stabilen hydrodynamischen Radius von $1.98 \pm 0.135 \text{ nm}$, der mit dem in der Literatur dokumentierten $R_h = 1.9 \text{ nm}$ übereinstimmt [Parmar & Muschol, 2009]. Im Gegensatz zum BMP-2 wird dieser Wert aber auch bei der Konzentration von 10 μM Lysozym gemessen und ändert sich nur unwesentlich in der MDS-Analytik.

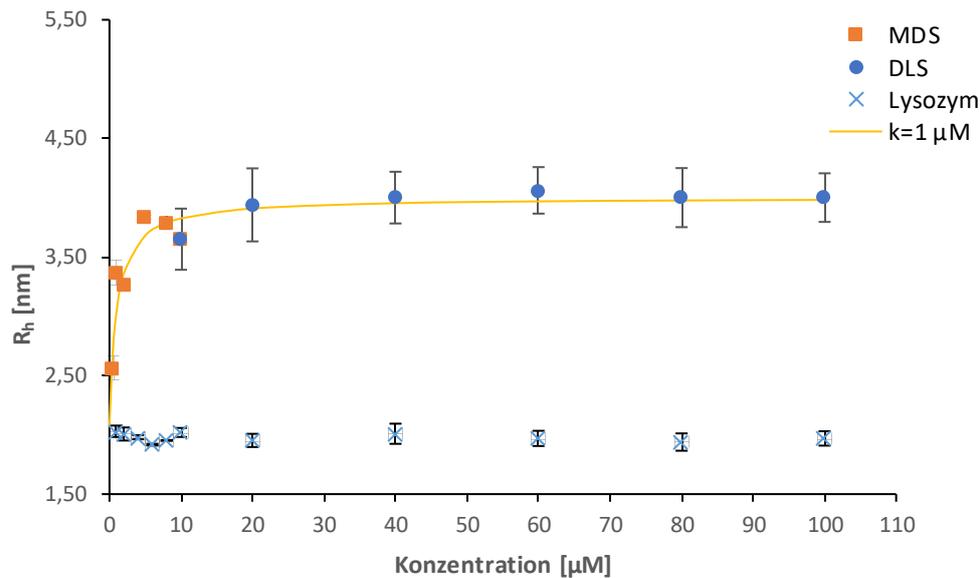


Abb. 28: Hydrodynamischer Radius von Lysozym und Wt-BMP-2 in Abhängigkeit von der Konzentration
 Datenkombination aus dynamischer Lichtstreuung (10-100 μM, Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical) und mikrofluidischer Diffusionstechnologie (0.5-10 μM, Fluidity One (Fluidic Analytics, Cambridge/UK)). Das Lysozym wurde in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 vermessen, der Wt-BMP-2 in 1 mM HCl.

$$\text{Approximation mit } y = \frac{R_{h\infty} * k + R_{h0} * c}{k + c} = \frac{4 \text{ nm} * c + 2,08 \text{ nm} * 1 \text{ nm}}{c + 1 \text{ nm}}$$

Dies kann als klares Indiz dafür gewertet werden, dass das konzentrationsabhängige Assoziationsverhalten von BMP-2 eine für genau dieses Protein charakteristische intrinsische Eigenschaft darstellt. In höheren mikromolaren Konzentrationen (>50 μM) ist BMP-2 nur in 1 mM HCl, also bei einem pH=3 in Lösung zu bringen. Im nanomolaren und damit physiologisch entscheidenden Konzentrationsbereich des Wachstumsfaktors ist BMP-2 auch bei neutralem pH löslich. Allerdings wurde selbst hier bei Affinitätsmessungen zur Rezeptorbindung mittels Oberflächenplasmonenresonanz ab $c > 5$ nM die Tendenz zur Selbstaggregation nachgewiesen [pers. Mitteilung, Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg].

Die Denaturierung von BMP-2 in 6 M Guanidiniumhydrochlorid erhöht im Vergleich zum nativen Protein den hydrodynamischen Radius auf 4.22 ± 0.171 nm. Dieser Wert bleibt über den kompletten per DLS zugänglichen Konzentrationsbereich annähernd stabil, ein Absinken von R_h kann hier nicht beobachtet werden (s. Abb. 29) Der im Vergleich zum nativen Protein gering erhöhte hydrodynamische Radius erstaunt auf den ersten Blick, da eine Proteinkomplettentfaltung mit einer wesentlich deutlichen Erhöhung von R_h einhergehen sollte. Wird jedoch die besondere Cystinknotenstruktur im BMP-2 berücksichtigt, so wird klar, dass das Protein nicht vollständig entfaltet werden kann und den für entfaltete Proteine üblichen hohen hydrodynamischen Radius daher nicht erreichen wird. Die Vermessung von BMP-2 in 6 M Guanidiniumhydrochlorid erwies sich am Fluidity One (Fluidic Analytics, Cambridge/UK)

als experimentell schwierig. Die hohe Viskosität der Proben sowie die aminbasierte Fluoreszenzdetektion führten meist zu Messwerten, die biologisch nicht sinnvoll interpretierbar waren ($R_h < 1 \text{ nm}$). Die nur punktuell erhaltenen (und deshalb statistisch nicht signifikanten) realistischen Messwerte zeigen auch hier nur ein geringes Absinken im Radius des Proteins.

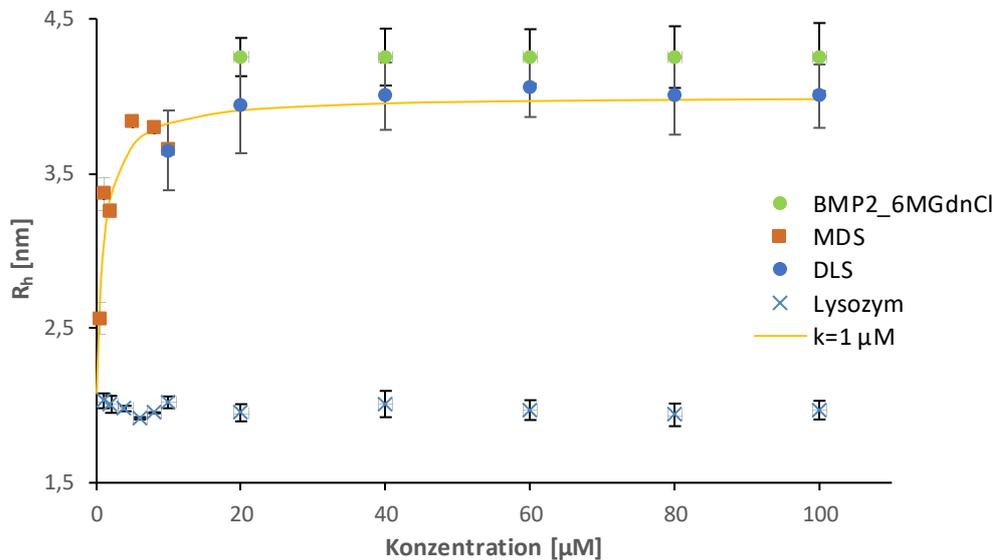


Abb. 29: Hydrodynamischer Radius von Wt-BMP-2 in nativer und entfalteter Form vs. Lysozym als f(c)
 Datenkombination aus dynamischer Lichtstreuung (10-100 μM , Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical)) und mikrofluidischer Diffusionstechnologie (0.5-10 μM , Fluidity One (Fluidic Analytics, Cambridge/UK)). Der native Wt-BMP-2 wurde in 1 mM HCl und entfaltet in 6 M Guanidiniumhydrochlorid vermessen. Das Lysozym hingegen in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4.

Dargestellt ist die Konzentrationsabhängigkeit des hydrodynamischen Radius (R_h) von nativem und denaturetem Wt-BMP-2 sowie von Lysozym als Prototyp eines löslichen Proteins. Nur beim nativen BMP-2 wird bei niedrigen Konzentrationen ein deutliches Absinken von R_h in Richtung R_g beobachtet. Die Denaturierung von BMP-2 in 6 M GdnHCl verkleinert R_h im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2. Die MDS-Werte zeigen hier eine Tendenz, die statistisch allerdings nicht signifikant ist. Für Lysozym wird im kompletten Konzentrationsbereich der in der Literatur dokumentierte hydrodynamische Radius von 1.9 [Parmar & Muschol, 2009] gemessen.

Die Datenlage legt somit in Summe nahe, dass das Aggregationsverhalten von BMP-2 nicht von seiner Primärstruktur alleine bestimmt wird. Sondern ähnlich wie bei amyloiden Strukturen durch die Konformation des Proteins bedingt ist, welche wiederum von den Lösungsbedingungen abhängt.

Kern dieser Doktorarbeit war eine Hydrophilisierungsstrategie, die auf lösliche und zugleich biologisch funktionelle BMP-2-Varianten abzielt. Es sollte untersucht werden, wie die

gewählte Strategie einerseits den hydrodynamischen Radius von BMP-2 und andererseits die eben gezeigte konzentrationsabhängige Aggregationstendenz beeinflusst.

Bislang ist unzureichend erforscht, welche Form von Oligomerisierungspezies von BMP-2 im Medizinpräparat InductOs® vorliegt bzw. wie lange dort die Solubilisierung von aktivem Dimer in Anspruch nimmt. Entsprechend sind hydrophylisierte BMP-2-Varianten ein sehr guter Ansatz für eine medizinisch besser kalkulierbare Osteogenese, da diese direkt als Dimer bzw. kleinere Oligomere exprimiert werden. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse aus der dynamischen Lichtstreuung untermauert. Dabei wurde für beide BMP-2-Varianten der gleiche oder ein sehr ähnlicher R_h ermittelt. Dafür wurden die gefriergetrockneten BMP-2 Varianten entweder in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 oder 1 mM HCl resolubilisiert. Die Quantifizierung der Molekulargewichtsverteilung bzw. der Assoziationstendenz erfolgte analog zum Wildtyp über die dynamische Lichtstreuung zur Ermittlung des hydrodynamischen Radius (R_h) der heterogenen Proteinproben.

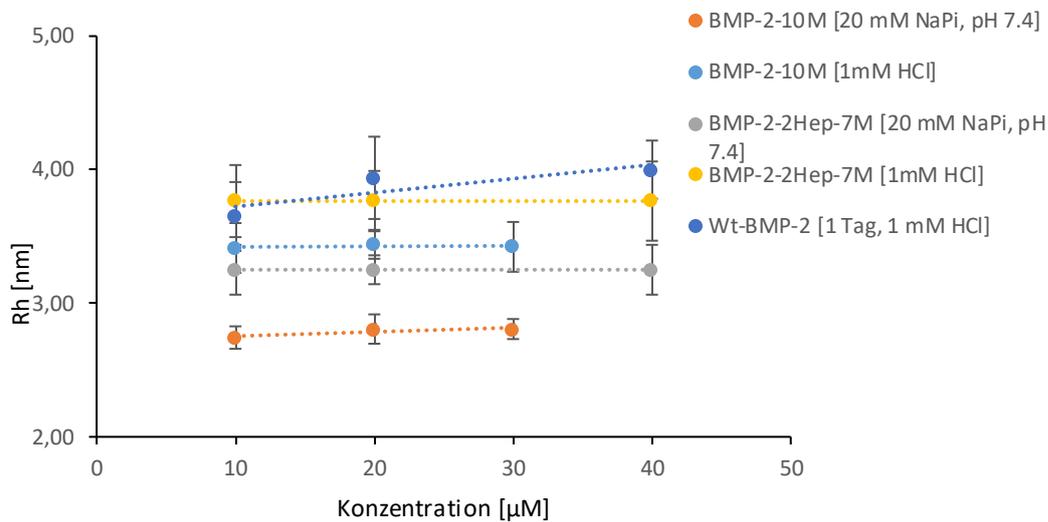


Abb. 30: Hydrodynamischer Radius von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M bei verschiedenen Pufferbedingungen

Dargestellt ist der hydrodynamische Radius (R_h) der BMP-2-Varianten in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 und 1 mM HCl. DLS-Messung am wurden am Zetasizer Nano ZS, Malvern Pananalytical durchgeführt.

Wie Abb. 30 veranschaulicht, konnte für BMP-2-10M in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 bei einer Konzentration von 10-30 μ M ein hydrodynamischer Radius (R_h) von 2.8 ± 0.219 nm ermittelt werden, kleiner also als bei der Vermessung des Wildtyps in analoger Konzentration und näher am R_g aus der Röntgenstrukturanalyse des Proteins. Mit der Änderung des Puffers in 1 mM HCl stieg der hydrodynamische Radius geringfügig auf 3.2 ± 0.364 nm und war damit interessanterweise genauso groß wie beim mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid denaturierten Wildtyp. Die Variante BMP-2-2Hep-7M besitzt im Gegensatz zu BMP-2-10M nur sieben hydrophilisierende Mutationen. Das somit stärker hydrophobe Protein zeigt entsprechend in

20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 einen hydrodynamischen Radius von 3.2 ± 0.160 nm, der nach Änderung des Lösemittels (1 mM HCl) auf 3.7 ± 0.270 nm ansteigt (s. Abb. 30).

Die im physiologischen pH-Bereich gemessenen Radien der Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M liegen dennoch klar über dem R_g des Wildtyp-Proteins = 2.08 nm, der für das bioaktive Dimer bestimmt wurde. Dies entspricht einer deutlichen Reduktion der Aggregationstendenz in den Varianten, aber nicht ihrer kompletten Beseitigung. Beim Vergleich der Werte für R_h für die Varianten alleine zeigt sich, dass zusätzliche hydrophilisierende Mutationen den hydrodynamischen Radius und damit auch das Aggregationsbestreben klar senken. Das Optimum an Hydrophilisierung bei gleichzeitigem Funktionserhalt ist also noch nicht gefunden.

Der stärker hydrophobe Charakter der Variante BMP-2-2Hep-7M im Vergleich zur BMP-2-10M-Variante und die damit verbundene größere Aggregationsneigung war bereits bei der Aufreinigung des Proteins aufgefallen. Diese wurde zunächst nach der Applikation auf eine Heparinsepharosesäule durch einen Salzgradienten mit einem Tris-Puffer (50 mM Tris pH 5.3, 2 M NaCl, 0.5 M L-Arginin) realisiert. Beim Versuch einer Aufreinigung über Gelpermeationschromatographie wurde jedoch nur ein einziges UV-Absorptionsmaximum im Bereich des Ausschlussvolumens detektiert. In der SDS-Tricin-Gelanalytik dagegen war eine saubere BMP-2-Präparation zu sehen, die nur aus Dimer und Monomer zu bestehen schien (s. Abb. 31) [Masterarbeit/Heinks, 2019].

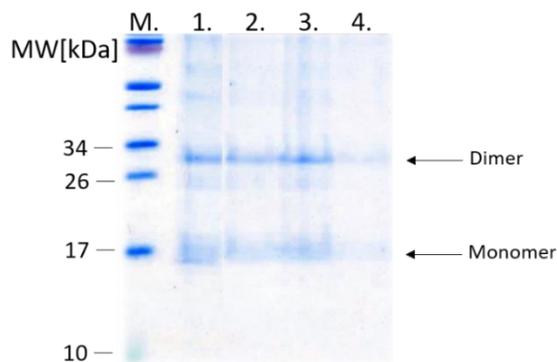


Abb. 31: Gelpermeationschromatographie von BMP-2-2Hep-7M im sauren pH-Wert und Hochsalzbedingungen

Dargestellt ist eine SDS-Tricin-PAGE-15%-Analytik (nicht reduzierend, Färbung mit Coomassie blau) der entsprechenden BMP-2-2Hep-7M Fraktionen nach Gelpermeationschromatographie. Spuren: M: Marker (PageRuler™, #26616, Thermo Fisher Scientific), 1: Probenpool nach Heparinsepharose (7.3 mg Protein in 2 ml), 2-4: Elutionsfraktionen nach Gelpermeationschromatographie. Die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen zeigen überpräsentiert das BMP-2 Monomer (~14 kDa) und Dimer (~28 kDa) der Variante BMP-2-2Hep-7M auf. Diese Analytik wurde mit 50 mM Tris, pH 5.3, 2 M NaCl, 0.5 M L-Arginin und 6 M Harnstoff realisiert [modifiziert nach Masterarbeit/Heinks, 2019].

Eine nachfolgende DLS-Analytik ergab schließlich, dass das vermeintliche Monomer-Dimer-Gemisch von BMP-2 ausschließlich hochaggregiert vorlag (R_h -Bereich 85-110 nm) (Daten

nicht gezeigt). Offensichtlich triggert die hohe Ionenstärke von 2 M NaCl analog zum Aussalzen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine zusätzliche Exponierung hydrophober Oberflächen und verstärkt damit das bereits intrinsische Aggregationsvermögen des Proteins. Die Aufreinigung von BMP-2-2Hep-7M in dimerer Form gelang schließlich über eine pH-Verschiebung im Elutionspuffer, der es erlaubte die Ionenstärke auf 0.5 M NaCl zu reduzieren.

Die über Lichtstreuung detektierten hydrodynamischen Radien spiegeln dennoch bereits wider, dass die Aggregationstendenz von BMP-2 durch hydrophilisierende Mutationen stark abnimmt.

6 Zellbiologische Arbeiten

6.1 Funktionelle Charakterisierung und quantitative Bestimmung des Osteogenesepotentials der BMP-2-Varianten

Die in dieser Arbeit entwickelten BMP-2-Varianten (BMP-2-10, BMP-2-2Hep-7M) stellen Prototypen für lösliches BMP-2 dar. Da zunächst nicht davon ausgegangen werden kann, dass diese das volle Funktionsspektrum des Wildtyps BMP-2 aufweisen, galt es zunächst zu überprüfen, ob das Hauptkriterium aus applikationstechnischer Sicht, nämlich die Funktionalität, erfüllt ist. Die elementare Voraussetzung dafür ist im Einsatz eines geeigneten Osteogenese-Zellkulturmodells begründet. Hierbei muss jedoch erstmal zwischen der unterschiedlichen Konzeptionierung der verwendeten Mutanten unterschieden werden, da bei BMP-2-10M eine hochaffine Bindung an BMP-2-Inhibitoren wie Noggin angestrebt wird. Dadurch soll die osteogene Wirkung von endogenem BMP-2 verbessert werden, wobei keine unmittelbare osteoinduktive Wirkung von der BMP-2-Variante selbst ausgeht. Das zweite Mutein, BMP-2-2Hep-7M, soll jedoch intrinsisch, osteogene Funktionalität besitzen und damit als BMP-2-Agonist wirken.

Für die funktionelle Validierung wurden murine Myoblasten der Linie C2C12 (ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten) und die HEK BRELuc-Zelllinie (AG Knaus, FUB) verwendet. Als BMP-2-Funktionstests diente ein experimentelles Verfahren, das die Signalübertragung von BMP-2 über die Alkalische Phosphatase (ALP) sichtbar macht, sowie ein Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR-Assay) zur Analyse der Smad-Aktivierung. Beide Funktionstests werden nachfolgend näher beschrieben. Alle experimentellen Zellkulturarbeiten wurden am Lehrstuhl für Chemie und Biochemie, AG Knaus, der Freien Universität Berlin realisiert. Diese wurden zudem maßgeblich von M.Sc. Tobias Heinks (AG Prof. Dr. A. Loidl-Stahlhofen, WHS Recklinghausen) mit der Unterstützung von Dr. Christian Hiepen und Sonja Niedrig (AG Knaus, FUB) durchgeführt.

Alkalisches Phosphatase-Assay (ALP-Assay)

Die Alkalische Phosphatase teilt den klassischen biochemischen Marker der Osteoblasten-Differenzierung dar. Dabei beruht ein *in vitro*-Assay auf der von ALP katalysierten Umsetzung von para-Nitrophenylphosphat (pNPP). Das experimentelle Setup nutzt die murine Zelllinie C2C12 (ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten), welche aus C2-Myoblasten (Maus) [Yaffee & Saxel, 1977] als Subklon isoliert wurden [Blau et al., 1998]. Diese Zelllinie wird als *in vitro*-Modell eingesetzt, da BMP-2 hierbei analog, wie im humanen System, eine Differenzierung von Myoblasten zu Osteoblasten induzieren kann [Katagiri et al., 1994, Cheng et al., 2003]. Im konkreten Testverfahren werden die C2C12-Zellen nach Anzucht in FCS-haltigem Medium für definierte Zeitintervalle (2-70 min) verschiedenen Stimuli ausgesetzt. Als Negativkontrolle

fungiert ein Hungermedium, das zur weiteren Ausprägung der myogenen Differenzierung beiträgt. So kommt es im Zuge einer durch BMP-2 induzierten Signaltransduktion über den Transkriptionsfaktor Id1 sekundär auch zur Expression der Alkalischen Phosphatase. Deren Aktivität kann im Zelllysate der C2C12-Zellen, wie zuvor beschrieben, nach Zugabe von pNPP über das Hydrolyseprodukt Nitrophenolat bei 405 nm quantifiziert werden.

Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR-Assay)

Die Basis des Dual-Luciferase Reporter Assays bilden HEK BRELuc-Zellen (AG Knaus, FUB, keine Publikation weiterführender Informationen vorhanden). Dieses System enthält zwei verschiedene Luciferase-Reporter-Enzyme, die in einer Zelllinie gleichzeitig exprimiert werden können. Dabei weisen sie eine stabil ins Genom transfizierte Genkassette auf. Diese codiert u.a. für die Firefly-Luciferase, die durch definierte Abschnitte des Id1-Promotors kontrolliert wird, sowie die Renilla-Luciferase, die unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht. Auch hier sorgt der osteogene Wachstumsfaktor BMP-2, der an die BMP-2-Rezeptoren I und II bindet, über eine intrazelluläre Signalübertragungskette für eine verstärkte Expression von Id1. Da die Renilla Luciferase über den Id1-Promotor verfügt, wird dieses Protein nun vermehrt gebildet. Bei der Auswertung erfolgt eine Normierung der gemessenen Luciferase-Aktivität [RLU] durch eine Division der Firefly [RLU] mit denen der Renilla-Luciferase.

6.1.1 Vergleichende Zellkulturanalyse der Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M mit dem Wildtyp-BMP-2

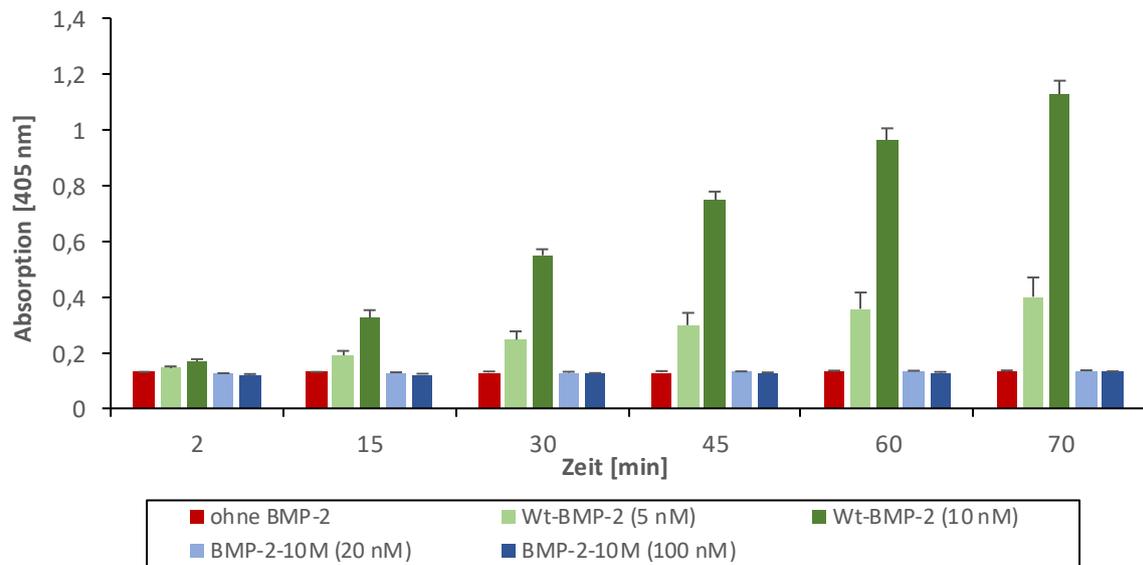
Zur Klärung der Frage, ob das Einbringen von Mutationen in die Aminosäuresequenz des BMP-2 zu einer Verbesserung der Löslichkeit des Wachstumsfaktors sowie zu einer Abnahme der Aggregationstendenz führt und zudem eine Auswirkung auf die biologische Aktivität haben, wurde eine Bestimmung der alkalischen Phosphatase- und der BRELuc-Reportergen-Aktivität der BMP-2-Varianten durchgeführt. Dafür wurden zunächst BMP-2-Mutein-Dimer-Fractionen nach Gelpermeationschromatographie (s. Abschnitt 3.2.3.7) gegen 1 mM HCl dialysiert und gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Proben in 100 µl 1 mM HCl resolubilisiert und bis zum Einsatz in den entsprechenden Assays bei 4 °C gelagert. Nach fünf Tagen Lagerung lag die Konzentration bei 0.82 mg/ml (ca. 31.5 µM) für BMP-2-10M und bei 1.5 mg/ml (ca. 57 µM) für BMP-2-2Hep-7M.

6.1.1.1 Alkalische Phosphatase-Assay

Der Alkalische Phosphatase-Assay (ALP-Assay) wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um die BMP-2-Varianten vergleichend zum Wildtyp-BMP-2 hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität zu überprüfen. Wie aus Abb. 32 ersichtlich, führt die Stimulation von C2C12-Zellen zunächst mit Wildtyp-BMP-2 (Konzentration: 5 nM, 10 nM) zu einem signifikanten Anstieg der alkalischen Phosphatase-Aktivität. Die biologische Aktivität der untersuchten Variante BMP-2-10M (Konzentration: 20 nM und 100 nM) korreliert zu keinem Zeitpunkt und bei

keiner der getesteten Konzentrationen mit den Wildtyp BMP-2-Daten (s. Abb. 32). Diese stagnieren eher konstant auf dem Level der getesteten Probe ohne BMP-2. Das daraus resultierende Ergebnis bestätigt die hier angewendete Klonierungsstrategie in BMP-2-10M, die bedingt durch die eingebrachten Mutationen, nicht in der Lage ist eine Signaltransduktion auszulösen, sondern eher als Noggin-binder fungieren soll. Da somit der natürliche BMP-2-Inhibitor abgefangen werden soll, kann daraus eine erhöhte biologische Aktivität des Wachstumsfaktors resultieren.

A.



B.

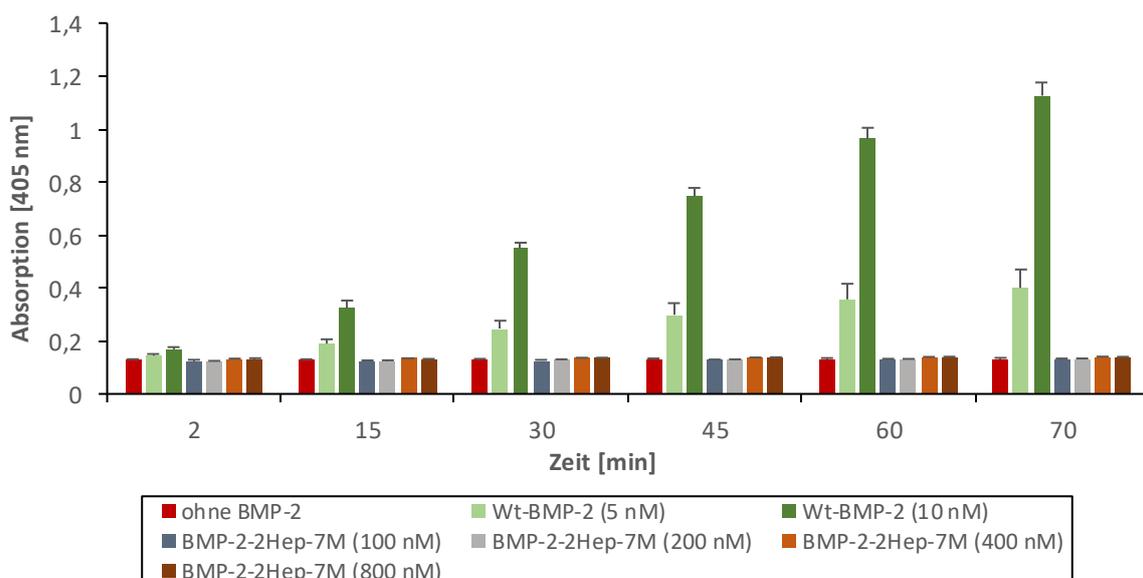


Abb. 32: ALP-Assay zum Nachweis der biologischen Aktivität von BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M und Wt-BMP-2

A: Konzentrationsabhängige Stimulation der ALP-Aktivität in C2C12-Zellen (ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten) in einem Zeitraum von 2-70 min durch die Variante BMP-2-10M. B: Konzentrationsabhängige Stimulation der ALP-Aktivität in C2C12-Zellen in einem Zeitraum von 2-70 min das Mutein BMP-2-2Hep-7M. Die ALP-Aktivität von Variante BMP-2-10M korreliert zu keinem Zeitpunkt mit den Ergebnissen der Referenz (Wildtyp-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg), die aufgrund eingebrachter Mutationen nicht in der Lage ist, einen funktionellen heterotetrameren BMP-2-I/II-Rezeptorkomplex zu bilden. Auch BMP-2-2Hep-7M zeigt zu keinem Zeitpunkt und getesteten Konzentration eine ALP-Aktivität [Abbildung B: modifiziert nach Masterarbeit/Heinks, 2019].

Auch ein Blick auf die in Abb. 32 B dargestellten Ergebnisse des ALP-Assays für BMP-2-2Hep-7M zeigt zunächst eindeutig, dass keine ALP-Aktivität bei den untersuchten Ligandenkonzentrationen von 100-800 nM detektiert wurde. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet die negativen Ergebnisse bei niedrigen Konzentrationen von 6.25-50 nM (BMP-2-2Hep-7M) hier aufzulisten (s. Abb. 44). Allerdings kann bedingt durch die geringere Sensitivität des angewendeten ALP-Assays an dieser Stelle die Theorie aufgestellt werden, dass eine zu geringe Konzentration der Variante BMP-2-2Hep-7M im Versuch eingesetzt wurde. Dies wird zudem durch die Tatsache begründet, dass die verwendete Variante BMP-2-2Hep-7M stark mit *E. coli*-Proteinen verunreinigt war und somit die tatsächlich eingesetzte Konzentration des Liganden als viel niedriger einzustufen ist. Zudem wirken sich eine vermutlich zu geringe Zelldichte sowie eine kurze Inkubations- und Stimulationszeit negativ auf das erzielte Ergebnis im ALP-Versuch aus.

Ergänzend zu den zuvor erläuterten Ergebnissen wurde zusätzlich eine oligomerisierte BMP-2-2Hep-7M-Variante im ALP-Assay analysiert. Diese lässt ebenfalls im Vergleich zur dimeren BMP-2-2Hep-7M-Variante keinen *in vivo*-Effekt dieser BMP-2-Form vermuten. Entsprechende Daten dazu sind im Anhang aufgeführt (s. Abb. 45).

6.1.1.2 Dual-Luciferase Reporter Assay

Komplementär wurden die BMP-2-Muteine BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M über das beschriebene Dual-Luciferase Reporter-Testsystem analysiert. Als Negativkontrollen wurden erneut Zellen genutzt, die im Hungermedium inkubiert waren. Als Positivkontrolle fungiert Wt-BMP-2 in den Konzentration 5 und 10 nM. Dabei sollte gezeigt werden, dass BMP-2-10M nicht in der Lage ist alleine osteogene Differenzierung zu induzieren. Allerdings wurde angestrebt, dass dieses Mutein den BMP-2-Inhibitor Noggin bindet und damit die Wirkung von Wt-BMP-2 indirekt steigert. Abb. 33 zeigt zunächst vergleichend die Ergebnisse des osteogenen Potentials von Wt-BMP-2 und BMP-2-10 M im Dual-Luciferase Reporter-Assay.

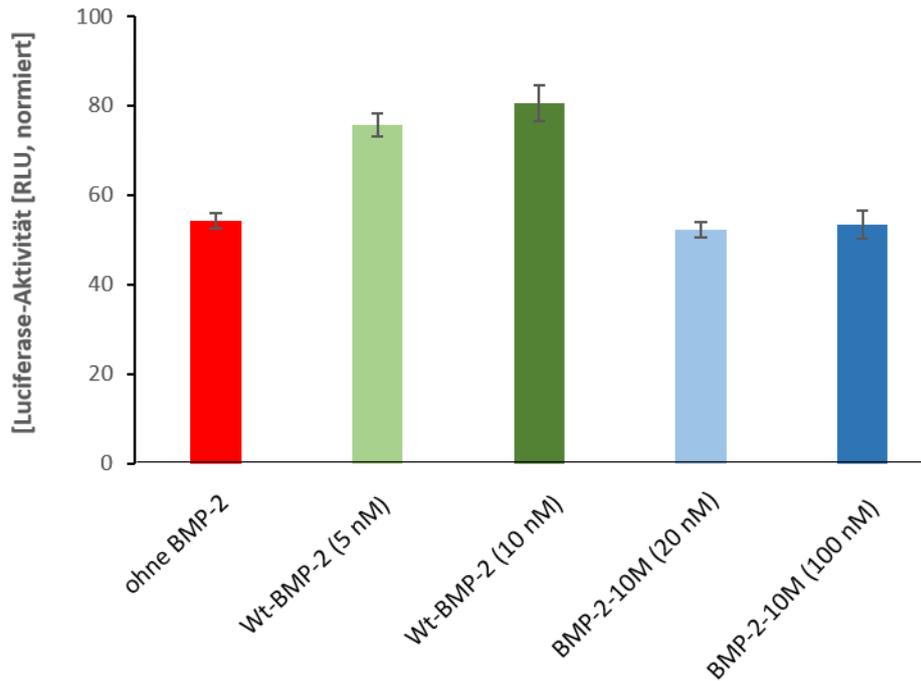


Abb. 33: Dual-Luciferase Reporter Assay in HEK BRELuc-Zellen

Überprüfung der Induktion der Luciferase Aktivität durch das BMP-2-10M Mutein im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg). Der verringerte Wert der gemessenen Aktivität zeigt, dass BMP-2-10M keinen Einfluss auf die Signalübermittlung hat und somit als potentieller Noggin-Antagonist fungieren kann. Die erhöhte Induktion der Expression in der getesteten Probe ohne BMP-2 (im Vergleich zur Referenz) ist auf die autokrine BMP-Sezernierung der eingesetzten Zelllinie und des verwendeten FKS zurückzuführen.

Die Überprüfung des Einflusses von BMP-2-10M (Konzentration: 20 nM und 100 nM) auf die Reporterogenaktivität in HEK BRELuc-Zellen (AG Knaus, FUB) ergab keine Erhöhung der Luciferase-Aktivität [RLU, normiert] im direkten Vergleich zur Stimulation der Zellen ohne BMP (s. Abb. 33). Das relativ hohe Basalniveau könnte unter Umständen den endogenen Liganden aus dem zugesetzten FKS (fetales Kälberserum) zugeschrieben werden, wobei eine Sekretion von autokrinem BMP durch die Zellen selbst einen weiteren Einflussfaktor darstellt. Ein Blick auf die Ergebnisse der Referenz (Wildtyp-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) lassen trotz des hohen Basalsignals bereits bei einer Konzentration von 5 nM eine 1.43-fache Steigerung der Luciferase-Aktivität (RLU, normiert) beobachten, die auf das 1.52-fache bei 10 nM ansteigt, was dem Plateau der eingesetzten Konzentration entspricht. Auch die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Steigerung der gemessenen Aktivität der verwendeten Referenz sehr gering ist, was durch eine zu kurze Optimierung des Versuchsbedingungen im neu angewandten dualen Reportersystem, begründet ist.

Nach der Überprüfung der Versuchseinzelkomponenten galt es, den Einfluss von BMP-2-10M auf den BMP-2-Inhibitor Noggin zu untersuchen. Gleichzeitig sollte der indirekte Nachweis der hochaffinen Bindung des Muteins BMP-2-10M an den BMP-Antagonisten Noggin erfolgen und damit dessen Einfluss auf die mögliche Verbesserung der osteogenen Wirkung von endogenem BMP-2 bestätigt wird. Dafür wurde das Testsystem so verändert, dass zusätzlich

zu den verwendeten Kontrollen (unstimulierte Zellen, Wt-BMP-2, und Noggin) nicht nur der hemmende Effekt von Noggin (Konzentration: 50 nM) auf den Wildtyp-BMP-2 (Konzentration: 10 nM) untersucht wurde, sondern auch die Wirkung von 150 nM BMP-2-10M bei Anwesenheit von 50 nM Noggin.

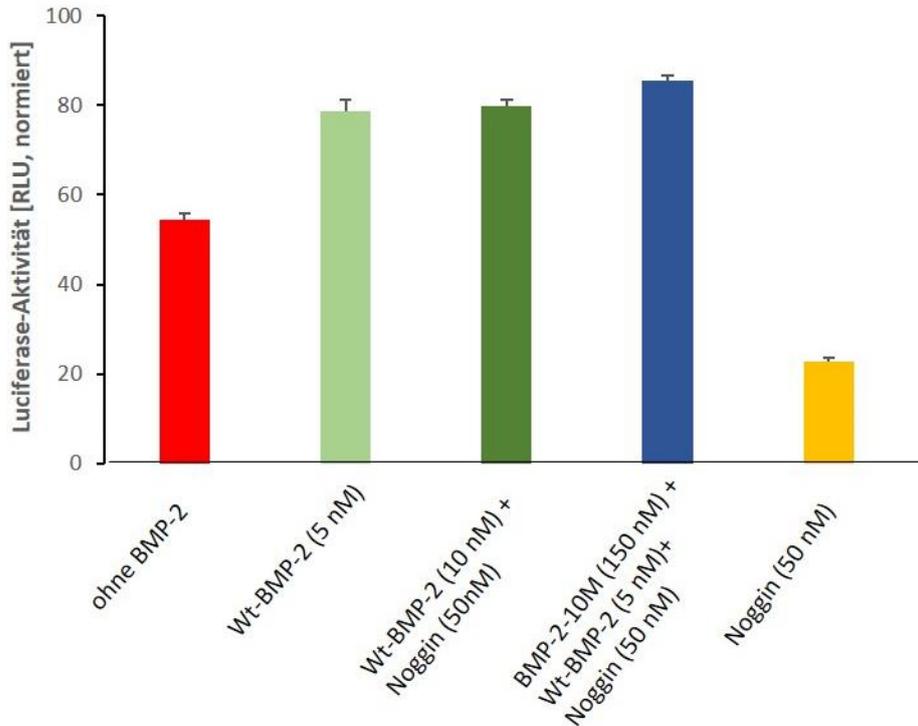


Abb. 34: Indirekter Nachweis der affinen Bindung von BMP-2-10M an den BMP-2-Inhibitor Noggin

Dieser Dual-Luciferase Reporter Assay wurde in instabil transfizierten HEK BRELuc-Zellen durchgeführt (AG Knaus, FUB). Es wurden normalisierte Werte-RLUs (*relative luminiscence units*) der Firefly-Luciferase durch die der Renilla-Luciferas dargestellt. Im Testsystem konnte keine inhibierende Wirkung des Muteins BMP-2-10M auf Noggin (AG Knaus, FUB) beobachtet werden, wobei auch kein hemmender Effekt von Noggin auf die Referenz (Wt-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) zu erkennen ist. In der Probe ohne BMP-2 kann im Vergleich zur Referenz noch eine Induktion der Expression beobachtet werden, da das eingesetzte FKS u.a. BMPs besitzt und die Zellen selbst in der Lage sind autokrines BMP zu sezernieren.

Anders als erwartet zeigte das in der Luciferase-Reporter-gen-Analyse eingesetzte rekombinante Noggin keine signifikante Hemmung der Funktionalität vom Wildtyp-BMP-2 (s. Abb. 34). Auch eine mehrmalige Wiederholung der Versuche im gleichen Testsystem ergab eine unklare Datenlage ohne Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Allerdings kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass das von der AG Knaus (FUB) zu Verfügung gestellte rekombinante Noggin keine oder nur geringe Aktivität oder Funktionalität aufwies und dadurch keine Inhibierung auf die Referenz (Wt-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) erzielt werden konnte. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass an dieser Stelle auch keine genaue Aussage über die Funktionalität des BMP-2-10M-Muteins getroffen werden kann und der Versuch mit aktivem Noggin wiederholt werden muss. Basierend auf den in dieser

Arbeit dargestellten Ergebnissen kann zudem nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die Variante BMP-2-10M tatsächlich vollständig korrekt und vollständig gefaltet vorlag. Auch dies würde verhindern physiologische Effekte der Varianten in zellbasierten Tests quantitativ zu erfassen. Ergänzend kann der Nachweis der Induktion der Expression in der Probe ohne BMP-2 auf das Vorhandensein von u.a. BMPs in FK-Serum sowie auf eine Sezernierung von autokrinem BMP durch die Zellen selbst zurückgeführt werden. Schließlich könnte das hohe Basalsignal in der nicht-induzierten Probe ohne Zugabe eines Liganden auf unzureichendes Waschen der Zellen mit PBS-Puffer sowie eine zu geringe Hungerphase von 6 h hinweisen. Aufgrund der begrenzten Zeit für den Forschungsaufenthalt in Berlin konnten die gemessenen Werte nicht mehr optimiert und deren Signifikanz erhöht werden.

Das Mutein BMP-2-2Hep-7M wurde so designt, dass eine funktionelle Bindung an die BMP-2-Rezeptoren möglich sein sollte. Daher wurde erwartet, dass diese BMP-2-Variante osteogene Differenzierung induzieren kann. Die dosisabhängige Induktion des BRELuc-Konstrukts durch BMP-2-2Hep-7M korreliert in geringer Weise mit den Ergebnissen aus dem ALP-Test (s. Abb. 35). Die erwartete osteogene Aktivität konnte aber nicht klar nachgewiesen werden. Dieser Eindruck verschiebt sich etwas, wenn berücksichtigt wird, dass die eingesetzten BMP-2-2Hep-7M-Proben stark mit *E. coli*-Proteinen kontaminiert waren. Bei extrem erhöhten Ligandenkonzentrationen (800 nM BMP-2-2Hep-7M) konnte im stark sensitiven Dual-Luciferase-basierten Reporter-gen-Systems gezeigt werden, dass BMP-2-2Hep-7M in der Lage ist den Smad1/5/8-Signalweg zu aktivieren, was sich durch eine erhöhte Luciferase-Aktivität beobachten lässt. Somit zeigt diese Variante *in vivo* durchaus einen Einfluss auf die biologische Aktivität. Bei niedrigeren Konzentrationen war jedoch keine Steigerung der detektierten Lumineszenz über den Basallevel darstellbar (200-400 nM, Daten nicht gezeigt). Auch hierbei sind die erzielten Ergebnisse aufgrund der Abschätzung der eingesetzten Konzentration an BMP-2-2Hep-7M bedingt durch vorhandene Kontaminationen mit Fremdproteinen nur unter Vorbehalt auswertbar.

Wie bereits beim Reporter-gen-Assay mit BMP-2-10M kann auch hierbei die gemessene hohe Luciferase-Aktivität in der Probe ohne Liganden auf eine autokrine Sezernierung von BMP-2 durch die eingesetzten Zelllinie sowie einem Restanteil an BMPs im FK-Serum zurückgeführt werden. Die geringe Steigerung der Aktivität bei den eingesetzten Konzentrationen von 5 nM und 10 nM der Referenz (Wildtyp-BMP-2) bedarf hier einer weiteren Optimierung der Versuchsbedingungen, was aber leider aus zeitlichen Gründen nicht mehr im Rahmen dieser Dissertation möglich war.

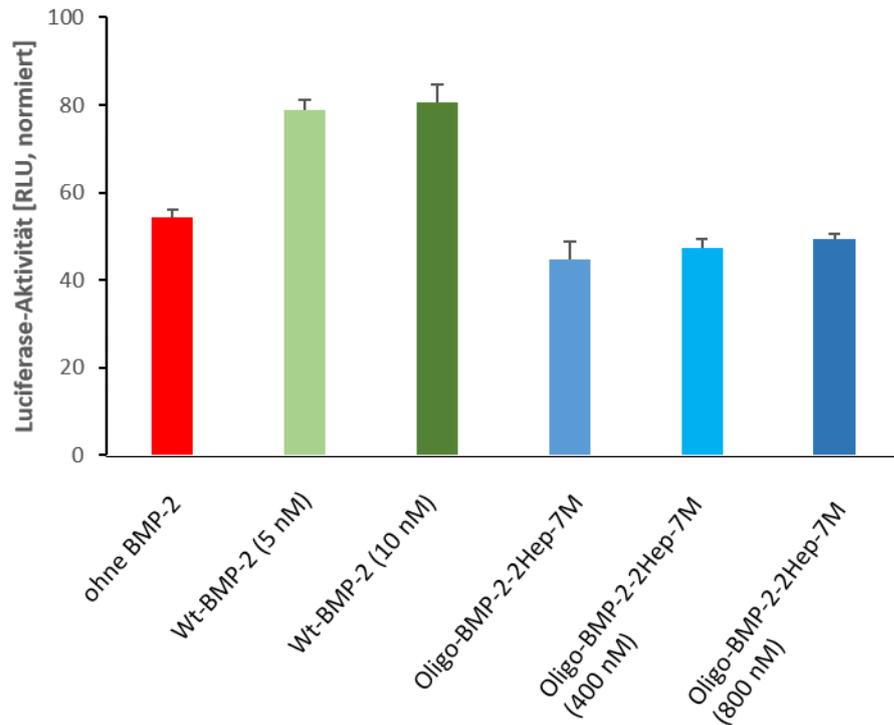


Abb. 35: Dual-Luciferase Reporter Assay von BMP-2-2Hep-7M in HEK BRELuc-Zellen

Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Lumineszenz-Steigerung der dualen Luciferase-Reporteraktivitäten. Für die Normierung der Werte wurde eine Division der RLUs (relative luminescence units) der Firefly-Luciferase durch die der Renilla-Luciferase durchgeführt. Wildtyp-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg), Stabil transizierte HEK BRELuc-Zellen (AG Knaus, FUB) [modifiziert nach Masterarbeit/Heinks, 2019].

7 Diskussion

Der Name *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) suggeriert bereits die eigentliche Funktionalität dieser Proteinfamilie als Initiator der Osteogenese. BMPs stellen wichtige Faktoren dar, die u.a. während der Neubildung von Knochen, sowie ihrer Regeneration unabdingbar sind [Kang et al., 2004]. Bei BMP-2 handelt es sich um ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie [Wozney et al., 1988, Massagué, 1998], die an einer Vielzahl an zellulären Prozessen in der Embryonalentwicklung und der Aufrechterhaltung von wichtigen Funktionen im adulten Körper beteiligt ist [Chen et al., 2004, Wagner et al., 2010]. Vor allem spielt das Protein eine entscheidende Rolle als aktiver Initiator der Osteogenese, wodurch es seit seiner Entdeckung immer mehr in den Fokus der Forschung geriet und letztendlich Einsatz in der humanen, regenerativen Medizin fand [Welch et al., 1998, Hollinger et al., 1998, Geiger et al., 2003, Bessa et al., 2008, Zimmermann et al., 2009]. Da die geringe Löslichkeit von Wt-BMP-2 Proteins das elementare und gravierendste Problem sowohl bei der rekombinanten Produktion als auch der klinischen Applikation darstellt, wurde mit dem in dieser Arbeit zuvor dargestellten systematischen Verfahren versucht, einen BMP-2-Varianten-Prototyp mit verbesserter Löslichkeit zu entwickeln.

7.1 Der Weg zu löslichen BMP-2-Varianten

Die starke Aggregationsneigung von rhBMP-2 führte in der Vergangenheit immer zu geringen Ausbeute, vor allem nach Expression in prokaryotischen Wirten, oder vielmehr zu unlöslichen Proteinen, wodurch seine Aufarbeitung zu löslichen und damit bioaktiven rhBMP-2-Präparationen enorm zeitaufwendig war [Hillger et al., 2005, Zhang et al., 2011]. Die Grundvoraussetzung bei der Entwicklung eines alternativen Ansatzes für die schnellere, einfachere und kostengünstige Gewinnung von löslichem BMP-2 war das Design von BMP-2-Varianten mit einer verminderten Aggregationsneigung im Vergleich zum Wt-BMP-2*(NCBI: NP_001191.1) (s. Abb. 4). Basierend auf einer *in silico*-Analyse (*AggreScan*), die sequenzspezifisch Aggregationstendenz zeigt, wurden BMP-2-Muteine konstruiert. Dabei erfolgte zunächst die Validierung des „*Proof of Principle*“ mit der Variante TrxA-BMP-2-10M. Es wurde überprüft, ob das gleichzeitige Einbringen mehrerer Mutationen in den *bmp-2*-codierenden Sequenzbereich (zur Eliminierung der AHS) tatsächlich effektiv ist und dadurch eine direkte und lösliche Herstellung von BMP-2 in einem prokaryotischen Wirt (*E. coli*) möglich ist. Da jedoch der Einsatz von Affinitäts-Anhängsel für die Aufreinigung eines Zielproteins mit einem allergenen Potential behaftet ist (z.B. während der Anwendung in präklinischen Studien), wodurch diese ein unkalkulierbares Problem darstellen, wurde gleichzeitig die Variante BMP-2-10M entwickelt. Sowohl bei TrxA-BMP-2-10M und BMP-2-10M wurden durch die Veränderung von zehn Aminosäureresten alle *aggregation hot spots* (AHS) eliminiert (s. Abb. 4 A). Neben der aufgehobenen Aggregationsneigung verfügen diese

Varianten zusätzlich über Aminosäuresubstitutionen, wie A 34→N (wichtig für die Bindung an den Rezeptor BMPR-II) und I 62→R (essentiell für die Bindung an BMPR-I) [Kirsch et al., 2000, Nickel et al., 2001, Keller et al., 2004, Sebald et al., 2004]. Es ist daher anzunehmen, dass BMP-2-10M nicht wirkeffektiv an den heterotetrameren BMPR-I-BMPR-II-Rezeptorkomplex binden kann und damit keine direkte BMP-2-analoge Signalübertragung auslösen wird. Jedoch wurde angenommen, dass dieses Konstrukt immer noch in der Lage sei, an BMP-2-Antagonisten, wie z.B. Noggin, zu binden. Sollte BMP-2-10M diese Inhibitoren durch Bindung funktionell ausschalten, könnte diese Variante die Wirkung von endogen vorhandenem BMP-2 erhöhen, indem hier der BMP-Antagonist „weggefangen“ wird. BMP-2-10M könnte in diesem Sinne gleichzeitig als Noggin-Antagonist, sowie auch als indirekter BMP-2 Agonist bezeichnet werden. Diese Modifizierung der Rezeptorbindungsaffinität stellte somit einen vielversprechenden Ansatz für eine indirekte Stimulation der Osteoinduktion dar, ohne dass diese Variante jedoch selbst unmittelbar osteoinduktive Aktivität besitzt [Keller et al., 2004, Sebald et al., 2012, Albers et al., 2012, Hauser et al., 2018, Khatabb et al., 2014, May et al., 2020].

Es gibt kaum publizierte Studien, die sich mit der Entwicklung von BMP-2-Varianten mit verbesserter Löslichkeit beschäftigen. Lediglich Bessa et al., 2008 konnten ein für *E. coli* optimiertes, periplasmatisches Expressionssystem entwickeln, mit dem aktives (His₆)-rhBMP-2 (Hexa-Histidin-flankiert) produziert werden konnte. Dieses lag nach dem Zellaufschluss jedoch lediglich in den Zellpellets vor (unlösliche Fraktion) und musste mittels L-Arginin, welches als Solubilisierungsvermittler fungierte [Tsumoto et al., 2004], in die lösliche Form überführt werden. Final fiel das über IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) präparierte BMP-2 hauptsächlich als Monomer an und zeigte eine geringfügige Neigung zur Ausbildung einer aktiven dimeren Struktur.

Ein weiterer zentraler Forschungspunkt dieser Arbeit war nicht nur die Entwicklung einer besser löslichen BMP-2-Variante, sondern gleichzeitig auch deren Funktionsoptimierung. Dies wurde mit der Variante BMP-2-2Hep-7M verwirklicht. Im Hinblick auf eine mögliche Erhöhung der osteoinduktiven Potenz ist eine charakteristische und zugleich interessante Eigenschaft des BMP-2 seine N-terminale Heparinbindestelle [Ruppert et al., 1996]. Diese beinhaltet basische Aminosäuren im reifen BMP-2, die bereits bekannten Heparinbindestellen anderer Wachstumsfaktoren oder Proteinen sehr ähneln [Roghani et al., 1994, Stone et al., 1994]. Für die basischen Aminosäuren des reifen BMP-2 können an dieser Stelle z.B. das Lys 285, Lys 287, Arg 289, Lys 290, Arg 291 und Lys 293 (N-Terminus des reifen BMP-2) genannt werden. Zwei weitere Aminosäuren, wie das Lys 297 und Arg 298, befinden sich direkt hinter dem ersten Cysteinrest des Cystinkontens [Ruppert et al., 1996]. Interessant ist auch die Tatsache, dass neben BMP-2 nur noch BMP-4 diesen basischen N-Terminus enthält [Ruppert et al., 1996, Choi et al., 2010, Billings & Pacifici, 2015, Smith et al., 2018]. Die spezifische Interaktion des BMP-2 mit der Heparansulfat (HS)-Kette einer Zelloberfläche oder

matrixgebundenen-Proteoglykanen [Ruppert et al., 1996, Nickel et al., 2002, Rider, 2006] werden heutzutage genutzt, um seine Bindung an Biomaterialien zu optimieren, sowie die Bioaktivität des Wachstumsfaktors zu modulieren [Wuerzler et al., 2004, Depprich et al., 2005, Sarrazin et al., 2011]. Auch in der vorliegenden Arbeit erscheint eine erhöhte Heparinbindung insbesondere unter applikationstechnischen Aspekten interessant, da die höhere Affinität an die extrazelluläre Matrix (ECM) eine längere Verweildauer dieser BMP-2-Varianten am Applikationsort ermöglicht. Um nun die Funktionsoptimierung bei BMP-2-2Hep-7M in diese Richtung zu erhöhen, wurde der flexible N-Terminus um basische Aminosäuren ergänzt (s. Abb. 4 B, AS₊₁₋₂₊₈), wodurch nicht nur die Löslichkeit, sondern auch die Kapazität der Heparinbindung verstärkt wurde. Die Erweiterung der Heparinbindestelle um basische Motive KHK und RKR ähnelt dem durch Wuerzler et al., 2004 veröffentlichten Ansatz.

Um die Hydrophilität dieser Variante zu erhöhen, wurden auch hier basierend auf einer *in silico* AggreScan-Analyse sieben Punktmutationen eingeführt (vgl. Tab. 18), die nicht in die Rezeptorbindung involviert sind. Lediglich ein *aggregation hot spot* (AHS), zentriert um die AS 35₊₈ (übereinstimmend mit der AS 35 des reifen BMP-2 und AS 316 des präproBMP-2), blieb erhalten. Es würde zwar die Möglichkeit bestehen, auch an dieser Position analog zu BMP-2-10M eine hydrophile Aminosäuresubstitution zur Eliminierung des AHS durchzuführen, z.B. Ala→Asn, jedoch würde das gleichzeitig eine Bindung des BMP-2 an den BMPR-II Rezeptor verhindern und damit die Bioaktivität des Konstrukts in Frage stellen [Sebald et al., 2004, Kirsch et al., 2000].

7.2 Lösliche Expression und Aufreinigung von BMP-2-Varianten

7.2.1 Lösliche Expression von BMP-2-Varianten in *E. coli*

Ursprünglich wurde hBMP-2 (human) durch ein komplexes, sowie anspruchsvolles und zeitintensives Verfahren aus Knochenmatrices isoliert [Urist, 1965, Urist, et al., 1984, Wang et al., 1988]. Das auf diese Weise gewonnene allogene Material muss jedoch als potentiell gesundheitsschädlich eingestuft werden [Kirker-Head, 2000]. Die Ausbeute an biologisch aktivem BMP-2 lag zudem lediglich bei 1-3 µg/kg Knochen.

Heutzutage kann die rekombinante Produktion therapeutischer Proteine grundsätzlich im pro- bzw. eukaryotischen System erfolgen, wobei beide sowohl Vor- als auch Nachteile bei der rekombinanten Expression von Proteinen mit sich bringen. Als wesentlicher Vorteil für die Darstellung im eukaryotischen Wirt ist die Produktion von Proteinen mit humanspezifischem, postrationalem Modifikationsmuster zu nennen. Dabei wird das gewünschte Protein direkt in seiner nativen Form erhalten, jedoch in relativ geringen Ausbeuten. So konnte durch Suo et al., 2006 zum Beispiel natives BMP-2 in transgenen Tabakpflanzen produziert werden (1 mg/kg Blattmasse, ca. 0.02 % des löslichen Gesamtproteins). Weitere eukaryotische

Expressionssysteme für die Produktion von diagnostisch genutztem oder medizinisch eingesetztem BMP-2 sind u.a. Insektenzellen, Insektenlarven oder sogar Säugerzelllinien [Hammonds et al., 1991, Israel et al., 1992, Ishida et al., 1994, Maruoka et al., 1995]. Letztendlich entscheidend aber ist, dass de facto nur Säugetierzellen in der Lage sind, auch humanspezifische Glykosylierungsmuster zu erzeugen [Harrison & Jarvis, 2006]. Bei der Produktion von biopharmazeutischen Proteinen in Säugerzelllinien muss jedoch ein großes Augenmerk auf die Vermeidung von Kontaminationen gelegt werden. Zudem verbieten viele religiöse Zweige jegliche Behandlung mit Produkten tierischen Ursprungs [Eriksson et al., 2013, Owczarek et al., 2019]. Zu den limitierenden Schritten bei der Nutzung des eukaryotischen Systems kann zudem grundsätzlich der aufwändige Produktionsprozess genannt werden, der ein *upscaling* in der Proteinproduktion massiv erschwert und extrem hohe Kosten mit sich bringt [Owczarek et al., 2019].

Da das BMP-2 keine posttranslationale Modifikation (Glykosylierung) benötigt [Ruppert et al., 1996], um hochaffin an seine Rezeptoren BMPR-IA oder BMPR-IB zu binden und bioaktiv zu sein, scheint die Biosynthese des BMP-2 in einem *E. coli*-System sehr attraktiv zu sein. Anders stellt sich diese Situation jedoch für das BMP-6 dar, welches nach der rekombinanten Herstellung in *E. coli* durch die fehlende Glykosylierung nicht an den für die Signalgebung essentiellen ActR-I-Rezeptor binden kann. Dieser ist jedoch für eine Aktivierung der hier folgenden Signalkaskade unerlässlich [Saremba et al., 2008].

BMP-2 ist im wässrigen Zellinneren von *E. coli* im nanomolaren Bereich prinzipiell löslich und das Protein ist hinsichtlich seiner Faltungstabilität thermisch enorm robust [siehe Beispiele Kübler et al., 1998, Bessho et al., 2000, Quaas, et al., 2019]. Das größte Problem seiner Überexpression im prokaryotischen Wirt liegt dennoch in seiner Struktur, da jede Untereinheit durch drei ineinander verschränkte Disulfidbrücken (Cystinknoten) stabilisiert ist. Biologisch aktiv ist hauptsächlich das BMP-2-Homodimer (Heterodimere zeigen aber auch Funktionalität [Lavery et al., 2008]), welches durch eine weitere Disulfidbrücke zwischen den Untereinheiten entsteht. Entsprechend gelingt es schnell, kostengünstig und effizient BMP-2 (hohe Expressionsraten) in einem *E. coli*-Expressionssystem zu produzieren. Allerdings kann die Ausbildung korrekt verknüpfter Disulfidbrücken, die sowohl mit der nativen Proteinkonformation als auch seiner biologischen Aktivität einhergeht, aufgrund der stark reduzierenden Bedingungen in *E. coli* (Cytoplasma) nur schwer verwirklicht werden. Ein weiteres Hindernis für die Produktion von BMP-2 im prokaryotischen Wirt stellt die hydrophob geprägte Primärstruktur dieses Zielproteins dar. Das Resultat heterologer BMP-2 Expression in *E. coli* ist die vermehrte Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten im bakteriellen Cytoplasma (*inclusion bodies*) [González-Montalbán, 2007]. Knaus & Sebald, 2001 zeigten in funktionellen Tests mit BMP-2-Homodimeren, dass deren Aktivität maßgeblich von der Bindung an zwei Typ II-Rezeptoren abhängt. Eine partielle Bioaktivität wird bei Bindung von BMP-2-Dimeren an mindestens einen Typ I-Rezeptor (Bindungsepitop wird durch

überlappende Bereiche zweier Monomer-Untereinheiten gebildet) beobachtet. Jedoch sind weder BMP-2-Aggregate noch BMP-2-Monomere alleine in der Lage die Signalkaskade zu aktivieren. Um nun aus diesen *inclusion bodies* biologisch aktives BMP-2 zu gewinnen, muss eine *in vitro*-Rückfaltung erfolgen. Diese besteht aus einer Reihe experimenteller Schritte, indem das BMP-2 zunächst aus den *inclusion bodies* extrahiert wird, gefolgt von einer oxidativen *in vitro*-Renaturierung, die unverzichtbar für die wichtige Dimer-Struktur ist, sowie einem mehrstufigen Aufreinigungsverfahren [Fischer et al., 1993, Vallejo et al., 2002, Middelberg et al., 2002, Hillger et al., 2005, von Einem et al., 2010, Zhang et al., 2010, Zhang et al., 2011]. Diese aktuell genutzte Strategie stellt sich leider als sehr zeitintensiv dar, was ein *upscaling* erschwert. Im Hinblick auf eine Reihe von Komplikationen, die in diesem Prozess auftreten können, wie beispielsweise die sehr langsam voranschreitende Dimerisierung während des Renaturierungsprozesses (Tage/Wochen), der Zielproteinverlust (durch das mehrstufige Reinigungsprotokoll verursacht), der mögliche Einsatz von toxischen Chemikalien (Guanidiniumhydrochlorid, Harnstoff, Lithiumsulfat) oder auch Detergenzien, wie CHES oder CHAPS (unerwünscht bei der Gewinnung von BMP-2 für den medizinischen Einsatz) [Ruppert et al., 1996, Vallejo et al., 2002, von Einem et al., 2010], wurde im Zuge dieser Arbeit ein Alternativweg für den existierenden und aktuell genutzten Prozess entwickelt.

Zu Beginn wurden mit TrxA-BMP-2-10M Expressionsstudien (in *E. coli* BL21 (DE3)) durchgeführt, um zu belegen, dass das Einbringen von mehreren Punktmutationen in die *bmp-2*-Gensequenz sich nicht negativ auf die rekombinante Herstellung dieses Wachstumsfaktors auswirkt. Die Löslichkeit des BMP-2 wird durch TrxA, das hier als Löslichkeitsvermittelnder Fuionsanhang fungiert, begünstigt [Yasukawa et al., 1995, Hammarström et al., 2006]. Ergänzend wird durch TrxA die Bildung von *inclusion bodies* während einer rekombinanten Produktion in *E. coli* verhindert [LaVallie et al., 2000]. Im Zuge dieser Versuche konnte eine sehr gute Expression von TrxA-BMP-2 beobachtet werden, wobei das monomere BMP-2 im Vergleich zum Dimer überpräsentiert vorlag (s. Abb. 8). Diese Studien beweisen zudem, dass die gewählte Mutationsstrategie eindeutig die Löslichkeit des Wachstumsfaktors unterstützt und selbst Disulfidbrücken nach einer Expression in einem prokaryotischen Expressionssystem (*E. coli* BL21 (DE3), reduzierendes Milieu) generiert werden, was jedoch bei einer fehlenden Proteinsekundär und -tertiärstruktur nicht möglich wäre [Besso et al., 2000, Quaas et al., 2019].

Es wurden zunächst unterschiedliche *E. coli*-Expressionsstämme getestet (*E. coli* BL21 (DE3), OrigamiTM B (DE3), SHuffle[®] T7), um die hydrophylisierten Varianten BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M herzustellen. In *E. coli* BL21 (DE3), dem Standardstamm für heterologe, rekombinante Expressionen von Proteinen, konnte zunächst keine detektierbare Expression von dimerem BMP-2-2Hep-7M nachgewiesen werden. Zwar gibt es einige Publikationen, die diesen Wirt als Expressionsstamm für die Synthese von BMP-2 postulieren, allerdings resultieren alle diese Versuche in der Herstellung von unlöslichem BMP-2 in Form von *inclusion bodies*, deren Problematik bereits mehrfach beschrieben wurde [Vallejo et al., 2002,

Middelberg, 2002, Hillger et al., 2005, von Einem, 2010, Zhang et al., 2010]. Der oben beschriebene Cystinknoten in BMP-2-Monomer sowie seine oxidative Verknüpfung sollen dafür noch einmal ursächlich erwähnt werden. Eine weitere mögliche Ursache für die schlechte Expression der BMP-2-Variante (BMP-2-2Hep-7M) liegt also im vorherrschenden, reduzierenden Milieu (reduzierendes Redoxpotential verursacht durch das Bakterien-eigene Thioredoxin- und Glutaredoxin-System) des bakteriellen Cytoplasma [Prinz et al., 1997, Bessette et al., 1999], das die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert [Gilbert, 1990] und dadurch die Aggregation disulfidhaltiger Proteine während einer cytoplasmatischen Expression begünstigt [Pollitt & Zalkin, 1983, Derman & Beckwith, 1991]. Sicherlich hatte an dieser Stelle auch der in BMP-2-2Hep-7M nicht komplett eliminierte AHS (*aggregation hot spot*, s. Abb. 4) und damit die leicht erhöhte Aggregationsneigung dieser Variante einen gewissen Einfluss auf die schlecht detektierbare lösliche Expression in *E. coli* BL21 (DE3).

Um nun die lösliche Herstellung der BMP-2-Varianten in *E. coli* zu verbessern und weiter zu steigern, besteht die Möglichkeit spezialisierte *E. coli*-Stämme zu testen. So wurde zunächst als potentieller Wirt für die heterologe Proteinexpression von hydrophilisierten BMP-2-Varianten *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) getestet. Obwohl dieser Expressionsstamm die schnellere Faltung von aggregationsempfindlichen Proteinen begünstigen sollte, hatte die niedrige Expressionstemperatur in diesem System (13 °C), sowie die gleichzeitige Coexpression von Chaperonen (Cpn60 und Cpn10; Spezifität dieses Expressionstammes) [Ferrer et al., 2003, Lebendiker & Danieli, 2014] keinen positiven Einfluss auf die Proteinbiosynthese von BMP-2-10M. Anschließend wurden zwei Expressionstämme (*E. coli* Origami™ B (DE3) [Xiong et al., 2005]), SHuffle® T7 [Lobstein et al., 2012]) genutzt, in denen vereinzelte Komponenten der das Redoxpotential kontrollierenden Einheiten, wie *trx*B (kodiert für Thioredoxin-reduktase) oder auch *gor*A (kodiert für Glutathionreduktase), genetisch so verändert sind, sodass in Form einer heterologen Proteinexpression Disulfidbrücken realisiert werden können. Entsprechend könnten dort auch Proteine mit Disulfidbrücken hergestellt werden. Ergänzend verfügt der SHuffle® T7-Stamm über die Möglichkeit einer (Über-)expression von *cDsbC* (Disulfidisomerase C), wodurch im bakteriellen Cytoplasma eine Disulfidisomeraseaktivität vorherrscht [Nakamoto & Bardwell, 2004, Lobstein et al., 2012] und gleichzeitig die Bildung korrekt gefalteter/nativer Disulfidbrücken (BMP-2) begünstigt wird [Scheufler et al., 1999]. Letztendlich konnte bei der Expression von BMP-2-2Hep-7M in *E. coli*-SHuffle® T7 durch die Anpassung der Expressionstemperatur auf 34 °C und der Induktion mit 1 mM IPTG die beste Ausbeute an löslichem, dimerem BMP-2-2Hep-7M erzielt werden [Masterarbeit/Heinks, 2019]. Jedoch kann dieser Erfolg, dimeres BMP-2 in löslicher Form direkt zu produzieren, nicht allein dem speziellen Expressionsstamm zugeschrieben werden, da die gentechnisch umgesetzte Hydrophilisierungsstrategie (sieben hydrophile Mutationen) und die Verdopplung der Heparinbindestelle in BMP-2-2Hep-7M ebenfalls dazu beigetragen hat, die Ausbeute an löslichen Proteinen signifikant zu steigern. Die spezielle Mutationsstrategie, die auch bei

BMP-2-10M angewendet wurde (AHS-Eliminierung durch 10 hydrophile Mutationen, s. Abb. 4), resultierte in einem deutlich höheren Ertrag an löslichem, dimerem BMP-2-10M. Anders jedoch als bei BMP-2-2Hep-7M wurden die besten Expressionsergebnisse in *E. coli* BL21 (DE3), bei 30 °C und einer Induktorkonzentration von 1 mM IPTG erzielt (s. Tab. 19 und Tab. 20). Zwar lieferten *E. coli* Origami™ B (DE3) und SHuffle® T7 auch vielversprechende Ergebnisse, trotzdem war dabei die Ausbeute an nativer Proteinspezies (dimeres BMP-2-10M) deutlich niedriger (s. Tab. 19).

7.2.2 Aufreinigung von BMP-2-Varianten aus *E. coli*

Wie zuvor bereits erläutert, basieren die meisten veröffentlichten BMP-2-Aufreinigungsprotokolle auf der Renaturierung der aus der Zelle zuvor isolierten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*), die dadurch in ihre biologisch aktive Form überführt werden konnten. Alle zusammen skizzieren die Notwendigkeit einer Rückfaltung des BMP-2 im Anschluss an eine Produktion des Proteins im prokaryotischen Wirt (s. Abb. 36). Mit den hier vorgestellten Daten (s. Punkt 4.2.2, 4.2.3) wurde bewiesen, dass es bei hydrophilisierten BMP-2-Varianten, wie BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M möglich ist, BMP-2 sowohl löslich in *E. coli* zu exprimieren als auch ohne Renaturierungsmethoden ein nativ gefaltetes Protein zu erhalten. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Reinigungsprotokoll (s. Absatz 4.2.3) wurde so modifiziert, dass mit einem geringen Arbeits- und Zeitaufwand kostengünstig natives BMP-2 hergestellt werden kann. Die Reinigungsstrategie basierte auf der Kombination von IEC (Ionenaustauschchromatographie) mit Affinitätschromatographie an Heparinsepharose sowie nachgeschalteter Gelpermeationschromatographie.

Bei Heparin handelt es sich um ein Mitglied der Glykosaminoglykane-Familie [Bolten et al., 2018]. Das lineare Polymer besteht aus polyanionischen Kohlenhydraten, die hoch sulfoniert sind [Perlin & Mazurek 1969, Esko & Linhardt, 2009], wodurch es einerseits als Affinitätsmaterial bei Chromatographieverfahren und andererseits als Kationenaustauscher eingesetzt werden kann [Xiong et al., 2008, Guan & Chen, 2014]. Für die Aufreinigung der BMP-2-Varianten war zum einen die natürliche Heparinbindestelle (N-terminal) von Vorteil und zum anderen die gesteigerte Affinität des BMP-2-2Hep-7M, bei dem die Heparinbindestelle verdoppelt wurde. Heparin ist außerdem dafür bekannt, dass es mit den polykationischen Strukturen vieler anderer Proteine (u.a. DNA-RNA-bindende Proteine) wechselwirkt. Dies führt dazu, dass es unmöglich ist in einem Reinigungsschritt ein heparinbindendes-Protein aus dem Zelllysate aufzureinigen [Bolten et al., 2018]. Auch dies wurde während der Aufreinigung von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M beobachtet. So enthielten die nach Ionenaustausch-/Affinitätschromatographie zunächst gewonnenen Proteinfractionen zahlreiche Kontaminationen mit *E. coli*-typischen Fremdproteinen (s. SDS-Tricin-PAGE in Abb. 11 und Abb. 13), die einen ergänzenden Reinigungsschritt über Gelpermeationschromatographie unausweichlich machten. Final konnten jedoch letzte

verunreinigende Mengen an endogenen ribosomalen *E. coli*-Proteinen (z.B. S3, S4, L2, L15) oder bakterielle Translationsinitiationsfaktoren (IF-3) (Daten nicht gezeigt, siehe auch [Heinks & Hettwer et al, 2021]) nicht komplett entfernt werden. Nichtsdestotrotz bietet die erzielte Ausbeute der nativen Proteinspezies (14-15 mg/L BMP-2-10M, 9-10 mg/L BMP-2-2Hep-7M) eine gute Basis für eine Überführung in einen größeren Produktionsmaßstab.

Die Methode der Heparinaffinitätschromatographie ist nicht nur sehr einfach in der Anwendung, sondern bringt auch den Vorteil mit sich, dass vor allem bei heparinbindenden Proteinen keine weiteren aufreinigungsunterstützenden Fusionsanhänge benötigt werden. Diverse andere rekombinante Proteine, wie z.B. FGF-2 [Seeger & Rinas, 1996], VEGF [Fiebich et al., 1993] oder auch Thrombin [Nordenman & Björk, 1977], konnten bereits erfolgreich mit Hilfe einer Heparinaffinitätschromatographie aufgereinigt werden. Trotzdem stellt die Aufreinigung therapeutischer Proteine durch eine Applikation über Heparinaffinität im Downstreamprozess einen großen Nachteil dar, da es sich häufig um ein Material tierischen Ursprungs handelt (Schlachthausabfälle, die mit Viren oder Prionen kontaminiert sein können) [van der Meer et al., 2017, Bolten et al., 2018]. Aus diesem Grund ist der Einsatz einer Heparinsepharosechromatographie für die Aufreinigung rekombinanter Proteine unter Einhaltung von GMP-konformen Bedingungen nicht anwendbar [Bolten et al., 2018]. Im Falle von BMP-2 existieren allerdings Publikationen, die auf alternative Aufreinigungsmethoden eingehen. So gelang es Sharapova et al., 2010 das aus *inclusion bodies* renaturierte BMP-2 mittels Kationenaustauschchromatographie (S-Sepharose FastFlow) aufzureinigen. Dieses war nicht nur biologisch aktiv, sondern verfügte zudem über eine 95%-ige Reinheit. Eine weitere Alternative für die Aufreinigung von BMP-2 ohne den Einsatz von Heparinsepharose stellte Guo et al., 2012 vor. In dieser Studie wurde ein biologisch aktives und zu 95 % reines Protein gewonnen (Zwei-Schritte-Reinigungsprotokoll, HIC (Hydrophobe-Interaktionschromatographie)). Die vorgestellten alternativen Beispiele zeigen einen ähnlichen Aufreinigungsgrad des BMP-2 im Vergleich zur Heparinsepharosechromatographie (Ruppert et al., 1996, Quaas et al., 2019, haben zu 100 % reines BMP-2 erhalten), aber auch zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen. Es sollte jedoch an dieser Stelle festgehalten werden, dass es einen bedeutenden Unterschied zwischen den existierenden Aufreinigungsmethoden des BMP-2 im Vergleich zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit gibt. Die im Rahmen dieser Arbeit exprimierte BMP-2-Mutante liegen direkt in *E. coli* als lösliche Proteine vor und müssen nicht aus *inclusion bodies* renaturiert werden. Das bedeutet wiederum auch, dass das renaturierte BMP-2 von Anfang an eine höhere Reinheit aufwies und sich im Vergleich zu den BMP-2-Varianten leichter und besser aufreinigen ließ, was letztendlich die geringen Verunreinigungen des BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M erklären würde. Des Weiteren liegen keine Publikationen vor, bei denen die Anwendbarkeit dieser alternativen Methoden an löslichen, heparinbindenden Proteine getestet wurden.

Lysate aufgeschlossener *E. coli*-Kulturen erhalten neben dem Zielprotein in hoher Menge stets auch eine Vielzahl von *E. coli*-eigenen Proteinen. Um die Gefahr von unspezifischen Proteininteraktionen zu verringern und einer unspezifischen Aggregatbildung vorzubeugen, wurde im Anschluss an den Zellaufschluss ein Löslichkeitsvermittler eingesetzt. Die Supplementierung des Zelllysats beider BMP-2-Varianten mit 0.5 M L-Arginin steigerte signifikant deren Löslichkeit. Sowohl für BMP-2-10M als auch für BMP-2-2Hep-7M wurde L-Arginin bereits direkt nach der Lelullyse zugesetzt. Allerdings konnte bei der Variante BMP-2-10M während anschließender Aufreinigungsschritte darauf verzichtet werden, was mit der kompletten Reduzierung der Aggregationskapazität durch die Eliminierung aller *aggregation hot spots* (AHS) begründen lässt (s. Abb. 4). Eine Zugabe von 0.5 M L-Arginin im Wasch- und Elutionspuffer resultierte im Falle von BMP-2-10M in einem signifikanten Anstieg coelulierender *E. coli*-Proteine in den BMP-2-10M-haltigen Elutionsfraktionen. Die weniger hydrophile BMP-2-Variante BMP-2-2Hep-7M zeichnet sich durch einen AHS, zentriert um AS 35+8, (AS 316 des präpro-BMP-2), aus. Entsprechend musste bei ihrer Aufreinigung L-Arginin während des Aufreinigungsprozesses mittels einer Heparinsepharosechromatographie zusätzlich im Elutionspuffer (s. auch Abschnitt 4.2.3.2) eingesetzt werden. Der Solubilisierungseffekt des L-Arginins konnte neben den hier präsentierten Daten auch in den Arbeiten u.a. durch Tsumoto et al., 2004, Baynes et al., 2005, Arakawa et al., 2007 und Chen et al., 2008, beobachtet werden. Dennoch ist der genaue Wirkmechanismus der Lösungsvermittlung durch L-Arginins bis heute nicht genau geklärt. Die Menge an eingesetztem L-Arginin, das normalerweise zur Lösungssteigerung eingesetzt wird, variiert je nachdem, welches Zielprotein isoliert wird [Yamaguchi & Miyazaki, 2014, Arakawa et al., 2017].

Bei der Anwendung von L-Arginin zur Förderung der Disaggregation von Proteinkomplexen wurde eine Limitierung in Bezug auf die eingesetzte Endkonzentration von 1 M beobachtet. Eine zu hohe L-Arginin-Konzentration verringerte die Aufreinigungseffizienz des BMP-2-2Hep-7M mittels Heparinsepharose (5 ml HiTrapTM Heparin HP Säule) deutlich [Masterarbeit/Heinks, 2019]. L-Arginin in dieser hohen Konzentration stört die Bindung hydrophilisierter BMP-2-Varianten an die Chromatographiesäule. Die Zielproteine binden zudem schwächer an Heparinsepharose und eluieren bereits bei sehr niedriger Ionenstärke von der Säule (Daten nicht gezeigt).

Während der Optimierung der Aufreinigungsprotokolle wurde festgestellt, dass für die Variante BMP-2-Hep-7M eine komplett andere Pufferzusammensetzung genutzt werden musste, als das bei BMP-2-10M zuvor der Fall war [Masterarbeit/Heinks, 2019]. So konnte die dimere Form von BMP-2-10M in 20 mM Phosphatpuffer, 0.5 M NaCl, pH 7.4 effektiv, sauber > 90 % und einem $R_h \sim 2.8 \pm 0.219$ nm (DLS-Analyse) isoliert werden. Für die Isolierung von BMP-2-2Hep-7M war der Wechsel auf Tris-basierte Puffer erforderlich. Eine Bindung dieser BMP-2-Variante an Heparinsepharose verlief optimal unter sauren Bedingungen (pH 5.3). Für die

Elution wurde ein basischer pH von 8.8, sowie eine leicht erhöhte Ionenstärke genutzt (50 mM Tris pH 8.8, 0.5 M NaCl, 0.5 M L-Arginin, s. Abschnitt 7.2.2). Nur mit dieser Variation des Reinigungsschematas war es letztendlich überhaupt möglich, dimere BMP-2-2Hep-7M mit einem kleinen R_h (Hydrodynamischer Radius = gemäß R_h von Wt-BMP-2*) von ~4-8 nm [s. Heinks & Hettwer et al, 2021] zu gewinnen. Die ermittelten hydrodynamischen Radien lassen sich u.a. durch eine stabile Dimerbildung (= erniedrigte Aggregatbildung) durch den gewählten basischen pH-Wert erklären. Dieser fördert eine schnellere Ausbildung von Disulfidbrücken und steigert somit zeitgleich Dimerisierungsraten der hydrophilisierten BMP-2-Variante. Das bei den Varianten eingesetzte L-Arginin (0.5 M) fördert als Co-Chaperon nicht nur die Löslichkeit [Tsumoto et al., 2004], sondern minimiert im Fall von BMP-2-2Hep-7M als Additiv im Chromatographiepuffer unerwünschte und unspezifische Interaktionen des Zielproteins mit der Chromatographiesäule, wodurch eine verbesserte Trennleistung erzielt wird [Arakawa et al., 2007]. Als letzter wichtiger Punkt, der einen positiven Einfluss auf die Aufreinigungseffizienz der BMP-2-Varianten hat, ist die niedrig gewählte NaCl-Konzentration im Elutionspuffer (0.5 M) [Masterarbeit/Heinks, 2019]. Diese senkt klar die Aggregationsneigung des BMP-2-Muteins.

Im Rahmen der Arbeiten dieser Dissertation wurde außerdem untersucht, ob der Zusatz von Harnstoff im Reinigungsprotokoll die Ausbeute und Reinheit der angestrebten BMP-2-Muteine nach Expression in *E. coli*-basierten Wirten steigern kann. Zahlreiche Publikationen verdeutlichen, dass Harnstoff Protein-Proteininteraktionen verringert und so eine Verbesserung der Aufreinigungseffizienz bei vielen rekombinant hergestellten Proteinen inkl. des BMP-2 erreicht werden kann [Khademi & Mostafaie, 2010, von Einem, 2010]. Harnstoff als chaotropes Additiv hemmt nicht nur die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Proteinen [Zou et al., 1998, Stumpe & Grubmüller, 2007, Canchi et al., 2010], sondern ist auch in der Lage, die Ladungsverteilung von Proteinen zu verändern [Hou et al., 2010], was letztendlich Konformationsänderungen begünstigt. Dies hat einen Einfluss auf das Elutionsverhalten der jeweiligen zu analysierenden Proteine während der Chromatographie. Bei Variante BMP-2-10M zeigte der Zusatz von 6 M Harnstoff nur eine minimale Zunahme der BMP-2-10M-Proteinbandenintensität (Monomer/Dimer) in der SDS-Tricin-PAGE (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich dazu verursachte die Addition von Harnstoff (6 M) während der Elution von BMP-2-2Hep-7M einen deutlich höheren Anteil an Fremdproteinen (SDS-Tricin-PAGE), die vor der BMP-2-Variante eluiert wurden, zudem aber auch besser aufgereinigte BMP-2-2Hep-7M-Fractionen, sowie intensivere Proteinbanden in der SDS-Analytik (Daten nicht gezeigt). Eine ergänzende Analyse dieser Elutionsfraktionen mittels DLS wies hingegen einen mittleren hydrodynamischen Radius von ca. 10-20 nm auf (Daten nicht gezeigt), was auf die noch ungeklärten Effekte des Harnstoffes zurückzuführen sein könnte. Aus diesem Grund wurde auf den Zusatz von Harnstoff im Aufreinigungsverfahren hydrophilisierter BMP-2-Varianten verzichtet.

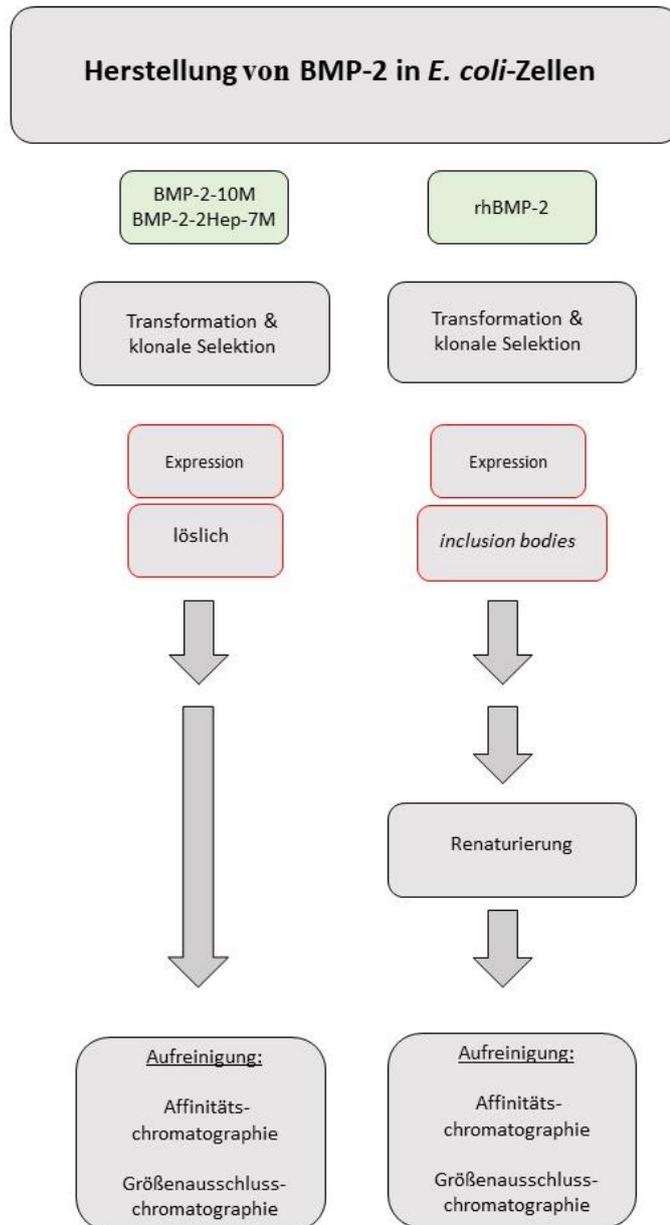


Abb. 36: Vergleichende Darstellung der Aufreinigungsabläufe von rhBMP-2 und hydrophilisiertem BMP-2

7.3 Biophysikalische Charakterisierung der BMP-2-Varianten

7.3.1 Charakterisierung von BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M und Wt-BMP-2 anhand von Massenspektroskopie

Um eindeutig zu belegen, ob es möglich ist BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M korrekt und in richtiger Länge im prokaryotischen Wirt (*E. coli*) zu exprimieren, wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Die MALDI-MSD-Analytik ermöglicht es durch

Fragmentierung des POI in einer Ionenquelle Rückschlüsse auf deren N- und C-terminale Aminosäuresequenz zu gewinnen, die mit einer Zielsequenz verglichen werden müssen (s. Absatz 3.2.4.2.). Wie in Abb. 15 veranschaulicht, wurden durch die MALDI-TOF-ISD-Analyse (durchgeführt an der FUB), sequenzspezifische Fragmente nachgewiesen (N-terminale c-Ionen (c8-c25) für BMP-2-10M und c8-c25 für BMP-2-2Hep-7M), sowie C-terminale (z+2)-Ionen (z-18-z30) für BMP-2-2Hep-7M (s. auch Heinks & Hettwer, 2021) die belegen, dass beide Termini der BMP-2-Varianten korrekt inkl. der eingebrachten Mutationen und der verdoppelten Heparinbindestelle des BMP-2-2Hep-7M (N-terminus) exprimiert wurden. Ergänzend konnte durch ESI-QTOF-MS-Analysen, durchgeführt am Forschungszentrum Jülich, die Gesamtmolekülmasse (inkl. N-Terminus und Methionin aus *E. coli*-Expression) der dimeren Spezies von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M mit hoher Präzision bestätigt werden. In Summe belegen die erhobenen Daten, dass die angestrebten Moleküle tatsächlich hergestellt wurden.

7.3.1.1 Circular dichroismus-Spektroskopie

Um mögliche Unterschiede der vorhandenen Sekundärstrukturelemente der Varianten im Vergleich zum Wt-BMP-2 zu gewinnen und um einen ersten allgemeinen Einblick in die Sekundärstruktur von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M zu erhalten, wurden zunächst CD-Spektren im fernen UV-Bereich aufgenommen (s. Abschnitt 5.2.1). Über Circular dichroismus-Spektroskopie konnte jedoch keine eindeutige Aussage über die Sekundärstruktur der BMP-2-Varianten getroffen werden. Für die Variante BMP-2-2Hep-7M waren lediglich Hinweise für das Vorhandensein gefalteter Sekundärstrukturelemente (positives Signal bei 190 nm, angedeutetes Minimum bei 220 nm) detektierbar. Die CD-Spektren von BMP-2-10M belegten vornehmlich die Existenz unstrukturierter Konformation (*Random coil*, Minimum ~195 nm, Plateau bei Null angenähert von 220-240 nm). Beim direkten Vergleich der Spektren mit dem Wt-BMP-2 waren auf den ersten Blick erwartungsgemäß einige Unterschiede zu erkennen. Die eingesetzte Referenz (Wt-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) wies unter den gewählten Versuchsbedingungen (Resolubilisierung nach Gefriertrocknung in 1 mM HCl) einen gewissen Anteil einer β -Faltblatt-Struktur auf, der mit einer α -Helix überlappt (breites Minimum von 220-208 nm), sowie einen unstrukturierten Bereich bei ~196 nm. Ein Minimum bei 218 nm kann als ein eindeutiger Hinweis für ausgeprägte Sekundärstrukturelemente gewertet werden. Die CD-Spektren der BMP-2-Varianten erscheinen auf den ersten Blick sehr ernüchternd. Allerdings muss an dieser Stelle auch bedacht werden, dass der Wildtyp-BMP-2 im Vergleich zu den neu entwickelten Proteinvarianten bereits besser charakterisiert ist und seine Herstellung hinsichtlich einer langen Stabilität bereits optimiert wurde. Sicherlich bedarf die Aufbereitung der Varianten nach GPC noch einiger Optimierungsschritte, wie beispielsweise die Länge der Inkubationszeit nach Resolubilisierung. Diese hat eine erhebliche Auswirkung auf die Konformationseinstellung von BMP-2-2Hep-7M, die deutlich sichtbar einige Stunden benötigt.

So sank der Anteil nicht nativer Strukturanteile dieser Variante durch eine längere Inkubationszeit (24 h statt 20 min) nach dem Lösen der Probe in 20 mM Phosphat-Puffer pH 7.4 signifikant (0.3 %-0.16 %, Dekonvolution der Daten nach CD-Spektroskopie mit DichroWeb-Programm (CDSSTR-Auswertalgorithmus, Datensatz Set 7) [Sreeraman & Woody, 2000]. Ob dieser Effekt auch bei BMP-2-10M auftritt, muss noch untersucht werden. Klar ist jedoch, dass eine Anpassung der Versuchsbedingungen (Puffer, pH-Wert, Zeit) für die Resolubilisierung der BMP-2-Varianten im Zuge einer systematischen Analyse durchgeführt müssen, um eine bessere Vergleichbarkeit mit dem Wildtyp gewährleisten zu können. Dabei ist es vorrangig wichtig, dass das Protein seine native Konformation einnehmen kann.

CD-spektroskopische Analysen zur Datenaufbereitung mit dem DichroWeb-Analyse tool (<http://dichroweb.cryst. bbk.ac.uk/ html/home.shtml>), CDSSTR Set 7 [Sreerama & Woody, 2000] verbesserten nur minimal die Datenlage. Zwar wurden die so identifizierten Sekundärstrukturelemente (β -Stränge 1 und 2, Turn, unstrukturierte Anteile) der BMP-2-Varianten und des Wt-BMP-2 in ähnlicher Größenordnung detektiert, jedoch wurde für die Referenz kein prozentueller Anteil an Helix 1 und Helix 2 detektiert. Es kann nur spekulativ eine Aussage über die möglichen Gründe getroffen werden. Sicherlich haben die gewählte Methode und die Auswerteparameter einen Einfluss auf die Berechnung der prozentuellen Anteile an Sekundärstrukturelementen von Proteinen, wodurch eine softwarebasierte Quantifizierung in aller Voraussicht nach als kritisch anzusehen ist. Ein möglicher Grund kann eventuell die Überlappung des β -Stranges mit der α -Helix sein, die bereits im CD-Spektrum (breites Minimum zwischen 220 nm-208 nm, s. Abb. 20) erfasst wurde.

Trotz der Abweichung der Analysedaten wurden zusammenfassend ähnliche Strukturelemente der hier neu konstruierten BMP-2-Varianten im Vergleich zum Wt-BMP-2 ermittelt. Somit liegt ein erstes Indiz vor, dass die Proteinvarianten zumindest anteilig nativ gefaltet (korrekt verknüpfte Dimerstruktur) sind und dadurch womöglich erste geringe physiologische Aktivität zeigen könnten, was zunächst in Zellassays zu beweisen war (s. Abschnitt 6).

Möglicherweise ist es im Zuge dieser Arbeit erstmalig gelungen, die thermische Faltungstabilität des in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 5.0 gelösten Wildtyp-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) darzustellen. Bei mehrfachen CD-Messungen (n=10) konnte eine bei >60 °C temperaturabhängige Entfaltung eindeutig gezeigt werden (s. Abb. 22). Da jedoch in eigenen Experimenten mit dem Wt-BMP-2 (Konzentration >10 μ M, pH ≥ 3) erste Anzeichen von Aggregation beobachtet werden konnten (s. auch Abschnitt 5.3), sollte das Ergebnis aus der CD-Spektroskopie dennoch mit Vorsicht betrachtet werden. BMP-2 zeigt bei Konzentrationen >10 μ M bereits bei pH 3 (saurer Milieu) erste Aggregationstendenzen (s. Abschnitt 5.3). Bei physiologischem pH jedoch und einer Konzentration >1 μ M aggregiert das Protein irreversibel. Paradox klingt die Tatsache, dass in einem Komplex mit seinen Rezeptoren Wt-BMP-2 sowohl sehr stabil wie auch löslich ist (15 mg/ml in 500 mM NaCl/HEPES, pH 7.4, pers. Mitteilung durch Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg).

Entsprechend lässt sich Wt-BMP-2 bei saurem pH auch in gelöster Form gut lagern. Für die Sekundärstrukturanalyse muss beachtet werden, dass saure Lösungsumgebungen die Wasserstoffbrückenstruktur der Proteinhauptketten durch Protonierung stören, was die Aussagekraft im Sauren ermittelter CD-Spektren in Frage stellt (pers. Mitteilung durch Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg). Im Zuge dieser Arbeit war es jedoch de facto möglich, durch lange Inkubationszeiten für die Resolubilisierung, BMP-2 auch in Konzentrationen von $>10 \mu\text{M}$ bei einem pH 5.0 in Lösung zu bringen. Es ist anzunehmen, dass das Protein auch hier bereits aggregiert, allerdings nur lösliche Oligomere ausbildet. Größere Aggregate konnten zudem durch Zentrifugation entfernt werden. Auf diese Weise könnte es erstmalig gelungen sein, die thermische Stabilität von BMP-2 angenähert realistisch zu beschreiben. Um diese These der konzentrationsabhängigen Aggregatbildung näher zu charakterisieren, wurde eine Quantifizierung der Molekulargewichtsverteilung mittels DLS (dynamischer Lichtstreuung) und MDS (mikrofluidale Diffusionsanalyse) durchgeführt.

7.3.1.2 Quantifizierung der Molekulargewichtsverteilung

Die Therapie langwieriger Knochenfrakturen stellt seit Jahren ein großes Problem dar, da zum einen die Heilungstendenz durch limitierte Therapieformen nur sehr schwer zu beeinflussen ist und zum anderen die betroffenen Patienten von einer verzögerten Rekonvaleszenz betroffen sind. Störungen in der Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit von pathologischen Frakturen resultieren nicht selten in schwerwiegenden Komplikationen (Osteoporose, Osteopenie, Pseudoarthrose) [Ehnert et al., 2010, Dobeles et al., 2010, Tannoury & An, 2014]. Um diese Behandlungslücke zu schließen, besteht seit einigen Jahren die Möglichkeit, humanes rekombinantes BMP einzusetzen, um gezielt ein Frakturmodellierung durchzuführen. Dafür stehen zwei Arzneimittel zur Verfügung, das Diboterminalfa (InductOs®, BMP-2-Präparat, Medtronic BioPharma B. V.) und das Eptoterminalfa (Osigraft®, BMP-7-Präparat, Stryker) [Giannoudis & Tzioupis, 2005, White & Wallace, 2007, Nauth et al., 2009, El Bialy et al., 2017]. Im Präparat InductOs® wird BMP-2 für den Mediziner in gefriergetrockneter Form bereitgestellt. Dieser erhält entweder 4 mg oder 12 mg des Wachstumsfaktors in Pulverform, ein nicht näher spezifiziertes Lösemittel, sowie eine Kollagenmatrix für die Implantation [El Bialy et al., 2017]. Implantiert werden je nach medizinischer Indikation hohe supraphysiologische Dosen an BMP-2 ($\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ -Bereich), obwohl unter physiologischen Bedingungen lediglich ng-Mengen wirksam werden [Bessa et al., 2008]. Dies führt folglich zu der Frage, ob im medizinischen Einsatz wirklich nur BMP-2-Dimere generiert werden, die allein physiologisch relevant sind. Unklar bleibt dabei, ob gleichzeitig oder eventuell sogar überwiegend lösliche oligomere Formen des Proteins entstehen, die es nötig machen das Protein derart überzudosieren. Darüber hinaus ist bei dieser Applikationsart längst nicht geklärt, ob eine langsame Resolubilisierung aus solchen oligomeren Aggregaten für die immensen Nebenwirkungen des Medizinpräparates InductOs® (unter Einsatz von supraphysiologischen Dosen) mitverantwortlich ist, die u.a. ektope Knochenbildung, tumorogene Stimulation, aber

auch die Ausbildung von Antikörpern gegen rhBMP-2 oder das Kollagen aus der verwendeten Carriermatrix verursachen [Govender et al., 2002, Boerckel et al., 2011, Devine et al., 2012]. Um nun die hohe Aggregationstendenz von BMP-2 zu belegen und besser zu verstehen, wurde zunächst eine Quantifizierung der Partikelverteilung (Molekulargewichts-verteilung) des Wt-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) im Zuge dieser Arbeit näher untersucht. Ergänzend wurde neben der Ermittlung des Löslichkeitsverhaltens des Wt-BMP-2 auch die Hydrophilisierungsstrategie (direkte Expression löslicher/funktionaler BMP-2-Varianten), was den zentralen Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit darstellt, hierdurch charakterisiert. Durch die Kombination zweier Messmethoden (DLS, MDS, siehe auch Abschnitt 5.3) konnte auf diese Weise das Aggregationsverhalten des Wt-BMP-2 erstmalig über den großen Konzentrationsbereich von 0.5-100 μM erfasst werden. Aus den gewonnenen Resultaten geht klar hervor, dass hohe Konzentrationen das Aggregationsverhalten des Proteins fördern, wodurch die hier ermittelten hydrodynamischen Radien (R_h : 4.0 ± 0.213 nm, DLS-Analyse) deutlich über dem R_g (Röntgenstrukturanalyse, 2 nm) liegen. Es ist entsprechend anzunehmen, dass im oberen zweistelligen μM -Bereich (>50 μM) sowohl Dimer und lösliches Oligomer gleichzeitig vorliegen. Sinkt jedoch die Proteinkonzentration des Wt-BMP-2 mit der Verdünnung (Konzentrationsbereich 10-40 μM), dann kann mit zunehmender Tendenz auch isoliertes Dimer nachgewiesen werden, der R_h [nm] nähert sich R_g [nm]. Dieses Phänomen der Aggregationsneigung in konzentrierten Wt-BMP-2-Lösungen konnte auch durch Sundermann et al. beobachtet werden [Sundermann et al., 2020]. In diesen Experimenten sank zudem mit steigender Verdünnung ebenfalls die Größe der BMP-2-Aggregate.

Die Visualisierung der hydrodynamischen Radien des BMP-2 im niedrigen Konzentrationsbereich (0.5-10 μM) wurde komplementär zur DLS-Analytik mit der einer neuen Methode (MDS-Analytik, Fluidic Analytics, Cambridge/UK) verwirklicht. Tatsächlich gelang es damit erstmalig zu zeigen, dass in physiologisch eher relevanten Konzentrationen ein R_h [nm] erfasst wird, der dem R_g [nm] des Dimers aus Röntgenstrukturanalyse sehr nahekommt (Konz. 500 nM, R_h : 2.56 ± 0.101 nm). DLS und MDS sind geeignete komplementäre Methoden zur Bestimmung von Partikelgrößen im Konzentrationsbereich von 0.5-100 μM . Die Vergleichbarkeit von Messergebnissen beider Methoden (DLS vs. MDS) konnte bei einer Konzentration von 10 μM beobachtet werden. Hier wurden fast identische hydrodynamische Radien ~ 3.65 nm bestimmt.

In Summe ermöglichte die Kombination der Daten aus dynamischer Lichtstreuung und mikrofluidischer Diffusionsanalyse eine Charakterisierung des Oligomerisierungsverhalten von Wt-BMP-2. Aus den so ermittelten hydrodynamischen Radien des BMP-2 geht hervor, dass das Assoziationsgleichgewicht dieses Proteins mit einer hyperbolen Kurve beschrieben werden kann. Dabei scheint es, dass es im löslichen Bereich bei steigender Konzentration, einen Sättigungswert entgegenstrebt. Das konzentrationsabhängige Oligomerisierungsverhalten erinnert in seiner graphischen Form an eine hyperbole Kinetik (analog zu Michaelis-Menten).

und kann durch die Gleichung $y = (R_{h\infty} * k + R_{h0} * k) / k + k = (R_{h\infty} + R_{h0})/2$ beschrieben werden. Dieser liegt bemerkenswerterweise nah an dem in der Röntgenstrukturanalyse bestimmten R_g . Der zweite Wert dagegen sagt aus, wie groß der entsprechende Partikel bei der Annäherung an den Konzentrationsbereich von 100 μM ist. So wurde für den untersuchten Konzentrationsbereich (10-100 μM) ein lösliches Aggregat aus acht Monomeren angenommen. Der Radius geht mit der Potenz 3 in das Volumen einher und die ermittelten Werte dieser Arbeit sind um Faktor 2 größer, was ein Oktamer als lösliches Oligomer nahelegt. Weitere Aggregatbildung im mM-Bereich ist jedoch nicht ausgeschlossen und könnte somit die Bildung von *inclusion bodies* nach heterologer Expression des Wt-BMP-2 im prokaryotischen Wirt erklären. Die genaue mathematische Herangehensweise für das errechnete Assoziationsgleichgewicht wurde im Abschnitt 5.3.1 erläutert.

Somit ist es einleuchtend, dass Proteine in höheren Konzentrationen zur Aggregatbildung neigen. Allerdings können in einer Zelle problemlos Proteinkonzentrationen von 300 mg/ml erzeugt werden, ohne dass unerwünschte Aggregationsprozesse deren Physiologie in irgendeiner Weise stören. Dass das bereits im Konzentrationsbereich bis zu 100 μM beobachtete Oligomerisierungsbestreben wirklich charakteristisch für BMP-2 ist, konnte mit einem Referenzexperiment am löslichen Protein Lysozym gezeigt werden. Lysozym zeigt im Bereich von 1-100 μM konzentrationsunabhängig (MDS + DLS-Analyse) einen stabilen R_h (1.98 ± 0.135 nm), der mit dem Literaturwert von 1.9 übereinstimmt [Parmar & Muschol, 2009], s. Abb. 28). Die hyperbole Assoziationskurve von BMP-2 ist damit eine intrinsische Eigenschaft dieses Cytokins.

Sehr anschaulich erklärt diese Datenlage weiterhin, warum das BMP-2 in höheren Konzentrationen (>50 μM) nur bei einem pH=3 (1 mM HCl, als dimere Spezies) in Lösung geht. Die bei diesem pH-Wert auftretende starke Protonierung des Proteins begünstigt die Dissoziation eventueller Oligomere. Somit haben nicht nur die Konzentration, sondern auch die Ionenstärke sowie die Pufferbedingungen und -konditionen einen signifikanten Einfluss auf Oligomerisierungstendenz, was physikalische Instabilität und Aggregationsneigung zusätzlich klar bedingt [Schwartz et al., 2006, Luca et al., 2010].

Im Medizinpräparat InductOs® kommen hohe BMP-2-Konzentrationen (>100 μM) zum Einsatz. In Kombination mit den vorliegenden Messungen dieser Doktorarbeit muss in jedem Fall von einem Gemisch ausgegangen werden, bei dem oligomere Formen des physiologisch aktiven Dimers stark dominieren. Des Weiteren geht bereits aus der Publikation von Schwartz et al., 2006 hervor, dass dieses Arzneimittel nach Rekonstitution (2.5 mg/ml rhBMP-2-Lösung, pH 4.5, Firma Medtronic) teilweise als Aggregat vorliegt. Bedingt durch die gewählte Analyseform (GPC-Analyse) liegt hierbei die Dunkelziffer der nachgewiesenen Aggregate mit Sicherheit weit über den angegebenen 1.2 % [Schwartz et al., 2006], die möglicherweise nur einen minimalen Anteil an aggregiertem BMP-2 detektieren konnte [Philo, 2009]. Luca et al., 2010 zeigten zudem in ihrer Publikation, dass die Aggregationstendenz des BMP-2

(InductOs®-Präparat) u.a. auch maßgeblich durch den pH-Wert beeinflusst wird. So stiegen die Aggregatgrößen ($>1 \mu\text{m}$, DLS-Analyse) und die Tendenz zu deren Ausbildung durch die Erhöhung des pH von 4.5 auf 6.5. Eine mögliche Ursache dafür kann eine Exponierung hydrophober Bereiche im rhBMP-2 sein, verursacht im Zuge einer pH-induzierten Konformationsänderung. Grundsätzlich ist die Proteinaggregation mit einer Konformationsänderung verbunden [Chi et al., 2003].

Es ist bekannt, dass BMP-2 als Wachstumsfaktor das Bestreben besitzt mit sich selbst zu interagieren, indem sich zwei BMP-2-Moleküle sowohl durch seine hydrophoben Regionen als auch seine geladenen Bereiche, die zueinander komplementär sind, einander annähern [Sundermann et al., 2020]. Laut Wang, 1999 und Morris et al., 2009 neigen einzelne BMP-2-Moleküle zur Aggregation, um ungünstige Bedingungen zu minimieren, die durch Interaktion zwischen einem hydrophilen Solvent und hydrophoben Proteinresten verursacht worden sind. Genau diese Aggregationstendenz vom Wt-BMP-2 war ausschlaggebend für die Themenstellung dieser Dissertation, in dessen Mittelpunkt BMP-2-Varianten lagen, die durch eine rationale Hydrophilisierungsstrategie (Eliminierung von AHS durch Austausch einzelner hydrophober AS, s. auch Abschnitt 4.1.1.2) erzeugt wurden. Wenn diese wie erhofft weniger aggregationsempfindlich und zugleich besser wasserlöslich sind, kann mit sehr viel höherer Wahrscheinlichkeit auch im μM - bis mM -Bereich von einem stabilen Dimerstatus ausgegangen werden. Auf diese Weise könnte womöglich gezielter und vorhersagbarer Osteogenese bei langwierigen Frakturen (lösliches Dimer, bzw. kleinere Oligomere) erreicht werden. Der relativ konstante dimere Status der neuen BMP-2-Variante konnte in einer dem Wt-BMP-2 analogen Versuchsreihe verifiziert und durch die quantitative Analyse des Oligomerisierungstatus (DLS-/MDS-Analytik) untermauert werden. Die gewonnenen Ergebnisse belegen klar, dass der für BMP-2-10M ermittelte R_h aus der DLS-Analyse ($2.8 \pm 0.219 \text{ nm}$; Konzentration $10\text{-}30 \mu\text{M}$, 20 mM Phosphat-Puffer, $\text{pH } 7.4$) nicht nur kleiner, sondern auch näher am R_g (Röntgenstrukturanalyse) liegt als beim Wildtyp-BMP-2 (Referenz). Die Aggregationstendenz dieser Variante ist somit nachweislich geringer. Wenn BMP-2-10M im Sauren ($\text{pH} = 3$; 1 mM HCl) gelöst wird, verändert sich sein hydrodynamischer Radius nur geringfügig. Anders als bei Wt-BMP-2 wurde in dieser Arbeit bei $\text{pH} \sim 3$ ein leicht erhöhter Wert gemessen ($3.2 \pm 0.364 \text{ nm}$). Somit scheint sich die in der Literatur oft beschriebene Reduzierung des pH-Wertes ($\text{pH } 3\sim 4.5$) im Fall der BMP-2-10M-Variante kaum auf dessen Löslichkeit auszuwirken. Die Datenlage zeigt zudem, dass für BMP-2-10M bei einem $\text{pH} > 6$ (Annäherung an den pI (8.2) des rhBMP-2), wie durch Ruppert et al., 1996 oder Vallejo & Rinas, 2004 dargestellt, keine drastische Verschlechterung der Löslichkeit auftritt, was beim rhBMP-2* vielfach dokumentiert ist. Ein pH-Shift (im gemessenen Konzentrationsbereich) scheint anders als bei rhBMP-2 keine großen Auswirkungen auf die Konformationsänderungen der Variante zu haben. Das Mutein BMP-2-2Hep-7M enthält nur sieben hydrophilisierende Mutationen, ist also stärker hydrophob als BMP-2-10M. Diese etwas höhere Aggregationstendenz spiegelt sich

im ermittelten hydrodynamischen Radius von 3.2 ± 0.160 nm (bei pH ~ 7.4), wider. Interessanterweise ist dieser fast identisch mit dem R_h von BMP-2-10M in 1 mM HCl. Auch die Variante BMP-2-2Hep-7M reagiert beim Pufferwechsel vom neutralen in den sauren Bereich (pH ~ 3) mit einem geringfügigen Anstieg des R_h (3.7 ± 0.270 nm). Die größere Aggregationsbereitschaft von BMP-2-2Hep-7M zeigte sich zudem deutlich bei Aufreinigungsversuchen unter Hochsalzbedingungen [Masterarbeit/Heinks, 2019]. Das Zielprotein BMP-2-2Hep-7M bindet bei einem pH von 5.3 auf Heparinsepharose und kann von dort auch ohne pH-Shift allein durch Steigerung der Ionenstärke auf 2 M eluiert werden. Diese Hochsalzfraktion zeigt im SDS-Tricin-PAGE nahezu reines BMP-2-2Hep-7M in monomerer und vor allem dimerer Form. Beim Versuch, die beiden oligomeren Spezies über GPC zu trennen, wurde die gesamte Proteinmenge aus der Auftragsfraktion bereits im Durchlauf erhalten. Damit war klar, dass das vermeintlich monomere und dimere BMP-2-2Hep-7M nicht in der Lage war in die Poren der Sepacrylmarix einzudringen. Es muss somit in zwar löslicher, aber oligomerer Form vorgelegen haben. Eine DLS-Kontrollmessung bestätigte diese Vermutung, wobei ein hydrodynamischer Radius von $R_h \sim 85-110$ nm (Daten nicht gezeigt) bestimmt wurde. Es macht zudem den Anschein, dass die hohe Ionenstärke das hohe Aggregationsvermögen von BMP-2-2Hep-7M stark triggert, wie das auch analog für monoklonale Antikörper in der Literatur beschrieben ist [Luo et al., 2014]. Nichtsdestotrotz liegen die gemessenen Radien der Varianten (BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M) noch über dem R_g (2.08 nm, aktives Dimer) des Wildtyps. Die Ergebnisse aus der DLS/MDS-Analytik können als ein klarer Hinweis gewertet werden, dass die Aggregationstendenz der beiden BMP-2-Varianten im Vergleich zu rhBMP-2 deutlich reduziert werden konnte, jedoch nicht komplett eliminiert wurde (s. Abb. 4). Die vorgenommenen hydrophilisierenden Mutationen zeigen den erwarteten Effekt (bessere Löslichkeit der Varianten). Außerdem unterstreichen die Daten aus DLS-MDS-Analyse, dass nicht nur die Proteinkonzentration, sondern auch der pH-Wert und die dadurch induzierte Konformationsänderung essentielle Faktoren für die Aggregation von rhBMP-2 sind und auch im Hinblick auf eine therapeutische Applikation nicht außer Acht gelassen werden dürfen.

Wie eine Konformationsänderung des Wachstumsfaktors bzw. sein Aggregationsbestreben sich auf die biologische Aktivität auswirken, sollte im Anschluss an diese Forschungsarbeit in *in vivo*-Studien grundsätzlich genauer überprüft werden. Wichtig dabei ist die biologische Signifikanz von Aggregaten nicht zu ignorieren, da diese sehr wohl eine cytotoxische Wirkung besitzen können (fibrilläre Aggregate/amyloide Aggregate) [Bucciantini et al., 2002]. Dass es möglich ist durch die Änderung von Pufferbedingungen präzipitierte Aggregate wieder aufzulösen, zeigte Quass et al., 2019 in seinen Studien (DLS-Analyse, zentrifugationsbasierte Präzipitationsexperimente), wobei die biologische Aktivität des BMP-2 dabei erhalten blieb.

Es steht außer Frage, dass es sich beim BMP-2 um ein aggregationsempfindliches Protein handelt. In Anbetracht der hier gewonnenen Erkenntnisse ist es empfehlenswert, dass zur

Unterstützung und Förderung einer Frakturheilung zukünftig bei der Anwendung eines BMP-2-Medizinprodukts ein Umdenken hinsichtlich der einzusetzenden Proteinmenge stattfindet. Aus der Datenlage lässt sich grundsätzlich die Schlussfolgerung ziehen, dass mit Proteinaggregation zu rechnen ist, wenn hohe BMP-2-Konzentrationen eingesetzt werden. Fraglich bleibt weiterhin, welche drastischen Folgen diese Überdosierung für den Patienten nach sich zieht.

7.4 Zellbiologische Arbeiten

Es steht außer Frage, dass durch den Einsatz von rhBMP-Medizinprodukten (InductOs®, Osigokraft®) ein Meilenstein bei der Behandlung von langwierigen Knochenfrakturen gelungen ist. Jedoch bringt diese Behandlungsmethode, die bereits andiskutierten Nachteile mit sich (siehe u.a. Lissenberg-Thunissen et al., 2011, James et al., 2016), wodurch die Suche nach alternativen Therapiewegen und -arten weiter anhält. Genau diese Gemengelage treibt die Entwicklung funktionsoptimierter BMP-2-Varianten voran.

Die Aktivität von BMPs kann durch eine Reihe an extrazellulären Antagonisten (u.a. Chordin, Gremlin, Dan) gesteuert werden (lokal) [Canalis et al., 2003, Walsh et al., 2010]. Eine wichtige Schlüsselrolle kann dabei auch der extrazelluläre Antagonist Noggin spielen, der in der Lage ist die Bindung von BMPs an seine Rezeptoren (BMPR-IA/B und BMPR-II) zu verhindern [Canalis et al., 2003, Rosen, 2006, Dean et al., 2009]. In der Literatur sind einige Beispiele zum Thema Frakturheilung mittels Suppression von BMP-Antagonisten beschrieben. So zeigte u.a. Wan et al., 2007, dass eine Suppression der Nogginexpression durch siRNA (small interfering RNA) sogar die osteoinduktive Aktivität von BMPs (Exo-/Endogen) verbessert. Eine Nogginsuppression (mittels siRNAs) in MC3T3-T1-Zellen oder auch in Schädel-Osteoblasten von Mäusen resultierte in einem verbesserten osteogenen Differenzierungspotential [Wan et al., 2007]. Auch die Ergebnisse von Takayama et al., 2009 suggerieren, dass durch *noggin-silencing* (Transfektion von Noggin siRNA oder lokale Injektion) eine verstärkte BMP-2-induzierte Osteoblastendifferenzierung (C2C12-Zellen), sowie ektopische Knochenbildung (Mausmodell) induziert durch rhBMP-2 erreicht werden können.

Die Inhibierung von BMP-2-Antagonisten bietet somit eine vielversprechende Alternative zum aktuellen Einsatz von rhBMP-2 für induzierte Knochenregenerationen (InductOs®, Osigokraft®). Mit der Konzeptionierung der BMP-2-10M-Variante sollte genau diese Idee umgesetzt werden. BMP-2-10M hatte zum Ziel affin an den BMP-2-Inhibitor Noggin zu binden, um eine verbesserte Wirkung von endogenem BMP-2 zu begünstigen. Die Validierung des Funktionsspektrums der in dieser Arbeit entwickelten BMP-2-Varianten (BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M) im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) wurde in der Zelllinie C2C12 (ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten) und HEK BRELuc-Zelllinie (AG Knaus, FUB) durchgeführt (s. Abschnitt 6.1.1). Zur quantitativen

Bestimmung des Osteogenepotentials der BMP-2-Varianten diente ein ALP-Assay. Die Induktion der alkalischen Phosphatase kann als klassischer biochemischer Marker der Osteoblasten-Differenzierung gewertet werden. Nach Applikation von BMP-2-10M (Konzentration 20 nM, 100 nM) kommt es zu keiner Steigerung der ALP-Aktivität. Entsprechend kann von einer Bestätigung der hier entwickelten Klonierungsstrategie ausgegangen werden (keine BMP-2-Typische Signaltransduktion bedingt durch eingebrachte Mutationen, s. auch Abb. 4 B). Im direkten Vergleich dazu wurde eine signifikante Erhöhung der ALP-Aktivität beim Wt-BMP-2 (Konzentration 5 nM, 10 nM) beobachtet, was für eine Aktivierung des osteogenen Signaltransduktionsweges über 1/5/8-Phosphosmads und Id1-Expression spricht.

Die rekombinant hergestellte BMP-2-2Hep-7M-Variante wurde als BMP-2-Agonist konzipiert und soll die therapeutische Verstärkung der Osteogenese bewirken. Wider Erwarten war auch nach Applikation von BMP-2-2Hep-7M (Ligandenkonzentration 100-800 nM) auf C2C12-Zellen keine Induktion der ALP-Aktivität messbar. Mögliche Gründe hierfür können in der geringeren Sensitivität des ALP-Test liegen, aber auch einer zu niedrig eingesetzten Ligandenkonzentration (starke Verunreinigung mit *E. coli*-Proteinen und dadurch eine ungenaue Bestimmung der eingesetzten Proteinkonzentration). Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich eine zu geringe Stimulations- und Inkubationszeit negativ auf das erzielte Ergebnis auswirken konnte.

Der Luciferase-Reportergen-Assay in HEK BRELuc-Zellen liefert eine weitere Möglichkeit Wt-BMP-2 sowie BMP-2-Varianten hinsichtlich ihrer Aktivität zu untersuchen. Dieser Test besitzt im Vergleich zum ALP-Assay eine viel höhere Sensitivität [Logeart-Avramoglou et al., 2006, Herrera & Inman, 2009]. Ein Ansteuern des Id1 Promotors wird über die gekoppelte Luciferaseaktivität quantitativ und sehr sensitiv erfassbar. Der in der AG Knaus etablierte Dual-Luciferase Reporter Assay nutzt zwei unterschiedliche Reporter (Luciferasen). Der erste Luciferase dient der Detektion des gewünschten Signals und die zweite wird als interne Kontrolle verwendet. Im Dual-Luciferase Reporter Assay werden beide Reporter bei verschiedenen Wellenlängen detektiert [Sherf et al., 1996]. Dabei erfolgt die Expression des letzten Reporters über einen konsekutiven Promotor, wodurch Messunterschiede (verursacht z.B. durch unterschiedliche Zellzahl oder auch Vitalität der Zellen) einerseits ausgeglichen werden könne und andererseits zur Normalisierung der Daten des ersten Promotors herangezogen werden können. Beim Dual-Luciferase Reporter Assay werden Bereiche des Id1-Promotors verwendet, die die Expression der Luciferase regulieren. Id1-Promotoren weisen grundsätzlich zwei sogenannte *BMP-responsive regions* auf, die sich aus drei Sequenzelementen zusammensetzen. Dabei handelt es sich um SBES (2x, *smad binding elements*) und GGCGCC palindromischen Sequenzen, die mit je zwei CAGC und CGCC-Motiven flankiert sind [Korchynskyi & ten Dijke, 2002]. In den verwendeten HEK BRELuc-

Zellen der AG Knaus (FUB) wird die Sensitivität zusätzlich gesteigert, indem gezielte Regionen des Id1-Promotors repetitiv verwendet werden.

BMP-2-10M zeigt im beschriebenen Testsystem anders als der Wt-BMP-2 keine Steigerung der Luciferaseaktivität, ein Effekt, der die Ergebnisse des ALP-Tests mit dieser Variante bestätigt. Die Primärstruktur der Variante verhindert ihre effektive Bindung an BMP-2-Rezeptoren. BMP-2-10M sollte jedoch als Noggin-Binder und damit als indirekter Verstärker endogener BMP-2-Aktivität wirken können. Im Rahmen der Forschungsaufenthalts an der FUB (AG Knaus) gelang es nicht, einen funktionellen Assay zu konzipieren, der die Noggin-Inhibition von BMP-2 quantitativ spiegelt. Das vor Ort verwendete rekombinante Noggin erwies sich als wenig aktiv. Damit war es auch nicht möglich, die Nogginbindung von BMP-2-10M und ihren Effekt auf die BMP-2-Signalübertragung angemessen zu charakterisieren. Entsprechend können zum gegenwärtigen Zeitpunkt aufgrund der unklaren Datenlage zunächst keine endgültigen Aussagen über die Funktionalität von BMP-2-10M getroffen werden. Die Versuche müssen mit aktivem Noggin erneut durchgeführt werden. Ob eine unvollständige oder unvollständig korrekte Proteinfaltung Auswirkungen auf den physiologischen Effekt von BMP-2-10M hatte, kann an dieser Stelle ebenfalls nicht eindeutig geklärt werden. Erste CD-spektroskopische Analysen einer anderen aufgereinigten Proteincharge des Muteins im Zuge dieser Dissertation belegen, dass BMP-2-10M (resolubilisiert in 1 mM HCl) größtenteils in einer *Random coil*-Struktur vorliegt, was auch im Dual-Luciferase Reporter Assay eine quantitative Erfassung der physiologischen Effekte verhindern würde.

Dass eine Inhibierung von Noggin mit einer BMP-2-Variante (L51P, Konzeptionierung s. [Keller et al., 2004]) möglich ist, zeigte bereits Albers et al., 2012 (s. auch [Sebald et al., 2012, Khattab et al., 2014, Khattab et al., 2019]). Es handelt sich dabei um eine Variante, die nicht mehr den Typ I-Rezeptor binden kann, deren Bindung an den Rezeptor-Typ-II und Modulatorproteine (Noggin, Chordin, Gremmlin) aber weiterhin möglich ist. L51P besitzt nachgewiesenermaßen Affinität zu Noggin [Keller et al., 2004]. In Zellkulturversuchen (primäre murine Osteoblasten) konnte durch den Einsatz von L51P im niedrigen nanomolaren Bereich eine inhibitorische Wirkung und im höheren Konzentrationen eine komplette Neutralisation des endogenen BMP-2-Antagonisten Noggin beobachtet werden, was in einer verbesserten osteogenen Aktivität resultierte. Bei der Literaturrecherche zu dieser Variante fiel jedoch auf, dass deren Funktionalität zwar an zahlreichen Beispielen belegt wurde (*in vitro*, *in vivo* (Tiermodell) [u.a. Albers et al., 2012, Sebald, W. & Hofstetter, 2012, Tekari et al., 2017]) sowie humane IVDCs (*intervertebrale disc cells*) [May et al., 2020], allerdings in keiner dieser Publikationen auf den Punkt der Aggregationsneigung eingegangen worden ist. Wie bereits vom rhBMP-2 bekannt, handelt es sich dabei um ein stark aggregationsempfindliches Protein. Werden nun für diese Variante die Ergebnisse aus dieser Dissertation (s. Abb. 4 A) bezüglich der Identifikation der 6 AHS herangezogen, so steht außer Frage, dass auch das BMP-2-Mutein L51P durchaus über eine starke Aggregationsneigung verfügt. Unter dem Gesichtspunkt der

Aggregationsempfindlichkeit ist es daher eher fraglich, ob diese Variante zukünftig für humane Applikationen tatsächlich eingesetzt werden kann, da auch hier, wie bereits bei rhBMP-2-Medizinprodukten, die Gefahr einer Überdosierung mit den bekannten Folgen besteht.

Auch für BMP-2-2Hep-7M korrelierten die Ergebnisse aus der dosisabhängigen Induktion der Luciferase des BRELuc-Konstruktes überwiegend mit den Resultaten aus dem ALP-Test (s. Abb. 32 B). Im sensitiven Dual-Luciferase Reporter Assay zeigte diese Variante jedoch eine sehr geringe Aktivierung des Smad 1/5/8-Signalweges. Bedingt durch vorhandene Kontaminationen des Liganden mit nicht abgetrennten *E. coli*-Proteinen muss hier mit einem verfälschten Ergebnis bezüglich der tatsächlich eingesetzten Konzentration an BMP-2-2Hep-7M gerechnet werden. Trotz eines hohen Basalleveles für die Probe ohne Ligandenzugabe konnte für die Referenz (Wt-BMP-2, Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) eine Steigerung der detektierten Lumineszenz beobachtet werden. Diese betrug dabei das 1.43-fache für eine Konzentration von 5 nM BMP-2, sowie das 1.52-fache bei 10 nM BMP-2. Die durch Wt-BMP-2 erzielten Lumineszenzwerte korrelieren prinzipiell mit Literaturdaten. Allerdings wurden dort entsprechende Steigerungen der Id1 Transkription bereits durch 1-2 nM BMP-2 erreicht [Logeart-Avramoglou et al., 2006, Zilberberg et al., 2007, Herrera & Inmann, 2009]. Die in dieser Arbeit nur suboptimale detektierte Aktivität des Wt-BMP-2 zeigt klar, dass es in der kurzen Zeit des Forschungsaufenthalts an der Freien Universität Berlin (3 Wochen) nicht gelungen ist, den Dual-Luciferase Reporter Assay aus dem Stand vollumfänglich erfolgreich zu reproduzieren.

Ein hohes Basalsignal der detektierten Luciferase-Aktivität (Probe ohne Liganden) lässt darauf schließen, dass die eingesetzte Zelllinie zusätzlich autokrin BMP-2 produziert. Alternativ könnten die HEK BRELuc-Zellen trotz der durchgeführten Waschkvorgänge noch zu viel FKS enthalten. Letzteres ist oft mit Spuren an BMP-2, das dann für höhere Basalaktivität sorgen würde, kontaminiert.

Abschließend kann hier keine eindeutige Aussage über die genauen Gründe für die geringe Funktionalität von BMP-2-2Hep-7M im Vergleich zum rhBMP-2 getroffen werden. Wie bereits zuvor erwähnt, wies diese Variante große Kontaminationen mit *E. coli*-Proteinen auf. Aus ergänzenden Experimenten (Daten nicht gezeigt) ging klar hervor, dass womöglich nur ca. 34 % des verwendeten Proteins als BMP-2-Dimer vorlag (Bestimmung der Dimer-Bandenintensitäten in SDS-Tricin-PAGE, Programm ImageJ). Die Kombination dieser Ergebnisse mit den Resultaten aus einer DLS-Messung (lediglich 5-10 % des BMP-2-Dimers der verwendeten Proteinprobe liegt nativ vor) führt zu der Annahme, dass eine 800 nM Ligandenlösung lediglich 13.6 - 27.2 % reines BMP-2-2Hep-7M-Dimer enthalten würde [Masterarbeit/Heinks, 2019]. Werden diese Daten in die Konzentrationsabschätzung des Liganden BMP-2-2Hep-7M mit einbezogen, so könnte diese hydrophilisierte BMP-2-Variante rein theoretisch nahezu Wildtyp-analog osteogen agieren.

Im Zuge der Manuskripterstellung mit dem Titel „Optimized expression and purification of a soluble BMP-2 variant based on in-silico design“ [Heinks & Hettwer, 2021], das im Anschluss an die Laborphase dieser Doktorarbeit angefertigt wurde, wurde die Funktionalität von BMP-2-2Hep-7M in zellbasierten Assays erneut bestimmt. Dabei gelang es erste fundierte Daten zur wirklichen biologischen Aktivität des Muteins zu erhalten.

1. BMP-2-2Hep-7M, das direkt als lösliches Dimer exprimiert werden kann (*E. coli*-Expressionsystem), induziert im etablierten C2C12-Zellmodell (AG Knaus, FUB) keine BMP-2 typische Signaltransduktion, wenn das Protein (ohne Wt-BMP-2) im Dual-Luciferase Reporter Assay analysiert wird.
2. Werden C2C12-Zellen jedoch sequenziell mit BMP-2-2Hep-7M und Wt-BMP-2 (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) kultiviert, so ist die hydrophilisierte BMP-2-Variante in der Lage, die Aktivität des Wildtyps um mindestens Faktor 2-3 zu erhöhen (s. Abb. 37).

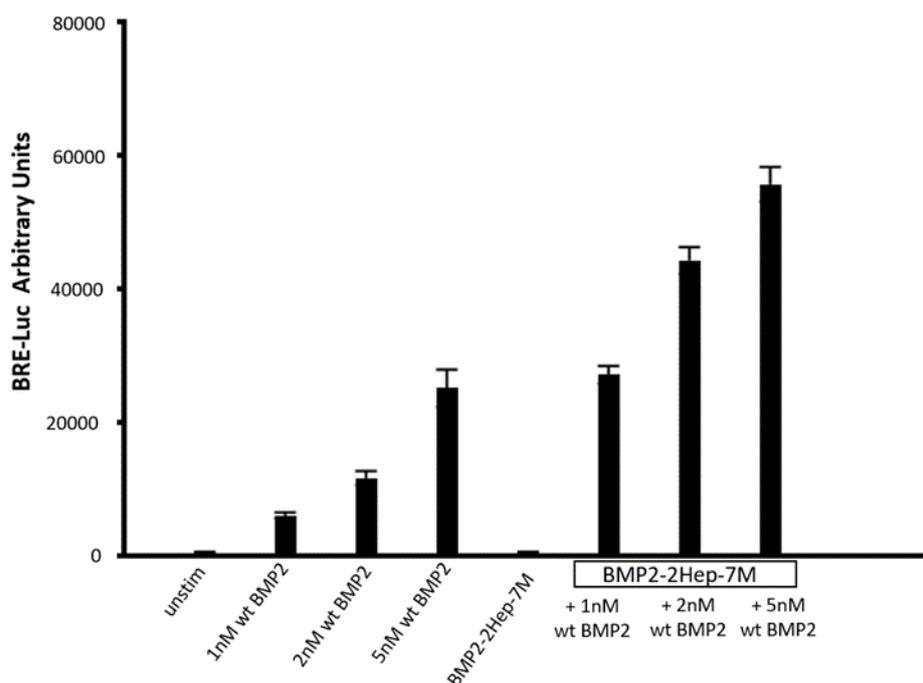


Abb. 37: Luciferase-Reportergen-Assay in C2C12 - BRELuc-Zellen

Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Lumineszenz-Steigerung der Luciferase-Reportergen-Aktivität (nur Firefly-Luciferase). Links: Keine biologische Aktivität von BMP-2-2Hep-7M detektierbar. Im Vergleich dazu zeigt sich ein Wt-BMP-2-induzierter Anstieg der Firefly-Luciferaseaktivität Expression. Rechts: Experimentelle Bedingungen: Vorexposition der C2C12-BRELuc-Zellen mit BMP-2-2Hep-7M für 15 min, anschließend Zugabe von Wt-BMP-2 in den angegebenen Konzentrationen. Vor der Messung 24 h Expression der Firefly-Luciferase in den C2C12-BRELuc-Zellen. In den mit BMP-2-2Hep-7M vorinkubierten Zellen ist ein 2-3-facher Anstieg der Wt-BMP-2-Aktivität (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) erkennbar [vorläufige Daten Niedrig/FUB, AG Knaus].

Das kurz skizzierte Kompetitonsexperiment wurde im vierfachen technischen sowie im zweifachen biologischen Replikat von einer Mitarbeiterin der AG Knaus durchgeführt. Die dort

erzielten Resultate sind statistisch signifikant und damit experimentell abgesichert und bestätigen daher die in eigenen Vorversuchen ermittelten Tendenzen zur Charakterisierung der biologischen Aktivität von BMP-2-2Hep-7M.

Als Fazit der vorläufigen Wettbewerbsversuche $N=1$ (s. Abb. 37) kann also eine synergistische Steigerung (2-3-fach) der Aktivität des Wt-BMP-2 durch die Zugabe von BMP-2-2Hep-7M als sehr wahrscheinlich gelten. Der konkrete Einfluss auf den EC_{50} von Wt-BMP-2 muss erst in einer echten Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt werden.

Wie aber ist dieser Effekt von BMP-2-2Hep-7 M mechanistisch zu erklären? Wir wissen, dass Wt-BMP-2 zu Beginn der von ihm ausgelösten Signaltransduktion an die extrazelluläre Matrix gebunden vorliegt. Entsprechend ist vorstellbar, dass die gleichzeitige Anwesenheit der Variante BMP-2-2Hep-7M mit Hilfe ihrer doppelten Heparinbindestelle die Freisetzung von Wt-BMP-2 aus der ECM beschleunigt. Wt-BMP-2 könnte so effektiver an seine Rezeptoren binden, was die Steigerung der BMP-2-Signaltransduktion erklären würde. Alternativ lassen die Ergebnisse auch den Schluss zu, dass BMP-2-2Hep-7M in der Lage ist, die BMP-2-Rezeptoren I und II vorzukonfigurieren. Diese könnten so in eine besonders bindungskompetente Konformation versetzt werden. Im Anschluss könnte die Signalübertragung über Wt-BMP-2 deutlich effektiver verlaufen. Welche dieser Theorien dem biologischen Geschehen wirklich nahe kommt, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

8 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein vereinfachtes Protokoll entwickelt, mit dem es möglich ist, funktionsoptimiertes BMP-2 löslich in einem *E. coli*-Expressionssystem unter geringem Zeitaufwand herzustellen. Der Schritt der *in vitro*-Renaturierung, wie es bei einer Aufreinigung von BMP-2 aus *inclusion bodies* nötig ist, entfällt vollständig. Die hier vorgestellten Ergebnisse haben für die weiterführende, funktionelle Charakterisierung der beiden löslich dargestellten dimeren Muteine, BMP-2-10M (diese Arbeit) und BMP-2-2Hep-7M (Masterarbeit/Heinks, 2019, diese Arbeit: Konzeptionierung der Variante, biophysikalische Charakterisierung), eine sehr gute Basis geschaffen. Jedoch bedarf es weiteren *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten, um diese vollumfänglich zu analysieren und ihr ganzes Potential zu entdecken. Dabei wäre es wichtig, zunächst den Fokus auf die Reduktion der verbleibenden Oligomerisierungstendenz zu legen, wodurch auch eine Steigerung der nativ gefalteten dimeren Proteinspezies zu erwarten wäre. Zukünftige Experimente sollten zudem auch auf das bestehende Problem der Probenkontamination mit *E. coli*-Fremdproteinen ausgelegt werden. Dies wäre u.a. durch die Coexpression von eukaryotischen Chaperonen möglich. Zusätzlich wären weitere hydrophilisierende Mutationen in der Nähe von A 35 denkbar. Ein spezieller Fokus bei der kompletten Charakterisierung beider BMP-2-Muteine im Vergleich zum rhBMP-2* sollte weiterhin auf der Überprüfung der potentiellen Antigenität gelegt werden, die mit dem Aminosäureaustausch innerhalb der BMP-2-Proteinsequenz assoziiert sein kann.

Hinsichtlich der für BMP-2-10M anfangs angenommenen Fähigkeit, Noggin zu binden und damit die BMP-2-Signaltransduktion möglicherweise indirekt gezielt zu beeinflussen, sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, um einen konkreten Nachweis und mögliche neue Erkenntnisse zur molekularen Erkennung und Bindung von BMP-2-10M an Noggin im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Kurve zu gewinnen. Falls nötig, sollte durch gezielte Mutagenesestrategien eine Rückmutation der Position A 34 erfolgen, da Noggin über ähnliche Bindungsepitope wie der BMPR-II Rezeptor verfügt [Kirsch et al., 2000].

Im Nachgang zu dieser Dissertation wurde die Funktionalität der Muteine BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M auch für die frühe durch BMP-2 eingeleitete Signalübertragung über Western Blot untersucht. Beide BMP-2-Varianten induzieren für sich allein getestet keine 1,3,5-Smad-Phosphorylierung. Werden die Muteine jedoch im Konkurrenzexperiment entweder nach Vorinkubation mit Wt-BMP-2 oder aber als Vorinkubationscytokine auf C2C12-Zellen appliziert, ergeben sich hochinteressante Befunde. BMP-2-10M ist in diesen Studien in der Lage, die Aktivität von Wt-BMP-2 nahezu komplett auszubremsen (Bachelorarbeit/Zerf, 2022, AG Prof. Dr. A. Loidl-Stahlhofen, WHS Recklinghausen). BMP-2-2Hep-7M dagegen steigert die Aktivität des Wildtyps um den Faktor 2-3, wie auch im BRELuc-Assay gezeigt (Bachelorarbeit/Zschieschack, 2022, AG Prof. Dr. A. Loidl-Stahlhofen, WHS Recklinghausen). Der molekulare Mechanismus dieser Modellierung der BMP-2-Signalübertragung ist

bisher rein hypothetisch. Möglicherweise kann BMP-2-10M zwar nicht funktionell an die BMP-Rezeptoren I und/oder II binden, diese aber im Sinne eines kompetitiven Effekts blockieren.

Die erhöhte Heparinaffinität des Muteins BMP-2-2Hep-7M dagegen könnte dazu führen im *in vivo*-Modell der C2C12-Zellkultur verstärkt in die extrazelluläre Matrix zu binden und dort vorher gespeichertes Wt-BMP-2 beschleunigt freizusetzen. Alternativ könnte eine Vorassemblierung der BMP-2-Rezeptoren I und II durch das Mutein BMP-2-2Hep-7M den synergistischen Effekt auf die Signalübertragung des Wildtyps erklären.

Die neue Datenlage zur Funktionalität der BMP-2-Muteine, die im Zuge von Wettbewerbsversuchen für die Manuskripterstellung im Nachgang an diese Arbeit gewonnen wurde, ist nicht nur unter mechanistischen Gesichtspunkten sehr interessant. Das Ende dieser Dissertation liefert somit ein spannendes Themenfeld für weitere Forschung, um das Potential von hydrophilisierten BMP-2-Muteinen umfangreich zu charakterisieren bzw. durch weitere Mutageneseschritte zu optimieren. So könnten möglicherweise interessante Erkenntnisse über den Einfluss von BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M und anderen Muteinen auf die BMP-2-Signaltransduktion gewonnen werden.

Zusätzlich ist auch der Aspekt einer potentiell möglichen Dosisminimierung bei der gleichzeitigen medizinischen Applikation von Wt-BMP-2* mit dem BMP-2-2Hep-7M-Mutein und der damit einhergehenden Reduzierung von Spätfolgen sehr vielversprechend und bedarf einer weiteren Austestung.

Nichtsdestotrotz sollte weiterhin am ursprünglichen Ziel festgehalten werden, um die Variante BMP-2-2Hep-7M hinsichtlich eines Wt-BMP-2-Analogons zu optimieren. Hier kann in einem nächsten Schritt das deletierte Methionin in Position 107 wieder eingefügt werden. Der Rest spielt offensichtlich für die Einleitung der BMP-2-Signalübertragung eine entscheidende Rolle (pers. Mitteilung Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg). Gleichzeitig kann versucht werden, das Potential einer Aktivitätssteigerung für endogenes BMP-2 weiter auszureizen. Dafür sollte die bisher doppelt vorhandene Heparinbindestelle der Variante weiter verstärkt (= multipliziert) werden.

Fernziel aller weiteren Studien sollte bleiben, künftig ein an BMP-2 angelehntes Medizinpräparat mit minimaler Aggregationstendenz zu entwickeln. Dies wäre löslich im prokaryotischen Wirt im großen Maßstab darstellbar und pharmakologisch sehr viel kalkulierbarer einsetzbar.

inklusive Enterokinase- und Thrombin Proteolysesequenz wurden durch Restriktion entfernt. Ein Stop-Codon verhindert zudem die Expression des C-terminalen 6xHis-Sequenz.

9.2 Lagerungsstudien

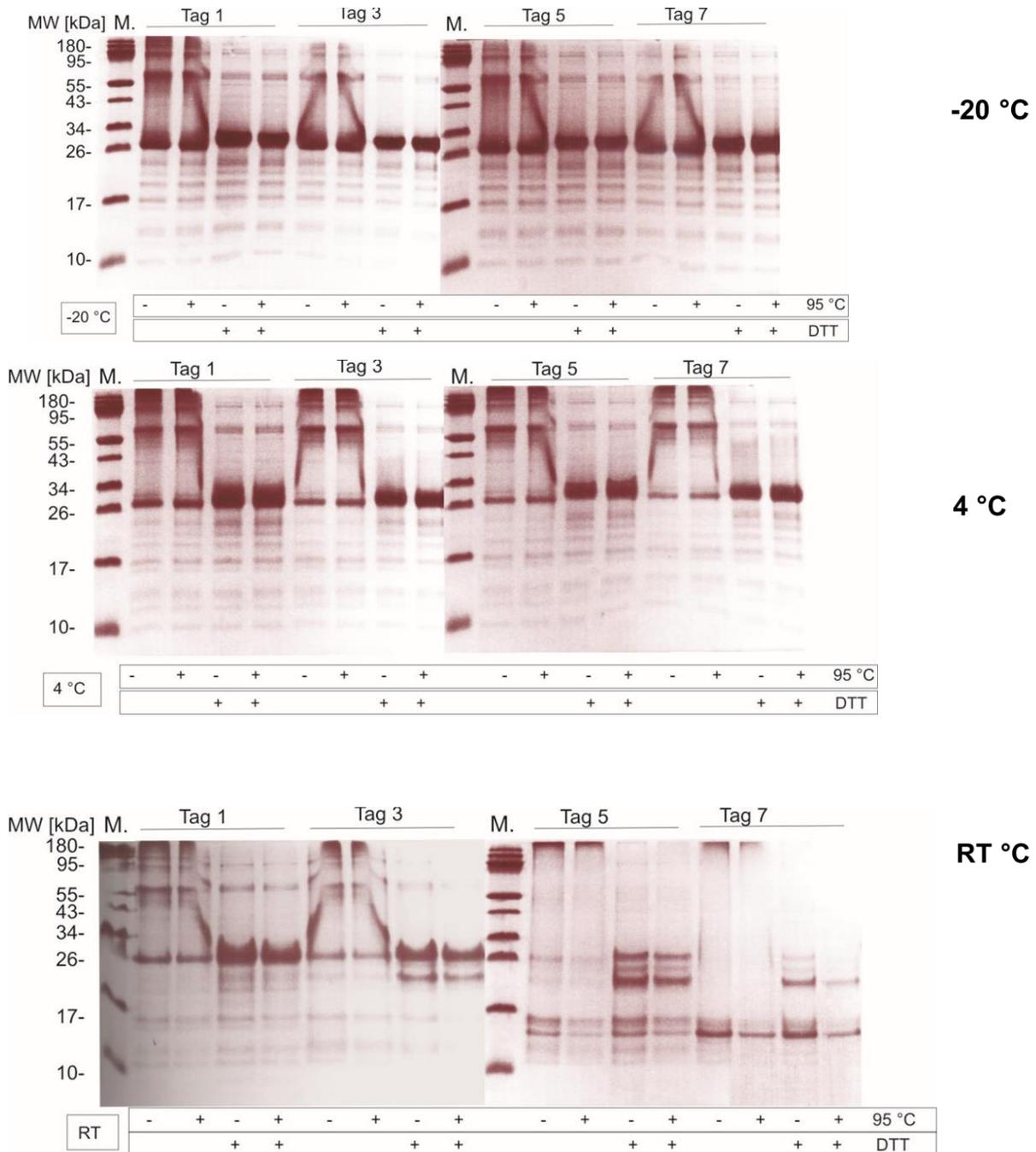


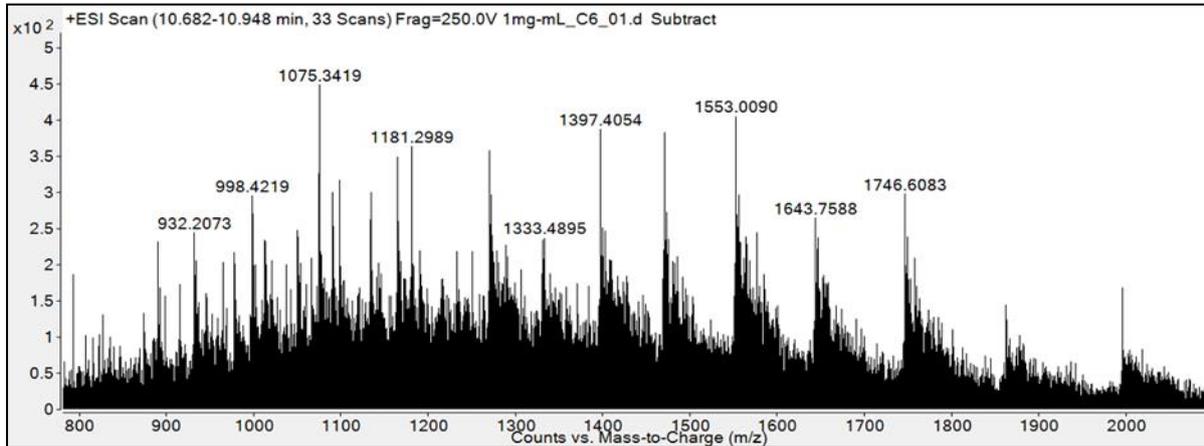
Abb. 39: Lagerungsstudien von TrxA-BMP-2-10M

Dargestellt sind 15% - SDS-Tricine-PAGE-Analysen von Lagerungsstudien der TrxA-BMP-2-10M bei -20 °C, 4 °C und Raumtemperatur (RT) über einen Zeitraum von 7 Tagen. Bei der Gegenüberstellung der Stabilitätsanalyse der Variante bei -20 °C, 4 °C und Raumtemperatur ist deutlich zu sehen, dass die beste Lagerfähigkeit für das BMP-2 bei -20 °C und 4 °C beobachtet werden konnte. Dies äußert sich durch eine dicke Bande bei ~26 kDa (Monomer) und ~56 kDa (Dimer). Dagegen ist es möglich, sowohl bei Raumtemperatur die TrxA-BMP-2-10M-Mutante kurzfristig zu lagern, jedoch nimmt hierbei die Proteinnmenge des BMP-2 nach Tagen deutlich ab. Des Weiteren war es

möglich durch den Einsatz von 50 mM DTT die Disulfidbrücken des BMP-2 zu spalten, was sich durch die Zunahme des BMP-2 Monomers auf der Höhe ~26 kDa widerspiegelt.

9.3 Massenspektrometrie

A.



B.

INPUT		RESULTS		
	Peaks from spectrum	charge (+)	MW [Da]	error [Da]
m/z (1):	932.2	15	13967.8891286985	1.9139128698498098
m/z (2):	998.4	14	13963.4965201186	-2.4786957100495783
m/z (3):	1075.3	13	13965.8039115387	-0.17130428995005786
m/z (4):	1164.9	12	13966.711302958802	0.7360871301516454
m/z (5):	0	0	0	0
m/z (6):	0	0	0	0
m/z (7):	0	0	0	0
m/z (8):	0	0	0	0
m/z (9):	0	0	0	0

charge min. (+): 1 Deconvoluted MW [Da]: 13965.97521582865
 charge max. (+): 100 Std. deviation [Da]: 1.8599430384938402

Abb. 40: ESI-Massenspektrum von Variante BMP-2-2Hep-7M (Monomer) bei 10.6-10.9 min (A) und Berechnung der deconvolvierten Masse des BMP-2-2Hep-7M Muteins (B).

9.4 CD-Spektroskopie

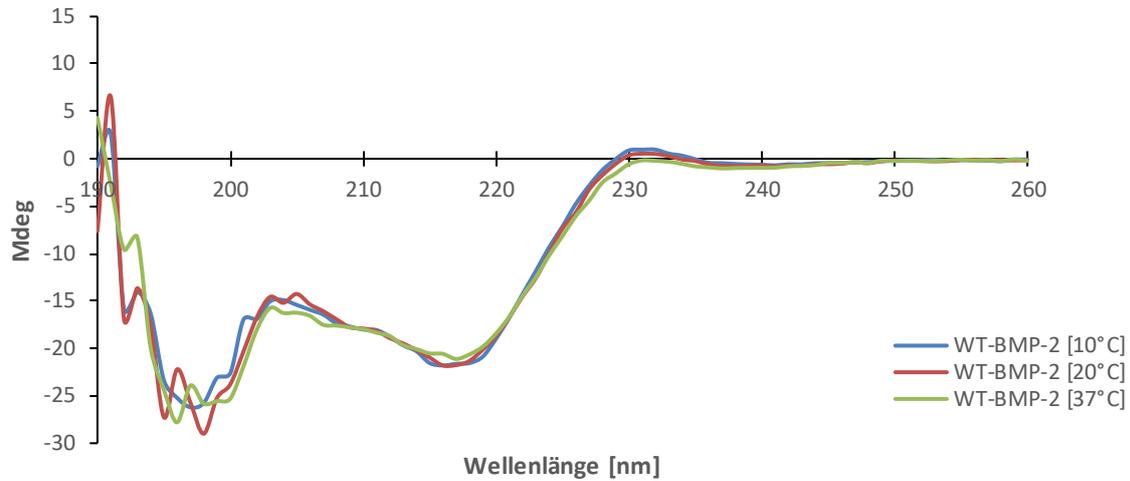


Abb. 41: CD-Spektren von Wt-BMP-2 im fernen UV-Bereich (hier 190 nm- 260 nm)

Dargestellt sind Spektren bei 10 °C, 20 °C, 37 °C und 60 °C. Die verwendete Wildtyp-BMP-2 Referenz (AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) wurde zuvor in 1 mM HCl gelöst und in einer Konzentration von 12 mM vermessen.

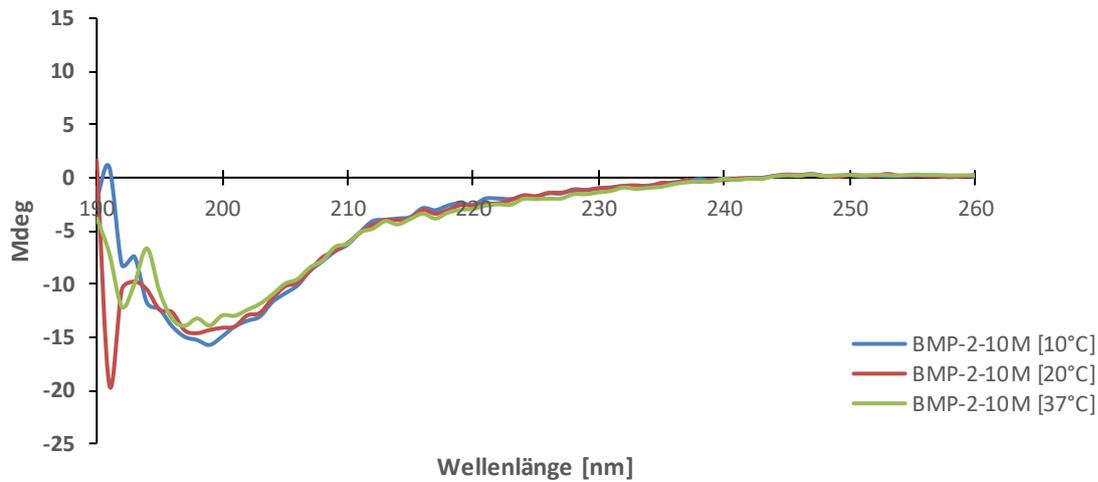


Abb. 42: CD-Spektren von BMP-2-10M im fernen UV-Bereich (hier 190 nm- 260 nm)

Dargestellt sind Spektren bei 10 °C, 20 °C und 37 °C. Das verwendete Mutein wurde zuvor in 1 mM HCl gelöst und in einer Konzentration von 12 mM vermessen.

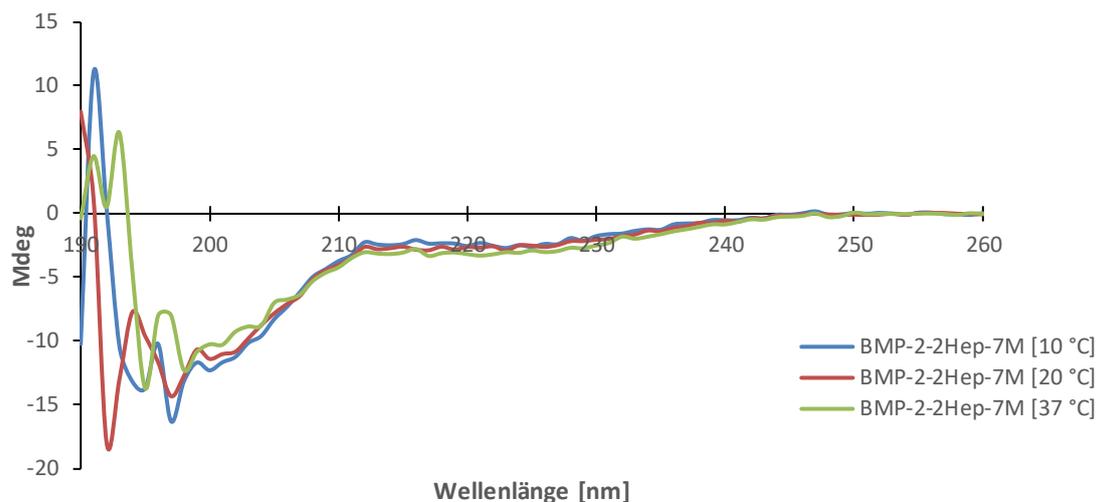


Abb. 43: CD-Spektren von BMP-2-2Hep-7M im fernen UV-Bereich (hier 190 nm- 260 nm)

Dargestellt sind Spektren bei 10 °C, 20 °C und 37 °C. Das verwendete Mutein wurde zuvor in 1 mM HCl gelöst und in einer Konzentration von 12 mM vermessen.

Tab. 23: Quantitative Analyse der Sekundärstrukturelemente [%] anhand der aufgenommenen CD-Spektren bei 10, 20 und 37 °C

Die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente wurde mit Hilfe der Programme CDSSTR Set 4 oder 7 durchgeführt. Proben wurden zuvor in 1 mM HCl, pH 3.0 gelöst.

Sekundärstrukturanteil [%]								
	Helix 1	Helix 2	Strand 1	Strand 2	Turn	Unfol.	Σ	Rmsd
10 °C, Set 7								
BMP-2-10M	0.00	0.02	0.17	0.10	0.16	0.54	0.99	0.056
BMP-2-2Hep-7M	0.07	0.01	0.14	0.07	0.37	0.38	1.02	0.060
Wt-BMP-2	0.01	0.00	0.31	0.14	0.28	0.27	0.99	0.025
10 °C, Set 4								
BMP-2-10M	0.00	0.06	0.21	0.12	0.23	0.36	0.98	0.052
BMP-2-2Hep-7M	0.00	0.02	0.13	0.14	0.24	0.45	0.98	0.042
Wt-BMP-2	0.02	0.05	0.25	0.15	0.22	0.32	0.97	0.017
20 °C, Set 7								
BMP-2-10M	0.03	0.02	0.43	0.21	0.23	0.05	0.96	0.015
BMP-2-2Hep-7M	0.02	0.01	0.25	0.18	0.26	0.27	0.97	0.013
Wt-BMP-2	0.00	0.00	0.33	0.16	0.25	0.24	0.98	0.022
20 °C, Set 4								
BMP-2-10M	0.00	0.11	0.21	0.12	0.30	0.24	0.98	0.036
BMP-2-2Hep-7M	0.00	0.06	0.27	0.13	0.26	0.27	0.99	0.043

Anhang

Wt-BMP-2	0.02	0.04	0.27	0.14	0.27	0.32	0.99	0.022
37 °C, Set 7								
BMP-2-10M	0.00	0.03	0.14	0.08	0.14	0.61	1.00	0.067
BMP-2-2Hep-7M	0.03	0.01	0.19	0.12	0.21	0.45	1.02	0.096
Wt-BMP-2	0.00	0.00	0.30	0.16	0.22	0.32	1.00	0.017
37 °C, Set 4								
BMP-2-10M	0.00	0.07	0.21	0.12	0.25	0.34	0.99	0.058
BMP-2-2Hep-7M	0.01	0.06	0.19	0.13	0.24	0.37	1.00	0.94
Wt-BMP-2	0.01	0.03	0.26	0.14	0.24	0.33	0.99	0.018

Tab. 24: Quantitative Analyse der Sekundärstrukturelemente [%] anhand der aufgenommenen CD-Spektren bei 10 °C, 20 °C und 37 °C

Die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente wurde mit Hilfe der Programme CDSSTR Set 4 oder 7 durchgeführt. Proben wurden zuvor in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4 und pH 5.0 (Wildtyp-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg) gelöst.

Sekundärstrukturanteil [%]								
	Helix 1	Helix 2	Strand 1	Strand 2	Turn	Unfol.	∑	Rmsd
10 °C, Set 7								
BMP-2-10M	0.01	0.03	0.25	0.12	0.36	0.27	1.02	0.082
BMP-2-2Hep-7M	0.01	0.01	0.29	0.17	0.22	0.30	1.00	0.041
BMP-2-2Hep-7M (24h gelöst)	0.41	0.12	0.13	0.12	0.05	0.16	0.99	0.003
Wt-BMP-2	n. gem.							
10 °C, Set 4								
BMP-2-10M	0.01	0.03	0.25	0.12	0.36	0.27	1.02	0.093
BMP-2-2Hep-7M	0.01	0.05	0.29	0.15	0.20	0.29	1.00	0.046
BMP-2-2Hep-7M (24h gelöst)	0.036	0.06	0.16	0.12	0.08	0.21	0.99	0.002
Wt-BMP-2	n. gem.							
20 °C, Set 7								
BMP-2-10M	Kein Erg.							
BMP-2-2Hep-7M	0.01	0.03	0.28	0.14	0.17	0.37	0.98	0.047
Wt-BMP-2	-	-	-	-	-	-	-	-

Anhang

20 °C, Set 4								
BMP-2-10M	Kein Erg.							
BMP-2-2Hep-7M	0.01	0.06	0.25	0.15	0.19	0.33	0.99	0.047
Wt-BMP-2	-	-	-	-	-	-	-	-
37 °C, Set 7								
BMP-2-10M	0.00	0.01	0.21	0.13	0.23	0.40	0.98	0.064
BMP-2-2Hep-7M	0.00	0.01	0.24	0.16	0.34	0.24	0.99	0.043
Wt-BMP-2	-	-	-	-	-	-	-	-
37 °C, Set 4								
BMP-2-10M	0.01	0.06	0.25	0.14	0.27	0.26	0.99	0.086
BMP-2-2Hep-7M	0.02	0.06	0.26	0.15	0.25	0.26	1.00	0.042
Wt-BMP-2	n. gem.							
60 °C, Set 7								
BMP-2-10M	n. gem.							
BMP-2-2Hep-7M	0.00	0.03	0.23	0.12	0.26	0.35	0.99	0.069
Wt-BMP-2	n. gem.							
60 °C, Set 4								
BMP-2-10M	n. gem.							
BMP-2-2Hep-7M	0.01	0.07	0.26	0.13	0.26	0.27	1.00	0.071
Wt-BMP-2	n. gem.							

9.5 Zellbiologische Arbeiten

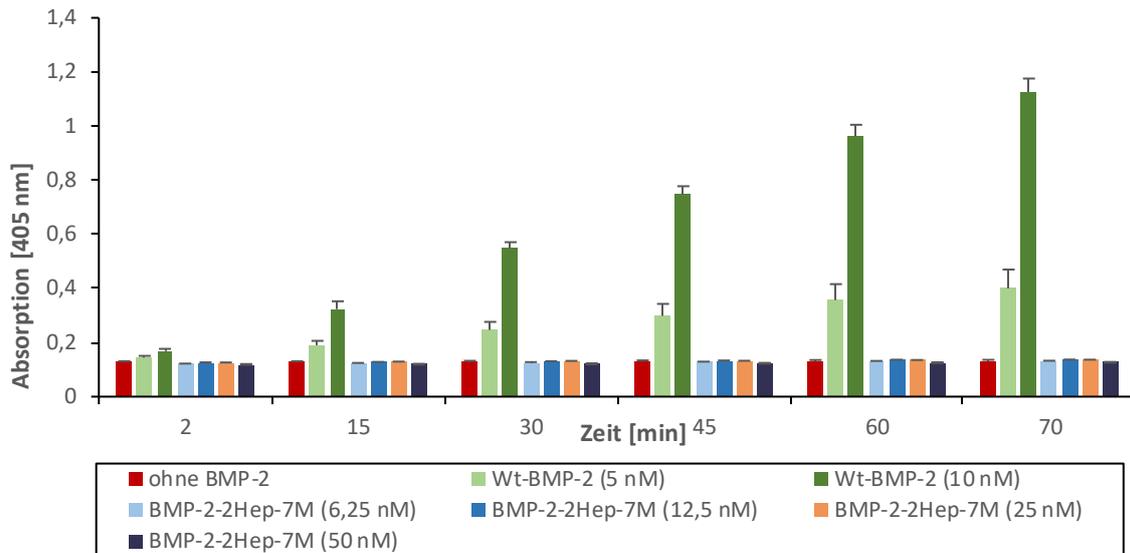


Abb. 44: ALP-Assay zum Nachweis der biologischen Aktivität von Variante BMP-2-2Hep-7M und Wt- BMP-2

Konzentrationsabhängige Stimulation der ALP-Aktivität in C2C12-Zellen (ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten) in einem Zeitraum von 2-70 min durch Variante BMP-2-2Hep-7M. Die ALP-Aktivität des BMP-2-Muteins korreliert zu keinem Zeitpunkt und getesteten Konzentration mit den Ergebnissen der Referenz (Wt-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg [modifiziert nach Masterarbeit/Heinks, 2019].

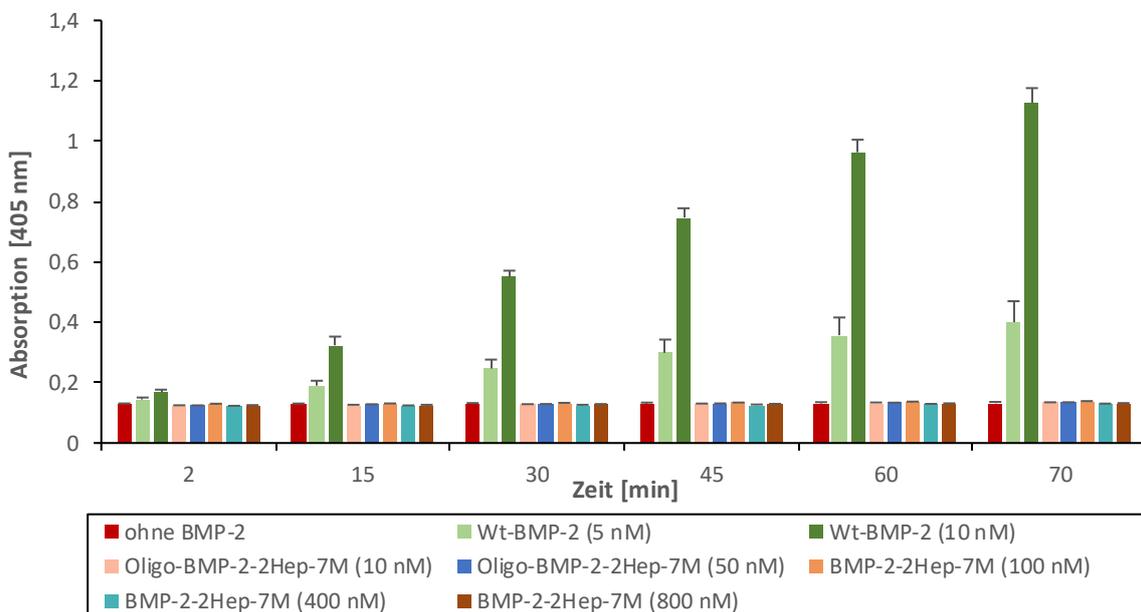


Abb. 45: ALP-Assay zum Nachweis der biologischen Aktivität der oligomerisierten Variante BMP-2-2Hep-7M, BMP-2-2Hep-7M und Wt-BMP-2

Konzentrationsabhängige Stimulation der ALP-Aktivität in C2C12- Zellen (ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten) in einem Zeitraum von 2-70 min durch das oligomerisierte Mutein BMP-2Hep-7M, die Variante BMP-2-2Hep-7M und Wildtyp-BMP-2. Die ALP-Aktivität des BMP-2-Muteins auch in seiner oligomerisierten Form korreliert zu keinem Zeitpunkt und getesteten Konzentration mit den Ergebnissen der Referenz (Wildtyp-BMP-2, AG Prof. Dr. T. Müller, Universität Würzburg [modifiziert nach Masterarbeit/Heinks, 2019].

10 Literaturverzeichnis

- Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazonom K., Kawabata, M. (1999).** c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem.*, 274(49):35269-77.
- Ahn, Y., Sanderson, B.W., Klein, O.D., Krumlauf, R. (2010).** Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development.*, 137(19):3221-31.
- Ali, I. H., Brazil, D.P. (2014).** Bone morphogenetic proteins and their antagonists: current and emerging clinical uses. *Br J Pharmacol.*, 171(15):3620-32.
- Albers, C.E., Hofstetter, W., Sebald, H.J., Sebald, W., Siebenrock, K.A., Klenke, F.M. (2012).** L51P - A BMP2 variant with osteoinductive activity via inhibition of Noggin. *Bone* 51(3): 401-406.
- Alonso, N., Tanikawa, D.Y., Freitas Rda, S., Canan, L. Jr., Ozawa, T.O., Rocha, D.L. (2010).** Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. *Tissue Eng Part C Methods.*, 16(5):1183-9.
- Amthor, H., Nicholas, G., McKinnell, I., Kemp, C.F., Sharma, M., Kambadur, R., Patel, K. (2004).** Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol.*, 270(1):19-30.
- Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., Timasheff, S.N. (2007).** Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects, *Bioph chem*, 127,1–8.
- Arakawa, T., Tsumoto, K., Nagase, K., Ejima, D. (2007).** The effects of arginine on protein binding and elution in hydrophobic interaction and ion-exchange chromatography. *Prot expr and purific*, 54, 1,110–116.
- Argintar, E., Edwards, S., Delahay, J. (2011).** Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Injury.*, 42(8):730-4.
- Arndt, S., Poser, I., Schubert, T., Moser, M., Bosserhoff, A.K. (2005).** Cloning and functional characterization of a new Ski homolog, Fussel-18, specifically expressed in neuronal tissues. *Lab Invest.*, 85(11):1330-41.
- Arndt, S., Poser, I., Moser, M., Bosserhoff, A.K. (2007).** Fussel-15, a novel Ski/Sno homolog protein, antagonizes BMP signaling. *Mol Cell Neurosc.*, 34(4):603-11.
- Aro, H.T., Govender, S., Patel, A.D., Hernigou, P., Perera de Gregorio, A., Popescu, G.I., Golden, J.D., Christensen, J., Valentin, A. (2011).** Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. *J Bone Joint Surg Am.*, 4;93(9):801-8.

- Aspenberg, P., Jeppsson, C., Economides, A.N. (2001).** The bone morphogenetic proteins antagonist Noggin inhibits membranous ossification. *J Bone Miner Res.*, 16(3):497-500.
- Avsian-Kretchmer, O. & Hsueh, A.J. (2004).** Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol*, 18(1): 1-12.
- Balemans, W. & Van Hul, W. (2002).** Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: A cocktail of modulators. *Dev Biol.*, 250, 231-250.
- Baynes, B.M., Wang, D.I.C., Trout, B.L. (2005).** Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation, *Biochem.* 44, 4919–4925.
- Beidas, O.E., Deschamps-Braly, J.C., Morgan, A.M., Workman, M.C., Knotts, C.D., Denny, A.D., El, Amm., CA. (2013).** Safety and efficacy of recombinant human bone morphogenetic protein 2 on cranial defect closure in the pediatric population. *J Craniofac Surg.*, 24(3):917-22.
- Bell, E., Muñoz-Sanjuán, I., Altmann, C.R., Vonica, A., Brivanlou, A.H. (2003).** Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGFbeta and Wnt inhibitor. *Development.*, 130(7):1381-9.
- 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 of tissue eng. and regener med* 2, 81–96.
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G. (1999).** Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 24, 13703–13708.
- Bessho, K., Konishi, Y., Kaihara, S., Fujimura, K., Okubo, Y., Izuka, T. (2000).** Bone induction by Escherichia coli -derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2, *The British J of oral & maxillof surg.*, 38, 645–649.
- Bostrom, M.P. (1998).** Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.*, (355 Suppl): S116-23.
- 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(2):355-65.
- Billings, P.C., & Pacifici, M. (2015).** Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: mechanisms and mysteries. *Connect. Tissue Res.*, 56, 272- 280.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.

- Blau, H.M., Webster, C., Chiu, C.P., Guttman, S., Chandler, F. (1998).** Differentiation properties of pure populations of human dystrophic muscle cells. *Exp Cell Res.*, 144(2):495-503.
- Boerckel, J.D., Kolambkar, Y.M., Dupont, K.M., Uhrig, B.A., Phelps, E.A., Stevens, H.Y., García, A.J., Guldborg, R.E. (2011).** Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomater.*, 32:5241–5251.
- Bolten, S.N., Rinas, U., Scheper, T. (2018).** Heparin: role in protein purification and substitution with animal-component free material. *Appl Microbiol Biotech.* 102(20):8647-8660.
- Brazil, D.P., Church, R.H., Surae, S., Godson, C., Martin, F. (2015).** BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol.*, 25(5):249-64.
- Brown, K.V., Li, B., Guda, T., Perrien, D.S., Guelcher, S.A., Wenke, J.C. (2011).** Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release. *Tissue Eng Part A.*, 17(13-14):1735-46.
- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Harland, R.M. (1998).** Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, 280(5368):1455-7.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., Stefani, M. (2002).** Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature.*, 416(6880):507-11.
- Buchan, D.W.A. & Jones. D.T. (2019).** The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on, *Nucleic acids research.*, 47, W402-W407.
- Cahill, K.S., McCormick, P.C., Levi, A.D. (2015).** A comprehensive assessment of the risk of bone morphogenetic protein use in spinal fusion surgery and postoperative cancer diagnosis. *J Neurosurg Spine.*, 23(1):86-93.
- Canalis, E., Economides, A.N., Gaggero, E. (2003).** Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.*, 24:218–35.
- Canchi, D., Paschek, D., Garcia, A. E. (2010).** Equilibrium study of protein denaturation by urea. *Journal of the American Chemical Society.*, 132, 7, 2338–2344.
- Carragee, E.J., Hurwitz, E.L., Weiner, B.K. (2011).** A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J.*, 2011; 11:471–91.
- Carreira, A.C., Lojudice, F.H., Halcsik, E., Navarro, R.D., Sogayar, M.C., Granjeiro, J.M. (2014).** Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res.*, 93(4):335-45.
- Chang, C., Holtzman, D.A., Chau, S., Chickering, T., Woolf, E.A., Holmgren, L.M., Bodorova, J., Gearing, D.P., Holmes, W.E., & Brivanlou, A.H. (2001).** Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature*, 410, 483-487.

- Charles, L.F., Woodman, J.L., Ueno, D., Gronowicz, G., Hurley, M.M., Kuhn, L.T. (2015).** Effects of low dose FGF-2 and BMP-2 on healing of calvarial defects in old mice. *Exp Gerontol.*, 64:62-9.
- Christiansen, J.H., Coles, E.G., Wilkinson, D.G. (2000).** Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.*, 12(6):719-24.
- Carreira, A.C., Lojudice, F.H., Halcsik, E., Navarro, R. D., Sogayar, M. C., Granjeiro, J. M. (2014).** Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J of Dent Res.*, 93(4):335-345.
- Carreira, A.C., Zambuzzi, W.F., Rossi, M.C., Astorino Filho, R., Sogayar, M.C., Granjeiro, J.M. (2015).** Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. *Vitam Horm.*, 99:293-322.
- Chen, D., Zhao, M., Harris, S. E., Mi, Z. (2004).** Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci.*, 9: 349-358.
- Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R. (2004).** Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.*, 22(4):233-41.
- Chen, J., Liu, Y., Wang, Y., Ding, H., Su, Z. (2008).** Different effects of L-arginine on protein refolding: suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding. *Biotechnol Prog.*, 24, 1365–1372.
- Chen, G., Deng, C., Li, Y.P. (2012).** TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.*, 8(2):272-88.
- Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J.P., Park, J.Y., He, T.C. (2003).** Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.*, 85(8):1544-52.
- Chi, E.Y., Krishnan, S., Randolph, T.W., Carpenter, J.F. (2003).** Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.*, 20, 1325–1336.
- Chien, S.Y., Tsai, C.H., Liu, S.C., Huang, C.C., Lin, T.H., Yang, Y.Z., Tang, C.H. (2020).** Noggin Inhibits IL-1 β and BMP-2 Expression, and Attenuates Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Destruction in Experimental Osteoarthritis. *Cells*, 9(4):927.
- Choi, Y. J., Lee, J. Y., Park, J. H., Park, J. B., Suh, J. S., Choi, Y. S., Lee, S. J., Chung, C.-P., and Park, Y. J. (2010).** The identification of a heparin binding domain peptide from bone morphogenetic protein-4 and its role in osteo-genesis. *Biomater.*, 31,7226–7238.
- Church, R.H., Krishnakumar, A., Urbanek, A., Geschwindner, S., Meneely, J., Bianchi, A., Basta, B., Monaghan, S., Elliot, C., Strömstedt, M., Ferguson, N., Martin, F., Brazil, D.P. (2015).** Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7. *Biochem J.*, 466(1):55-68.

- Conchillo-Sole, O., de Groot, N. S., Aviles, F. X., Vendrell, J., Daura, X., Ventura, S. (2007).** AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinfo.*, 8: 65. 10.1186/1471-2105-8-65.
- Comer, G.C., Smith, M.W., Hurwitz, E.L., Mitsunaga, K.A., Kessler, R., Carragee, E.J. (2012).** Retrograde ejaculation after anterior lumbar interbody fusion with and without bone morphogenetic protein-2 augmentation: a 10-year cohort-controlled study. *Spine J.*, 12:881–90.
- Compton, L.A., & Johnson, W.C., Jr. (1986).** Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.*, 155, 155–167.
- Cuff, J. A. & Barton, G.J. (2000).** Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins.*, 40, 502–511.
- 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;17(16):4735-43.
- Daluiski, A., Engstrand, T., Bahamonde, M.E., Gamer, L.W., Agius, E., Stevenson, S.L., Cox, K., Rosen, V., Lyons, K.M. (2001).** Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet.*, 27(1):84-8.
- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y., Davies, D.R. (1992).** Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*, 257(5068): 369-73.
- Dean, D.B., Watson, J.T., Moed, B.R., Zhang, Z. (2009).** Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture. *Front Biosci.*, 14:2878–2888.
- Dean, D.B., Watson, J.T., Jin, W., Peters, C., Enders, J.T., Chen, A., Moed, B.R., Zhang, Z. (2010).** Distinct functionalities of bone morphogenetic protein antagonists during fracture healing in mice. *J Anat.*, 216(5):625-30.
- Deglinerti, A., Haremake, T., Warmflash, A., Sorre, B., Brivanlou, A.H. (2015).** Coco is a dual activity modulator of TGF β signaling. *Development.*, 142(15):2678-85.
- Deheuminck, J., & Luo, K. (2009).** Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell research*, 19(1), 47–57.
- Damien, C.J. & Parsons, J.R. (1991).** Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.*, 2(3):187-208.
- Derman, A.I. & Beckwith, J. (1991).** Escherichia coli alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol.*, 173(23):7719-22.
- Derynck, R. & Zhang, Y. E. (2003).** Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425(6958): 577-584.
- Depprich, R., Handschel, J., Sebald, W., Kübler, N.R., Wuerzler, K.K. (2005).** Vergleich der osteogenen Potenz gentechnisch modifizierter BMP, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie: MKG 9, 363–368.

Devine, J.G., Dettori, J.R., France, J.C., Brodt, E., McGuire, R.A. (2012). The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? *Evid Based Spine Care J.*, 3(2):35-41.

Döbele, S., Horn, C., Eichhorn, S., Buchholtz, A., Lenich, A., Burgkart, R., Nüssler, A.K., Lucke, M., Andermatt, D., Koch, R., Stöckle, U. (2010). The dynamic locking screw (DLS) can increase interfragmentary motion on the near cortex of locked plating constructs by reducing the axial stiffness. *Langenbecks Arch Surg.*, 395(4):421-8.

Dumic-Cule, I, Peric, M., Kucko, L., Grgurevic, L., Pecina, M., Vukicevic, S. (2018). Bone morphogenetic proteins in fracture repair. *Int Orthop.*, 42(11):2619-2626.

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., Miyazono, K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.*, 276: 12477–12480.

Ehnert, S., Baur, J., Schmitt, A., Neumaier, M., Lucke, M., Dooley, S., Vester, H., Wildemann, B., Stöckle, U., Nussler, A.K. (2010). TGF- β 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One*, 22;5(11): e14073.

El Bialy, I., Jiskoot, W., Nejadnik, M.R. (2017). Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharm research*, 34(6): 1152–1170.

Eppendorf USERGUIDE No. 13 I Mai 2015: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/de/109168_Userguide/Eppendorf_Detection_Userguide_013_BioPhotometer-plus_Troubleshooting-Guide-measurement-nucleic-acids-BioPhotometer_D30.pdf (Mai, 2021).

Eriksson, A., Burcharth, J., Rosenberg, J. (2013). Animal derived products may conflict with religious patients' beliefs. *BMC medical ethics.*, 14,48.

Esko, J.D. & Linhardt, R.J. (2009). Proteins that bind sulfated glycosaminoglycans In: *essentials of Glycobiology*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Everts, P., Onishi, K., Jayaram, P., Lana, J.F., Mautner, K. (2020). Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci.*, 21, 7794.

Feeley, B.T., Liu, N.Q., Conduah, A.H., Krenek, L., Roth, K., Dougall, W.C., Huard, J., Dubinett, S., Lieberman, J.R. (2006). Mixed metastatic lung cancer lesions in bone are inhibited by noggin overexpression and Rank: Fc administration. *J Bone Miner Res.*, 21(10):1571-80.

Feeley, B.T., Krenek, L., Liu, N., Hsu, W.K., Gamradt, S.C., Schwarz, E.M., Huard, J., Lieberman, J.R. (2006). Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone.*, 38(2):154-66.

Ferre, F. & Clote, P. (2005). DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res* 33(Web Server issue): W230-232. 10.1093/nar/gki412.

- Ferrer, M., Chernikova, T., Yakimov, M., Golyshin, P.N., Timmis, K.N. (2003).** Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat Biotechnol* 21, 1266–1267.
- Fiebich, B.L., Jager, B., Schollmann, C., Weindel, K., Wilting, J., Kochs, G., Marme, D., Hug, H., Weich, H.A. (1993).** Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells. *Eur J Biochem*, 211:19–26.
- Fiedler, J., Röderer, G., Günther, K.P., Brenner, R.E. (2002).** BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*, 87(3):305-12.
- Fischer, B., Sumner, I., Goodenough, P. (1993).** Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng.*, 41(1):3-13.
- Fumagalli, S., Doneda, L., Nomura, N., Larizza, L. (1993).** Expression of the c-ski proto-oncogene in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.*, 3: 23–27. 24.
- 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(5): 491-498.
- Gámez, B., Rodríguez-Carballo, E., Ventura, F. (2013).** BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation, *Front in cell neuros.*, 7, 87.
- Gandhi, N.S. & Mancera, R.L. (2012).** Prediction of heparin binding sites in bone morphogenetic proteins (BMPs), *Bioch et bioph acta* 1824,1374–1381.
- Gamer, L. W., Cox, K. A., Small, C., Rosen, V. (2001).** Gdf11 is a negative regulator of chondrogenesis and myogenesis in the developing chick limb. *Dev. Biol.*, 229, 407–420.
- Gamradt, S.C. & Lieberman, J.R. (2004).** Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biomed Eng.*, 32(1):136–147.
- Gautschi, O.P., Frey, S.P., Zellweger, R. (2007).** Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J. Surg.*, 77: 626–631.
- Gazzerro, E., Gangji, V., Canalis, E. (1998).** Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest.*, 102(12):2106-14.
- Gazzerro, E. & Canalis, E. (2006).** Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord.*, 7(1-2):51-65.
- Geiger, M., Li, R.H., Friess, W. (2003).** Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP- 2. *Adv Drug Deliv Rev.*, 55(12):1613-29.
- Giannoudis, P.V. & Tzioupis, C. (2005).** Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. *Injury.*, 36 Suppl 3: S47-50.

Gilbert, H.F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol.*, 63: 69-172.

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(3):1023-35.

González-Montalbán, N., García-Fruitós, E., Villaverde, A. (2007). Recombinant protein solubility - does more mean better? *Nat Biotechnol.*, 25(7):718-20.

Gong, Y., Krakow, D., Marcelino, J., Wilkin, D., Chitayat, D., Babul-Hirji, R., Hudgins, L., Cremers, C.W., Cremers, F.P., Brunner, H.G., Reinker, K., Rimoin, D.L., Cohn, D.H., Goodman, F.R., Reardon, W., Patton, M., Francomano, C.A., Warman, M.L. (1999). Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet.*, 21(3):302-4.

Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K., Miyazawa, K. (2007). Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem.*, 282(28):20603-11.

Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K, Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Börner, M.G., et al., (2002). BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group. 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(12):2123-34.

Greenblatt, M.B., Shim, J.H., Zou, W., Sitara, D., Schweitzer, M., Hu, D., Lotinun, S., Sano, Y., Baron, R., Park, J.M., Arthur, S., Xie, M., Schneider, M.D., Zhai, B., Gygi, S., Davis, R., Glimcher, L.H. (2010). The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. *The J of clin invest.*, 120(7), 2457–2473.

Greenfield, N. & Fasman, G.D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.*, 8(10):4108-16.

Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Belmonte, J.C., Choe, S. (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*, 420 (6916):636-642.

Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Baban, K., Affolter, M., Vale, W.W., Belmonte, J.C., Choe, S. (2003). Structural basis of BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl., 3:52-58.

Guan, D. & Chen, Z. (2014). Challenges and recent advances in affinity purification of tag-free proteins. *Biotechnol., Lett* 36:1391–1406.

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(11): 2060-2068.

Guo, W., Zhu, X., Cai J, Huang, L., Cen, P., Xu, Z. (2012). Refolding and two-step purification by hydrophobic interaction chromatography of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. *Process Biochem.*, 47:960–967.

Hajimiri, M., Shahverdi, S., Kamalinia, G., Dinarvand, R. (2015). Growth factor conjugation: strategies and applications. *J Biomed Mater Res A.*, 103(2):819-38.

Halloran, D., Durbano, H.W., Nohe, A. (2020). Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *J Dev Biol.*, 13;8(3):19.

Hammarström, M., Woestenenk, E.A., Hellgren, N., Härd, T., Berglund, H. (2006). Effect of N-terminal solubility enhancing fusion pro-teins on yield of purified target protein. *J Struct Funct Genomics*, 7, 1–14.

Hammonds, R.G. Jr., Schwall, R., Dudley, A., Berkemeier, L., Lai, C., Lee, J., Cunningham, N., Reddi, A.H., Wood, W.I., Mason, A.J. (1991). Bone-inducing activity of mature BMP-2b produced from a hybrid BMP-2a/2b precursor. *Mol Endocrinol.*, 5(1):149-55.

Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T., Miyazono, K. (2001). The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol.*, 155(6):1017-27.

Harrison, R.L. & Jarvis, D.L. (2006). Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res.*, 68:159-91.

Hauser, M., Siegrist, M., Keller, I., Hofstetter, W. (2018). Healing of fractures in osteoporotic bones in mice treated with bisphosphonates - A transcriptome analysis. *Bone.*, 112:107-119.

Hausmann, M., Ehnert, S., Hofmann, V., Döbele, S., Freude, T., Stöckle, U., Nussler, A. (2014). Use of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) for the Treatment of Pseudarthroses - Efficiency and Therapy Failure. *Z Orthop Unfall.*, 152(2):144-51. German

Heinks, T. (2019). Hochaufreinigung und Charakterisierung einer löslichen BMP2-Variante hoher Heparin-Affinität. Masterarbeit, AG Prof. Dr. A. Loidl-Stahlhofen, WHS Recklinghausen.

Herrera, B. & Inman, G.J.A. (2009). A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol.*, 10:20.

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 of Biol. Chem.* 280, 14974–14980.

- Hollinger, J.O., Schmitt, J.M., Buck, D.C., Shannon, R., Joh, S.-P., Zegzula, H.D., Wozney, J. (1998).** Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.*, 43(4), 356–64.
- Holtzhausen, A., Golzio, C., How, T., Lee, Y. H., Schiemann, W. P., Katsanis, N., Blobe, G. C. (2014).** Novel bone morphogenetic protein signaling through Smad2 and Smad3 to regulate cancer progression and development. *FASEB J.*, 28(3): 1248-1267.
- Hou, Y., Hansen, T.B., Staby, A., Cramer, C. M. (2010).** Effects of urea induced protein conformational changes on ion exchange chromatographic behavior. *J Chromatogr A.*, 1217(47):7393-400.
- 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. *Molecular cell*, 1, 673-683.
- Hyvönen, M. (2003).** CHR1, a novel domain in the BMP inhibitor chordin, is also found in microbial proteins. *Trends Biochem Sci.*, 28(9):470-3.
- Hung, W.T., Wu, F.J., Wang, C.J., Luo, C.W. (2012).** DAN (NBL1) specifically antagonizes BMP2 and BMP4 and modulates the actions of GDF9, BMP2, and BMP4 in the rat ovary. *Biol Reprod.*, 86(5):158, 1-9.
- Ideno, H., Takanabe, R., Shimada, A., Imaizumi, K., Araki, R., Abe, M., Nifuji, A. (2009).** Protein related to DAN and cerberus (PRDC) inhibits osteoblastic differentiation and its suppression promotes osteogenesis in vitro. *Exp Cell Res.*, 1;315(3):474-84.
- Iemura, S., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H., Ueno, N. (1998).** Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early Xenopus embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(16):9337-42.
- Im, J., Kim, H., Kim, S., Jho, E.H. (2007).** Wnt/ β -catenin signaling regulates expression of PRDC, an antagonist of the BMP-4 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 354, Issue 1, Pages 296-301.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., Miyazono, K. (1997).** Smad6 inhibits signaling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, 9;389(6651):622-6.
- Inman, G.J. & Hill, C.S. (2002).** Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J Biol Chem.*, 277(52): 51008-51016.
- Ishida, N., Tsujimoto, M., Kanaya, T., Shimamura, A., Tsuruoka, N., Kodama, S., Katayama, T., Oikawa, S., Matsui, M., Nakanishi, T. und et al. (1994).** Expression and characterization of human bone morphogenetic protein-2 in silkworm larvae infected with recombinant Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus. *J of Biochem.*, 115(2): 279-85.
- 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(2):139-50.

- Itasaki, N., Jones, C.M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P.M., Smith, J.C., Krumlauf, R. (2003).** Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development*, 130(18):4295-305.
- Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C.H., ten Dijke, P., Itoh, S. (2001).** Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J.*, 1;20(15):4132-42.
- James, A.W., LaChaud, G., Shen, J., Asatrian, G., Nguyen, V., Zhang, X., Ting, K., Soo, C. (2016).** A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev.*, 22(4):284-97.
- Jones, D.T. (1999).** Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.*, 292(2):195-202.
- Jones, A.L., Bucholz, R.W., Bosse, M.J., Mirza, S.K., Lyon, T.R., Webb, L.X., Pollak, A.N., Golden, J.D., Valentin-Opran, A. (2006).** BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma-Allgraft (BESTT-ALL) Study Group. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am.*, 88(7):1431-41.
- Kang, Q., Sun, M. H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A. G., Deyrup, A. T., Jiang, W., Luu, H. H., Luo, J., Szatkowski, J. P., Vanichakarn, P., Park, J. Y., Li, Y.; Haydon, R. C., He, T. C. (2004).** Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther.*, 11(17): 1312-1320.
- 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(6 Pt 1):1755-66.
- Kattamuri, C., Luedeke, D.M., Nolan, K., Rankin, S.A., Greis, K.D., Zorn, A.M., Thompson T.B. (2012).** Members of the DAN family are BMP antagonists that form highly stable noncovalent dimers. *J Mol Biol.*, 424(5):313-27.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., Wrana, J.L. (2000).** Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell.*, 6: 1365–1375.
- Keller, S., Nickel, J., Zhang J.L., Sebald, W., Mueller, T. D. (2004).** Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat Struct Mol Biol.*, 11(5):481-488.
- Kelly, S.M. & Price. N.C. (2000).** The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr Protein Pept Sci.*, 1(4):349-84
- Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C. (2005).** How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1751(2):119–139.
- Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. (2009).** Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc.*, 4(3): 363-371.

Khademi, F. & Mostafaie, A. (2010). Effect of urea on protein separation by ion exchange chromatography. *J Biochem.*, 147(5):735–741.

Khattab, H.M., Ono, M., Sonoyama, W., Oida, Y., Shinkawa, S., Yoshioka, Y., Maekawa, K., Tabata, Y., Sugama, K., Sebald, W., Kuboki, T. (2014). The BMP2 antagonist inhibitor L51P enhances the osteogenic potential of BMP2 by simultaneous and delayed synergism. *Bone.*, 69:165-73.7

Khattab, H.M., Kubota, S., Takigawa, M., Kuboki, T., Sebald, W. (2019). The BMP-2 mutant L51P: a BMP receptor IA binding-deficient inhibitor of noggin. *J Bone Miner Metab.*, 37(2):199-205.

Kim, S., Kang, Y., Krueger, C.A., Sen, M., Holcomb, J.B., Chen, D., Wenke, J.C., Yang, Y. (2012). Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation. *Acta Biomater.*, 8(5):1768-77.

Kim, M.J., Kim, K.M., Kim, J., Kim, K.N. (2014). BMP-2 promotes oral squamous carcinoma cell invasion by inducing CCL5 release. *PloS one*, 9(10), e108170.

King, W.J. & Krebsbach, P.H. (2012). Growth factor delivery: How surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64:1239–1256.

Kirker-Head, C.A. (2000). Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev.*, 43(1):65-92.

Kirsch, T., Nickel, J., Sebald, W. (2000). BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J.*, 19(13): 3314-3324.

Kirsch, T., Sebald, W., Dreier, M.K. (2000). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nature Struct. Biol.*,7(6), 492-6.

Knaus, P. & Sebald, W. (2001). Cooperativity of binding epitopes and receptor chain in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol Chem.*, 382(8):1189-95.

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. und et al. (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.*, 14: 5961-74

Komori, T. (2010). Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.*, 339(1):189-95.

Korchynskyi, O. & ten Dijke, P. (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem.*, 15;277(7):4883-91.

Krause, C., Korchynskyi, O., de Rooij, K., Weidauer, S.E., de Gorter, D.J., van Bezooijen, R.L., Hatsell, S., Economides, A.N., Mueller, T.D., Löwik, C.W., ten Dijke, P. (2010). Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem.*, 31;285(53):41614-26.

Krause, C., Guzman, A., Knaus, P. (2011). Noggin. *Int J Biochem Cell Biol.* ,43(4):478-81.

- Kriebitz, N.N., Kiecker, C., McCormick, L., Lumsden, A., Graham, A., Bell, E. (2009).** PRDC regulates placode neurogenesis in chick by modulating BMP signalling. *Dev Biol.*, 15;336(2):280-92.
- Kusu, N., Laurikkala, J., Imanishi, M., Usui, H., Konishi, M., Miyake, A., Thesleff, I., Itoh, N. (2003).** Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity. *J Biol Chem.*, 27;278(26):24113-7.
- Kübler, N.R., Reuther, J.F., Faller, G., Kirchner, T., Ruppert, R., Sebald, W. (1998).** Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int J of oral and maxillofac surg.*, 27, 305–309.
- Kübler, N.R., Wuerzler, K., Reuther, J.F., Faller, G., Sieber, E., Kirchner, T., Sebald, W. (1999).** EHBMP-2. Erstes BMP-Analog mit osteoinduktiven Eigenschaften, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie: MKG 3 Suppl 1, S. 134-9.
- Kübler, N.R., Wuerzler, K., Reuther, J.F., Sieber, E., Kirchner, T., Sebald, W. (2000).** Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die knochenbildenden Eigenschaften von rekombinanten BMPs, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie: MKG 4 Suppl 2, S. 465-9.
- Lad, S.P., Bagley, J.H., Karikari, I.O., Babu, R., Ugiliweneza, B., Kong, M., Isaacs, R.E., Bagley, C.A., Gottfried, O.N., Patil, C.G., Boakye, M. (2013).** Cancer after spinal fusion: the role of bone morphogenetic protein. *Neurosurgery.*, 73(3):440-9.
- Lai, C.F & Cheng, S.L. (2002).** Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem.*, 277(18):15514-22.
- Larrain, J., Oelgeschlager, M., Ketpura, N.I., Reversade, B., Zakin, L., De Robertis, E. M. (2001).** Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Develop.*, 128: 4439–4447.
- Laurikkala, J., Kassai, Y., Pakkasjärvi, L., Thesleff, I., Itoh, N. (2003).** Identification of a secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot. *Dev Biol.*, 264(1):91-105.
- LaVallie, E.R., Lu, Z.J., Diblasio-Smith, E.A., Collins-Racie, L.A., McCoy, J.M. (2000).** Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Chimeric Genes Hybrid Proteins Pt A326*, 32.
- Lavery, K., Swain, P., Falb, D., Alaoui-Ismaili, M.H. (2008).** BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *The J of Biol Chem.*, 283(30), 20948–20958.
- Lebendiker, M. & Danieli, T. (2014).** Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS letters.*, 588, 2, 236–246.
- Lehmann, K., Seemann, P., Silan, F., Goecke, T.O., Irgang, S., Kjaer, K.W., Kjaergaard, S., Mahoney, M.J., Morlot, S., Reissner, C., Kerr, B., Wilkie, A.O., Mundlos, S. (2007).** A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *American J of human genet.*, 81(2), 388–396.

- Leong, G.M., Subramaniam, N., Figueroa, J., Flanagan, J.L., Hayman, M.J., Eisman, J.A., Kouzmenko, A.P. (2001).** Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J Biol Chem.*, 276(21):18243-8
- Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E., Wu, D. (2005).** Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.*, 280(20):19883-7.
- Lin, X., Liang, M., Feng, X.H. (2000).** Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem.*, 275:36818–36822.
- Lintern, K.B., Guidato, S., Rowe, A., Saldanha, J.W., Itasaki, N. (2009).** Characterization of Wise protein and its molecular mechanism to interact with both Wnt and BMP signals. *J Biol Chem.*, 284(34):23159-68.
- Lissenberg-Thunnissen, S.N, de Gorter, D.J, Sier, C.F, Schipper, I.B. (2011).** Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop.*, 35(9):1271-80.
- Littenberg, B., Weinstein, L.P., McCarren, M., Mead, T., Swiontkowski, M.F., Rudicel, S.A., Heck, D. (1998).** Closed fractures of the tibial shaft. A meta-analysis of three methods of treatment. *J Bone Joint Surg Am.*, 80(2):174-83.
- Lobley, A., Whitmore, L., Wallace, B.A. (2002).** DICHROWEB: An interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics*, 18, 211–212.
- Lobstein, C.A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, M. Berkmen. (2012).** SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm, *Microb cell fact.*, 11,56.
- Loesch, M. & Chen, G. (2008).** The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Front Biosci.*, 13:3581-93.
- Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R., Petite, H. (2005).** Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med.*, 9(1):72-84.
- Long, S., Truong, L., Bennett, K., Phillips, A., Wong-Staal, F., Ma, H. (2006).** Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli. *Prot Expr Purif.*, 46, 374–378.
- Luca, L., Capelle, M.A., Machaidze, G., Arvinte, T., Jordan, O., Gurny, R. (2010).** Physical instability, aggregation and conformational changes of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Int J Pharm.*, 31;391(1-2):48-54.
- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S, Zhou, Q. (1999).** The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev.*, 13(17):2196-206.

- Luo, H., Macapagal, N., Newell, K., Man, A., Parupudi, A., Li, Y., Li, Y. (2014).** Effects of salt-induced reversible self-association on the elution behavior of a monoclonal antibody in cation exchange chromatography. *J Chromatogr A.*, 3;1362:186-93
- Manavalan, P. & Johnson, W.C., Jr. (1987).** Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem.* 167:76–85.
- Marcelino, J., Sciortino, C.M., Romero, M.F., Ulatowski, L.M., Ballock, R.T., Economides, A.N., Eimon, P.M, Harland, R.M., Warman, M.L. (2001).** Human disease-causing NOG missense mutations: effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(20):11353-8.
- Maruoka, Y., Oida, S., Iimura, T., Takeda, K., Asahina, I., Enomoto, S., Sasaki, S. (1995).** Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. *Biochem Mol Biol Int.*, 35(5):957-63.
- Marques, S., Borges, A.C., Silva, A.C., Freitas, S., Cordenonsi, M., Belo, J.A. (2004).** The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes Dev.*, 1;18(19):2342-7.
- Massague, J. (1998).** TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.*, 67: 753-791.
- Massague, J., Blain, S.W., Lo, R.S. (2000).** TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 103(2):295-309.
- Massague, J. (2000).** How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 1(3): 169-178. 10.1038/35043051.
- Massague, J. & Wotton, D. (2000).** Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19(8): 1745-1754. 10.1093/emboj/19.8.1745.
- Masters, K.S. (2011).** Covalent growth factor immobilization strategies for tissue repair and regeneration. *Macromol Biosci.*, 11(9):1149-63.
- Mathews, L.S. & Vale, W.W. (1991).** Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65: 973-82.
- Matsuguchi, T., Chiba, N., Bandow, K., Kakimoto, K., Masuda, A., Ohnishi, T. (2009).** JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.*, 24(3):398-410.
- May, R.D., Frauchiger, D.A., Albers, C.E., Hofstetter, W., Gantenbein, B. (2020).** Exogenous Stimulation of Human Intervertebral Disc Cells in 3-Dimensional Alginate Bead Culture With BMP2 and L51P: Cytocompatibility and Effects on Cell Phenotype. *Neurospine.*, 17(1):77-87.
- McGuffin, L.J., Bryson, K., Jones, D.T. (2000).** The PSIPRED protein structure prediction server, *Bioinform (Oxford, England)* 16, 404–405.

- McMahon, J.A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C.M., Harland, R.M., McMahon, A.P. (1998).** Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes & development.*, 12(10), 1438–1452.
- Middelberg, A.P.J. (2002).** Preparative protein refolding, *Trends in Biotechnology* 20, 437–443.
- Migliorini, E., Horn, P., Haraszi, T., Wegner, S.V., Hiepen, C., Knaus, P., Richter, R.P., Cavalcanti-Adam, E.A. (2017).** Enhanced Biological Activity of BMP-2 Bound to Surface-Grafted Heparan Sulfate. *Advanc biosys* 1, e1600041.
- Mine, N., Anderson, R.M., Klingensmith, J. (2008).** BMP antagonism is required in both the node and lateral plate mesoderm for mammalian left-right axis establishment. *Development.* 2008, 135(14):2425-34.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., Miyazono, K. (2002).** Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells.*, 7(12):1191-204.
- Miyazawa, K. & Miyazono, K. (2017).** Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 9(3): a022095.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., Morikawa, M. (2010).** Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* 147, 1, 35–51.
- Morris, A.M., Watzky, M.A., Finke, R.G. (2009).** Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature. *Biochem Biophys Acta.*, 1794, 375–397.
- Mueller, T.D. & Nickel, J. (2012).** Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.*, 586(14):1846-59.
- Mumcuoglu, D., Siverino, C., Tabisz, B., Kluijtmans, B., Nickel, J. (2017).** How to use BMP-2 for clinical applications? A review on pros and cons of existing delivery strategies. *J of Transl Sci.* 3. 10.15761/JTS.1000195.
- Mussano, F., Ciccone, G., Ceccarelli, M., Baldi, I., Bassi, F. (2007).** Bone morphogenetic proteins and bone defects: a systematic review. *Spine*, 32: 824-30.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., Heldin, C.H. (2001).** Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci.*, 114(Pt 24):4359-69. doi:
- Mulloy, B. & Rider, C.C. (2015).** The Bone Morphogenetic Proteins and Their Antagonists. *Vitam Horm.*, 99:63-90.
- Nakamoto, H. & Bardwell, J.C. (2004).** Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the Escherichia coli periplasm. *Biochim Biophys Acta.*, 1694(1-3):111-9.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., ten Dijke, P. (1997).** Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, 389(6651):631-5.

- Nauth, A., Ristiniemi, J., McKee, M.D., Schemitsch, E.H. (2009).** Bone morphogenetic proteins in open fractures: past, present, and future. *Injury*, 40, S27-S31.
- Newfeld, S.J., Wisotzkey, R.G., Kumar, S. (1999).** Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers. *Genetics*, 152: 783-95.
- Nickel, J., Dreyer, M. K., Kirsch, T., Sebald, W. (2001).** The crystal structure of the BMP-2: BMPR-IA complex and the generation of BMP-2 antagonists. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1(Pt 1): S7-14.
- Nickel, J., Dreyer, M., Sebald, W. (2002).** Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction. In: Vukicevic, S., Sampath, K.T. (eds) *Bone Morphogenetic Proteins. Prog in Inflamm Res.*, Birkhäuser, Basel.
- Nickel, J., Sebald, W., Groppe, J.C., Mueller, T.D. (2009).** Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(5-6):367-77.
- 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.
- Nolan, K., Kattamuri, C., Luedeke, D.M., Deng, X., Jagpal, A., Zhang, F., Linhardt, R.J., Kenny, A.P., Zorn, A.M., Thompson, T.B. (2013).** Structure of protein related to Dan and Cerberus: insights into the mechanism of bone morphogenetic protein antagonism. *Structure.*, 6;21(8):1417-29.
- Nolan, K. & Thompson, T.B. (2014).** The DAN family: modulators of TGF- β signaling and beyond. *Protein Sci.*, 23(8):999-1012.
- Nordenman, B. & Björk, I. (1977).** Purification of thrombin by affinity chromatography on immobilized heparin. *Thromb Res.*, 11:799–808.
- Oelgeschläger, M., Larrain, J., Geissert, D., De Robertis, E.M. (2000).** The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405: 757–763.
- Ohazama, A., Johnson, E.B., Ota, M.S., Choi, H.Y, Porntaveetus, T., Oommen, S., Itoh, N., Eto, K., Gritli-Linde, A., Herz, J., Sharpe, P.T. (2008).** Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. *PLoS One.*, 3(12): e4092.
- Ohta, H., Wakitani, S., Tensho, K., Horiuchi, H., Wakabayashi, S., Saito, N., Nakamura, Y., Nozaki, K., Imai, K., Takaoka, K. (2005).** The effects of heat on the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J of bone and mineral metol*, 23, 6, 420–425.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J., Niehrs, C. (1999).** Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 30;401(6752):480-5.

- Owczarek, B., Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K. (2019).** A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. *BioMed res inter.*, 4216060.
- Pan, D., Zhu, Q., Luo, K. (2009).** SnoN functions as a tumour suppressor by inducing premature senescence. *EMBO J.*, 28(22):3500-13.
- Park, S.Y, Kim, K.H., Kim, S., Lee, Y.M., Seol, Y.J. (2019).** BMP-2 Gene Delivery-Based Bone Regeneration in Dentistry. *Pharmac.*, 11(8):393.
- Parmar, A.S. & Muschol, M. (2009).** Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: effects of chaotropic versus kosmotropic ions. *Bioph J.*, 97(2), 590–598.
- Perlin, A. & Mazurek, M. (1968).** A proton magnetic resonance spectral study of heparin.: L-Iduronic acid residues in commercial heparins. *Carbohydr Res.*, 5:369–379.
- Phillips, D.J. & de Kretser, D.M. (1998).** Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol.*,19(4):287-322.
- Philo, J.S. (2009).** A critical review of methods for size characterization of nonparticulate protein aggregates. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10, 359–372.
- Piccolo, S, Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E.M. (1996).** Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell.*, 23;86(4):589-98.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., De Robertis, E.M. (1999).** The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature*, 25;397(6721):707-10.
- Pobloth, A.M., Duda, G.N., Giesecke, M.T., Dienelt, A., Schwabe, P. (2017).** High-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model. *J Tissue Eng Regen Med.*,11(5):1514-1523.
- Pollitt, S. & Zalkin, H. (1983).** Role of primary structure and disulfide bond formation in beta-lactamase secretion. *J Bacteriol.*, 153(1):27-32.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A, Beckwith, J. (1997).** The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, 272, 25, 15661–15667.
- Ramel, M.C. & Hill, C.S. (2012).** Spatial regulation of BMP activity. *FEBS Lett.* 586(14):1929-41.
- Reddi, A. H. (1995).** Bone morphogenetic proteins. *Adv Dent Res.*, 9(3 Suppl):13.
- Reddi, A.H. (1998).** Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.*, 16(3):247-52.

- Reddi, A.H. (2000).** Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng.*, 6(4):351-9.
- Reddi, A.H. (2001).** Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 1(Pt 1): S1-6.
- Reddi, A. H. (2005).** BMPs: From bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cyt and Grow Factor Rev.*, 16(3 SPEC. ISS.), 249-250.
- Rider, C.C. (2006).** Heparin/heparan sulphate binding in the TGF-cyto-kine superfamily. *Biochem. Soc. Trans.*, 34,458–460.
- Rider, C.C. & Mulloy, B. (2010).** Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J.*, 429(1):1-12.
- Rodríguez Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A.N., Pascual, J., Ortiz, A., Izpisúa Belmonte, J.C. (1999).** The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature*, 401(6750):243-51.
- Rodriguez, I.A., Growney Kalaf, E.A., Bowlin, G.L., Sell, S.A. (2014).** Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. *Biomed Res Int.*, 392398.
- Roffi, A., Di Matteo, B., Krishnakumar, G.S., Kon, E., Filardo, G. (2017).** Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in the clinical practice. A systematic review. *Int Orthop.*, 41(2):221-237.
- Rosen, V. (2006).** BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci.*, 1068:19–25.
- Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984).** Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.*, Nr. 11, S. 601.
- Roghani, M., Mansukhani, A, Dell’Era, P., Bellosta, P., Basilico, C., Rifkm, D.B. Moscatelli, D. (1994).** Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J. Biol. Chem.*, 269, 3976-3984.
- Ruschke, K., Hiepen, C., Becker, J., Knaus, P. (2012).** BMPs are mediators in tissue crosstalk of the regenerating musculoskeletal system. *Cell Tissue Res.*, 347(3):521-44.
- 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(1): 295-302.
- Saremba, S., Nickel, J., Seher, A., Kotzsch, A., Sebald, W., Mueller, T.D. (2008).** Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N- glycosylation of the ligand. *FEBS J.*, 275(1), 172–83.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., Esko, J.D. (2011).** Heparan sulfate pro-teoglycans. *Cold Spring Harb Prospect Biol.*3, a004952

- Schein, C.H. & Noteborn, M.H.M. (1988).** Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia coli* is Favored by Lower Growth Temperature, *Nat Biotechnol* 6, 291–294.
- Scheufler, C., Sebald, W., Hulsmeyer, M. (1999).** Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J. of Mol. Biol.* 287, 1, 103–115.
- Schlange, T., Arnold, H.H., Brand, T. (2002).** BMP2 is a positive regulator of Nodal signaling during left-right axis formation in the chicken embryo. *Development.*, 129(14):3421-9.
- Schneppendahl, J., Jungbluth, P., Sager, M., Benga, L., Hertel, M., Scholz, A., Wild, M., Hakimi, M., Windolf, J., Grassmann, J.P. (2016).** Synergistic effects of HBO and PRP improve bone regeneration with autologous bone grafting. *Injury.*, 47(12):2718-2725.
- Schmidt-Bleek, K., Willie, B.M., Schwabe, P., Seemann, P., Duda, G.N. (2016).** BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 27:141-8.
- Schwabe, P., Greiner, S., Ganzert, R., Eberhart, J., Dähn, K., Stemberger, A., Plank, C., Schmidmaier, G., Wildemann, B. (2012).** Effect of a novel nonviral gene delivery of BMP-2 on bone healing. *Scientific World Journal*, 2012:560142.
- Schwaninger, R., Rentsch, C. A., Wetterwald, A., van der Horst, G., van Bezooijen, R. L., van der Pluijm, G., Löwik, C. W., Ackermann, K., Pyerin, W., Hamdy, F. C., Thalmann, G. N., & Cecchini, M. G. (2007).** Lack of noggin expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases. *The American J of path.*, 170(1), 160–175.
- Semënov, M., Tamai, K., He, X. (2005).** SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem.*, 280(29):26770-5.
- Sharapova, N.E., Kotnova, A.P., Galushkina, Z.M., Lavrova, N.V., Poletaeva, N.N., Tukhvatulin, A.E., Semikhin, A.S., Gromov, A.V., Soboleva, L.A., Ershova, A.S., Zaitsev, V.V., Sergienko, O.V., Lunin, V.G., Kariagina, A.S. (2010).** Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli* and testing of its biological activity in vitro and in vivo. *Mol Biol (Mosk).*, 44(6):1036-44. Russian. Erratum in: *Mol Biol (Mosk)*. 2011 Jan-Feb;45(1):200. Tukhvatullin, A E [corrected to Tukhvatulin, A E].
- Schwartz, D., Sofia, S., Friess, W. (2006).** Integrity and stability studies of precipitated rhBMP - 2 microparticles with a focus on ATR-FTIR measurements. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63, 241–248.
- Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J.L., Mueller, T.D. (2004).** Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem.*, 385: 697-710.
- Sebald, H.J., Klenke, F.M., Siegrist, M., Albers, C.E., Sebald, W., Hofstetter, W. (2012).** Inhibition of endogenous antagonists with an engineered BMP-2 variant increases BMP-2 efficacy in rat femoral defect healing. *Acta Biomater.*, 8(10):3816-20.
- Seeger, A. & Rinas, U. (1996).** Two-step chromatographic procedure for purification of basic fibroblast growth factor from recombinant *Escherichia coli* and characterization of the equilibrium parameters of adsorption. *J Chromatogr.*, A 746:17–24.

Seemann, P., Brehm, A., König, J., Reissner, C., Stricker, S., Kuss, P., Haupt, J., Renninger, S., Nickel, J., Sebald, W., Groppe, J.C., Plöger, F., Pohl, J., Schmidt-von Kegler, M., Walther, M., Gassner, I., Rusu, C., Janecke, A.R., Dathe, K., Mundlos, S. (2009). Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS Genet.*, 5(11): e1000747.

Seemann, P., Mundlos, S., Reissner, C., Duda, G.N., Zimmer, J. (2012). Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) Variants with reduced BMP Antagonist Sensivity. United States Patent Application US2012/0058944 A1.

Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., Velankar, S., Burley, S.K., Koča, J., Rose, A.S. (2021). Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res.*, 49(W1): W431-W437.

Sellers, R.S., Zhang, R., Glasson, S.S., Kim, H.D., Peluso, D., D'Augusta, D.A., Beckwith, K., Morris, E.A. (2000). Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am.*, 82(2):151-60.

Sharov, A.A., Weiner, L., Sharova, T.Y., Siebenhaar, F., Atoyian, R., Reginato, A.M., McNamara, C.A., Funa, K., Gilchrest, B.A., Brissette, J.L., Botchkarev, V.A. (2003). Noggin overexpression inhibits eyelid opening by altering epidermal apoptosis and differentiation. *EMBO J.*, 22(12):2992-3003.

Sherf, B.A., Navarro, S.L., Hannah, R. R, Wood, K.V. (1996). Dual-Luciferase™ Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. Promega Corporation. Promega Notes Magazine, 57.

Shi, W., Zhao, J., Anderson, K.D., Warburton, D. (2001). Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 280(5): L1030-9.

Shi, Y. & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 13;113(6):685-700.

Shi, W., Chang, C., Nie, S., Xie, S., Wan, M., Cao, X. (2007). Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci.*, 120(Pt7):1216-1224. 10.1242/jcs.03400.

Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(5-6):343-55.

Simmons, D.G. & Kennedy, T.G. (2002). Uterine sensitization-associated gene-1: a novel gene induced within the rat endometrium at the time of uterine receptivity/sensitization for the decidual cell reaction. *Biol Reprod.*, 67(5):1638-45.

Smith, W.C. & Harland, R.M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*, 70 (5):829-840.

- Smith, R.A.A., Murali, S., Rai, B., Lu, X., Lim, Z.X.H., Lee, J.J.L., Nurcombe, V., Cool, S.M. (2018).** Minimum structural requirements for BMP-2-binding of heparin oligosaccharides. *Biomaterials*, 184, 41–55.
- Song, K., Krause, C., Shi, S., Patterson, M., Suto, R., Grgurevic, L., Vukicevic, S., van Dinther, M., Falb, D., ten Dijke, P., Alaoui-Ismaili, M.H. (2010).** Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. *J Biol Chem*, 285(16):12169-80.
- Sreerama, N. & Woody, R.W. (2000).** Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem*, 287, 252–260.
- Stewart, E. J., Aslund, F., Beckwith, J. (1998).** Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J*.17, 5543–5550.
- Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., Luo, K. (1999).** Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science*, 286(5440):771-4.
- Stone, S.R., Brown Luedi, M.L., Rovelli, G., Guidolin, A, McGlynn, E., Monard, D. (1994).** Localization of the heparin-binding site of glia-derived nexin/protease nexin-I by site-directed mutagenesis. *Biochem*, 33, 7731 -7735.
- Stumpe, M. C. & Grubmueller. H. (2007).** Interaction of urea with amino acids: implications for urea-induced protein denaturation. *J of the American Chemi Soc* 129, 51, 16126–16131.
- Suh, D.Y., Boden, S.D., Louis-Ugbo, J., Mayr, M., Murakami, H., Kimm H.S., Minamide, A., Hutton, W.C. (2002).** Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate. *Spine, (Phila Pa 1976)*, 27(4):353-60.
- Sundermann, J., Zagst, H., Kuntschem J., Wätzig, H., Bunjes, H. (2020).** Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Aggregates Can be Solubilized by Albumin-Investigation of BMP-2 Aggregation by Light Scattering and Electrophoresis. *Pharmac*.12(12):1143.
- Suo, G., Chen, B., Zhang, J., Gao, Y., Wang, X., He, Z, Dai, J. (2006).** Expression of active hBMP2 in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.*, 25: 1316-24.
- Sun, Y., Liu, X., Eaton, E.N., Lane, W.S., Lodish, H.F., Weinberg, R.A. (1999).** Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Mol Cell*, 4(4):499-509.
- Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., Miyazono, K. (2002).** Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 277(42):39919-25.
- Swiontkowski, M.F., Aro, H.T., Donell, S., Esterhai, J.L., Goulet, J., Jones, A., Kregorm P.J., Nordsletten, L., Paiement, G., Patel, A. (2006).** Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am*, 88(6):1258-65.

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.

Takahashi, T., Takahashi, I., Komatsu, M., Sawaishi, Y., Higashi, K., Nishimura, G., Saito, H., Takada, G. (2001). Mutations of the NOG gene in individuals with proximal symphalangism and multiple synostosis syndrome. *Clin Genet.*, 60(6):447-51.

Tang, L.Y., Yamashita, M., Coussens, N.P., Tang, Y., Wang, X., Li, C., Deng, C.X., Cheng, S.Y., Zhang, Y.E. (2011). Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF- β signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. *EMBO J.*, 30(23):4777-89.

Tukhvatulin, A.E., Semikhin, A.S., Gromov, A.V., Soboleva, L.A., Ershova, A.S., Zaitsev, V.V., Sergienko, O.V., Lunin, V.G., Karyagina, A.S. (2010). Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli* and testing of its biological activity in vitro and in vivo. *Mol. Biol.*, 923–930.

Takayama, K., Suzuki, A., Manaka, T., Taguchi, S., Hashimoto, Y., Imai, Y., Wakitani, S., Takaoka, K. (2009). RNA interference for noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins in vivo and in vitro. *J Bone Miner Metab.*, 27(4):402-11.

Tannoury, C.A. & An, H.S. (2014). Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J.*, 14(3):552-9.

Tarragona, M., Pavlovic, M., Arnal-Estapé, A., Urosevic, J., Morales, M., Guiu, M., Planet, E., González-Suárez, E., Gomis, R. R. (2012). Identification of NOG as a specific breast cancer bone metastasis-supporting gene. *The J of biol chem.*, 287(25), 21346–21355.

Tekari, A, May, R.D., Frauchiger, D.A., Chan, S.C., Benneker, L.M., Gantenbein, B. (2017). The BMP2 variant L5.1P restores the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in the presence of intervertebral disc cells. *Eur Cell Mater.*, 33:197-210.

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(10):2879-87.

ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.H. (1996). Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol.*, 8(2):139-145.

ten Dijke, P., Fu, J., Schaap, P., Roelen, B.A. (2003). Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl., 3: 34-38.

Termaat, M.F., Den Boer, F.C., Bakker, F.C., Patka, P., Haarman, H.J. (2005). Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am.*, 87(6):1367-78.

Tsumoto, K., Umetsu, U., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J.S., Arakawa, T. (2004). Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotech prog.*, 20, 1301–1308.

- Quaas, B., Burmeister, L., Li, Z., Satalov, A., Behrens, P., Hoffmann, A., Rinas, U. (2019).** Stability and Biological Activity of E. coli Derived Soluble and Precipitated Bone Morphogenetic Protein-2. *Pharmac res.*, 36,184.
- Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S., Guillemin, R. (1987).** Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84(23):8282- 6.
- Urist, M.R. (1965).** Bone: Formation by autoinduction. *Science*, 150: 893-899.
- Urist, M.R., Huo, Y.K., Brownell, A.G., Hohl, W.M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M., DeLange, R.J. (1984).** Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 81(2):371-5.
- 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. of Biotech.*, 94, 185–194.
- Vallejo, L.F. & Rinas, U. (2004).** Optimized procedure for renaturation of recombinanthuman bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotech Bioeng.*, 85: 601-9.
- Vallejo, L.F. & Rinas, U. (2013).** Folding and dimerization kinetics of bone morphogenetic protein-2, a member of the transforming growth factor- β family. *FEBS J.*, 280(1):83-92.
- Valera, E., Isaacs, M. J., Kawakami, Y., Izpisúa Belmonte, J. C., Choe, S. (2010).** BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. *PloS one*, 5(6), e11167.
- van Bezooijen, R.L, Svensson, J.P., Eefting, D., Visser, A., van der Horst, G., Karperien, M., Quax, P.H., Vrieling, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P., Löwik, C.W. (2007).** Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Bone Miner Res.*, 22(1):19-28.
- van der Meer, J.Y., Kellenbach, E., van den Bos, L.J. (2017).** From Farm to Pharma: An Overview of Industrial Heparin Manufacturing Methods. *Molecules*. 22(6):1025.
- Vasiliadis, E.S., Evangelopoulos, D.S., Kaspiris, A., Benetos, I.S., Vlachos, C., Pneumaticos, S.G. (2022).** The Role of Sclerostin in Bone Diseases. *J Clin Med.*, 2;11(3):806.
- Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A. Villaverde, A. (2007).** The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures, *Biotech and bioeng.*, 96,1101–1106.
- Vo, T.N., Kasper, F.K., Mikos, A.G. (2012).** Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.*, 64(12):1292-309.

- Vogel, P., Liu, J., Platt, K.A., Read, R.W., Thiel, M., Vance, R.B., Brommage, R. (2015)** Malformation of incisor teeth in *Grem2*^{-/-} mice. *Vet Pathol.*, 52(1):224-9.
- von Einem, S., Schwarz, E., Rudolph, R. (2010).** A novel TWO-STEP renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2. *Prot expr and purific.*, 73, 65–69.
- Wagner, D. O., Sieber, C., Bhushan, R., Borgermann, J. H., Graf, D., Knaus, P. (2010).** BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci. Signal.*, 3(107).
- Walsh, D.W., Godson, C., Brazil, D.P., Martin, F. (2010).** Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol.*, 20:244–56.
- Wan, D.C., Pomerantz, J. H., Brunet, L.J., Kim, J-B., Chou, Y-F., Wu, B.M., Harland, R., Blau, H.M., Longaker, M.T. (2007).** Noggin Suppression Enhances In vitro Osteogenesis and Accelerates in Vivo Bone Formation. *JBC Vol. 282, No. 36*, pp. 26450–26459.
- Wang, E.A, Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R.M., Kriz, M.J., Luxenberg, D.P., Sibley, B.S., Wozney, J.M. (1988).** Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 9484–9488.
- Wang, W. (1999).** Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm.*, 185, 129–188.
- Wang, Y., Hong, S., Li, M., Zhang, J., Bi, Y., He, Y., Liu, X., Nan, G., Su, Y., Zhu, G., Li, R., Zhang, W., Wang, J., Zhang, H., Kong, Y., Shui, W., Wu, N., He, Y., Chen, X., Luu, H.H., Haydon, R.C., Shi, L.L., He, T.C., Qin, J. (2013).** Noggin resistance contributes to the potent osteogenic capability of BMP9 in mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*, (11):1796-803.
- Weber, D., Kotzsch, A., Nickel, J., Harth, S., Seher, A., Mueller, U., Sebald, W., Mueller, T.D. (2007).** A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor. *BMC Struct Biol.*, 12; 7:6.
- Wei, S., Cai, X., Huang, J., Xu, F., Liu, X., Wang, Q. (2012).** Recombinant human BMP-2 for the treatment of open tibial fractures. *Orthopedics.*, 35(6): e847-54.
- Weivoda, M.M., Youssef, S.J., Oursler, M.J. (2017).** Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte. *Bone.*, 96:45-50.
- Welch, R.D., Jones, A.L., Bucholz, R.W., Reinert, C.M., Tjia, J.S., Pierce, W.A., Wozney, J.M., Li, X.J. (1998).** Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13, 1483–1490.
- White, A.P, Vaccaro, A.R., Hall, J.A., Whang, P.G., Friel, B.C., McKee, M.D. (2007).** Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop.*, 31:735–741.

- Whitmore, L. & Wallace, B.A. (2004).** DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32, W668–W673.
- Winkler, D.G., Sutherland, M. K., Geoghegan, J.C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J.E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B.R., Staehling-Hampton, K., Appleby, M., Brunkow, M.E., Latham, J.A. (2003).** Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.*, 1;22(23):6267-76.
- Winkler, R. (2010).** ESIprot: A universal tool for charge state determination and molecular weight calculation of proteins from electrospray ionization mass spectrometry data. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24(3), 285-294.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A. (1988).** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242(4885): 1528-1534.
- Wozney, J.M. (2002).** Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, (Phila Pa 1976); 15;27(16 Suppl 1): S2-8.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massagué, J. (1994).** Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370: 341-7.
- Wu, J.W., Krawitz, A.R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K., Shi, Y. (2002).** Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell*, 111, 357-367.
- Wuerzler, K., Emmert, J., Eichelsbacher, F., Kübler, N.R., Sebald, W., Reuther, J.F. (2004).** Evaluation der osteoinduktiven Potenz von gentechnisch modifizierten BMP-2-Varianten, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie: *MKG* 8, 3–92.
- Xiong, S., Wang, Y.F., Ren, X.R., Li, B., Zhang, M.Y., Luo, Y., Zhang, L., Xie, Q.L., Su, K.Y. (2005).** Solubility of disulfide-bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its "oxidizing" mutant. *World J Gastroenterol.* 11(7):1077-82.
- Xiong, S., Zhang, L., He, Q-Y. (2008).** Fractionation of proteins by heparin chromatography. *Methods Mol Biol.*, 424:213–221.
- Xu, W., Angelis, K., Danielpour, D., Haddad, M.M., Bischof, O., Campisi, J., Stavnezer, E., Medrano, E.E. (2000).** Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(11):5924-9.
- Yaffe, D. & Saxel, O. (1979).** Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270, 725–727.
- Yamaguchi, H. & Miyazaki, M. (2014).** Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules.*, 4(1):235-51.

- Yang, J., Shi, P., Tu, M., Wang, Y., Liu, M., Fan, F., Du, M. (2014).** Bone morphogenetic proteins: Relationship between molecular structure and their osteogenic activity, *Food Science and Human Wellness* 3 (2014) 127–135.
- Yasko, A.W., Lane, J.M., Fellingner, E.J., Rosen, V., Wozney, J.M., Wang, E.A. (1992).** The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am.*, 74(5):659-70. Erratum in: *J Bone Joint Surg Am.*, 74(7):1111.
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., Ishii, S. (1995).** Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem.*, 270, 25328–25331.
- Yokouchi, Y., Vogan, K.J., Pearse, R.V. 2nd, Tabin, C.J. (1999).** Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell*, 3;98(5):573-83.
- Young, C.L., Britton, Z.T., Robinson, A.S. (2012).** Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotech. J.*, 7, 620–634.
- Yu, L., Hébert, M.C., Zhang, Y.E. (2002).** TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.*, 21(14):3749-59.
- Zerf, O. (2002).** Hochaufreinigung, Dimmersionierung und Funktionalität von BMP-2-10M., Bachelorarbeit, AG Prof. Dr. Loid-Stahlhofen, WHS Recklinghausen.
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A., Derynck, R. (2001).** Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci.*, 98: 97497–97499.
- Zhang, W. & Liu H.T. (2002).** MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12(1):9-18.
- Zhang, D., Ferguson, C.M., O'Keefe, R.J., Puzas, J.E., Rosier, R.N., Reynolds, P.R. (2002).** A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification. *J Bone Miner Res.*, 17(2):293-300.
- Zhang, H., Wu, I., Zhang, Y., Fu, N., Wang, J., Zhao, S. (2010).** Optimized procedure for expression and renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentrations. *Mol Biol rep.*, 37, 3089–3095.
- Zhang, C. (2010).** Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *J Orthop Surg Res.*, 5: 37.
- Zhang, Y., Ma, Y., Yang, M., Min, S., Yao, J., Zhu, L. (2011).** Expression, purification, and refolding of a recombinant human bone morphogenetic protein 2 in vitro. *Protein Expr Purif.*, 75, 155–160.
- Zhao, B., Katagiri, T., Toyoda, H., Takada, T., Yanai, T., Fukuda, T., Chung, U.I., 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, L., Marvin, M.J., Gardiner, A., Lassar, A.B., Mercola, M., Stern, C.D., Levin, M. (1999). Cerberus regulates left-right asymmetry of the embryonic head and heart. *Curr Biol.*, 9;9(17):931-8.

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(6745):687-93.

Zilberberg, L., ten Dijke, P., Sakai, L.Y., Rifkin, D.B. (2007). A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity. *BMC Cell Biology*, 8, 41.

Zimmerman, L.B., De Jesus-Escobar, J.M., Harland, R.M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 86:599–606.

Zimmermann, G., Wagner, C., Schmeckenbecher, K., Wentzensen, A., Moghaddam, A. (2009). Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft. *Injury*, 40, S50-S53.

Zou, Q., Habermann-Rottinghaus, S. M, Murphy, K.P. (1998). Urea effects on protein stability: Hydrogen bonding and the hydrophobic effect. *Proteins*, 31, 2, 107–115.

Zscheschack, N. (2002). Hochaufreinigung, Dimerisierung von Funktionalität von BMP-2-2Hep-7M. Bachelorarbeit, AG Prof. Loidl-Stahlhofen, WHS Recklinghausen.

11 Abkürzungsverzeichnis

ActR	activin type Receptors
Aft4.....	activating transcription factor 4
Alk.....	activin receptor like kinase
ALP	Alkalische Phosphatase
AMHR.....	anti-Müllerian hormone receptor
BAMBI.....	BMP and activin membrane-bound inhibitor
BISC	BMP-inducing signaling complex
BMPR-IA	BMP Typ IA Rezeptor
BMPR-IB	<i>BMP Typ IB Rezeptor</i>
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CDSSTR.....	Estimation of protein secondary structure from circular dichroism
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHES.....	N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
CHO	chinese hamster ovary
CHRD.....	Chordin-Familie
c-Ski-Proteine.....	cellular-sloan-Kettering Institute
CV	Column Volume
DAN-Familie.....	Differential screening-selected gene Aberrant in Neuroblastoma
DiANNA	Diaminoacid neural network application
DLS	dynamische Lichtstreuung
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DsbC.....	cytoplasmatische Disulfid isomerase
DTT	Dithiothreitol
EC50.....	mittlere effektive Konzentration
EMA.....	europäische Arzneimittelagentur
ERK.....	extracellular signal related kinases
ESI-MS.....	Elektronenspray-Ionisation Massenspektrometrie
FDA.....	US Food and Drug Administration
FGF.....	Fibroblast Growth Factor
FPC.....	furin-like prohormon-convertase
FSH.....	Follikelstimulierendes Hormon
FUB	Freie-Universität Berlin
Fusel-15	Functional smad suppressing element on chromosome 15
GDF	growth differentiation factor
GdnHCl.....	Guanidiniumchlorid
GPC	Gelpermeationschromatographie, Gelpermeationschromatographie
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG.....	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISD	in source decay-Analyse
IVD.....	intervertebrale disc cells
JNK.....	c-Jun-NH ₂ -terminal kinase
LC-MS.....	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LPM.....	lateral plate mesoderm
LRP.....	low-density lipoprotein-related protein
MALDI-TOF-ISD-MS.....	Siehe
MALDI-TOF-MS.....	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse und Quellenzerfall Massenspektrometrie
MAPK	mitogen activated protein kinases

Abkürzungsverzeichnis

MDS	Microfluidal Diffusional Sizing
MKK	MAP-kinase kinase
MPKKK	MAP-kinase kinase kinase
NIBS	Non-Invasive Back-Scatter
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
NOG	Noggin
OD	optische Dichte
p38	p38 mitogen-activated protein kinases
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PFC	pre-formed-complex
Phyre	Protein homology/analogy recognition engine
PRDC	Protein related to Dan and Cerberus
PRP	platelet rich plasma
PSIPRED	PSI-blast based secondary structure PREDiction
QTOF	Quadrupole time-of-flight-Massendetektor
R _h	hydrodynamischer Radius
RLU	relative luminiscence units
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
Runx2	runt-related transcription factor 2
SBE	smad binding elements
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smad	(small body size) und MAD (mothers against DPP homologs)
Smurfs	Smad ubiquitination regulatory factor 1
SnoN	Ski-related novel Protein N
SYM1	proximaler Symphalangismus
SYNS1	multiple Synostosis Syndrom
TAB1	tAK1-binding protein
TGFR	Transforming Growth Factor Receptor
TSG	Twisted Gastrulation
UHPLC-System	ultra-high performance liquid chromatography
XIAP	X-chromosomal linked inhibitor of apoptosis
X-Ray	Röntgenstrukturanalyse

12 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: 3D-Strukturmodell des BMP-2-Dimers	3
Abb. 2: BMP-2-Signaltransduktion.....	6
Abb. 3: Sequenzalignment der reifen Regionen von BMP-2-10M, BMP-2, BMP-6, BMP-7 und BMP-9 bezogen auf die Aminosäuren 55-65, ausgehend von BMP-6 Nummerierung	15
Abb. 4: A: AggreScan-Analyse von Wildtyp-BMP-2* (oben), der Variante BMP-2-10M (Mitte) und BMP-2-2Hep-7M (unten). B: Aminosäuren-Sequenzalignment von Wildtyp-BMP-2*, Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M	48
Abb. 5: Sekundärstrukturabschätzung der Variante BMP-2-10M (oben) und BMP-2-2Hep-7M	49
Abb. 6: Subklonierung der BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M-Varianten-codierenden Gensequenz in den Vektor pET32a.....	55
Abb. 7: 1%-Agarosegelelektrophorese von potentiellen Klonen von pET32a-BMP-2-10M nach Restriktionsverdau mit <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i>	57
Abb. 8: Proteinexpression von TrxA-BMP-2-10M in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	58
Abb. 9: Aufreinigung von TrxA-BMP-2-10M aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) über Heparinsepharose-/ Ionenaustauschchromatographie	58
Abb. 10: SDS-Tricin-PAGE von TrxA-BMP-2-10M nach Heparinsepharosechromatographie	59
Abb. 11: Heparinsepharose/Ionenaustauschchromatographie und SDS-Tricin-PAGE-15% von BMP-2-10M.....	65
Abb. 12: Gelpermeationschromatographie und SDS-Tricin-PAGE-15% von BMP-2-10M...	66
Abb. 13: Heparinsepharose/Ionenaustauschchromatographie und SDS-Tricin-PAGE-15% von BMP-2-2Hep-7M	67
Abb. 14: Gelpermeationschromatographie und SDS-Tricin-PAGE-15% von BMP-2-2Hep-7M.	68
Abb. 15: MALDI-MS-Spektrum von Variante BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M in einem Massenbereich von 800-4.000 Da	71
Abb. 16: ESI-Massenspektrum von BMP-2-10M (Dimer) bei 12.8-13.5 min. (A). Berechnung der deconvolvierten Masse des BMP-2-Proteins (B)	73
Abb. 17: ESI-Massenspektrum von BMP-2-2Hep-7M (Dimer) bei 10.9 – 11.1 min (A). Berechnung der deconvolvierten Masse des BMP-2 Proteins (B).....	74
Abb. 18: ESI-Massenspektrum des Wt-BMP-2 (Dimer) bei 13.1-13.8 min (A). Berechnung der deconvolvierten Masse des BMP-2-Proteins (B).	75
Abb. 19: Darstellung der verschiedenen Strukturelemente in CD-Spektren am Beispiel von Poly-L-Lysin (nach Greenfield & Fasman, 1969)	77

Abb. 20: Vergleichende CD-Spektren von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M zum Wt-BMP-2	78
Abb. 21: Graphische Darstellung der Sekundärstrukturanalyse [%] von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M im Vergleich zum Wt-BMP-2	80
Abb. 22: Prozentueller Anteil an Sekundärstrukturelementen des Muteins BMP-2-2Hep-7M nach 20 min und 24 h.....	81
Abb. 23: Temperaturabhängige Kinetik der Proteinfaltung/-entfaltung von Wt-BMP-2	82
Abb. 24: Dynamische Lichtstreuung-Analyse von Wt-BMP-2 in einem Konzentrationsbereich 10-100 μ M	85
Abb. 25: Analyse mikrofluidischer Diffusion von Wildtyp-BMP-2 in einem Konzentrationsbereich 0.5-10 μ M	86
Abb. 26: Hydrodynamischer Radius von Wildtyp-BMP-2 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	87
Abb. 27: Hydrodynamischer Radius von Wt-BMP-2 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	89
Abb. 28: Hydrodynamischer Radius von Lysozym und Wt-BMP-2 in Abhängigkeit von der Konzentration.....	90
Abb. 29: Hydrodynamischer Radius von Wt-BMP-2 in nativer und entfalteter Form vs. Lysozym als f (c).....	91
Abb. 30: Hydrodynamischer Radius von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M bei verschiedenen Pufferbedingungen	92
Abb. 31: Gelpermeationschromatographie von BMP-2-2Hep-7M im sauren pH-Wert und Hochsalzbedingungen	93
Abb. 32: ALP-Assay zum Nachweis der biologischen Aktivität von BMP-2-10M, BMP-2-2Hep-7M und Wt-BMP-2	97
Abb. 33: Dual-Luciferase Reporter Assay in HEK BRELuc-Zellen.....	99
Abb. 34: Indirekter Nachweis der affinen Bindung von BMP-2-10M an den BMP-2-Inhibitor Noggin.....	100
Abb. 35: Dual-Luciferase Reporter Assay von BMP-2-2Hep-7M in HEK BRELuc-Zellen.	102
Abb. 36: Vergleichende Darstellung der Aufreinigungsabläufe von rhBMP-2 und hydrophilisiertem BMP-2.....	113
Abb. 37: Luciferase-Reportergen-Assay in C2C12 - BRELuc-Zellen	125
Abb. 38: Expressionsvektor zur Herstellung von BMP-2-Varianten.....	129
Abb. 39: Lagerungsstudien von TrxA-BMP-2-10M.....	130
Abb. 40: ESI-Massenspektrum von Variante BMP-2-2Hep-7M (Monomer) bei 10.6-10.9 min (A) und Berechnung der deconvolvierten Masse des BMP-2-2Hep-7M Muteins (B).....	131
Abb. 41: CD-Spektren von Wt-BMP-2 im fernen UV-Bereich (hier 190 nm- 260 nm)	132
Abb. 42: CD-Spektren von BMP-2-10M im fernen UV-Bereich (hier 190 nm- 260 nm).....	132

Abb. 43: CD-Spektren von BMP-2-2Hep-7M im fernen UV-Bereich (hier 190 nm- 260 nm)	133
Abb. 44: ALP-Assay zum Nachweis der biologischen Aktivität von Variante BMP-2- 2Hep-7M und Wt-BMP-2	136
Abb. 45: ALP-Assay zum Nachweis der biologischen Aktivität der oligomrisierten Variante BMP-2-4Hep-7M, BMP-2-2Hep-7M und Wt-BMP-2.....	136

13 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Resistenz unterschiedlicher BMPs gegen ihren Antagonisten-Noggin	15
Tab. 2: Verwendete Chemikalien	24
Tab. 3: Verwendete Kits	26
Tab. 4: Darstellung der verwendeten Zelllinien	26
Tab. 5: Primer für die Kolonie-PCR	27
Tab. 6: Verwendete Antibiotika	27
Tab. 7: Verwendete Chromatographie Säulen	27
Tab. 8: Verwendete Bakterienstämme für Klonierung und Proteinexpression.....	27
Tab. 9: Verwendete Enzyme	28
Tab. 10: Verwendete Vektoren für die Proteinexpression in <i>E. coli</i>	29
Tab. 11: Darstellung der verwendeten Geräte	30
Tab. 12: Zusammensetzung eines Standard Restriktionsverdau	33
Tab. 13: Zusammensetzung des Ligationsansatzes	33
Tab. 14: Zusammensetzung SDS-Tricin Gele (2 Stück, 0.75 mm dick).....	37
Tab. 15: Vorhersage zur Ausbildung von hoch konservierten Disulfidbrücken in BMP-2- Varianten im Vergleich zum Wildtyp-BMP-2*	50
Tab. 16: Übersicht von Aminosäure Positionen in der BMP-2-Aminosäuresequenz die für die Bindung von BMP-2-RI und BMP-2-II nötig sind.....	51
Tab. 17: Auflistung der eingebrachten Mutationen in BMP-2-10M und TrxA-BMP-2- 10M.	53
Tab. 18: Auflistung der eingebrachten Mutationen in BMP-2-2Hep-7M.....	54
Tab. 19: Expressionsstudien der Variante BMP-2-10M	61
Tab. 20: Expressionsstudie der BMP-2-2Hep-7M-Variante.....	63
Tab. 21: ESI-Auswertung der gesamt Molekulargewichtsbestimmung für BMP-2-10M, BMP- 2-2Hep-7M und Wildtyp-BMP-2	72
Tab. 22: Sedundärstrukturanteil [%] von BMP-2-10M und BMP-2-2Hep-7M im Vergleich zum Wt-BMP-2	79
Tab. 23: Quantitative Analyse der Sekundärstrukturelemente [%] anhand der aufgenommenen CD-Spektren bei 10, 20 und 37 °C	133
Tab. 24: Quantitative Analyse der Sekundärstrukturelemente [%] anhand der aufgenommenen CD-Spektren bei 10 °C, 20 °C und 37 °C	134

14 Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Müller, der ohne Wenn und Aber die Betreuung meiner Dissertation übernommen hat. Deine zahlreichen Anregungen und Ideen haben mich immer ein großes Stück nach vorne gebracht. Danke für die Unterstützung und die immer sehr schönen Besuche in Würzburg. Aber vor allem bin ich froh und dankbar, dass deine Wt-BMP-2-Quelle nie versiegt ist und Du uns damit immer bestens versorgt hast.

Mein ganz besonderer Dank gilt zudem auch meiner Doktormutter, Prof. Dr. Angelika Loidl-Stahlhofen, die es mir überhaupt ermöglicht hat die hier vorliegende Dissertation anzufertigen. Wir haben damals gemeinsam Neuland betreten, Du als Doktormutter und ich als Promovendin, und sind über die Jahre ein sehr gutes Team geworden. Dein steter Enthusiasmus, unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie auch deine Offenheit gegenüber meinen eigenen Ideen haben zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen. Danke für deinen Rückhalt und deine Unterstützung, die bis heute anhält.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle ebenso bei Jasmin und Anke, die ich während ihrer Bachelorarbeiten betreuen durfte, aber vor allem bei Dir Tobi, für dein Vertrauen unter meiner Betreuung Deine Masterarbeit anzufertigen. Dank Dir war endlich auch jemand im Labor, der nicht nur gerne früh morgens angefangen hat, sondern auch jemand, der bei den zahlreichen Hitzetagen im Sommer verrückt genug war, um mit mir schon morgens um 6 Uhr in den Laboralltag zu starten. Ich hätte mir einen besseren Laborpartner nicht wünschen können und denke gerne an diese schöne Zeit zurück.

Bei allen aus der „Kaffeeküche“ möchte ich mich hiermit für die lustigen Pausen bedanken, aber auch für die Diskussionsbereitschaft und Eure Hilfe. Ihr seid der beste Beweis dafür, dass Chemiker und Biologen doch die „gleiche Sprache“ sprechen können und sich bei der Forschung wunderbar unterstützen und ergänzen können, wenn sie es wollen.

Weiterhin gilt mein Dank Chris Weise (FUB) für die Anfertigung der zahlreichen MALDI-Analysen, sowie dafür, dass Du mich während meines Forschungsaufenthaltes in Berlin nicht nur in die Thematik eingebracht hast, sondern auch dafür, dass ich zusammen mit dir das MALDI-Massenspektrometer reparieren durfte.

Danken möchte ich auch der ganzen AG Knaus und vor allem Euch, Sonja und Chris, dass ihr mich in die Zellkulturtechniken eingeführt habt. Die drei Wochen bei Euch in Berlin waren sehr lehrreich für mich.

Es gibt eine Vielzahl an Menschen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Deswegen möchte ich mich an dieser Stelle auch bei der Morphoplant GmbH (Bochum) für die Gefriertrocknung der Proben, bei Frau Dr. Beatrix Santiago-Schübel für die Anfertigung der ESI-Analysen, bei Frau Dr. Luitgard Nagel-Steger für die Unterstützung bei den CD-Analysen

Danksagung

und bei Prof. Dr. Alexander Bühl, der mich in die MDS-Technologie eingeführt hat, bedanken. Mein Dank gilt auch Monika Brummel für ihre Hilfe zum Beginn des Projekts.

Aus tiefsten Herzen möchte ich mich bei meiner Mama bedanken, die gerade in der Endphase während der Anfertigung meiner Dissertation für mehrere Wochen zu uns gezogen ist, um mir die Betreuung meines Sohnes Aron weiterstehend abzunehmen, damit ich in Ruhe schreiben kann. DANKE MAMA, das werde ich dir NIE vergessen! Mein Dank geht aber auch an meine Schwiegermutter, die ihren Enkel ganz oft betreut hat, um mich zu entlasten.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinem Mann Björn! Danke dafür, dass Du mich über meine ganze akademische Ausbildung begleitet hast und mich immer so gut es ging unterstützt hast. Wie heißt es so schön „Aller guten Dinge sind drei“ und es ist hoffentlich die letzte Abschlussarbeit, die Du für mich korrigieren und vor allem final formatieren musst. Du hast mich immer daran erinnert, wofür ich über so einen langen Zeitraum kämpfe und das aufgeben keine Option ist. Du warst derjenige, der immer an mich geglaubt hat, bist mit mir durch Höhen, aber auch unermüdlich durch viele Tiefen gegangen und hast meine Tränen getrocknet. Ich weiß, dass gerade die lange Schreibphase noch zusätzlich an deinen Kräften gezerrt hat, nichtsdestotrotz hast du alles dafür getan, dass ich noch genug Zeit finde, um an meiner Arbeit weiterzuschreiben. Ohne dich wäre sie sicherlich nie fertig geworden. Danke für alles mein Schatz! Ich bin froh, dass ich dich habe und wir gemeinsam diesen Weg gegangen sind.

Bei meinem Sohn Aron möchte ich mich für die vielen freien Abendstunden und meistens ruhigen Nächte bedanken, in denen Du es mir ermöglicht hast mich in Ruhe ins Büro zurückzuziehen, um mich weiterhin in Richtung Ziel durchzubeißen.

Kaum zu glauben, aber es ist endlich geschafft. Danke Euch allen!

15 Publikationen

Heinks, T¹., **Hettwer, A¹**., Hiepen, Ch., Weise, Ch., Gorka, M., Knaus, P., Mueller, T.D., Loidl-Stahlhofen, A. (2021). Optimized expression and purification of a soluble BMP2 variant based on in-silico design. Protein Expression and Purification, Volume 186, 105918.

¹ contributed equally to the work

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: **„Entwicklung und Charakterisierung einer löslichen und funktionalen BMP-2-Variante“**, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: **„Development and characterization of a soluble BMP-2-variant.“** is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den _____

Signature PhD-student