

## Zusammenfassung

Knochenmorphogenetische Proteine (*bone morphogenetic proteins*: BMPs) bilden eine große, evolutionär hoch konservierte Familie pluripotenter Zytokine, die zur *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ) Superfamilie gehören. Im Zusammenspiel mit den jeweiligen Rezeptoren auf der Zelloberfläche koordinieren sie Prozesse der Embryonalentwicklung und Homöostase in multizellulären Organismen. Seit der Entdeckung von BMPs als Wachstumsfaktoren, extrahierbar aus Knochenmatrix, wird darüber spekuliert, wie die Verankerung von BMPs in der extrazellulären Matrix (EZM) ihre Bioverfügbarkeit reguliert. Ein besseres Verständnis über die Regulation von Aktivität und Bioverfügbarkeit bedingt durch die Proteine der EZM, könnte neue Therapiewege für Bindegewebserkrankungen eröffnen, die durch EZM Defizienz und einer damit verbundenen Fehlregulation von Wachstumsfaktoren verursacht sind. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die spezifischen molekularen Interaktionen der BMP-7 Prodomäne mit einerseits dem zugehörigen Wachstumsfaktor und andererseits mit einer Hauptkomponente von Fibrillin Mikrofibrillen, dem Fibrillin-1, verantwortlich für die Bindung und Präsentation des BMP-7 Komplexes in der EZM, zu charakterisieren.

Mittels CD-Analysen, der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und ELISA-ähnlichen Bindungsstudien konnten die für die Prodomäne-Wachstumsfaktor-Interaktion entscheidenden Epitope innerhalb der BMP-7 Prodomäne identifiziert werden. Trotz der Unterschiede in der Bioaktivität des BMP-7 Komplexes und des TGF- $\beta$  *small latent complex* (SLC), zeigt die Prodomäne von BMP-7 eine vergleichbare Sekundärstruktur zur TGF- $\beta$  Prodomäne. Hierbei bildet der N-terminale Abschnitt der BMP-7 Prodomäne zwei, durch eine prolinreiche Region getrennte,  $\alpha$ -helikale Bereiche aus. Die C-terminale Region repräsentiert die Armdomäne und besteht hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Analog zum TGF- $\beta$  SLC bildet die  $\alpha_1$ -Helix zusammen mit der prolinreichen Region das Interaktionsmotiv des Wachstumsfaktors. Dabei trägt ein zusätzliches Prodomäne-Prodomäne-Interaktionsmotiv innerhalb der 18 N-terminalen Aminosäuren zur Stabilität des BMP-7 Komplexes bei. Elektronenmikroskopie und SAXS-Analyse zeigen eine von der Ring-förmigen TGF- $\beta$  SLC abweichende V-förmige Struktur des BMP-7 Komplexes und erklären damit die unterschiedliche Bioaktivität von BMP-7 und TGF- $\beta$  in Lösung. Die Bindung des BMP-7 Komplexes an Fibrillin-1 führt wiederum zu einer Konformationsänderung in der BMP-7 Prodomäne, wobei die V-förmige Struktur des BMP-7 Komplexes eine der TGF- $\beta$  SLC ähnliche Ring-Form annimmt.

Zusammenfassend, zeigt diese Arbeit wie Fibrillin-1 die Bioverfügbarkeit des bioaktiven BMP-7 Komplexes, bedingt durch Bindung und Konformationsänderung der BMP-7 Prodomäne, moduliert. Dabei verhindert diese Konformationsänderung die Wechselwirkung

der BMP Rezeptoren mit dem Wachstumsfaktor und führt zur Inaktivierung des bioaktiven BMP-7 Komplexes.

## Abstract

Bone morphogenetic proteins (BMPs) compose a large and evolutionarily highly conserved family of pluripotent cytokines which belong to the transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) superfamily. They act as ligands of cell surface receptors and orchestrate developmental and homeostatic processes throughout the life of multicellular organisms. Since the discovery of BMPs as growth factors extractable from bone matrix it has been speculated how targeting of BMPs to the extracellular matrix (ECM) modulates their bioavailability. Understanding the mechanisms of how the bioactivity and bioavailability of BMPs is controlled by the ECM may help to find new therapies for connective tissue disorders characterized by ECM deficiency and growth factor dysregulation. Therefore this study aimed to characterize the specific molecular interactions between the BMP-7 prodomain and its cognate growth factor and further the prodomain and fibrillin-1 postulated to be responsible for targeting and presentation of the BMP-7 complex by the ECM.

Based on CD-analysis, SPR-spectroscopy, and ELISA-style assays, this study revealed critical epitopes for the interaction of the BMP-7 growth factor within the BMP-7 prodomain. Despite the differences in biological activity of the BMP-7 complex and the TGF- $\beta$  small latent complex (SLC), the BMP-7 prodomain shows analogies in secondary structure to corresponding sequences of the TGF- $\beta$  prodomain. While the N-terminal region is composed of two  $\alpha$ -helices separated by a proline-rich linker, the C-terminal region, representing the arm domain, mainly consists of  $\beta$ -sheet structures. In agreement with these secondary structure analogies to the TGF- $\beta$  prodomain, the interaction between the prodomain and growth factor of the BMP-7 complex occurs similar to the TGF- $\beta$  SLC. It was determined that the  $\alpha_1$ -helix accompanied by the proline-rich region in the N-terminus of BMP-7 prodomain exerts the interaction to the growth factor. However, an additional prodomain self-interaction motif in the 18 very N-terminal amino acids was found to contribute to the overall stability of the BMP-7 prodomain-growth factor complex. In contrast to the ring-shaped structure of TGF- $\beta$  SLC, the nanoscale structure of the BMP-7 prodomain-growth factor complex studied by single particle electron microscopy and SAXS revealed an open V-like structure, illustrating the differences in bioactivity of BMP-7 and TGF- $\beta$  in solution. However, targeting of BMP-7 complex to fibrillin-1 triggers a conformational change in the BMP-7 prodomain, transforming the V-like structure of the BMP-7 complex into a ring-like structure similar to TGF- $\beta$  SLC.

In summary, this study shows how fibrillin-1 may modulate the bioavailability of bioactive BMP-7 complex by induction of a conformational change in the prodomain upon binding. This conformational change denies access of BMP receptors to the growth factor rendering the growth factor latent. conformational change denies access of BMP receptors to the growth factor rendering the growth factor latent.